

Заявка є частковим подовженням патентної заявки США №08/718 703, що подано 27.09.1996 під назвою «ЛІКУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ТА МІСЦЕВОЇ ІШЕМІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНГІБІТОРІВ НААПҚДАЗИ», патентної заявки США №08/842 360, що подано 24.04.1997 під назвою «ПОХІДНІ ФОСФОНОВОЇ КИСЛОТИ», патентної заявки США, що подано 27.05.1997, патентне свідоцтво №23029 X (серійний номер ще не надано), під назвою «ІНГІБІТОРИ НААПҚДАЗИ», а також патентної заявки США, що подано 27.05.1997, патентне свідоцтво №23029 X2 (серійний номер ще не надано), під назвою «ІНГІБІТОРИ НААПҚДАЗИ», що наведені як посилання.

Згідно з винаходом запропоновано спосіб лікування глутаматного порушення та спосіб посилення нейронної діяльності у тварин з використанням інгібітору НААПҚДази, а також фармацевтичну композицію, що включає ефективну кількість інгібітору НААПҚДази для лікування глутаматного порушення та посилення нейронної діяльності у тварин.

Глутамат залучено в різних неврологічних захворюваннях та станах, включаючи епілепсію, напад, хвороби Альцгеймера, Хантингтона та Паркінсона, бічний аміотрофічний склероз (БАС), шизофренію, хронічний біль, ішемію та втрату нейронів після гіпокії, гіпоглікемію, ішемію, травму та нервову пошкодження. Нейрони у великій кількості виділяють глутамат, коли їм не вистачає кисню, що може відбуватися при такому ішімічному інсульті мозку, як напад, або серцевому приступі. Це надлишкове вивільнення глутамату в свою чергу призводить до перестимуляції (ексцитотоксичності) рецепторів NMDA, AMPA, кайнату та MGR. При приєднанні глутамату до цих рецепторів іонні канали клітинних мембран відкриваються, пропускаючи крізь себе потік іонів, наприклад  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Na}^{+}$  в клітину, а  $\text{K}^{+}$  - з неї. Ці потоки іонів, особливо, приплив  $\text{Ca}^{2+}$ , призводять до перестимуляції нейронів. Перестимульовані нейрони секретиють більше глутамату, створюючи домінуючий ефект, що призводить під кінець до загибелі клітин через утворення протеаз, ліпаз та вільних радикалів.

Намагання попередити ексцитотоксичність блокуванням рецепторів NMDA, AMPA, кайнату та MGR зустрічається з труднощами, оскільки кожний рецептор має багато ділянок, до яких може приєднатися глутамат. Багато композицій, що ефективно блокують рецептори, також токсичні для тварин. Тому зараз ефективного лікування глутаматних порушень нема.

До кількох патологічних станів людини та тварин залучено НААГ та НААПҚДаду. Наприклад, було продемонстровано, що внутрішньогіпокампові ін'єкції НААГ викликають подовжену активізацію приступу. Нещодавно показано, що генетично схильні до епілептичних приступів пацюки мають постійно підвищений базальний рівень активності НАА-ПҚДази. Ці спостереження підтримують гіпотезу, що підвищена здатність синаптичного глутамату посилює схильність до приступів і що інгібітори НААПҚДази можуть виявляти антиепілептичну активність.

НААГ та НААПҚДаду залучено також до патогенезу БАС та патологічно подібного захворювання тварин під назвою спадкова атрофія спинних м'язів собак (САСМС). Було показано, що концентрації НААГ та його метаболітів - НАА, глутамату та аспартату в цереброспинальній рідині хворих на БАС пацієнтів та на САСМС собак підвищуються в 2-3 рази. Крім того, активність НААПҚДази у тканині спинного мозку хворих на БАС пацієнтів та на САСМС собак після їх смерті значно (в 2-3 рази) підвищена. Відтак, інгібітори НААПҚДази можуть бути клінічно корисними для стримування розвитку БАС, якщо зрослий метаболізм НААГ чутливий до змін рівнів у цереброспинальній рідині цих амінокислот та пептидів.

Відхилення рівня НААГ та активності НААПҚДази було також визначено шизофреніків після їх смерті, особливо в префронтальному та лімбічному відділах.

Описане вище підтверджує, що інгібітори НААПҚДази можуть бути корисними при лікуванні глутаматних порушень, зокрема, нападу, хвороб Альцгеймера, Хантингтона та Паркінсона, бічного аміотрофічного склерозу (БАС) та поранення спинного мозку.

Поки було ідентифіковано невелику кількість інгібіторів НААПҚДази, їх використовували тільки в неклінічних дослідях. Приклади таких інгібіторів включають такі загальні металопептидазні інгібітори, як о-фенантролін, такі хелатоутворюючі засоби, як ЕГТА та ЕДТА, та такі пептидні аналоги, як кісқвалинова кислота та  $\beta$ -НААГ. Відповідно, для лікування глутаматних порушень існує необхідність у нових інгібіторах НААПҚДази, а також фармацевтичних композиціях та способах використання таких нових та відомих інгібіторів НААПҚДази.

Згідно з винаходом запропоновано фармацевтичну композицію, що включає

- i) ефективну кількість інгібітору НААПҚДази для лікування глутаматних порушень або посилення нейронної діяльності у тварин, та
- ii) фармацевтичну прийнятний носій.

Крім того, згідно з винаходом запропоновано спосіб лікування глутаматних порушень у тварин, що включає застосування ефективної кількості інгібітору НААПҚДази до вказаної тварини.

Також, згідно з винаходом запропоновано спосіб посилення нейронної діяльності у тварин, що включає застосування ефективної кількості інгібітору НААПҚДази до вказаної тварини.

Фіг.1 - графік залежності токсичності *in vitro* ішемічного інсульту (ціанід калію та 2-дезоксиглюкоза) від різних доз 2-(фосфонометил)пентадіової кислоти, якими обробляли культури кортикальних клітин.

Фіг.2 - графік залежності токсичності *in vitro* від різних доз НААГ, при яких витримували культури кортикальних клітин.

Фіг.3 - графік залежності токсичності *in vitro* після обробки 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою від різних доз НААГ, при яких витримували культури кортикальних клітин.

Фіг.4 - графік залежності токсичності *in vitro* ішемічного інсульту від часу, протягом якого культури кортикальних клітин обробляли 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою.

Фіг.5 - графік залежності токсичності *in vivo* розміру кортикальних пошкоджень від різних доз 2-(фосфонометил)пентадіової кислоти, якою лікували пацієнтів після подовженої оклюзії середньої церебральної артерії.

Фіг.6 - графік залежності токсичності in vivo розміру загального інфаркту мозку у пацієнтів від часу, протягом якого їх лікували 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою після подовженої оклюзії середньої церебральної артерії.

Фіг.7 - графік залежності зростання in vivo зовнішньоклітинного глутамату в смугастому тілі пацієнтів від часу, протягом якого їх лікували середовищем або 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою після подовженої оклюзії середньої церебральної артерії.

Фіг.8 - графік залежності зростання in vivo зовнішньоклітинного глутамату в тім'яній корі головного мозку пацієнтів від часу, протягом якого їх лікували середовищем або 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою після подовженої оклюзії середньої церебральної артерії.

Фіг.9 - графік залежності зростання in vivo зовнішньоклітинного глутамату у фронтальній корі головного мозку пацієнтів від часу, протягом якого їх лікували середовищем або 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою після подовженої оклюзії середньої церебральної артерії.

Фіг.10(а) - мікрофотографія сідничного нерва миші, обробленого після кріпошкодження середовищем.

Фіг.10(б) - мікрофотографія сідничного нерва миші, обробленого після кріпошкодження 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою.

Фіг.11 - графік залежності проценту ТГ-іннерваційної густини від лікування мишей одним середовищем, середовищем після МРТР, або 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою після МРТР.

Фіг.12 - графік залежності неврологічної функціональної норми від лікування пацієнтів одним динорфіном А, або динорфіном А з 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою.

Фіг.13 - графік залежності ХАТ-активності органотипичних культур спинного мозку пацієнтів від лікування одною 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою, одним ТГА, або ТГА з 2-(фосфонометил)пентадіовою кислотою.

Фіг.14 - графік залежності ХАТ-активності органотипичних культур спинного мозку пацієнтів від дози 2-(фосфонометил)пентадіової кислоти, якою обробляли культури в присутності ТГА.

«Сполука 3» означає 2-(фосфонометил)пентадіову кислоту (ФМПК). «Глутаматне порушення» означає будь-яке захворювання, розлад чи стан, в якому залучено глутамат, включаючи патологічні стани з підвищеним рівнем глутамату. Приклади глутаматного порушення включають епілепсію, напад, хвороби Альцгеймера, Хантингтона та Паркінсона, бічний аміотрофічний склероз (БАС), шизофренію, хронічний біль, ішемію та втрату нейронів після гіпоксії, гіпоглікемію, ішемію, травму та нервову пошкодження.

«Глутаматний модулятор» означає будь-яку композицію речовин, що одна чи в сполученні з іншими засобами змінює рівень глутамату у тварин.

«Інгібування» в контексті ферментів означає таке оборотне інгібування ферментів, як конкурентне, антиконкурентне та неконкурентне. Конкурентне, антиконкурентне та неконкурентне інгібування можна розрізнити за дією інгібітору на реакційну кінетику ферменту. Конкурентне інгібування здійснюється, коли інгібітор оборотно поєднується з ферментом так, що він конкурує зі звичайним субстратом за зв'язування з активною ділянкою. Спорідненість між інгібітором та ферментом можна виміряти як константу інгібітору  $K_i$ , яку визначено як

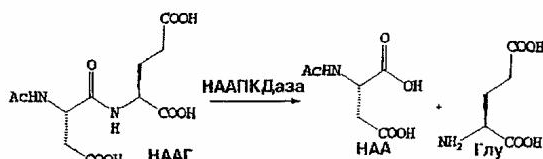
$$K_i = \frac{[F][I]}{[FI]}$$

де  $[F]$  - концентрація ферменту,  $[I]$  - концентрація інгібітору, а  $[FI]$  - концентрація їх комплексу, утвореного при реакції інгібітору з ферментом. Якщо не визначено інше,  $K_i$  означає спорідненість між дослідною сполукою та НААПКДазою.  $iK_{50}$  - концентрація чи кількість сполуки, що забезпечує 50% інгібування потрібного ферменту.

«Ішемія» означає локалізовану тканинну анемію, що обумовлена затримкою потоку артеріальної крові. Глобальна ішемія відбувається, коли потік крові до всього мозку призупиняється на деякий час. Місцева ішемія відбувається, коли нормальної подачі крові позбавлена частина мозку, що може бути внаслідок тромбоемболітичної закупорки мозкової судини, травми голови, водянки або пухлини мозку. Навіть скороминуща глобальна чи місцева ішемія може викликати широкорозповсюджене нейронне пошкодження. Хоч пошкодження нервової тканини відбувається протягом годин чи навіть діб після початку ішемії, деякі постійні пошкодження нервової тканини можуть розвиватися в перші хвилини після затримки потоку крові до мозку, багато з цих пошкоджень пояснюються глутаматною токсичністю та вторинними наслідками реперфузії тканини, як-то вивільнення вазоактивного продукту пошкодженням ендотелієм та вивільнення пошкодженою тканиною таких цитотоксичних продуктів, як вільні радикали та лейкотрієни.

«НААГ» означає N-ацетил-аспартил-глутамат, важливий пептидний компонент мозку, рівень якого можна порівняти з рівнем головного інгібітору нейротрансмітеру гамааміномасляної кислоти (ГАМК). НААГ нейронспецифічний, присутній у синаптичних щільностях і вивільняється при стимуляції нейронів у кількох системах, які вважають глутаматергічними. Досліди підтверджують, що НААГ може функціонувати як нейротрансмітер та/або нейромодулятор в центральній нервовій системі, або як попередник нейротрансмітерного глутамату.

«НААПКДаз» означає N-ацетилвану  $\alpha$ -придану кислотну дипептидазу, зв'язану з мембраною металопептидазою. катаболізує НААГ до N-ацетил-аспартату (НАД) та глутамату:



НААПКДаз виявляє високу спорідненість до НААГ з  $K_m$  540нМ. Якщо НААГ - біоактивний пептид, НААПКДаз може слугувати для інактивації синаптичної дії НААГ. З іншого боку, якщо НААГ функціонує як попередник глутамату, первинною функцією НААПК-Даз може бути регулювання наявності синаптичного глутамату.

«Нервова функція» означає різні функції нервової системи, що серед іншого забезпечують відповідність зовнішньому та внутрішньому середовищу тіла, роблять можливою довільну та рефлексорну дію між різними структурними елементами організму та урівноважують реакції організму на зміни середовища.

«Нервове пошкодження» означає будь-яке пошкодження нервової тканини та будь-яку нездатність її функціонування чи загибель від цього. Причини нервового пошкодження можуть бути метаболічними, токсичними, нейротоксичними, ятрогенічними, термічними чи хімічними та включають без обмеження ішемію, гіпоксію, цереброваскулярний інфаркт, травму, операцію, стискання, вплив маси, геморагію, радіацію, вазоспазм, нейродегенеративне захворювання, інфекцію, хворобу Паркінсона, БАС, миелінізацію/дем'єлінізацію, епілепсію, пізнавальний розлад, глутаматне порушення та його вторинні наслідки. Зараз ефективне лікування пошкодження нервової тканини невідоме.

«Нервова тканина» означає різні компоненти, що складають нервову систему, та включає без обмеження нейрони, нервові підтримуючі клітини, гліальні клітини Швама, судинну сітку, що міститься у цих структурах та підтримує їх, центральну нервову систему, мозок, стовбур мозку, спинний мозок, з'єднання центральної нервової системи з периферійною нервовою системою, периферійну нервову систему та суміжні структури.

«Нейрозахисний» відноситься до ефекту зменшення, затримки чи полегшення нервового пошкодження та захисту, підтримки чи оживлення нервової тканини, що постраждали від нервового пошкодження.

«Фармакологічно прийнятна сіль» означає сіль сполуки згідно з винаходом, яка виявляє бажану фармакологічну активність і не є біологічно чи інакше небажаною. Сіль може бути утвореною такою неорганічною чи органічною кислотою, як оцтова, адипінова, алгінова, аспарагінова, бензойна, бензолсульфонова, бісульфатна, масляна, лимонна, камфорна, камфорсульфонова, циклопентанпропіонова, диглюконова, додецилсульфонова, етансульфонова, фумарова, глюкогептанова, гліцерофосфатна, гемісульфатна, гептанова, гексанова, гідрохлоридна, гідробромідна, гідроїодидна, 2-гідроксіетансульфонова, молочна малеатна, метансульфонова, 2-нафталінсульфонова, нікотинава, щавлева, тіоціанова, тозиллова та ундеканова. Приклади солей з основами включають солі амонію, таких лужних металів, як калій та натрій, таких лужноземельних металів, як магній та кальцій, таких органічних основ, як дициклогексиламін, N-метил-D-глюкамін, таких амінокислот, як аргінін та лізин. Основні нітрогеномісні групи можна зробити четвертинними засобами, що включають такі нижчі алкілгалогеніди, як метил-, етил-, пропіл- та бутилхлорид, -бромід чи -іодид, такі діалкілсульфати, як диметил-, діе-тил-, дипропіл-, дибутил- та діамілсульфат, такі довголанцюгові галогеніди, як децил-, лаурил-, міристил- та стеарилхлорид, -бромід чи -іодид, та такі аралкілгалогеніди, як бензил- та фенетилбромід.

«Лікування» означає

(i) попередження хвороби, розладу чи стану тварини, яким може передувати хвороба, розлад та/чи стан, які ще не діагностовано,

(ii) інгібування хвороби, розладу чи стану тварини, тобто затримка їх розвитку, та

(iii) послаблення хвороби, розладу чи стану тварини, викликаючи, в т.ч., регресію хвороби, розладу та/чи стану.

Згідно з винаходом запропоновано фармацевтичну композицію, що включає

i) ефективну кількість інгібітору НААПКДази для лікування глутаматних порушень або посилення нейронної діяльності у тварин, та ii) фармацевтично прийнятний носій.

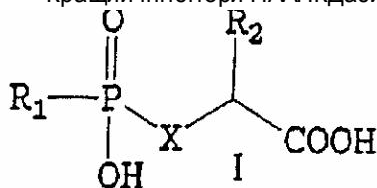
Крім того, фармацевтична композиція може включати щонайменше один додатковий терапевтичний засіб.

Оскільки НААПКДаза є металопротеїтазою, для фармацевтичних композицій згідно з винаходом корисні інгібітори НААПКДази, що включають невеликі молекули з такими функціональними групами, про які відомо, що вони інгібують металопротеїтази, як гідроксифосфінільні похідні.

За літературними даними глутаматна група грає більш важливу роль, ніж аспартатна в розпізнаванні НААПКДазою НААГ. Відтак, кращим інгібітором НААПКДази є гідроксифосфінільно-глутаматне похідне, аналог кислотного пептиду або їх суміш.

Кращий пептидний аналог вибирають з групи, що включає Asp-Glu, Glu-Glu, Gly-Glu, гамма-Glu-Glu або Glu-Glu-Glu.

Кращі інгібітори НААПКДази - гідроксифосфінільно-глутаматне похідне формули I



або його фармацевтичноприйнятна сіль чи гідрат, в яких

R<sub>1</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний чи розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, причому вказаний R, заміщено чи ні карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним чи розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, лінійним чи розгалуженим C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкоксилом, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкенілоксилом, феноксилом, бензилоксилом, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

X-CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, O або NR<sub>1</sub>;

R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub>, незалежно, вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкіл, лінійний чи розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, Ar, галоген та їх суміш;

R<sub>2</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний чи розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, причому вказаний R<sub>2</sub> заміщено чи ні карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним чи розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, лінійним чи розгалуженим C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксилом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілоксилом, феноксилом, бензилоксилом, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

Ag вибрано з групи, що включає 1-нафтил, 2-нафтил, 2-індоліл, 3-індоліл, 4-індоліл, 2-фурил, 3-фурил, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, бензил та феніл, причому вказаний Ag заміщено чи ні галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним чи розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, лінійним чи розгалуженим C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою або їх сумішшю.

Краще, коли X-CH<sub>2</sub>.

Ще краще, коли R<sub>2</sub> заміщено карбоксигрупою.

Особливо добре, коли R<sub>1</sub>- гідроген, лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, лінійний чи розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл бензил чи феніл, причому вказаний R<sub>1</sub> заміщено чи ні карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним чи розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, лінійним чи розгалуженим C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою, бензилом, фенілом або їх сумішшю; а R<sub>2</sub>- C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>алкіл.

Найкраще, коли гідроксифосфінільно-глутаматне похідне вибрано з групи:

- 2-(фосфометил)пентандіова кислота;
  - 2-(фосфометил)янтарна кислота;
  - 2-[(2-карбоксіетил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(бутилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(циклогексилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(циклогексил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота ;
  - 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілметил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілетил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілпропіл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілбутил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(4-метилбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(4-флуорбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(2-флуорбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(пентафлуорбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(метоксибензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(2,3,4-триметоксифеніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(фенілпроп-2-еніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(2-флуорбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(гідрокси)фенілметил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(3-метилбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(4-флуорфеніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[(3-трифлуорметилбензил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота; та
- їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

В інших втіленнях R<sub>2</sub> - це C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>алкіл; R<sub>1</sub> - це 2-індоліл, 3-індоліл, 4-індоліл, 2-фурил, 3-фурил, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил або лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, який заміщено 2-індолілом, 3-індолілом, 4-індолілом, 2-фурилом, 3-фурилом, тетрагідрофуранілом, 2-тієнілом, 3-тієнілом, 2-піридилом, 3-піридилом або 4-піридилом; або R<sub>1</sub> це 1-нафтил, 2-нафтил, або лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, що заміщено 1-нафтилом або 2-нафтилом. Кращими сполуками згідно з винаходом є:

- 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]гександіова кислота;
- 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]гександіова кислота;
- 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]гептандіова кислота;
- 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]гептандіова кислота;
- 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]октандіова кислота;
- 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]октандіова кислота;
- 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]нонандіова кислота;
- 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]нонандіова кислота;
- 2-[(метилгідроксифосфініл]метил]декандіова кислота;
- 2-[(бензилгідроксифосфініл]метил]декандіова кислота;
- 2-[(2-піридил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(3-піридил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(4-піридил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(3-піридил]етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(3-піридил]пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(тетрагідрофураніл]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(тетрагідрофураніл]етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(тетрагідрофураніл]пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(2-тетрагідропіраніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(3-тетрагідропіраніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(4-тетрагідропіраніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[(2-індоліл]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;

2-[(3-індоліл)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(4-індоліл)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-індоліл)етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-індоліл)пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-тієніл)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-тієніл)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(4-тієніл)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-тієніл)етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-тієніл)пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-піридил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-піридил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(4-піридил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(тетрагідрофураніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-індоліл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-індоліл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(4-індоліл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-тієніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(3-тієніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(4-тієніл)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(1-нафтил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-нафтил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(1-нафтил)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-нафтил)метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(1-нафтил)етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-нафтил)етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(1-нафтил)пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-нафтил)пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(1-нафтил)бутилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 2-[(2-нафтил)бутилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;  
 та їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

В іншому кращому втіленні X - це  $\text{CH}_2$ , а  $\text{R}_2$  вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений  $\text{C}_1\text{-C}_{20}\text{alkyl}$ , лінійний або розгалужений  $\text{C}_2\text{-C}_8\text{alkenyl}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{cycloalkyl}$ ,  $\text{C}_5\text{-C}_7\text{cycloalkenyl}$ , бензил та феніл, де вказаний  $\text{R}_2$  незаміщено або заміщено  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{cycloalkyl}$ ,  $\text{C}_5\text{-C}_7\text{cycloalkenyl}$ , лінійним або розгалуженим  $\text{C}_1\text{-C}_8\text{alkyl}$ , лінійним або розгалуженим  $\text{C}_2\text{-C}_8\text{alkenyl}$ ,  $\text{C}_1\text{-C}_4\text{alkoxymethyl}$ , фенілом або їх сумішшю.

Краще, коли  $\text{R}_1$  - це гідроген, лінійний або розгалужений  $\text{C}_1\text{-C}_4\text{alkyl}$ , лінійний або розгалужений  $\text{C}_2\text{-C}_4\text{alkenyl}$ ,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{cycloalkyl}$ ,  $\text{C}_5\text{-C}_7\text{cycloalkenyl}$ , бензил або феніл, де вказаний  $\text{R}_1$  незаміщено або заміщено карбоксигрупою,  $\text{C}_3\text{-C}_8\text{cycloalkyl}$ ,  $\text{C}_5\text{-C}_7\text{cycloalkenyl}$ , галогеном, гідроксильною, нітрогрупою, трифлюорометильною, лінійним або розгалуженим  $\text{C}_1\text{-C}_8\text{alkyl}$ , лінійним або розгалуженим  $\text{C}_2\text{-C}_8\text{alkenyl}$ ,  $\text{C}_1\text{-C}_4\text{alkoxymethyl}$ ,  $\text{C}_2\text{-C}_4\text{alkenyl oxymethyl}$ , феноксильною, бензилоксильною, аміногрупою, бензилом, фенілом або їх сумішшю.

Найкраще, коли, глутаматно-гідроксифосфінільне похідне вибрано з групи, в склад якої входять:

3-(метилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(етилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(пропілгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(бутилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(циклогексилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-[(циклогексил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(фенілгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(фенілетилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(фенілпропілгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(фенілбутилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-[(2,3,4-триметоксифеніл)-3-гідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(фенілпроп-2-енілгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-етилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-пропілпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-бутилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-циклогексилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(циклогексил)метилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-бензилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілетилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілпропілпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілбутилпропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(2,3,4-триметоксифеніл)пропанова кислота;  
 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-фенілпроп-2-енілпропанова кислота; та  
 їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

В іншому втіленні щонайменше один з  $\text{R}_1$  та  $\text{R}_2$  - це 2-індоліл, 3-індоліл, 4-індоліл, 2-фурил, 3-фурил, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, або лінійний чи

розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, який заміщено 2-індолілом, 3-індолілом, 4-індолілом, 2-фурилом, 3-фурилом, тетрагідрофуранілом, 2-тієнілом, 3-тієнілом, 2-піридиллом, 3-піридиллом або 4-піридиллом; або R, - це 1-нафтил, 2-нафтил, або лінійний чи розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкіл, який заміщено 1-нафтилом або 2-нафтилом.

До кращих сполук згідно з цим втіленням входять:

- 3-[(2-піридил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-піридил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(4-піридил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-піридил)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-піридил)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(тетрагідрофураніл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(тетрагідрофураніл)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(тетрагідрофураніл)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-індоліл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-індоліл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(4-індоліл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-індоліл)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-індоліл)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-тієніл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-тієніл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(4-тієніл)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-тієніл)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(3-тієніл)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(2-піридил)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-піридил)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(4-піридил)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-піридил)етилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-піридил)пропілпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(тетрагідрофураніл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(тетрагідрофураніл)етилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(тетрагідрофураніл)пропілпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(2-індоліл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-індоліл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(4-індоліл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-індоліл)етилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-індоліл)пропілпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(2-тієніл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-тієніл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(4-тієніл)метилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-тієніл)етилпропанова кислота;
- 3-(бензилгідроксифосфініл)-2-(3-тієніл)пропілпропанова кислота;
- 3-[(1-нафтил)гідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-нафтил)гідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(1-нафтил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-нафтил)метилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(1-нафтил)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-нафтил)етилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(1-нафтил)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-нафтил)пропілгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(1-нафтил)бутилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;
- 3-[(2-нафтил)бутилгідроксифосфініл]-2-фенілпропанова кислота;

та їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

Коли X=0, краще, коли R<sub>2</sub> заміщено карбоксигрупою.

До особливих сполук згідно з цим втіленням входять:

- 2-(метилгідроксифосфініл)окси]пентандіова кислота;
- 2-[(етилгідроксифосфініл)окси] пентандіова кислота;
- 2-[[пропілгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[бутилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[циклогексилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[циклогексил]метилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[бензилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілетилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілпропілгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілбутилгідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[4-флуоробензил]гідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[пентафлуоробензил]гідроксифосфініл]окси] пентандіова кислота;
- 2-[[метоксибензил]гідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;
- 2-[[2,3,4-триметоксифеніл]гідроксифосфініл]окси]пентандіова кислота;

[illegible]

В іншому кращому втіленні R<sub>2</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкеніл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, бензил та феніл, де вказаний R<sub>2</sub> незаміщено або заміщено C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, лінійним або розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, лінійним або розгалуженим C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксилем, фенілом або їх сумішшю.

[illegible]

2-[[метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
2-[[етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
2-[[пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;



2-[[бутилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[циклогексилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[циклогексилметилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[(фенілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[фенілетилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[фенілпропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[фенілбутилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[4-флуоробензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[пентафлуоробензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[метоксибензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2,3,4-триметоксифеніл]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[1-нафтил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 15 2-[[2-нафтил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[1-нафтил]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-нафтил]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[1-нафтил]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-нафтил]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[1-нафтил]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-нафтил]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[1-нафтил]бутилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-нафтил]бутилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[фенілпроп-2-еніл]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]аміно]-2-пентандіова кислота;  
 2-[[[гідрокси]фенілметил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[3-метилбензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[4-флуоропеніл]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[(фосфоно)аміно]пентандіова кислота;  
 2-[[3-трифлуорметилбензил]гідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]гександіова кислота;  
 2-[(бензилгідроксифосфініл]аміно]гександіова кислота;  
 2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]гептандіова кислота;  
 2-[(бензилгідроксифосфініл]аміно]гептандіова кислота;  
 2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]октандіова кислота;  
 2-[(бензилгідроксифосфініл]аміно]октандіова кислота;  
 2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]нонандіова кислота;  
 2-[(бензилгідроксифосфініл]аміно]нонандіова кислота;  
 2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]декандіова кислота;  
 2-[(бензилгідроксифосфініл]аміно]декандіова кислота;  
 3-[[2-придил]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-придил]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[4-придил]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-придил]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-придил]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[тетрагідрофураніл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[тетрагідрофураніл]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[тетрагідрофураніл]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[2-індоліл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-індоліл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[4-індоліл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-індоліл]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-індоліл]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[2-тієніл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-тієніл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[4-тієніл]метилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-тієніл]етилгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота;  
 3-[[3-тієніл]пропілгідроксифосфініл]аміно]пентандіова кислота; та  
 їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

В іншому кращому втіленні R<sub>2</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, бензил та феніл, де вказаний R<sub>2</sub> незаміщено або заміщено C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксилем, фенілом або їх сумішшю.

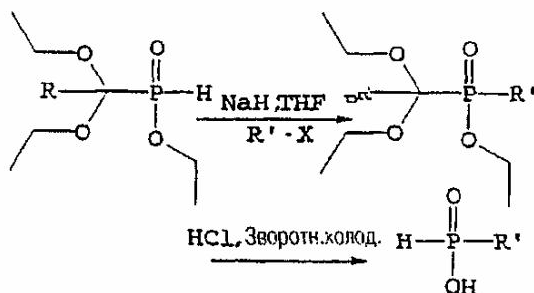
До особливих сполук згідно з цим втіленням входять:

2-[(метилгідроксифосфініл]аміно]-2-фенілетанова кислота;  
 2-[(етилгідроксифосфініл]аміно]-2-фенілетанова кислота;  
 2-[[пропілгідроксифосфініл]аміно]-2-фенілетанова кислота;

[illegible]

2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-індоліл)метилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(4-індоліл)метилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-індоліл)етилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-індоліл)пропілетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(2-тієніл)метилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-тієніл)метилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(4-тієніл)метилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-тієніл)етилетанова кислота;  
 2-[[бензилгідроксифосфініл]аміно]-2-(3-тієніл)пропілетанова кислота; та  
 їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

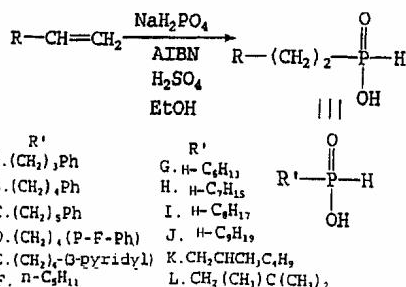
Синтези інгібіторів НААПКДаз. Інгібітори НААПКДазі формули I можна легко виготовити стандартними способами органічної хімії, використовуючи описаний нижче схемою I-IX загальний шлях синтезу. Вихідні сполуки можна виготовити відомими фахівцям способами, як-то описаними Jackson et al., J. Med. Chem. Vol. 39, №2, 619-622, (1996) та Froesti et al., J. Med. Chem. Vol. 38, 3313-3331, (1995).



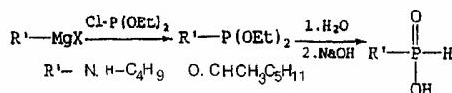
Спосіб заміщення груп R відомий фахівцям. Додаткові способи синтезування естерів фосфінових кислот описано в J. Med. Chem. Vol. 31, 204-212, (1988) і показано нижче схемою II.

Схема II

Спосіб А

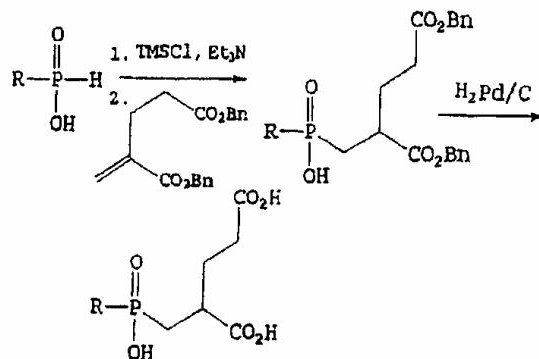


Спосіб Б



Починаючи з вищезгаданого естеру фосфінової кислоти, виготовити сполуку формули (I) можна різними шляхами. Загальний спосіб, наприклад, описано в J. Med. Chem. Vol. 39, 619-622, (1996) і представлено нижче на схемі III.

Схема III



Інший спосіб виготовлення сполуки формули (I) представлено нижче на схемах IV та V. Схеми IV та V як вихідний матеріал показують похідне, а групою R є будь-який потрібний хімічний замісник, що включає без обмеження наведені на схемі II та в описі замісники.

Схема IV

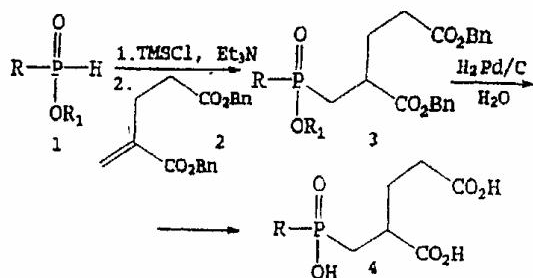
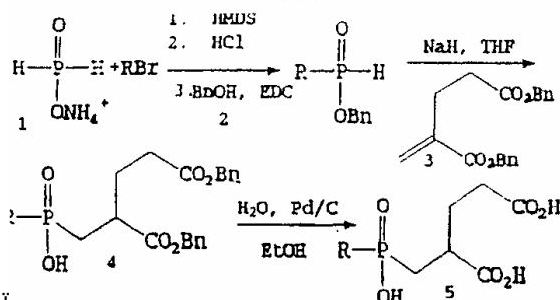


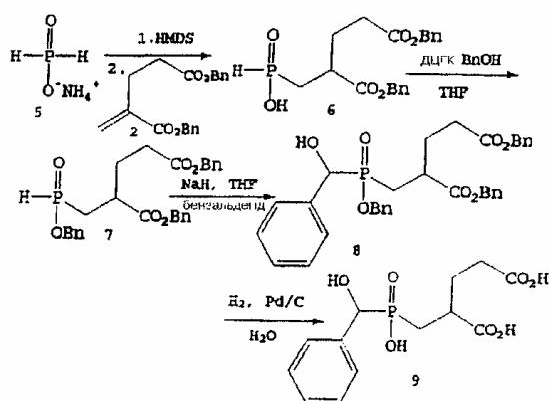
Схема V



I

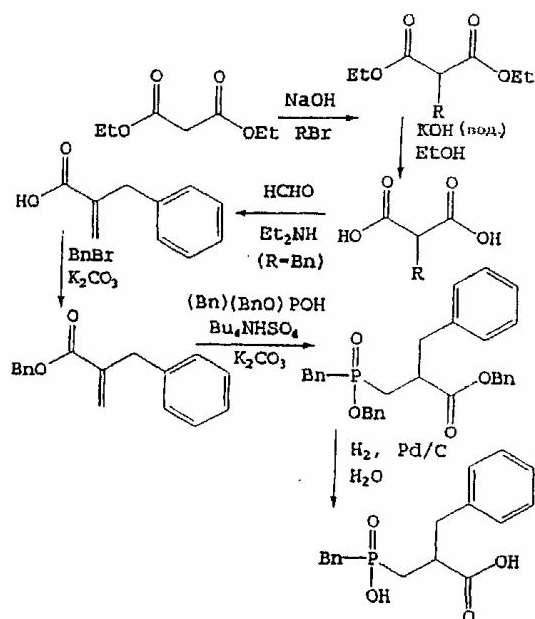
Інший спосіб виготовлення сполуки формули (I), що дозволяє ароматичне заміщення  $R_1$ , показано на схемі VI.

Схема VI



Інший спосіб виготовлення сполуки формули (I), що дозволяє ароматичне заміщення  $R_1$ , показано на схемі VII.

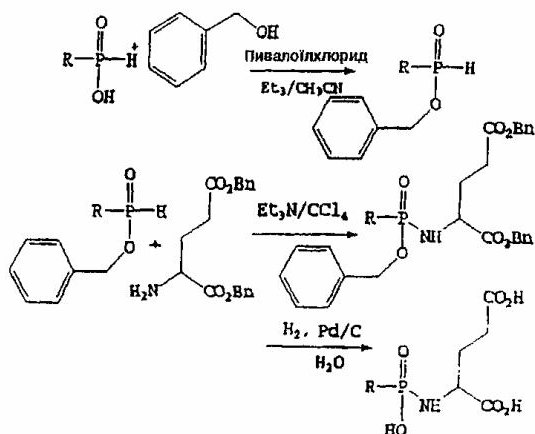
Схема VII



Інший спосіб виготовлення сполуки формули (I), в якій  $X = NR_1$ , показано на схемі

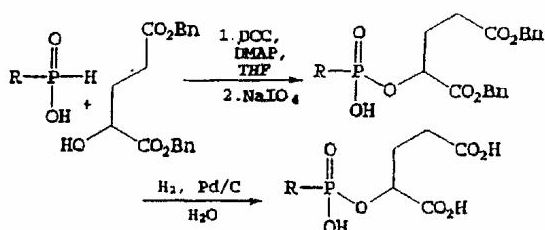
## VIII.

Схема VIII



Інший спосіб виготовлення сполуки формули (I), в якій X - оксиген, показано на схемі IX.

Схема IX



Способи лікування глутаматного порушення При відсутності будь-якої конкретної теорії можна думати, що інгібітори НААПКдази, які використовують способом згідно з винаходом, модулюють рівень глутамату дією на сховану форму глутамату, що гіпотетично передус ефектам, які опосередковано рецептором NMDA.

Відповідно, згідно з винаходом запропоновано спосіб лікування глутаматного порушення у тварин, який включає вживання вказаною твариною ефективної кількості інгібітору НААПКдази.

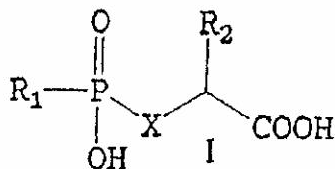
Глутаматне порушення може бути будь-яким захворюванням, розладом чи станом, до якого залучено глутамат, включаючи патологічні стани з підвищеним рівнем глутамату. Приклади глутаматного порушення включають без обмеження епілепсію, напад, хвороби Альцгеймера, Хантингтона та Паркінсона, бічний аміотрофний склероз (БАС), шизофренію, хронічний біль, ішемію, периферійну невропатію, травми мозку та фізичні пошкодження спинного мозку. В кращому втіленні глутаматне порушення вибирають з групи, що включає напад, хворобу Паркінсона, бічний аміотрофний склероз (БАС) та фізичні пошкодження спинного мозку.

Інгібітори НААПКдази можна вживати поодиночі, або у сполученні з щонайменше одним додатковим терапевтичним засобом.

Кращими інгібіторами НААПКдази є глутамат-гідроксифосфінільні похідні, кислотні пептидні аналоги або їх суміші.

Кращими кислотними пептидними аналогами є амінокислотні послідовності, які вибрано з групи, що включає Asp-Glu, Glu-Glu, Gly-Glu, гамма-Glu-Glu або Glu-Glu-Glu.

Кращим інгібітором НААПКдази є глутамат-гідроксифосфінільне похідне формули I



або її фармацевтично прийнятні сіль або гідрат,  
в яких:

R<sub>1</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, де вказаний R<sub>1</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним або розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

X-це CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, O або NR<sub>1</sub>;

R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> незалежно вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, Ar, галоген та їх суміші;

R<sub>2</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, де вказаний R<sub>2</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою,

трифлуорметиллом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксиллом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілоксиллом, феноксиллом, бензилоксиллом, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

Ar вибрано з групи, що включає трифлуорметиллом 1-нафтил, 2-нафтил, 2-індоліл, 3-індоліл, 4-індоліл, 2-фурил, 3-фурил, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, бензил та феніл, де вказаний Ar незаміщено або заміщено галогеном, гідроксиллом, нітрогрупою, трифлуорметиллом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксиллом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілоксиллом, феноксиллом, бензилоксиллом, аміногрупою або їх сумішшю.

Краще, коли, X - це CH<sub>2</sub>.

Ще краще, коли R<sub>2</sub> заміщено карбоксигрупою. Іще краще, коли R<sub>1</sub> - гідроген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>лінійний або розгалужений алкіл, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>лінійний або розгалужений алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, бензил або феніл, де вказаний R<sub>1</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксиллом, нітрогрупою, трифлуорметиллом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>алкоксиллом, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкенілоксиллом, феноксиллом, бензилоксиллом, аміногрупою, бензилом, фенілом або їх сумішшю; а R<sub>2</sub> - C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>алкіл.

Найкраще, коли глутамат-гідроксифосфінільне похідне вибрано з групи:

- 2-(фосфонометил)пентандіова кислота;
  - 2-(фосфонометил)янтарна кислота;
  - 2-[[2-(карбоксіетил)гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[бутилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[циклогексилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[циклогексил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[бензилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілметил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілетил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілпропіл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілбутил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[4-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[пентафлуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[метоксибензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[2,3,4-триметоксифеніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[фенілпроп-2-еніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[3-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[3-метилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[4-флуорофеніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
  - 2-[[3-трифлуорметилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота; та
- їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

Приклади інших глутамат-гідроксифосфінільних похідних, що корисні згідно з запропонованим способом, визначено вище при розгляді фармацевтичних композицій.

Спосіб посилення нейронної діяльності Винахідниками було встановлено, що інгібування НААПКДаз промотує нервову регенерацію та утворення мієліну.

Відповідно, згідно з винаходом запропоновано також спосіб посилення нейронної діяльності у тварин, який включає вживання вказаною твариною ефективною кількістю інгібітору НААПКДаз.

Спосіб посилення нейронної діяльності згідно з винаходом, можна вибрати з групи, що включає стимуляцію пошкоджених нейронів, промотування регенерації нейронів, попередження нейродегенерації та лікування неврологічних розладів.

Приклади неврологічних розладів, які можна лікувати способом згідно з винаходом включають без обмеження невралгію трійчастого нерву, язикоглоткову невралгію, параліч Белла, міастенію вагітних, м'язову дистрофію, аміотрофний бічний склероз, прогресуючу м'язову атрофію, прогресуючу бульбарну спадкову м'язову атрофію, синдром хронічного випадіння диска, шийний спондилез, розлади сплетіння, синдром деструкції торакального виходу, такі периферійні невропатії, як викликані отруєнням свинцем, дапсоном, кліщами, порфірією або синдромом Джилліан-Барра, хворобами Альцгеймера та Паркінсона.

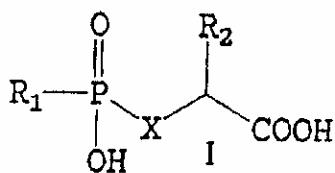
Спосіб згідно з винаходом особливо корисний для лікування неврологічних розладів, що вибрано з групи, що включає периферійні невропатії, які викликані фізичними пораненнями або хворобливим станом, травматичні поранення мозку, фізичні пошкодження спинного мозку, асоційований з пошкодженням мозку напад, демієлінізуючі захворювання та неврологічні розлади, що відносяться до нейродегенеративних, включаючи хвороби Альцгеймера та Паркінсона, а також бічний аміотрофний склероз (БАС).

Інгібітори НААПКДаз можна вживати поодиночі, або у сполученні з щонайменше одним додатковим терапевтичним засобом.

Кращими інгібіторами НААПКДаз є глутамат-гідроксифосфінільні похідні, кислотні пептидні аналоги або їх суміші.

Кращими кислотними пептидними аналогами є амінокислотні послідовності, які вибрано з групи, що включає Asp-Glu, Glu-Glu, Gly-Glu, гамма-Glu-Glu або Glu-Glu-Glu.

Кращим інгібітором НААПКДаз є глутамат-гідроксифосфінільне похідне формули I



або його фармацевтично прийнятні сіль або гідрат,  
в яких:

R<sub>1</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, де вказаний R<sub>1</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, лінійним або розгалуженим C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

X - це CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, O або NR<sub>1</sub>;

R<sub>3</sub> та R<sub>4</sub> незалежно вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, Ar, галоген та їх суміші;

R<sub>2</sub> вибрано з групи, що включає гідроген, лінійний або розгалужений C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>алкіл, лінійний або розгалужений C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл та Ar, де вказаний R<sub>2</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою, Ar або їх сумішшю;

Ar вибрано з групи, що включає 1-нафтил, 2-нафтил, 2-індоліл, 3-індоліл, 2-фурил, 3-фурил, тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, 2-тієніл, 3-тієніл, 2-піридил, 3-піридил, бензил та феніл, де вказаний Ar незаміщено або заміщено галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою або їх сумішшю.

Краще, коли, X - це CH<sub>2</sub>.

Ще краще, коли R<sub>2</sub> заміщено карбоксигрупою. Іще краще, коли R<sub>1</sub> - гідроген, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>лінійний або розгалужений алкіл, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>лінійний або розгалужений алкеніл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкіл, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкеніл, бензил або феніл, де вказаний R<sub>1</sub> незаміщено або заміщено карбоксигрупою, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>циклоалкілом, C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>циклоалкенілом, галогеном, гідроксилом, нітрогрупою, трифлуорметилом, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкілом, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>лінійним або розгалуженим алкенілом, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкоксилем, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>алкенілоксилем, феноксилем, бензилоксилем, аміногрупою, бензилом, фенілом або їх сумішшю; а R<sub>2</sub> - C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>алкіл.

Найкраще, коли глутамат-гідроксифосфінільне похідне вибрано з групи:

- 2-(фосфонометил)пентандіова кислота;
- 2-(фосфонометил)янтарна кислота;
- 2-[[2-карбоксіетил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[етилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[пропілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[бутилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[циклогексилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[циклогексил]метилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[бензилгідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілметил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілетил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілпропіл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілбутил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[4-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[пентафлуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[метоксибензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[2,3,4-триметоксифеніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[фенілпроп-2-еніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[2-флуоробензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[[3-гідрокси]фенілметил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[3-метилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[4-флуорофеніл]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота;
- 2-[[3-трифлуорметилбензил]гідроксифосфініл]метил]пентандіова кислота; та

їх фармацевтично прийнятні солі та гідрати.

Приклади інших глутамат-гідроксифосфінільних похідних, що корисні згідно з запропонованим способом, визначено вище при розгляді фармацевтичних композицій.

Шлях вживання

Способом згідно з винаходом сполуки можна вживати перорально, парентерально, ректально, букально, назально, вагінально або імплантуванням резервуара дозованої композиції, що містить звичайні нетоксичні носії, допоміжні речовини та середовище. «Парентеральне» включає підшкірне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, інтраперитональне, внутрішньооболонкове, інтравентрикулярне, інтрастернальне або

інтракраніальне вживання ін'єкціями та вливанням. Інвазивні способи кращі, особливо при безпосередній доставці до пошкодженої нейронної тканини.

Щоб ефективно діяти на цілі у центральній нервовій системі, при периферійному вживанні інгібітори НАОПКДазі, які використовують способом згідно з винаходом, повинні легко долати крово-мозковий бар'єр. Сполуки, що не можуть здолати цей бар'єр, можна ефективно вживати інтравентрикулярно.

Сполуки можна також вживати у формі стерильних, готових до ін'єкції препаратів, наприклад, як стерильні, готові до ін'єкції водні чи масляні суспензії, які можна створити загальновідомими способами з використанням придатних диспергуючих чи змочуючих засобів та суспендуючих засобів. Стерильні готові до ін'єкції препарати можуть бути також стерильними, готовими до ін'єкції розчинами чи суспензіями в нетоксичних парентерально прийнятних розріджувачів чи розчинників, наприклад, як розчини в 1,3-бутандіолі. Серед прийнятних середовищ та розчинників, що можна застосовувати, є вода, розчин Рінгера та ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як розчинники чи суспендуючі середовища використовують звичайно стерильні стійкі олії, для чого можна застосовувати будь-які легкі стійкі масла, як-то синтетичні моно- чи дигліцериди. Для виготовлення препаратів для ін'єкцій корисні такі жирні кислоти, як олеїнова, та її гліцеридні похідні, включаючи оливкову та рицинову олію, особливо в поліетоксильованому стані. Такі масляні розчини або суспензії можуть також включати довголанцюгові спиртові розріджувачі чи дисперсанти.

Крім того, сполуки можна вживати перорально у формі капсул, таблеток, водних суспензій чи розчинів. Таблетки можуть включати такі носії, як лактозу, кукурудзяний крохмаль та/або зм'якшувач, як-то стеарат магнію. Капсули можуть містити розріджувачі, що включають лактозу та висушений кукурудзяний крохмаль. Водні суспензії можуть включати поєднані з активними інгредієнтами емульгуючі та суспендуючі засоби. Пероральні дозовані форми можуть також включати підсолюджуючі, та/або смакові, та/або забарвлюючі засоби.

Сполуки можна також застосовувати ректально як супозиторії. Ці композиції можна виготовити змішуванням лікувального засобу з придатним неподразнюючим носієм, що при кімнатній температурі твердий, а при ректальній рідкий, так що в ректумі він плавиться, вивільнюючи лікувальний засіб. Такі носії включають масло какао, бджолиний віск та поліетиленгліколь.

Більш того, сполуки можна вживати за місцем, особливо, коли лікуємі стани включають зони чи органи, що легкодоступні для нанесення за місцем, як-то при неврологічних розладах очей, шкіри чи нижчого відділу шлунково-кишкового тракту, ректально як супозиторії.

Для місцевого застосування на очах, або офтальмологічного використання сполуки можна ввести в мікронізовані суспензії в ізотонічному розчині солі з відрегульованим рН, або, переважно, як розчини в ізотонічному розчині солі з відрегульованим рН, разом з такими консервантами, як хлорид бензилалконіума, чи без них. Інакше сполуки можна вводити в такі мазі, як вазелін.

Для місцевого застосування на шкірі сполуки можна вводити в придатні мазі, що містять сполуку суспендованою чи розчищеною, наприклад, у суміші одного чи більше з нижченаведеного: мінеральне масло, рідкий вазелін, білий вазелін, пропіленгліколь, сполуку поліоксіетилену з поліоксипропіленом, емульсифікований віск та вода. Інакше, сполуки можна вводити в придатні лосьйони та креми, в яких її суспендовано або розчинено, наприклад, в суміші одного чи більше з нижченаведеного: мінеральне масло, моностеарат сорбіту, полісорбат 60, віск цетилового естеру, цетарилловий спирт, 2-октилдодеканол, бензиловий спирт та вода.

Для місцевого застосування в нижчому відділі шлунково-кишкового тракту ефективні ректальні супозиторії (див. вище), або придатні композиції для клізм.

Інгібітори НАОПКДазі, що використовують способом згідно з винаходом, можна вживати одиничними чи багатократними дозами, або постійною інфузією. Оскільки сполуки малі, легко дифундують та відносно стабільні, вони добре придатні для постійної інфузії, для якої особливо придатні насоси, особливо підшкірні.

Рівні доз порядку 0,1-10,000мг сполуки активного інгредієнту корисні при лікуванні вищевказаних станів, кращі рівні приблизно 0,1-1,000мг. Специфічні дози для будь-яких конкретних пацієнтів варіюються залежно від різних факторів, що включають активність конкретної сполуки, вік, масу тіла, загальний стан здоров'я, стать та харчування пацієнта, час вживання, швидкість виведення, комбінації лікувальних засобів, суворість конкретної лікуємої хвороби, а також форми вживання. Звичайно, отримані *in vitro* дози забезпечують корисну вказівку на вірний вибір дози для вживання пацієнтом. Корисні також досліді на моделях тварин. Умови визначення правильних доз добре відомі фахівцям.

Згідно з кращим втіленням інгібітори НАОПКДазі використовують у ліофілізованому стані. В цьому випадку можна ліофілізувати в окремій склянці 1-100мг інгібітору НАОПКДазі разом з носієм та буфером, як-то маніт та фосфат натрію. Сполуку перед вживанням можна відновити у склянці стерильною водою.

При лікуванні глобальної ішемії інгібітори НАОПКДазі краще використовувати пе-рорально, ректально, парентерально або за місцем, щонайменше 1-6 разів на добу, початкова болюсна доза може бути більшої концентрації.

Як згадано вище, інгібітори НАОПКДазі, що використовують згідно з винаходом, можна вживати в комбінації з одним чи більше терапевтичними засобами. Конкретні рівні доз цих засобів залежать від умов, що ідентифіковано вище для інгібіторів НАОПКДазі.

Способом згідно з винаходом для успішного лікування можна застосовувати та за необхідністю повторювати будь-який режим, що регулює час та послідовність прийому ліків. Такий режим може включати попереднє лікування додатковими терапевтичними засобами та/або співживання з ними.

Для максимізації захисту нервової тканини від нервового пошкодження інгібітори НАОПКДазі слід застосовувати до уражених клітин якнайшвидше. В ситуаціях попередження нервового пошкодження сполуку слід вживати до цього. Такі ситуації зростаючої ймовірності нервового пошкодження включають хірургію (каротидно-ендартеректомію, серцеву, судинну, на аорті, ортопедичну), такі внутрішньосудинні процедури, як катетеризація артерії (каротидної, вертебральної, аорти, серцевої, ренальної, спінальної, за Адамкевичем), ін'єкції емболічних засобів, катушки чи балони для гемостазу, порушення судин при лікуванні уражень мозку, а



також такі провокуючі стани, як посилення серцевого тону при ішемічному нападі, емболія та наступні напади. За неможливості чи нереальності попереджувального лікування важливо доставити інгібітори НААПҚДазі до уражених клітин якнайшвидше протягом чи після події. Період часу між нападом, діагнозом та лікувальною процедурою повинен бути мінімальним, щоб захистити клітини від подальшого пошкодження та загибелі.

У способі лікування нервового пошкодження (особливо, гострого ішемічного нападу та глобальної ішемії, обумовленої утопленням чи травмою голови) інгібітори НААПҚДазі можна застосовувати разом з одним чи більше терапевтичними засобами, краще тими, що зменшують ризик нападу (такі, як аспірин), а найкращі засоби, що здатні зменшити ризик повторного ішемічного нападу (такі, як тиклопідин).

Інгібітори НААПҚДазі можна застосовувати разом з одним чи більше терапевтичними засобами (і) разом в одній комбінації, або (ii) окремо в різних комбінаціях, що призначені для оптимальної швидкості вивільнення їх відповідних активних агентів. Кожна комбінація може містити приблизно, краще - 3,5-60% за масою, інгібітору НААПҚДазі, а також один чи більше фармацевтичних допоміжників, як-то змочуючі, емульгуючі та рН-буферуючі.

Токсичність інгібіторів НААПҚДазі *in vivo* Для визначення токсичної дії групі мишей вводили 2-(фосфонометил)пентадіову кислоту, інгібітор НААПҚДазі високої активності, в дозах 1, 5, 10, 30, 100, 300 та 500мг/кг маси тіла. Далі мишей спостерігали 2 рази на добу протягом 5 наступних діб. Ступінь виживання для кожної дози наведено нижче в таблиці I. Результати показують, що інгібітор НААПҚДазі для мишей нетоксичний, що вказує на можливість його нетоксичності для людини при вживанні в терапевтично ефективній кількості.

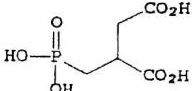
Таблиця I

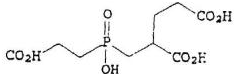
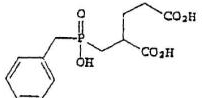
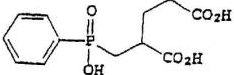
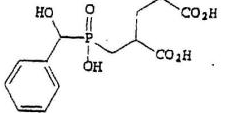
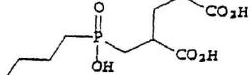
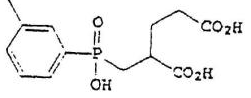
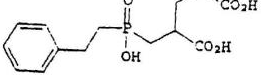
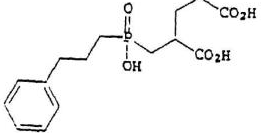
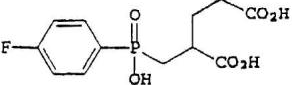
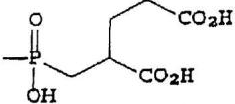
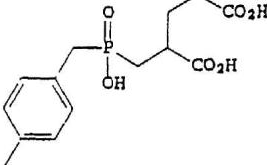
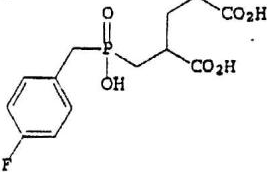
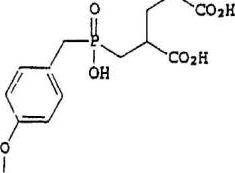
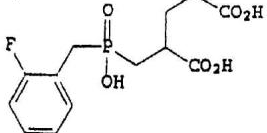
Токсична дія інгібіторів НААПҚДазі

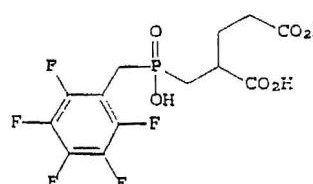
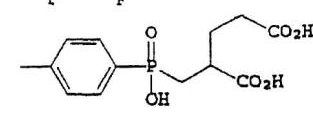
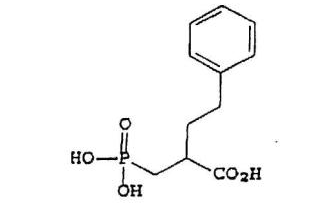
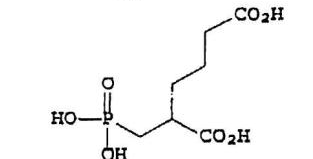
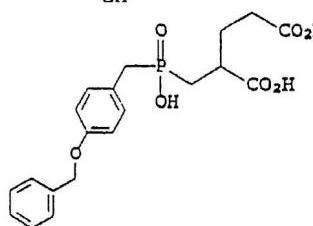
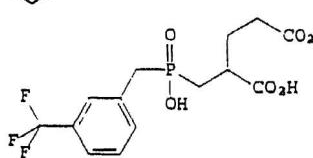
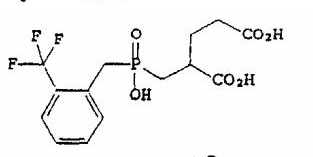
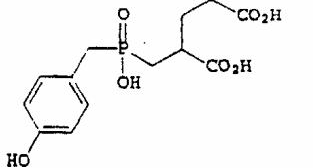
Доза (мг/кг)	1	5	10	30	100	300	500
Ступінь виживання через 5 діб (%)	100	100	100	100	100	100	66,7

Інгібування активності НААПҚДазі *in vitro*. Різні сполуки формули 1 тестували на інгібування активності НААПҚДазі *in vitro*. Результати наведено нижче в таблиці II.

Таблиця II

Токсична дія інгібіторів НААПҚДазі Сполука	$K_i$ (нМ)
 2-(фосфонометил)пентадіова кислота	0,293±0,08
 2-(фосфонометил)янтарна кислота	700,00±67,3

	1,89±0,19
2-[[[2-карбоксіетил]гідроксифосфініл]метил]пентадіова кислота	
	34,15
	35,85
	54,50
	113,50
	180,00
	148,50
	231,67
	532,00
	1100,00
	68,00
	70,00
	89,50
	145,00

	22,67
	204,00
	199,00
	185,00
	177,00
	22,50
	92,00
	117,00

Результати показують, що 2-(фосфометил)пентадіова кислота виявляє високу активність як інгібітор НААПКДаз з величиною  $K_i$  0,293нМ. Активність цієї сполуки більше ніж у 1000 разів вища, ніж у описаних раніше інгібіторів НААПКДаз.

У порівнянні, 2-(фосфометил)янтарна кислота виявляє набагато меншу активність як інгібітор НААПКДаз, що вказує на те, що глутаматний аналог, який приєднано до фосфонові кислоти, сприяє її активності як інгібітору НААПКДаз.

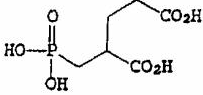
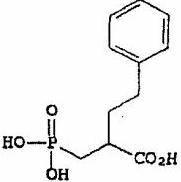
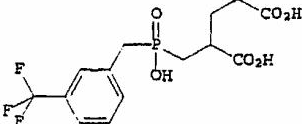
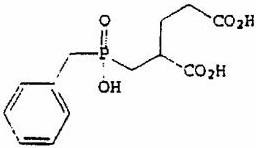
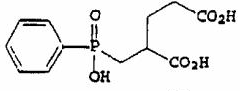
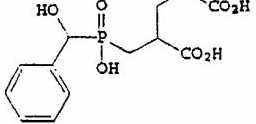
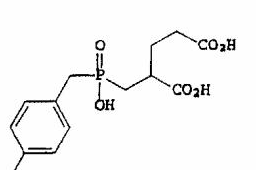
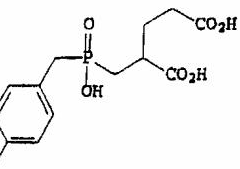
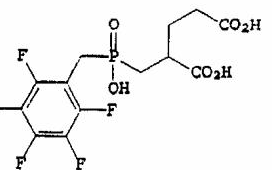
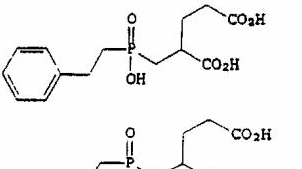
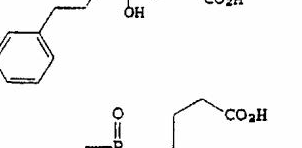
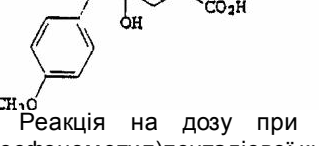
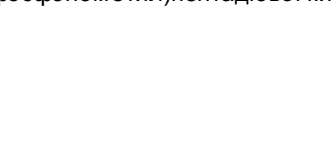
Результати вказують також, що 2-[[2-(2-карбоксіетил)гідроксифосфініл]метил]пентадіова кислота, яка має додатковий бічний ланцюг карбонової кислоти, що подібний до аспар-татного залишку, який знайдено в НААГ, виявляє нижчу активність як інгібітор НААПКДаз, ніж 2-(фосфометил)пентадіова кислота.

Протокол дослідження інгібування активності НААПКДаз *in vitro* Протягом 15 хвилин при 37°C вимірювали кількість вивільненого в 50мМ буфері Tris-Cl з [ $^3$ H]НААГ [ $^3$ H]Glu, використовуючи 30-50μг синаптосомального білку. Субстрат та продукт розділяли рідинною аніонообмінною хроматографією. Подвійний аналіз провели так, щоб гідролізувалося не більше 20% НААГ, забезпечуючи лінійну ділянку активності пептидази. Квісвалат (100μМ) включили до туби, яку досліджували паралельно, для підтвердження специфічності вимірів.

Дослідження інгібіторів НААПКДаз *in vitro* при ішемії Для виявлення дії інгібіторів НААПКДаз *in vitro* при ішемії культури кортикальних клітин обробляли різними сполуками формули (I) протягом ішемічного інсульту (ціанід калію та 2-дезоксиглюкоза) та одну годину після цього (експериментальні деталі дивись у Vornov et al., J.Neurochem, Vol 65, №4, 1681-1691, 1995).

Нейрозахисну дію кожної тестованої сполуки наведено нижче у таблиці III(a). Нейрозахисну дію виражено як  $DK_{50}$  - концентрацію, при якій глутаматна токсичність після ішемічного інсульту знижена на 50%.

Таблиця III(a)

Сполука	ДК <sub>50</sub> (нМ)
	0,67
	373,0
	112,0
	132,0
	100,0
	767,0
	794,0
	37,00
	79,00
	2,00
	834,00
	4315,00
	1670,00

Реакція на дозу при цьому, яка виміряна як % токсичності при різних концентраціях 2-(фосфонометил)пентадієвої кислоти, представлена в таблиці III(б), а графічно - на фіг.1.

Таблиця III(б)

Доза	% токсичності
Контроль	100,00±9,0 (n=5)
100нМ	66,57±4,38 (n=5)
1нМ	42,31±9,34 (n=5)
10нМ	33,08±9,62 (n=5)
100нМ	30,23±9,43 (n=5)
1μМ	8,56±8,22 (n=5)

Результати вказують, що при зростанні концентрації 2-(фосфонометил)пентадієвої кислоти токсичність зменшується, підтверджуючи, що інгібітори НААПКДазі можуть бути ефективними при лікуванні ішемії чи викликаних нею нейронних пошкоджень.

Способи проведення цих аналізів детально описано нижче. Конкретніше, культури клітин піддавали дії ціаніду калію та 2-дезоксиглюкози (2-ДГ) (10мМ) та аналізували на вивільнення лактатної дегідрогенази (ЛДГ).

Токсичність НААГ in vitro Для виявлення токсичності НААГ in vitro культури кортикальних клітин обробляли НААГ протягом 20 хвилин (при концентраціях 3цМ-3мМ). Виміри токсичності для кожної концентрації представлено нижче в таблиці IV та графічно - на фіг.2.

Таблиця IV

Доза НААГ	% токсичності
3μМ	3,51 (n=1)
10μМ	4,30±3,12 (n=3)
30μМ	11,40±6,17 (n=3)
100μМ	12,66±5,50 (n=3)
300μМ	13,50±4,0 (n=3)
1мМ	21,46±4,20 (n=3)
3мМ	45,11±4,96 (n=3)

Результати вказують, що токсичність зі збільшенням концентрації зростає. Токсичність обумовлено вивільненням глутамату при розщепленні НААГ НААПКДазою.

Дослідження впливу інгібіторів НААПКДазі in vitro на токсичність НААГ Для виявлення дії інгібіторів НААПКДазі in vitro на токсичність НААГ культури кортикальних клітин обробляли 2-(фосфонометил)пентадієвою кислотою (1μМ) протягом обробки НААГ та годину по тому. Виміри токсичності для кожної концентрації представлено нижче в таблиці V та графічно - на фіг.3.

Таблиця V

Доза НААГ	% токсичності
3μМ	-4,71 (n=1)
10μМ	-3,08±0,81 (n=3)
30μМ	-4,81±1,13 (n=3)
100 μМ	-2,87±0,78 (n=3)
300μМ	-2,09±0,48 (n=3)
1мМ	0,26±1,11 (n=3)
3мМ	16,83±8,76 (n=3)

При порівнянні результатів таблиці IV/фіг.2 та таблиці V/фіг.3 вказують, що токсичність значно зменшується після обробки інгібітором НААПКДазі, вказуючи, що він може бути ефективним при лікуванні глутаматних порушень.

Дослідження інгібіторів НААПКДазі in vitro при ішемії для різного часу вживання

Для виявлення дії інгібіторів НААПКДазі in vitro на ішемічну токсичність для різного часу вживання культури кортикальних клітин обробляли 2-(фосфонометил)пентадієвою кислотою (i) протягом ішемічного інсульту та годину по тому (лікування та відновлення), (ii) годину після ішемічного інсульту (тільки відновлення), та (iii) годину, починаючи через 30 хвилин після ішемічного інсульту (затримка 30 хвилин). Виміри токсичності при різному часі вживання представлені в таблиці VI, а графічно - на фіг.4.

Таблиця VI

Час вживання відносно ішемічного інсульту	% токсичності
Контроль	100,00
лікування та відновлення	2,54
тільки відновлення	9,03
затримка 30 хвилин	31,49

Результати вказують, що значного протектування досягають, коли інгібітори НААПКДази вживають протягом лікування та відновлення від ішемічного інсульту і навіть через 30 хвилин затримки після нього.

Протокол дослідження токсичності *in vitro*

а. Культура клітин Культури роз'єднаних кортикальних клітин виготовляли, використовуючи папаїн-дисоціативний спосіб Гейтнера та Баугмана (1986), як модифікований Мерфі та Барабаном (1990). Дивись таблицю VII для використаних тут правил роз'єднаної культури. Зародки 17-добових ембріонів видаляли з вагітних пацюків (Harian Sprague Dawley). Кору головного мозку швидко відсікали у буферований фосфатом сольовий розчин Дульбекко, відділяли від мозкових оболонок та інкубували в розчині папаїну при 37°C протягом 15 хвилин, потім тканину механічно розтирали та пелетували при 500д (1000-2000об/хв. на оборотному ковшу Beckman). Пелету ресуспендували в розчині ДНКази, тритували піпеткою на 10мл x15-20, покривали розчином «10x10», що містив інгібітор альбуміну та трипсину (див. Приклад розчину «10x10» в таблиці VII), знов пелетували та ресуспендували в середовищі для посіву, що містило 10% сироватки зародку теляти (HyClone A-1111-L), 5% інактивованої теплою кінської сироватки (HyClone A-3311-L) та 84% модифікованого основного середовища Ерла (MCE) (Gibco 51200-020) з високим вмістом глюкози (4,5г/л) та 1г/л  $\text{NaHCO}_3$ . Кожну 24-коміркову плату перед посівом попередньо обробляли полі-D-лізином (0,5мл/комірку, 10цг/мл) протягом 1 години та промивали водою. Культури засівали при кількості  $2,5 \times 10^6$  клітин/мл з вмістом 500μл на кожну комірку 24-коміркової плати. Інакше, чашки по 35 мм можна засівати при 2мл/чашку, 6-коміркові плати - при 2 мл/комірку, або 12-коміркові плати - при 1мл/комірку. Після посіву 50% середовища замінювали кожні 3-4 доби зі зростанням кількості сироватки, що містила 5% інактивованої теплою кінської сироватки (HyClone A-3311-L), 95% модифікованого основного середовища Ерла (MCE) (Gibco 51200-020) та 1% L-глутаміну (Gibco 25030-081). Експерименти проводили через 21 добу культивування. Культури витримували в атмосфері з 5%  $\text{CO}_2$  при 37°C. Ця послідовність додатково описана нижче в таблиці VII.

Таблиця VII

#### ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

I. Виготовлення розчинів

Вихідні розчини/розчини

Вихідний розчин ДНКази, 1 мл

(100x)

5 мг ДНКази I (Worthington LS002004);

1 мл диссоц. EBSS;

сублімовано як аліквоти по 50мл.

400 мл дист. води;

та стерильне фільтрування.

Диссоц. EBSS, 500мл

1,1г  $\text{NaHCO}_3$ ;

500 мл вихідного розчину EBSS

(Gibco-14050-025;

400мл дист. води;

та стерильне фільтрування.

#### ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

10 та 10 вихідний розчин. 10мл

100 мг альбуміну бичачої сироватки (Sigma A-4919);

100 мг інгібітору трипсину з яєчного білку (Sigma T-2011);

10 мл диссоц. EBSS;

та стерильне фільтрування

Середовище

#### ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

Роз'єднане зростання. 500мл

500мл MCE (Gibco 51200-020) з вмістом глюкози та  $\text{NaHCO}_3$  (2,25г глюкози та 0,5г  $\text{NaHCO}_3$ );

25 мл інактивованої теплою кінської сироватки (HyClone A-3311-L),

5мл L-глутаміну (200мМ, 100x вихідний розчин, Gibco 25030-081);

стерильне фільтрування.

15 мл інактивованої теплою кінської сироватки (HyCloneA-3311-L),

3мл L-глутаміну (200мМ, 100x вихідний розчин, Gibco 25030-081); (Gibco 15140-015);

1мл вихідного розчину пеніциліну-стрептоміцину.

#### ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

Для роз'єднання папаїном

4мг цистеїну (C-8277);

10мл диссоц. EBSS;

250μл папаїну

(Worthington LS003126);

БФСР Дульбекко. 500мл

4г  $\text{NaCl}$  (J.T.Backer 3624-01);

1,06г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fisher S373-3);

100мг  $\text{KCl}$  (Fisher P217-500);

100мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma P-0662);

500мл дист. води;

доведення рН до 7,4 та стерильне фільтрування.

Вихідний розчин ЕДТА, 10мл

184,2г натрієвої солі ЕДТА (Sigma ED4S);

400мл дист. води;

та стерильне фільтрування.

Вихідний розчин полі-D-лізину, 5мл

5мг полі-D-лізину, 100-150 К

(Sigma P-6407);

5мл стер. води; та

сублімація

250 мл MCE з вмістом глюкози та

$\text{NaHCO}_3$  (2,25г глюкози та 0,5г

$\text{NaHCO}_3$  в 500мл MCE (Gibco

51200-020));

30мл сироватки зародку теляти

(HyClone A-1111-L),

Для обробки ДНКазою

ДНКаза, 5мл

4,5мл диссоц. EBSS;

500μл «10 та 10» вихідного розчину;

500μл вихідного розчину ДНКази.

розміщували на водяній бані при 37°C до прозорості.

«10 та 10», 5мл  
4,5 мл диссоц. EBSS;

## II. ПОКРИТІ ЧАШКИ

Використовували вихідний розчин про розбавленні 100х для покриття 24-коміркових плат (0,5мл/комірку) або про розбавленні 10х для покриття 35-мм покривного скла (1,0мл/покривне скло). Залишали до закінчення відсікання.

## ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

## III. ВІДСІКАННЯ ТКАНИНИ

Для отримання 17-добових ембріонів використовували вагітних пацюків (Harlan Sprague Dawley).

Обезголовлювали, живіт обприскували 70% етанолом.

Матку видаляли і розсікали по середній лінії та переносили у стерильний буферований фосфатом сольовий розчин Дульбекко.

Видаляли мозки ембріонів, залишаючи їх у БФСР.

Видалення мозку: Розтинали гострими щипцями череп та шкіру в районі ламбди, тягнули назад до відкритої задньої ямки, далі переміщували щипці вперед до окремого сагітального шва. Мозок можна видалити ложкою позаду нюхальної цибулини під мозком.

Мозок переносили в свіжий БФСР та відсікали від кори головного мозку.

## ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

## IV. РОЗ'ЄДНАННЯ ПАПАЙНОМ

Переносили кору головного мозку порівну в дві туби по 15мл зі стерильним розчином папаїну, витримували при 37°C.

Тритували 1х стерильною піпеткою на 10мл.

Інкубували тільки 15 хвилин при 37°C.

Обертали 5 хвилин при 500g (1000-2000об/хв. на оборотному ковшу Beckman).

## V. ОБРОБКА ДНКазою

Виділяли супернатант та гель ДНК від пелет клітин (або відбирали та видаляли пелету піпеткою).

Переносили пелету в розчин ДНКаз.

Тритували х15-20 стерильною піпеткою на 10мл.

Покривали суспензією клітин за допомогою піпетки поверх розчину «10 та 10» проти сторони туби.

Обертали знов 5 хвилин при 500g (клітини вкручуються у розчин «10 та 10»).

Промивали боки туби середовищем для культивування без руйнування пелети.

Видаляли промивне середовище піпеткою та повторювали промивку.

## ПРОТОКОЛ РОЗ'ЄДНАНОЇ КУЛЬТУРИ

## VI. ШАР СЕРЕДОВИЩА

Додавали до кожної пелети приблизно по 4,5мл середовища для засівання до об'єму 5мл.

Ресуспендували піпеткою на 10мл.

Збирали клітини в одиночну тубу.

Швидко додавали 10μl суспендованих клітин в гемоцитометр, не даючи їм осісти.

Підраховували клітини на великому квадраті, що відповідає 10 мільйонам клітин/мл.

Переносили клітини в більшу посудину, щоб їх число складало 2,5 мільйонів клітин/мл.

Тритували до гомогенності.

Кінцеве покриття плат:

Відсмоктували або вивантажували лізин;

Промивали 1х стерильною водою та вивантажували.

Додавали середовище для засівання з клітинами як показано нижче:

35-мм-чашки 2мл/чашку;

6-коміркові плати 2мл/комірку;

12-коміркові плати 1мл/комірку;

24-коміркові плати 0,5мл/комірку.

## VII. ЖИВЛЕННЯ

Культури звичайно виготовляють у четвер.

Початкове живлення двічі на тиждень; починаючи з наступного понеділка живлення у понеділок та п'ятницю.

Видалення 50% об'єму та заміщення свіжим середовищем для росту.

б. Ішемічний інсульт з використанням ціаніду калію та 2-дезоксиглюкози. Дослід проводили на 21-24 добу після початку культивування кортикальних клітин. Клітини тричі промивали буферованим ГЕПЕСом безфосфатним сольовим розчином і піддавали дії ціаніду калію (5мМ) та 2-дезоксиглюкози (2-ДГ, 10мМ) протягом 20 хвилин при 37°C. Раніше було показано, що ці концентрації індукують максимальну токсичність (Vornov et al., J.Neurochem, Vol.65, №4, 1681-1691, 1995). Наприкінці 24 годин культури аналізували на вивільнення цитозольного ферменту лактатної дегідрогенази (ЛДГ), стандартне вимірювання лізису клітин. Виміри ЛДГ проводили згідно зі способом: Koh and Choi, J. Neuroscience Methods, 1987.

в. Індукована НААГ нейротоксичність Культури досліджували мікроскопічно, і ті з них, що мали однакову густину нейронів, використовували в пробах на нейротоксичність НААГ.

При проведенні дослідів культури один раз промивали буферованим ГЕПЕСом сольовим розчином (БФСР; NaCl 143,4мМ, ГЕПЕС 5мМ, KCl 5,4мМ, MgSO<sub>4</sub> 1,2мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2мМ, CaCl<sub>2</sub> 2,0мМ, D-глюкози 10мМ) (Vornov et al, 1995), а потім піддавали дії різних концентрацій НААГ в межах 3μМ-3мМ, що включають 3μМ, 10μМ, 30μМ, 100μМ, 300μМ, 1мМ та 3мМ, при 37°C протягом 20 хвилин. В кінці обробки клітини один раз промивали буферованим ГЕПЕСом сольовим розчином, а потім переносили у вільне від сироватки основне середовище Ерла і інкубували далі протягом 24 годин в атмосфері з CO<sub>2</sub>.

г. Визначення лактатної дегідрогенази Для підрахунку уражень використовували вивільнення цитозольного ферменту лактатної дегідрогенази (ЛДГ), стандартне вимірювання клітинного лізису (Koh and

Choi, 1987). Виміри ЛДГ-активності стандартизували для контролю різниці між препаратами культур. (Koh and Choi, 1987). Кожний незалежний дослід включав контроль умов, при яких додавали інгібітори НААПКДаз, при цьому в контролі виявили невелику активність ЛДГ. Цей контрольний вимір віднімали від кожної експериментальної точки. Ці величини стандартизували в кожному досліді як процент викликаних НААГ-ішемією уражень. Значним був тільки вплив інгібітору НААПКДаз, взаємовплив дози та умов статистично не виявлено.

Вимір потужності кожної тестуємої сполуки проводили вимірюванням проценту вивільнення ЛДГ в середовище росту після впливу НААГ/ішемії з інгібітором НААПКДаз або НААГ/ішемії з сольовим розчином (контроль). Оскільки високі концентрації глутамату можуть бути в деяких випадках токсичними для клітин, виміри глутаматної токсичності спостерігали, використовуючи ЛДГ як стандартну техніку виміру.

Дослідження інгібіторів НААПКДаз in vivo кортикальним порушенням після ЗСЦА у пацієнтів SHRSP

Для визначення дії інгібіторів НААПКДаз на кортикальні порушення in vivo об'єм інфаркту вимірювали на пацієнтах SHRSP з безперервною закупоркою середньої церебральної артерії (ЗСЦА), яких було далі оброблено

(i) сольовим розчином, (ii) 10мг/кг 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти, а потім протягом години 2мг/кг-год 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти, або (iii) 100мг/кг 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти, а потім протягом години 20мг/кг-год 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти.

Об'єм кортикального порушення для кожної групи пацієнтів наведено нижче в таблиці VIII, а графічно - на фіг.5.

Таблиця VIII

Об'єм кортикального порушення (мм <sup>3</sup> )	
Контроль	184,62±33,52 (n=10)
10мг/кг	135,00±32,18 (n=10)
100мг/кг	65,23±32,18 (n=10)
Об'єм кортикального порушення (мм <sup>3</sup> )	
Контроль	34,44±6,53 (n 10)
10мг/кг	29,14±7,68 (n=10)
100мг/кг	13,98±6,64 (n=10)
Кортикальний захист (% захисту)	
Контроль	0
10мг/кг	27
100мг/кг	65

Результати свідчать, що при збільшенні кількості інгібітору НААПКДаз об'єм кортикального порушення зменшується, а кортикальний захист зростає, що також свідчить про нейрозахисну дію інгібітору НААПКДаз.

Протокол дослідження дії інгібіторів НААПКДаз in vivo кортикальним порушенням після ЗСЦА у пацієнтів SHRSP

Колонію пацієнтів SHRSP розвели в Johns Hopkins School трифлуорметилом Medicine з трьох пар самців та самок, яких отримали від National institute Health (Laboratory, Science Section, Veterinary Resources, Bethesda, MD). Усіх пацієнтів тримали у вільному від вірусів середовищі і на регулярній дієті (NIH 31, Zeigler Bros, Inc) та доскоху давали воду. Усім групам пацієнтів дозволяли їсти та пити до ранку початку досліді.

Тимчасову закупорку середньої церебральної артерії (СЦА) здійснювали переміщенням 4-0 хірургічного найлонового шовного матеріалу у внутрішню сонній артерії (ВСА) для блокування початку СЦА (Koizumi, 1986; Longa, 1989; Chen, 1992). Пацієнтів анестезували 4% галотаном і підтримували 1-1,5% галотану в збагаченому киснем повітрі, використовуючи маску. Ректальну температуру підтримували в межах 37,0±0,5°C протягом хірургічної операції тепловою лампою. Праву стегнову артерію катетеризували для виміру вмісту кисню (pO<sub>2</sub>) та діоксиду карбону (P<sub>CO2</sub>) у крові до та протягом ішемії та контролю кров'яного тиску протягом операції. Праву спільну сонну артерію (ССА) розрізали по середній лінії, здатний до самонаведення ретрактор розміщали між двобрюшними та соскоподібним м'язами, а лопатево-під'язичну видаляли. Праву зовнішню сонну артерію (ЗСА) розтинали та перев'язували. Далі ізолювали та коагулювали відгалуження потиличної артерії від ЗСА, після чого ізолювали праву внутрішню сонну артерію (ВСА), поки розкривали крилопіднебінну артерію, і обережно відділяли від сусіднього блукаючого нерва. Крилопіднебінну артерію перев'язували 4-0 шовковим шовним матеріалом поблизу її початку.

Після перев'язування ССА 4-0 шовковим шовним матеріалом для попередження 4-0 шовковим шовним матеріалом кровотечі з ділянки проколу, через яку у порожнину ВСА вводили 2,5см 4-0 моноволоконного найлонового шовного матеріалу (Ethilon) з округленими нагріванням на електричному термокаутері кінцями. 6-0 шовковий шовний матеріал для попередження кровотечі затягували на розгалуженні навкруги внутрішньо-порожнинного найлонового шовного матеріалу, і відпускали напружений шовний матеріал у ССА та ВСА. Далі найлоновий шовний матеріал обережно переміщували на 20мм.

Анестезію закінчували через 10 хвилин після закупорки СЦА в обох групах, і пацієнти пробуджувалися через 5 хвилин після цього. Через 2 години ішемії анестезію повторювали і здійснювали реперфузію витягуванням найлонового шовного матеріалу, поки віддалений кінець не ставав видимим на початку ВСА.

Величину артеріального рН і P<sub>CO2</sub> та парціальний тиск кисню (pO<sub>2</sub>) вимірювали на самокаліброваній радіометричній електродній системі (ABL 3, Копенгаген, Швеція). Гемоглобін та вміст артеріального кисню вимірювали гемоксиметром (радіометр, модель OSM3, Копенгаген, Швеція). Глюкозу в крові вимірювали аналізатором глюкози (модель 2300A, Yellow Springs instruments, Yellow Springs, OH).



Кожну групу піддавали 2 годинній закупорці правої СЦА та 22 годинам реперфузії. Усі перемінні за винятком ректальної температури вимірювали як базові на 15-й та 45-й хвилини закупорки. Ректальну температуру вимірювали як базову на 0-й та 15-й хвилини закупорки та 0-й та 22-й годинах реперфузії.

Дослідження дії інгібіторів НААПКДазі *in vivo* на ураження мозку після ЗСЦА у пацієнтів Sprague Dawley

Для визначення нейрозахисної дії інгібіторів НААПКДазі на ураження мозку *in vivo* пацієнтів було оброблено середовищем або 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою до та після безперервної тимчасової закупорки середньої церебральної артерії (ЗСЦА).

У контрольній групі (n=8) пацієнти отримували інтраперитональну ін'єкцію сольового розчину через 30 хвилин після закупорки з наступною внутрішньовенною інфузією сольового розчину з швидкістю 0,5мл/год. У групах обробки лікувальним засобом пацієнти отримували інтраперитональну ін'єкцію 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти в дозі 100мг/кг протягом 20 хвилин до закупорки (n=5), 60 хвилин після закупорки (n=7), або 120 хвилин після закупорки (n=4) з наступною внутрішньовенною інфузією 20мг/кг/год. з швидкістю 0,5мл/год. Між інтраперитональною та внутрішньовенною обробкою проміжок часу складав 15 хвилин. Через 22 години після реперфузії пацієнтів умертвляли і видаляли їх мозок. Відбирали сім коронарних секцій товщиною 2мм і фарбували їх 1% розчином хлориду 2,3,5-трифенілтетраколіуму (ХТТ) протягом 20 хвилин, а потім фіксували 10% формаліном. Передню та задню поверхню найростральнішої секції мозку та задню поверхню інших 6 секцій відображали. Визначення розміру ділянки інфаркту кожного мозку проводили комп'ютерною цифровою системою аналізу образів (КЦСАО). Повністю забарвлені ХТТ ділянки мозку представляли уражену тканину. Загальний об'єм інфаркту для кожного пацієнта розраховували числовим інтегруванням відповідних послідовних площин мозку.

Загальний об'єм інфаркту для кожної групи пацієнтів представлено графічно фіг.6.

Оброблені середовищем пацієнти виявили загальний об'єм інфаркту  $293 \pm 26 \text{ мм}^3$ .

Оброблені 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою до чи після ішемічного інсульту пацієнти виявили значно нижчий загальний об'єм інфаркту  $122 \pm 26 \text{ мм}^3$  (p=0,003 від середовища) для 20 хвилин попередньої обробки,  $208 \pm 40 \text{ мм}^3$  (p=0,2 від середовища) для 30 хвилин наступної обробки,  $125 \pm 57 \text{ мм}^3$  (p=0,015 від середовища) для 60 хвилин наступної обробки та  $133 \pm 35 \text{ мм}^3$  (p=0,005 від середовища) для 120 хвилин наступної обробки, що вказує на нейрозахисні властивості 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти на моделі приступу після ЗСЦА у пацієнтів при застосуванні протягом 2 годин після закупорки.

Протокол дослідження дії інгібіторів НААПКДазі *in vivo* на ураження мозку після ЗСЦА у пацієнтів Sprague Dawley

Використовували самців пацієнтів Sprague Dawley (260-320г). До початку дослідження пацієнти жили окремо і мали вільний доступ до їжі та пиття. Кожному пацієнту зробили дві операції: катетерування яремної вени для внутрішньовенної інфузії та ЗСЦА. При операції пацієнтів анестезували 2% галотаном у кисні через інгаляційну маску. Температуру тіла контролювали та підтримували на нормальному рівні за допомогою гомеотермічного нагрівального пристрою. Спочатку в праву яремну вену вставляли поліетиленовий катетер PE-50, а через годину пацієнта знов анестезували для операції ЗСЦА. ЗСЦА здійснювали способом ендovasкулярного шва, як описано Long et al., Stroke, Vol.20, 84-91, (1989). Конкретно, праву зовнішню сонну артерію (ЗСА) відкривали, коагулювали та розсікали. У проксимальну куку ЗСА артеріотомією та просуванням на 20мм з боку розгалуження вводили 3-0 моноволоконний найлоновий шовний матеріал з округленими кінцями, поки він не досягав проксимальної ділянки передньої церебральної артерії, закупорюючи так початок СЦА. Пацієнтам давали проснутися, через 2 години пацієнтів знов анестезували для реперфузії, при цьому найлоновий шовний матеріал витягували до куки ЗСА, що відкривало доступ крові до СЦА.

Дослідження дії інгібіторів НААПКДазі *in vivo* на індуковане нападом зростання рівня глутамату у мозку

Для визначення дії інгібіторів НААПКДазі на глутаматергічні порушення *in vivo* пацієнтів з індукованим нападом зростанням рівня глутамату у мозку було оброблено середовищем або 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою.

Результати, які представлено графічно фіг.фіг.7, 8 та 9, показують, що обробка 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою (інтраперитонально 100мг/кг, потім внутрішньовенно 20мг/кг/год.) значно знижує індуковане нападом зростання рівня зовнішньоклітинного глутамату в смугастому тілі (фіг.7) у порівнянні з обробленими середовищем пацієнтами (p<0,05), та повне попередження збіжних змін глутамату у тім'яній частині кори головного мозку (p<0,05, фіг.8). За контрастом, значного впливу самого нападу на глутамат у передній частині кори головного мозку та наступної різниці між обробленими середовищем та 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою групами не спостерігали (фіг.9). Величини представлено як % одержаних значень, що включають результати трьох послідовних 20-хвилинних проб, що передували нападу. Абсолютні базові (до обробки) величини для глутамату (значення  $\pm$  похибка) у каудальній, тім'яній та фронтальній корі були  $0,25 \pm 0,1$ ,  $1,1 \pm 0,3$  та  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ , відповідно, у оброблених середовищем пацієнтах, та  $0,46 \pm 0,1$ ,  $2,0 \pm 0,7$  та  $0,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ , відповідно, у оброблених 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою пацієнтах.

Протокол дослідження дії інгібіторів НААПКДазі *in vivo* на індуковане нападом зростання рівня глутамату у мозку

Самцям пацієнтів Sprague Dawley (270-330г, n=5-6 на групу) імплантували концентраційний мікродіалітичний зонд аналогічно операції, що раніше описана Britton et al., J.Neurochem, Vol.67,324-329, 1996). Резюмуючи, під анестезією галотаном зонд (сконструйований у себе з використанням капілярної мембрани Cynophane, відрізано 10Kmw, діалізуюча довжина 2м=6,6) та тім'яну кору (AP=(2, ML=5, DIV=3) (координати в мм відносно брегми та твердої оболонки мозку, відповідно), регіони, які, вважають, представляють серцевинну та напівтіньову зони індукованих ішемією уражень. Рівень глутамату в діалізаті визначали з використанням попередньої обробки о-фталевим діальдегідом, а потім ВЕРХ з флуорометричним детектуванням.

Приблизно через 20 годин після імплантування зонда пацієнтів діалізували перфузійною рідиною (125mM NaCl, 2,5mM KCl, 1,18mM MgCl<sub>2</sub>, 1,26mM CaCl<sub>2</sub>) при швидкості 2,5μл/хв. Через 60 хвилин періоду стабілізації діалізаційні зразки відбирали кожні 20 хвилин. Після відбору 3-х базових зразків пацієнтів анестезували галотаном та піддавали тимчасовій ішемії, використовуючи волоконний спосіб ЗСЦА (Britton et al., Life Science,

Vol.60, №20, 1729-1740, 1997). Коротше, праву зовнішню (ЗСА) відкривали та коагулювали її розгалуження. 3-0 моноволоконний найлоновий шовний матеріал з округленими кінцями вводили у внутрішню сонну артерію шляхом артеріотомії ЗСА та просуванням, поки він не досягав проксимальної ділянки передньої церебральної артерії, так початок СЦА. Ендоваскулярний шовний матеріал витягували через 2 години після закупорки для реперфузії.

Температуру тіла підтримували на нормальному рівні протягом операції та реперфузії. Пацієнтів дозували інтраперитонеально 100мг/кг 2-(фосфометил)пентандіової кислоти за 20 хвилин до закупорки та внутрішньовенно 20мг/кг/год. протягом 4 годин часу закупорки. Діалізаційні зразки від неанестезованих пацієнтів відбирали кожні 20 хвилин. Через 24 години після реперфузії пацієнтів умертвляли і видаляли їх мозок. Відбирали сім коронарних секцій товщиною 2мм з ділянки, що починається за 1мм від фронтального полюса і закінчується як-раз рострально на кортико-церебелярному з'єднанні. Аналіз ішемічних церебральних пошкоджень проводили фарбуванням ХТТ та комп'ютерною цифровою системою аналізу образів, як описано Britton et al., 1997.

Дослідження дії інгібіторів НААПҚДазі in vivo на утворення мієліну після кріпошкодження сідничного нерва

Нещодавно виявлено, що НААПҚДазі спадно регулюється в гліальних клітинах, як тільки вони починають утворювати мієлін і відсутня у мієлінуючих клітинах Шванна. на основі цих даних автори припустили, що інгібування НААПҚДазі може впливати на сигнальний механізм між аксонами та клітинами Шванна і призводити до посилення мієлінізації. Для перевірки автори досліджували дію 2-(фосфометил)пентандіової кислоти на регенерацію нервів та мієлінізацію після кріпошкодження сідничного нерва у самців мишей.

Результати представлено нижче в таблиці IX та графічно на фіг.фіг. 10(a) та 10(b).

Таблиця IX

Дія інгібіторів НААПҚДазі in vivo на утворення мієліну після кріпошкодження сідничного нерва

	2-(фосфометил)пентандіова кислота	середовище
Відношення числа мієлінованих аксонів ліки/середовище	1,5	
Число мієлінованих ламел	16,53±0,65	13,77±0,09
% зростання мієлінованих ламел у порівнянні з середовищем	20%	
значення за t-тестом	p<0,005	

Як видно з фіг.фіг. 10(a) та 10(b), на яких наведено результати дослідження на світловому та електронному мікроскопах нерва на відстані 3мм від ділянки кріпошкодження, демонструють значне зростання числа мієлінованих аксонів (у 1,5 рази) та товщини мієліну (20% зростання, p<0,005) у порівнянні з нервами оброблених середовищем мишей.

Фіг.фіг. 10(a) та 10(b) показують мікрофотографії цієї дії. Зрізи фарбували толудіновим блакитним, який забарвлює мієлін. Сідничні нерви, що оброблено імплантатом з вмістом 2-(фосфометил)пентандіової кислоти, у порівнянні з сідничними нервами, що оброблено імплантатом з вмістом середовища, виявляли зростання числа мієлінованих аксонів, а також товщини мієліну.

Протокол дослідження дії інгібіторів НААПҚДазі in vivo на утворення мієліну після кріпошкодження сідничного нерва

Кріпошкодження сідничного нерва у мишей провели способом за Koenig et al., Science, Vol.268, 1500-1503, (06.1997). Резюмуючи, кожну мишу анестезували і відкривали її сідничний нерв у верхній частині стегна кріпошкоджували його за допомогою мідного кріоду діаметром 5мм, який занурювали у рідкий азот та кілька разів прикладали до верхньої частини нерва. Протяжність пошкодження була приблизно 1мм.

2-(фосфометил)пентандіову кислоту вводили в силіконові стрічки способом Connoid et al., Developmental Brain Res., Vol.28, 99-104, (1986), та імплантували в ділянку кріпошкодження в добу 0 і заміщували в 3, 6, 9 та 12 добу. Кожної доби з силіконового імплантату вивільнялося приблизно 2,5µг/добу 2-(фосфометил)пентандіової кислоти. Уражали обидва сідничних нерва кожної миші, лівий та правий, правий нерв обробляли імплантованою силіконовою стрічкою з вмістом 2-(фосфометил)пентандіової кислоти. Через 15 діб після операції мишей умертвляли, відокремлювали і обробляли їх сідничні нерви для світлової та електронної мікроскопії. Швидко відділені ділянки на відстані 2-3мм від пошкодження якісно аналізували на світловому мікроскопі, використовуючи пофарбовані толудіновим блакитним зрізи товщиною 1µм, і фотографували.

Дослідження інгібіторів НААПҚДазі in vivo при хворобі Паркінсона

Для вивчення дії інгібіторів НААПҚДазі in vivo при хворобі Паркінсона МРTP-уражених мишей обробляли 2-(фосфометил)пентандіовою кислотою або середовищем.

Процент допамінергічних нейронів для кожної групи мишей представлено нижче в таблиці X та графічно на фіг.11.

Таблиця X

Дія інгібіторів НААПҚДазі in vivo при хворобі Паркінсона

	%іннерваційної густини в смугастому тілі ТГ
Середовище/середовище	24,74±1,03
МРГР/середовище	7,82±0,68

Оброблені МРТП та середовищем миші виявляли значні втрати функціональних допамінергічних терміналів у порівнянні з неураженими мишами (приблизно 68% втрат). Уражені миші, що одержували 2-(фосфонометил)пентандіову кислоту (10мг/кг), показали значне відновлення ТГ-пофарбованих допамінергічних нейронів ( $p < 0,001$ ). Ці результати свідчать що 2-(фосфонометил)пентандіова кислота захищає мишей від МРТП-токсичності.

Протокол дослідження інгібіторів НААПКДазі in vivo при хворобі Паркінсона

МРГР-пошкодження допамінергічних нейронів у мишей використовували в якості тваринної моделі хвороби Паркінсона, як описано Steiner, Proc.Nati.Acad.Sci., Vol.94, 2019-2024, (03.1997). Резюмуючи, до білих мишей CD1 віком 4 тижні інтраперорально застосовували протягом 5 діб 30мг/кг МРТП, 10мг/кг 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти або середовище застосовували підшкірно протягом 5 діб з МРТП, а потім ще 5 діб після закінчення обробки МРТП. Через 18 діб після обробки МРТП мишей умертвляли, відокремлювали і секціонували їх мозок. Імунопофарбовання сагітальних та коронарних зрізів мозку проводили, використовуючи антитіла до антитирозинової гідроксилази(ТГ) для кількісної оцінки виживання та відновлення допамінергічних нейронів.

Дослідження дії інгібіторів НААПКДазі in vivo на індуковані динорфіном пошкодження спинного мозку

Для вивчення нейрозахисної дії інгібіторів НААПКДазі in vivo на екситотоксичні пошкодження спинного мозку пацюків, у яких підтримували індуковані динорфіном пошкодження спинного мозку, обробляли 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою або середовищем.

Результати представлено графічно на фіг.12.

При застосуванні разом з динорфіном-А 4  $\mu$ молей 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти викликали значне поліпшення оцінок рухомості через 24 години після ін'єкції у порівнянні з обробленими середовищем пацюками ( $p < 0,05$  порівняння за Kruskal-Wallis). Пацюків характеризували як рухомих чи ні на основі виявлення їх неврологічних оцінок (0-4). Через 24 години після ін'єкції 73% зі співоброблених 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою 15 пацюків були рухомими, на відміну від 14% зі співоброблених середовищем 14 пацюків ( $p < 0,05$ ). Результати свідчать, що 2-(фосфонометил)пентандіова кислота ефективно захищає від індукованих динорфіном пошкоджень спинного мозку.

Протокол дослідження дії інгібіторів НААПКДазі in vivo на індуковані динорфіном пошкодження спинного мозку Спинальні ін'єкції під павутинну оболонку

Індуковані динорфіном пошкодження спинного мозку здійснювали як описано Long et al., JPET., Vol.269, №1 358-366, (1993). Резюмуючи, спінальні ін'єкції під павутинну оболонку робили, використовуючи вставлені між 14 та 15 хребцями самців пацюків Sprague Dawley (300-350г) голки 30 розміру. Пацюків анестезували галотаном і негайно робили розріз по середній лінії спини рострально до тазового поясу. При використанні хребтового способу в якості показового голку вводили у ділянку павутинної оболонки навкруги cauda equina. Коректування розташування голки здійснювали CSF-потокм з голки після її введення. Ін'єкцію проводили з використанням мікрошприця Гамільтона з загальним об'ємом 20 $\mu$ л, який містив 20нМ динорфіну, промивну рідину та 2-(фосфонометил)пентандіову кислоту або середовище. Після ін'єкції розріз обробляли за місцем антибактеріальним фуразолідоном та стискали скобками для ран. Швидкий вихід з анестезії галотаном давав змогу зробити неврологічну оцінку в межах 5 хвилин після ін'єкції.

Неврологічна оцінка

Неврологічні функції оцінювали за 5-ступінчатою шкалою: 4 - нормальні моторні функції, 3 - середній парепарез зі здатністю тримати вагу та ходити з порушеннями, 2 - парепарез зі здатністю переміщатися, неповністю тримаючи вагу, 1 - суворий парепарез, при якому пацюк може робити обмежені рухи задніми кінцівками, та 0 - повний параліч з повною відсутністю будь-яких рухів задніми кінцівками. Неврологічні оцінки проводили через 24 години після ін'єкції динорфіну А.

Статистика

Різницю в неврологічних оцінках серед груп обробки визначали за допомогою тестів Mann-Whitney U або Kruskal-Wallis.

Дослідження інгібіторів НААПКДазі при бічному аміотрофному склерозі (БАС)

Для вивчення нейрозахисної дії інгібіторів НААПКДазі при бічному аміотрофному склерозі (БАС) органотипічні культури спинного мозку обробляли треогідроксіаспатрта-том (ТГА), 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою або 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою разом з треогідроксіаспатратом і аналізували на активність холінацетилтрансферази (ХАТ).

Активність ХАТ для кожної обробки органотипічних культур спинного мозку представлено в таблиці XI та графічно на фіг.13.

Таблиця XI

Нейрозахисна дія інгібіторів НААПКДазі при БАС на моделі культур спинного мозку

Обробка	Активність ХАТ (% від контролю)
Контроль	100±22,1
2-(фосфонометил)пентандіова кислота	108±18,4
ТГА	36±12,1
2-(фосфонометил)пентандіова кислота + ТГА	121±18,8

Як видно з фіг.13, обробка органотипічних культур спинного мозку 100 $\mu$ М ТГА призводить до зменшення активності ХАТ до приблизно 36% від контрольної. Співінкубування культури з ТГА разом з 2-(фосфонометил)пентандіовою кислотою (100нМ - 10 $\mu$ М) значно захистило культури від токсичності ТГА.

Залежність ефекту від дозування представлено в таблиці XII та графічно на фіг.14.

## Нейрозахисна дія інгібіторів НААПКДаз при БАС на моделі культур спинного мозку

Обробка	Активність ХАТ (% від контролю)
Контроль	100,0
ТГА	0
ТГА+1нМ 2-(фосфонометил)пентандіова кислота	-23,9±18,6
ТГА+10нМ 2-(фосфонометил)пентандіова кислота	23,1±12,5
ТГА+100нМ 2-(фосфонометил)пентандіова кислота	87,5±21,1
ТГА+1μМ 2-(фосфонометил)пентандіова кислота	187,7±32,8
ТГА+10μМ 2-(фосфонометил)пентандіова кислота	128,7±17,2

Культури спинного мозку інкубували з різними дозами 2-(фосфонометил)пентандіової кислоти (1нМ - 10μМ) у присутності ТГА (100μМ) протягом 14 діб. Як видно з фіг.14, 2-(фосфонометил)пентандіова кислота виявляє залежну від дози дію проти індукованої ТГА токсичності з максимумом при 1μМ.

Протокол дослідження інгібіторів НААПКДаз при бічному аміотрофному склерозі (БАС) in vivo

Органотипічні культури спинного мозку

Органотипічні культури спинного мозку готували з поясничного спинного мозку пацієнтів віком 8 діб, як описано Rothstein et al., J.Neurochem., Vol.65, №2, (1995) та Rothstein et al., Proc.Nati.Acad.Sci. USA, Vol.90, 6591-6595, (06.1993). Резюмуючи, поясничний спинний мозок видаляли, нарізали спино-брюшні секції товщиною 300μМ і розміщали 5 зрізів на напівпроникних мембранних вставках діаметром 30мм з Millipore CM. Вставки розміщали на 1мл культурного середовища у комірках діаметром 35мм. Культурне середовище містило 50% мінімального основного середовища, та вільного від фосфату ГЕПЕСа (25мМ), 25% інактивованої нагріванням кінської сироватки та 25% збалансованого сольового розчину Ханка (GIBCO), підтриманого D-глюкозою (25,6мг/мл) та глутаміном (2мМ), при кінцевому рН 7,2. Антибіотики та антифунгіцидні засоби не використовували. Культури інкубували при 37°C у зволоженій атмосфері з вмістом 5% CO<sub>2</sub> (Forma Scientific). Середовище, само чи з доданими фармакологічними засобами замінювали двічі на тиждень.

Модель хронічної токсичності з ТГА

Для всіх дослідів культури використовували через 8 діб після виготовлення, протягом цього часу додавали до культурного середовища треогідроксіаспатрат (ТГА, 100μМ), 2-(фосфонометил)пентандіову кислоту (100пМ - 10μМ) або ТГА (100μМ)+2-(фосфонометил)пентандіову кислоту (100пМ - 10μМ), після чого інкубували ще 13-20 діб з 100μМ ТГА. Після цього культури збирали для визначення активності ХАТ, як описано нижче.

Аналіз ХАТ

Для визначення активності холінацетилтрансферази (ХАТ) тканини спинного мозку у кожній посудині (5 зрізів) збирали та заморожували при -75°C до початку аналізу. Активність ХАТ вимірювали радіометрично описаним способом, використовуючи [<sup>3</sup>H]ацетил-CoA (Amersham, Fonnun, 1975). Вміст білку в гомогенаті тканини визначали набором Coomassie Protein Assay (Pierce, Rockford, IL).

Нижченаведені приклади ілюструють винахід, не обмежуючи його. Якщо не вказано інше, усі проценти надано від маси кінцевої композиції.

Приклад 1 Виготовлення 2-[(метилгідроксифосфініл)метил]пентандіонової кислоти

Схема IV: R-CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>Ph

Метил-о-бензилфосфінова кислота. Дихлорметилфосфіт (10,0г, 77ммоль) у 80мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту охолодили до -20°C і краплями протягом 1 години додали розчин бензилового спирту (23г, 213ммоль) та тріетиламіну (10,2г, 100ммоль) у 40мл діетилового етеру, підтримуючи температуру середовища 0-10°C). Після повного додавання давали нагрітися до кімнатної температури та перемішували протягом ночі. Суміш профільтовували і тверду фазу промивали 200мл діетилового етеру. Поєднані органічні фази випарювали під зниженим тиском, отримавши 25г прозорої безбарвної рідини, яку очищали флеш-хроматографією, елюючи (гексаном/етилацетатом 1:1)→ етилацетатом (ЕтА). Потрібну фракцію відбирали та випарювали, отримавши метил-о-бензилфосфінову кислоту (1) (R-CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>Ph, 6,5г, 50%) як прозоре безбарвне масло.

R<sub>f</sub> - 0,1 (гексан/етилацетат 1:1). <sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 7,4 (m, 5H), 7,4 (m, 5H), 5,0 (dd, 2H), 1,5 (d, 3H)

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(метил)-о-бензилфосфінова кислота Метил-о-бензилфосфінову кислоту (3,53г, 20,7ммоль) у 200мл дихлорметану в атмосфері азоту охолодили до -5°C і шприцом додали тріетиламін (3,2г, 32ммоль), а потім триметил-силілхлорид (2,9г, 27ммоль). Суміш перемішували та нагрівали до кімнатної температури протягом 1 години. Додавали дибензил(2-метиленаптадіоат) (2) (6,0г, 18,5ммоль) у 10мл дихлорметану і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Далі охолоджували до 0°C і додавали триметилалюміній (9мл, 18ммоль, 2,0М у дихлорметані), колбу нагрівали та перемішували 72 години. Прозорий світло-жовтий розчин охолоджували до 5°C і гасили повільним додаванням 5% гідрохлоридної кислотою. Нагрівали до кімнатної температури та відділяли органічний шар, промивали його 5% гідро-хлоридною кислотою та водою, сушили сульфатом магнію та випарювали під зниженим тиском, отримавши 8г світло-жовтого масла, яке очищали на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1→ етилацетатом (ЕтА). Потрібну фракцію відбирали та випарювали, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(метил)-о-бензилфосфінову кислоту (3) (R-CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>-CH<sub>2</sub>Ph, 0,8г, 8%) як прозоре безбарвне масло.

R<sub>f</sub>-0,5 (етилацетат). <sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 7,4 (m, 15H), 5,1 (m, 6H), 3,0 (m, 1H), 2,4 (m, 3H), 2,1 (m, 3H), 1,5 (dd, 3H). Аналіз: Розраховано для C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>O<sub>6</sub>P·0,5H<sub>2</sub>O: C, 68,01, H, 6,32, знайдено: C, 66,85, H, 6,35.

2-[(метилгідроксифосфініл)метил]пентадіова кислота

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(метил)-о-бензилфосфінову кислоту (0,8г, 1,6ммоль) у 20мл води з вмістом 100мг 10% Pd/C гідрували при 27,5кПа протягом 4 годин. Суміш профільтовували крізь шар б्रोунмілериту та випарювали у високому вакуумі, отримавши 2-[(метилгідроксифосфініл)метил]пентадіову кислоту (4) (R-CH<sub>3</sub>, 0,28г, 78%) як в'язке прозоре безбарвне масло.

Аналіз: Розраховано для C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>6</sub>P·0,2H<sub>2</sub>O: C, 36,92, H, 5,93, знайдено: C, 37,06, H, 6,31.

Приклад 2 Виготовлення 2-[(бутилгідроксифосфініл)метил]пентандіової кислоти

Схема IV: R-н-бутил, R<sub>1</sub>-H

Бутилфосфінова кислота Діетилхлорфосфіт (25,0г, 160ммоль) у 60мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту охолодили до 0°C і краплями протягом 2 години додали розчин бензилмагнійхлориду (2,0М, 80мл, 160ммоль) у діетиловому етері, підтримуючи температуру середовища 0°C. Після повного додавання густу білу масу нагрівали до 30°C протягом 1 години. Суспензію профільтовували в атмосфері азоту і фільтрат випарювали під зниженим тиском, прозору світло-жовту рідину переносили в 15мл води і перемішували при кімнатній температурі, потім додавали 0,5мл концентрованої HCl, спостерігаючи екзотермічну реакцію, потім перемішували ще 15 хвилин і екстрагували двічі по 75мл етилацетатом. Поєднані органічні фази сушили сульфатом магнію і випарювали під зниженим тиском, отримавши прозору безбарвну рідину, яку обробляли 40мл 2,0М NaOH і перемішували протягом 1 години, потім промивали діетиловим етером і підкислювали до pH 1. Потрібний продукт екстрагували двічі по 100мл етилацетатом. Поєднані органічні фази сушили сульфатом магнію і випарювали під зниженим тиском, отримавши бутилфосфінову кислоту (1) (R-н-бутил, R<sub>1</sub>-H, 10г, 51%) як прозору безбарвну рідину.

<sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 6,9 (d, 1H), 1,6 (m, 2H), 1,4 (m, 4H), 0,9 (t, 3H)

Бутил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінова кислота Бутилфосфінову кислоту (2,0г, 16ммоль) у 80мл безводного дихлорметану в атмосфері азоту охолодили до 0°C і додали тріетиламін (6,7г, 66ммоль), а потім триметилсилілхлорид (58мл, 58ммоль, 1,0М у дихлорметані). Суміш перемішували при 0°C протягом 10 хвилин та додавали дибензил(2-метилпенпетадіоат) (2) (6,4г, 20ммоль) у 20мл дихлорметану. Видаляючи охолоджуючу баню і суміш нагрівали та перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Далі охолоджували до 0°C і гасили повільним додаванням 50 мл 5% гідрохлоридної кислоти. Відділяли органічний шар, промивали його 5% гідрохлоридною кислотою та розсолем, сушили сульфатом магнію та випарювали, отримавши світло-золотаву рідину, яку очищали флеш-хроматографією, елюючи гексаном/етилацетатом 3:1 з 5% оцтової кислоти. Потрібну фракцію відбирали та випарювали, отримавши бутил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінову кислоту (3) (R-н-бутил, R<sub>1</sub>-H, 2,9г, 40%) як прозоре безбарвне масло.

R<sub>f</sub>-0,12 (3:1 гексан/етилацетат). <sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 7,3 (m, 10H), 5,0 (s, 4H), 2,7 (m, 1H), 2,3 (t, 2H), 1,8 (m, 2H), 1,3 (m, 4H), 0,83 (t, 3H).

2-[(бутилгідроксифосфініл)метил]пентадіова кислота

Бензил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінову кислоту (2,9г, 6,5ммоль) у 30мл води з вмістом 320мг 10% Pd/C гідрували при 27,5кПа протягом 4,5 годин. Суміш профільтовували крізь шар б्रोунмілериту та випарювали у високому вакуумі, отримавши 2-[(бутилгідроксифосфініл)метил]пентадіову кислоту (4) (R-н-бутил, 0,75г, 43%) як в'язке прозоре безбарвне масло.

Аналіз: Розраховано для C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub>P·0,5H<sub>2</sub>O: C, 43,64, H, 7,23, знайдено: C, 43,25, H, 7,12.

Приклад 3 Виготовлення 2-[(бензилгідроксифосфініл)метил]пентандіової кислоти

Схема IV: R-CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>1</sub>-H

Бензилфосфінова кислота. Діетилхлорфосфіт (25,0г, 160ммоль) у 100мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту охолодили до 0°C і краплями протягом 2 години додали розчин бензилмагнійхлориду (2,0М, 80мл, 160ммоль) у діетиловому етері, підтримуючи температуру середовища нижче 10°C. Утворену густу білу масу при кімнатній температурі перемішували протягом 1 години. Суміш профільтовували в атмосфері азоту і фільтрат випарювали під зниженим тиском, і утворену прозору безбарвну рідину перемішували з 15мл води, потім додавали концентрованої HCl, спостерігаючи екзотермічну реакцію, перемішували ще 30 хвилин і екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази промивали розсолем, сушили сульфатом магнію і випарювали під зниженим тиском, отримавши прозору світло-золотаву рідину, яку обробляли 50мл 2,0М NaOH і перемішували протягом 1 години, потім промивали діетиловим етером і підкислювали водний шар концентрованою HCl до pH 1. Потім екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази сушили сульфатом магнію і випарювали, отримавши бензилфосфінову кислоту (1) (R-CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>1</sub>-H, 8г, 32%) як прозоре світло-золотаве масло.

<sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 7,3 (m, 5H), 6,9 (d, 1H), 3,1 (d, 2H).

Бензил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінова кислота. Бензилфосфінову кислоту (2,3г, 15ммоль) у 150мл безводного дихлорметану в атмосфері азоту охолодили до 0°C і додали тріетиламін (6,5г, 65ммоль), а потім триметилсилілхлорид (5,8г, 54ммоль), підтримуючи температуру 0°C, та через 30 хвилин протягом 5 хвилин додавали дибензил(2-метилпенпетадіоат) (2) (4,4г, 13,6ммоль) у 20мл дихлорметану. Суміші давали нагрітис до кімнатної температури та перемішували протягом ночі. Прозорий розчин охолоджували до 0°C і гасили 5% гідрохлоридною кислотою. Органічний шар промивали 5% гідрохлоридною кислотою та розсолем, сушили сульфатом магнію та випарювали, отримавши прозору жовту рідину, яку очищали флеш-хроматографією, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1 з 10% оцтової кислоти, отримавши бензил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінову кислоту (3) (R-CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>1</sub>-H, 2,0г, 28%) як прозоре світло-жовте масло.

R<sub>f</sub>-0,37 (1:1 гексан/етилацетат, 10% HOAc).

<sup>1</sup>H-ЯМР (d<sub>6</sub>-DMCO, млн.<sup>-1</sup>) 7,2 (m, 15H), 5,0 (s, 4H), 3,0 (d, 2H), 2,8 (m, 1H), 2,3 (t, 2H), 1,9 (m, 2H), 1,7 (t, 1H).

2-[(бензилгідроксифосфініл)метил]пентадіова кислота

Бензил[2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил]фосфінову кислоту (0,5г, 1ммоль) у 20мл води з вмістом 120мг 10% Pd/C гідрували при 27,5кПа протягом 6 годин. Суміш профільтовували крізь шар б्रोунмілериту та випарювали у високому вакуумі, отримавши 2-[(бензилгідроксифосфініл)метил]пентадіову кислоту (4) (R-CH<sub>2</sub>Ph, 0,17г, 57%) як білу тверду речовину.

Аналіз: Розраховано для  $C_{13}H_{17}O_6P$ : С, 52,00, Н, 5,71, знайдено: С, 51,48, Н, 5,70.

Приклад 4 Виготовлення 2-[(Фенілетилгідроксифосфініл)метил]пентандіової кислоти

Схема IV:  $R-CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$

Фенетилфосфінова кислота Діетилхлорфосфіт (15,6г, 100ммоль) у 100мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту охолодили до  $5^{\circ}C$  і краплями протягом 2 години додали розчин фенетилмагнійхлориду (1,0М, 100мл, 100ммоль) у ТГФ, підтримуючи температуру середовища  $0-10^{\circ}C$ . Утворену густу білу масу при кімнатній температурі перемішували протягом ночі. Суміш профільтрували в атмосфері азоту і фільтрат випарювали під зниженим тиском, утворену прозору безбарвну рідину перемішували з 15мл води, потім додавали 0,5мл концентрованої  $HCl$ , спостерігаючи екзотермічну реакцію, перемішували ще 15 хвилин і екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази промивали розсоллом, сушили сульфатом магнію і випарювали, отримавши прозору рідину, яку обробляли 40мл 2,0М  $NaOH$ , перемішували протягом 1 години, потім промивали один раз діетиловим етером і підкислювали водний шар концентрованою  $HCl$  до  $pH$  1. Потім екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази сушили сульфатом магнію і випарювали, отримавши фенетилфосфінову кислоту (1) ( $R-CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$ , 9,8г, 58%) як прозоре світло-жовте масло.

$^1H$ -ЯМР ( $d_6$ -ДМСО, млн. $^{-1}$ ) 7,2 (m, 5H), 6,9 (d, 1H), 2,8 (m, 2H), 1,9 (m, 2H). 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(фенетил)фосфінова кислота Фенетилфосфінову кислоту (1,0г, 5,9ммоль) у 50мл безводного дихлорметану в атмосфері азоту охолодили до  $-5^{\circ}C$  і додали тріетиламін (2,3г, 23ммоль), а потім триметилсилілхлорид (2,2г, 21ммоль), підтримуючи температуру  $0^{\circ}C$ , та через 10 хвилин протягом 10 хвилин додавали дибензил(2-метиленаптадіоат) (2) (1,7г, 5,2ммоль) у 10мл дихлорметану. Суміші давали нагрітись до кімнатної температури та перемішували протягом ночі. Прозорий розчин охолоджували до  $0^{\circ}C$  і гасили 5% гідрохлоридною кислотою. Органічний шар промивали розсоллом, сушили сульфатом магнію та випарювали, отримавши прозору світло-золотаву рідину, яку очищали флеш-хроматографією, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1з 5% оцтової кислоти, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(фенетил)фосфінову кислоту (3) ( $R-CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$ , 1,2г, 41%) як прозоре безбарвне масло.

$^1H$ -ЯМР ( $d_6$ -ДМСО, млн. $^{-1}$ ) 7,2 (m, 15H), 5,0 (s, 4H), 3,3 (m, 1H), 2,8 (m, 4H), 2,3 (m, 2H), 1,8 (m, 4H).

2-[(Фенетилгідроксифосфініл)метил]пентадіова кислота

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(фенетил)фосфінову кислоту (1,1г, 2,2ммоль) у 20мл води з вмістом 120мг 10%  $Pd/C$  гідрували при 27,5кПа протягом 6 годин. Суміш профільтрували крізь шар бромнілмериту та випарювали у високому вакуумі, отримавши 2-[(фенетилгідроксифосфініл)метил]пентадіову кислоту (4) ( $R-CH_2CH_2Ph$ , 0,8г, 114%) як білу тверду речовину.

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 7,2 (m, 5H), 2,7 (m, 2H), 2,5 (m, 1H), 2,3 (t, 2H), 1,9 (m, 6H), 1,6 (t, 1H).

Аналіз: Розраховано для  $O_{14}H_{19}O_6P \cdot 0,75H_2O \cdot 0,5HOAc$ : С, 50,35, Н, 6,34, знайдено: С, 50,26, Н, 5,78.

Приклад 5 Виготовлення 2-[(3-фенілпропілгідроксифосфініл)метил]пентандіової кислоти

Схема IV:  $R-CH_2CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$

3-фенілпропілфосфінова кислота. До ошукрок магнію (2,44г, 100ммоль) у 100мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту додали кілька кристалів іоду. Фенілпропілб-ромід (20,0г, 100ммоль) у 80мл сухого діетилового залили в крапельну лійку, додали приблизно 10мл розчину броміду до ошукрок магнію і почали перемішувати. Через кілька хвилин іод зник і, підтримуючи температуру середовища  $35^{\circ}C$ , додавали ще фенілпропілбромід. Після повного додавання протягом 1,5 годин суміш закривали і зберігали при  $5^{\circ}C$ .

Діетилхлорфосфіт (15,7г, 100ммоль) у 50мл сухого діетилового етеру в атмосфері азоту охолодили до  $5^{\circ}C$  і краплями протягом 2 години додали розчин фенетилмагній-броміду (1,0М, 100мл, 100ммоль) у діетиловому етері, підтримуючи температуру середовища  $0-10^{\circ}C$ . Утворену густу білу масу перемішували ще 30 хвилин. Суміш профільтрували в атмосфері азоту і фільтрат випарили під зниженим тиском, утворену прозору безбарвну рідину перемішували з 15мл води, потім додавали 0,5мл концентрованої  $HCl$ , спостерігаючи екзотермічну реакцію, перемішували ще 20 хвилин і екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази промивали розсоллом, сушили сульфатом магнію і випарювали, отримавши прозору рідину, яку обробляли 40мл 2,0М  $NaOH$ , перемішували протягом 1 години, потім промивали діетиловим етером і підкислювали водний шар концентрованою  $HCl$  до  $pH$  1. Потім двічі екстрагували етилацетатом. Поєднані органічні фази сушили сульфатом магнію і випарювали, отримавши 3-фенілпропілфосфінову кислоту (1) ( $R-CH_2CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$ , 9,8г, 53%) як прозоре безбарвне масло.

$^1H$ -ЯМР ( $d_6$ -ДМСО, млн. $^{-1}$ ) 7,2 (m, 5H), 6,9 (d, 1H), 2,6 (t, 2H), 1,7 (m, 2H), 1,6 (m, 2H).

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(3-фенілпропіл)фосфінові кислота 3-фенілпропілфосфінову кислоту (1,0г, 5,4ммоль) у 50мл безводного дихлорметану в атмосфері азоту охолодили до  $-5^{\circ}C$  і додали тріетиламін (2,2г, 22ммоль), а потім три-метилсилілхлорид (2,1г, 19ммоль), підтримуючи температуру  $0^{\circ}C$ , а через 10 хвилин протягом 10 хвилин додавали дибензил(2-метиленаптадіоат) (2) (1,6г, 4,9ммоль) у 10мл дихлорметану. Суміші давали нагрітись до кімнатної температури та перемішували протягом ночі. Прозорий розчин охолоджували до  $0^{\circ}C$  і гасили 5% гідрохлоридною кислотою. Органічний шар промивали розсоллом, сушили сульфатом магнію та випарювали, отримавши прозору жовту рідину, яку очищали флеш-хроматографією, елюючи гексаном/етилацетатом 4:1з 5% оцтової кислоти, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(3-фенілпропіл)фосфінову кислоту (3) ( $R-CH_2CH_2CH_2Ph$ ,  $R_1-H$ , 1,5г, 56%) як прозоре світло-жовте масло.

$R_f$  0,58 (1:1 гексан/етилацетат, 5%  $HOAc$ ).

$^1H$ -ЯМР ( $d_6$ -ДМСО, млн. $^{-1}$ ) 7,2 (m, 15H), 5,0 (s, 4H), 2,7 (m, 1H), 2,5 (m, 5H), 2,2 (m, 2H), 1,8(m,3H), 1,6 (m, 2H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{29}H_{33}O_6P \cdot 1,3H_2O$ : С, 65,48, Н, 6,75, знайдено: С, 65,24, Н, 6,39.

2-[(3-фенілпропілгідроксифосфініл)метил]пентадіова кислота

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(3-фенілпропіл)фосфінову кислоту (15) (1,4г, 2,8ммоль) у 20мл води з вмістом 150мг 10%  $Pd/C$  гідрували при 27,5кПа протягом ночі.

Суміш профільтрували крізь шар броунмілериту та випарювали у високому вакуумі, отримавши 2-[(3-фенілпропілгідроксифосфініл)метил]пентадіову кислоту (4) ( $R-CH_2CH_2CH_2Ph$ , 0,8г, 89%) як світложовте в'язке масло.

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 7,4 (m, 5H), 2,7 (m, 3H), 2,4 (t, 3H), 1,8 (m, 7H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{15}H_{21}O_6P \cdot 0,75H_2O \cdot 0,75HOAc$ : C, 51,23, H, 6,64, знайдено: C, 50,85, H, 6,02.

Приклад 6 Виготовлення 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл] метилпентандіової кислоти

Схема V: сполука 5, R-4-метилбензил

Гексаметилдисилазан (21,1мл, 100ммоль) при енергійному перемішуванні додали до фосфінату амонію (8,30г, 100ммоль) і перемішували суспензію при 105°C протягом 2 годин, потім при 0°C краплями додали розчин 4-метилбензилброміду (5,0г, 27ммоль) і перемішували суміш при кімнатній температурі протягом 19 годин, потім розбавляли її 50мл дихлорметану і промивали 50мл 1,0N HCl. Органічну фазу сушили сульфатом натрію і концентрували, отримавши 4,72г білої твердої речовини, яку розчиняли в 50мл дихлорметану і додавали бензиловий спирт (3,24г, 30ммоль), потім при 0°C дициклогексилкарбодіімід (ДЦГК) (6,19г, 30ммоль), і перемішували суспензію при кімнатній температурі протягом 14 годин. Розчинник випарили під зниженим тиском і залишок суспендували в етилацетаті, суспензію профільтрували і концентрували фільтрат. Залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 4:1→1:1, отримавши 4-метилбензил-о-бензилфосфінову кислоту (2) ( $R$ -4-метилбензил, 2,40г, 34%) як білу тверду речовину.

R-0,42 (етилацетат).

$^1H$ -ЯМР ( $d_6$ -DMCO, млн. $^{-1}$ ) 2,30 (s, 3H), 3,29 (d, 2H), 5,2 (m, 2H), 7,0 (d, 1H), 7,1-7,2 (m, 4H), 7,3-7,4 (m, 5H).

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(4-метилбензил)-о-бензилфосфінова кислота. До розчину 4-метилбензил-о-бензилфосфінової кислоти (2, R-4-метилбензил) (2,16г, 8,3ммоль) у 15мл ТГФ додали гібрид натрію (0,10г, 60% дисперсія в маслі), а потім при 0°C дибензил(2-метилпентадіоат) (3) (3,24г) та перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин, потім розбавляли 50мл етилацетату та виливали в 50мл 1N HCl. Органічний шар відділяли, сушили сульфатом натрію та концентрували, отримавши продукт, який очищали на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 4:1→1:1, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(4-метилбензил)-о-бензилфосфінову кислоту (4) ( $R$ -4-метилбензил, 3,41г, 70%) як безбарвне масло.

R-0,61 (етилацетат).

$^1H$ -ЯМР ( $CDCl_3$ , млн. $^{-1}$ ) 1,6-1,8 (m, 1H), 1,9-2,0 (m, 2H), 2,1-2,4 (m, 6H), 2,7-2,9 (m, 1H), 3,05 (dd, 2H), 4,8-5,1 (m, 6H), 7,0-7,1 (m, 4H), 7,2-7,4 (m, 15H).

2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]метилпентандіова кислота

До розчину 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил(4-метилбензил)-о-бензилфосфінової кислоти (0,70г, 1,2ммоль) у 30мл етанолу додали 100мг 5% Pd/C і струшували в атмосфері водню при 34,5кПа протягом 18 годин. Суміш профільтрували крізь шар броунмілериту та концентрували під зниженим тиском, розчинили залишок у 5мл дистильованої води і пропустили через колонку зі смолою AG 50W-X8 ( $H^+$ -форма) та ліофілізували, отримавши 2-[[4-метилбензил]гідроксифосфініл]метилпентандіову кислоту (5) ( $R$ -4-метилбензил, 55%) як білу тверду речовину.

R-0,62 (ізопропанол-вода 7:3).

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 1,7-1,9 (m, 3H), 2,0-2,2 (m, 1H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 1H), 3,12 (d, 2H), 7,0-7,1 (m, 2H), 7,2-7,3 (m, 2H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{13}H_{17}O_6P \cdot 0,30H_2O$ : C, 52,60, H, 6,18, знайдено: C, 52,60, H, 6,28.

Приклад 7 Виготовлення 2-[[4-флуорбензил]гідроксифосфініл]метилпентандіової кислоти

Схема V: R-4-флуорбензил

Виготовлено способом з вищенаведеного прикладу, в якому R - метилбензил.

R-0,64 (ізопропанол-вода 7:3).

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 1,7-1,9 (m, 3H), 2,0-2,2 (m, 1H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 1H), 3,12 (d, 2H), 7,0-7,1 (m, 2H), 7,2-7,3 (m, 2H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{13}H_{16}FO_6P \cdot 0,25H_2O$ : C, 48,38, H, 5,15, знайдено: C, 48,38, H, 5,15.

Приклад 8 Виготовлення 2-[[4-метоксибензил]гідроксифосфініл]метилпентандіової кислоти

Схема V: R-4-метоксибензил

Виготовлено способом з вищенаведеного прикладу, в якому R - метилбензил.

R-0,56 (ізопропанол-вода 7:3).

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 1,8-1,9 (m, 3H), 2,0-2,2 (m, 1H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 1H), 3,16 (d, 2H), 3,81 (s, 3H), 6,98 (d, 2H), 7,25 (d, 2H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{14}H_{19}FO_6P \cdot 0,30H_2O$ : C, 50,09, H, 5,89, знайдено: C, 49,98, H, 5,80.

Приклад 9 Виготовлення 2-[[2-флуорбензил]гідроксифосфініл]метилпентандіової кислоти

Схема V: R-2-флуорбензил

Виготовлено способом з вищенаведеного прикладу, в якому R - метилбензил.

R-0,67 (ізопропанол-вода 7:3).

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 1,8-1,9 (m, 3H), 2,0-2,2 (m, 1H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,55-2,70 (m, 1H), 3,28 (d, 2H), 7,1-7,5 (m, 4H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{13}H_{16}FO_6P \cdot 0,10H_2O$ : C, 48,79, H, 5,10, знайдено: C, 48,84, H, 5,14.

Приклад 10 Виготовлення 2-[[пентафлуорбензил]гідроксифосфініл]метилпентандіової кислоти

Схема V: R - пентафлуорбензил

Виготовлено способом з вищенаведеного прикладу, в якому R - метилбензил.

R-0,69 (ізопропанол-вода 7:3).

$^1H$ -ЯМР ( $D_2O$ , млн. $^{-1}$ ) 1,8-2,0 (m, 3H), 2,1-2,3 (m, 1H), 2,3-2,5 (m, 2H), 2,7-2,9 (m, 1H), 3,29 (d, 2H).

Аналіз: Розраховано для  $C_{13}H_{12}F_5O_6P \cdot 0,45H_2O$ : C, 39,20, H, 3,26, знайдено: C, 39,17, H, 3,28.

Приклад 11 Виготовлення 2-[[метилгідроксифосфініл]метилпентандіової кислоти

#### Схема VI: сполука 9

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутилфосфінова кислота (6) Фосфінат амонію (10г, 120ммоль) увели при перемішуванні в атмосфері азоту до круглодонної колби, додали гексаметилдисилазан (25,5мл, 120ммоль) і гріли при 110°C протягом 2 годин, потім охолодили до 0°C і додали 120мл дихлорметану, а потім краплями додали дибензил-2-метилєнпєнтандіоат (41г, 140ммоль) і перемішували суміш при кімнатній температурі протягом 16 годин, потім гасили 75мл 5% HCl. Органічну фазу сушили сульфатом магнію і випарювали під зниженим тиском, отримавши 42г (90%) прозорого безбарвного масла.

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, млн.<sup>-1</sup>) 7,36 (m, 10H), 7,1 (d, 1H), 5,19 (s, 2H), 5,15 (s, 2H), 2,92 (m, 1H), 2,21 (m, 6H).

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутилбензилфосфінова кислота (7). До розчину 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутилфосфінової кислоти (19,3г, 49,4ммоль) (6) у ТГФ додали бензиловий спирт (5,3г, 49,4ммоль) та 0,5г диметиламінопіридину, потім дициклогексилкарбодіімід (ДЦГК) (12г, 58ммоль). Утворився осад і через 30 хвилин суспензію профільтрували і випарили фільтрат під зниженим тиском і залишок суспендували в етилацетаті, суспензію профільтрували і концентрували фільтрат. Прозоре безбарвне масло очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутилбензилфосфінову кислоту (7) (11,50г, 47%) як прозоре безбарвне масло. R<sub>f</sub> 0,16 (гексан/етилацетат 1:1).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, млн.<sup>-1</sup>) 7,3 (m, 15H), 7,2 (d, 1H), 5,0 (m, 6H), 2,9 (m, 1H), 2,2 (m, 3H), 1,9 (m, 3H).

2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил[гідрокси(фєніл)метил]бензилфосфінова кислота (8). 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутилбензилфосфінову кислоту (7) у 5мл ТГФ додали краплями до охолодженої до 0°C суміші гідриду натрію (0,09г, 2,3ммоль) у 15мл ТГФ, а через 30 хвилин 15 хвилин шприцом бензальдегід (0,23г, 2,2ммоль), підтримуючи 0°C. Через 30 хвилин суміш гасили водою та двічі екстрагували дихлорметаном. Органічні шари поєднували та випарювали, отримавши прозоре безбарвне масло, яке хроматографували на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1. Потрібні фракції збирали та випарювали, отримавши 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил[гідрокси(фєніл)метил]бензилфосфінову кислоту (6) (0,4г, 33%) як прозоре безбарвне масло.

R<sub>f</sub> 0,18 (гексан/етилацетат 1:1).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, млн.<sup>-1</sup>) 7,3 (m, 20H), 5,2 (m, 1H), 4,9 (m, 6H), 2,8 (dm, 1H), 2,2 (m, 3H), 1,9 (m, 3H).

2-([гідрокси(фєніл)метил]гідроксифосфінілметил)пєнтандіоєва кислота 2,4-ди(бензилоксикарбоніл)бутил[гідрокси(фєніл)метил]бензилфосфінової кислоти (6) (0,37г, 0,6ммоль) у 20мл води з вмістом 100мг 10% Pd/C гідрували при 27,5кПа протягом 6 годин. Суміш профільтровували крізь шар броміліериту та ліофізували, отримавши 2-([гідрокси(фєніл)метил]гідроксифосфінілметил)пєнтандіоєву кислоту (9) (0,14г, 70%) як білу тверду речовину.

<sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O, млн.<sup>-1</sup>) 7,4 (m, 5H), 5,0 (d, 1H), 2,7 (m, 1H), 2,4 (m, 2H), 2,2 (m, 1H), 1,9 (m, 3H).

Аналіз: Розраховано для C<sub>13</sub>H<sub>7</sub>O<sub>7</sub>P·0,6H<sub>2</sub>O: C, 47,74, H, 5,61, знайдено: C, 47,73, H, 5,68.

Приклад 12 Виготовлення дибензил(2-метилєнпєнтандіоату)

#### Схема III

Бензилакрилат (500г, 3,0моль) на масляній бані нагрівали до 100°C, припиняли нагрів та краплями додавали гексаметилфосфамід (10г, 62ммоль), підтримуючи температуру нижче 140°C. Після закінчення додавання суміш перемішували та охолоджували до кімнатної температури. Суспензію діоксиду силіцію в гексані/етилацетаті 5:1 додавали до суміші і переносили на колонку з шаром сухого діоксиду силіцію, промивали гексаном/етилацетатом 1:1, фракції поєднували та випарювали, одержавши 450г прозорої світло-золотавої рідини, яку переганяли у високому вакуумі (200μHg) при 185°C, одержавши 212г (42%) прозорої безбарвної рідини.

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, млн.<sup>-1</sup>) 7,3 (m, 10H), 6,2 (s, 1H), 5,6 (s, 1H), 5,2 (s, 2H), 5,1 (s, 2H), 2,6 (m, 4H).

Приклад 13 Виготовлення дибензил(2-[[біс(бензилокси)фосфорил]метилєн]пєнтандіоату)

#### Схема III

Дибензилфосфіт (9,5г, 36ммоль) у 350мл дихлорметану охолодили до 0°C і при перемішуванні додали триметилалюміній (18,2мл, 36,4ммоль, 2,0М у гексані), а через 30 хвилин краплями протягом 10 хвилин додавали дибензил(2-метилєнпєтандіоат) (2) (6,0г, 37ммоль) у 90мл дихлорметану і прозорому безбарвному розчину давали нагрітиса до кімнатної температури і перемішували протягом ночі. Суміш гасили повільним додаванням 5% гідрохлоридної кислоти, перемішували ще 1,5 години та відділяли нижчий органічний шар, водний шар екстрагували 100мл дихлорметану, органіку поєднували, сушили сульфатом магнію та випарювали, отримавши 8г світло-золотавої рідини, яку хроматографували на силікагелі (4см-30см), елюючи гексаном/етилацетатом 4:1→1:1. Потрібні фракції поєднували та випарювали, отримавши дибензил(2-[[біс(бензилокси)фосфорил]метилєн]пєнтандіоат) (7,1г, 42%) як прозору безбарвну рідину, яку переганяли в апараті Кухлєрора при 0,5мм Hg при 195-200°C. Дистилат викидали, а залишкове світло-золотаве масло хроматографували на силікагелі, елюючи гексаном/етилацетатом 1:1, отримавши дибензил(2-[[біс(бензилокси)фосфорил]метилєн]пєнтандіоат) (2,9г) як прозоре безбарвне масло.

ТШХ R<sub>f</sub> - 0,5 (гексан/етилацетат 1:1).

<sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) млн.<sup>-1</sup>) 7,1-7,4 (m, 20H), 5,05 (s, 2H), 4,8-5,03 (m, 6H), 2,8 (1H), 2,22-2,40 (m, 3H), 1,80-2,02 (m, 3H).

Приклад 14 Виготовлення 2-(фосфонометил)пєнтандіоєвої кислоти

#### Схема III: сполука 3

Бензилпєнтандіоат 2 (2,9г, 4,9ммоль) додали до 20мл метанолу з вмістом 290мг (6мол.%) 10% Pd/C і гідрували при 27,5кПа протягом 24 годин, профільтровували та випарювали, отримавши 3 (1,0г, 90%) як прозоре світло-золотаве масло.

<sup>1</sup>H-ЯМР (D<sub>2</sub>O, млн.<sup>-1</sup>) 2,6-2,78 (m, 1H), 2,25-2,40 (m, 2H), 1,75-2,15 (m, 4H).

Приклад 15 Пацієнт має ризик пошкодження від ішемічного нападу. Пацієнт може попередньо вжити ефективну кількість інгібітору НААПКДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати,



що після такого попереднього лікування пацієнта буде захищено від будь-якого викликаного ішемічним нападом пошкодження.

Приклад 16 Пацієнт страждає від ішемічного нападу. Пацієнт може вжити протягом нападу чи після нього ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після такого лікування пацієнта буде позбавлено будь-якого викликаного ішемічним нападом пошкодження або він не буде страждати від нього.

Приклад 17 Пацієнт страждає від викликаного ішемічним нападом пошкодження. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде позбавлено від викликаного ішемічним нападом пошкодження.

Приклад 18 Пацієнт страждає від глутаматного порушення. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальших викликаних глутаматним порушенням пошкоджень або позбавлено від глутаматного порушення.

Приклад 19 Пацієнт страждає або постраждав від такого нервового пошкодження, як похідного від нейродегенеративного захворювання чи нейродегенеративного процесу. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшого викликаного нервовим пошкодженням порушення або позбавлено від нервового пошкодження.

Приклад 20 Пацієнт страждає від хвороби Паркінсона. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшого нейродегенеративного процесу або позбавлено від хвороби Паркінсона.

Приклад 21 Пацієнт страждає від БАС. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшого нейродегенеративного процесу або позбавлено від БАС.

Приклад 22 Пацієнт страждає від епілепсії. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшого нейродегенеративного процесу або позбавлено від епілепсії.

Приклад 23 Пацієнт страждає від аномалій процесу мієлінізації/дем'єлінізації. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшого нейродегенеративного процесу або позбавлено від аномалій процесу мієлінізації/дем'єлінізації.

Приклад 24 Пацієнт страждає або постраждав від такого цереброваскулярного порушення, як напад. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від викликаного цереброваскулярним порушенням пошкодження або позбавлено від нього.

Приклад 25 Пацієнт страждає від травми голови. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від викликаних травмою голови ішемії мозку, спінального чи периферійного пошкоджень або позбавлено від них.

Приклад 26 Пацієнт страждає від спінальної травми. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від викликаних спінальною травмою ішемічних пошкоджень або позбавлено від них.

Приклад 27 Пацієнт чекає хірургічної операції. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування у пацієнта не буде розвиватися будь-якої ішемічних пошкоджень мозку, спінального чи периферійного, що викликані хірургічною операцією.

Приклад 28 Пацієнт страждає від такої фокальної ішемії, як пов'язаної з тромбоемболітичною закупоркою судини мозку, травматичного поранення голови, водянки чи пухлини мозку. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, спінального чи периферійного, що викликані фокальною ішемією.

Приклад 29 Пацієнт страждає від глобальної ішемії. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, спінального чи периферійного, що викликані глобальною ішемією.

Приклад 30 Пацієнт страждає від серцевого нападу. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, спінального чи периферійного, що викликані серцевим нападом.

Приклад 31 Пацієнт страждає від гіпоксії, асфіксії або перинатальної асфіксії. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, спінального чи периферійного, що викликані гіпоксією, асфіксією або перинатальною асфіксією.

Приклад 32 Пацієнт страждає від поранення кори головного мозку. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, що викликані пораненням кори головного мозку.

Приклад 33 Пацієнт страждає від поранення хвостатого ядра. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від будь-яких пошкоджень мозку, що викликані пораненням хвостатого ядра.

Приклад 34 У пацієнта діагностовано ідентифікований в цих прикладах стан. Можна застосувати до пацієнта ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрішньопо-рожнинно у мозок, ректально, підшкірно, через катетер з насосом чи без, перорально, через трансдермальний пластр, за місцем або за допомогою полімерного імплантату. Можна чекати, що після лікування стан пацієнта буде поліпшено.

Приклад 35 У пацієнта діагностовано ідентифікований в цих прикладах стан. Можна застосувати до пацієнта ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом у формі болюса 100мг/кг з наступною, як варіант, внутрішньовенною інфузією 20мг/кг за годину протягом 1-2 годин. Можна чекати, що після лікування стан пацієнта буде поліпшено.

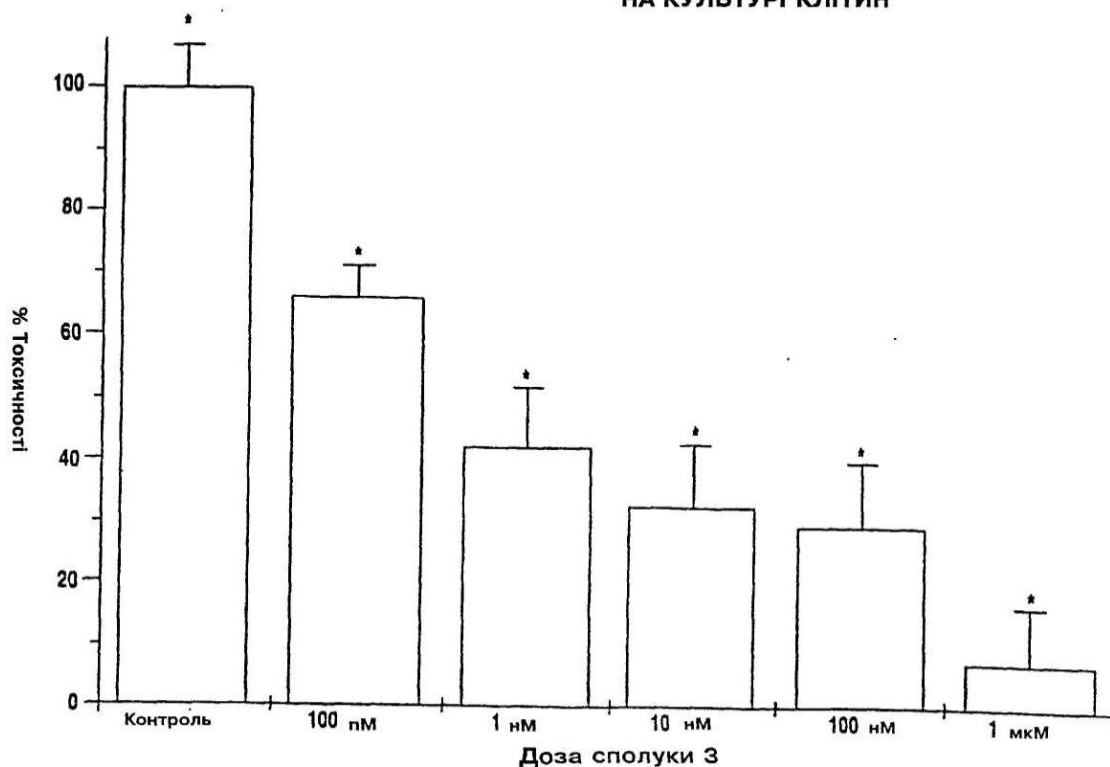
Приклад 36 Пацієнт страждає від пошкодження кори головного мозку, що обумовлено ідентифікованим в цих прикладах станом. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальших пошкоджень, або виявлено щонайменше 65-80% позбавлення від пошкодження кори головного мозку.

Приклад 37 Пацієнт страждає від розсіяного склерозу. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшої демієлінізації, або позбавлено від розсіяного склерозу.

Приклад 38 Пацієнт страждає від викликаного синдромом Джуліана-Барра периферійної невропатії. Пацієнт може вжити ефективну кількість інгібітору НААПҚДазі або фармацевтичної композиції згідно з винаходом. Можна чекати, що після лікування пацієнта буде захищено від подальшої демієлінізації, або позбавлено від периферійної невропатії.

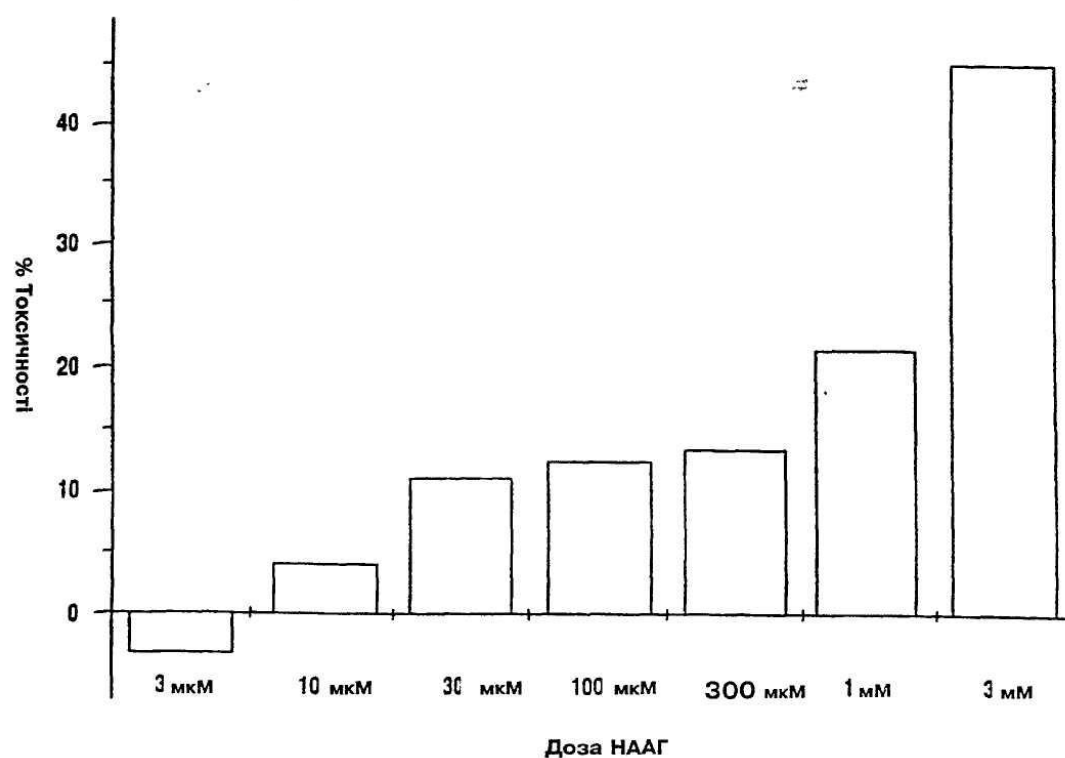
Повинно бути ясно, що описаний винахід можна варіювати багатьма шляхами. Такі варіації не виходять за рамки винаходу і всі такі модифікації включено в рамки нижчена-веденої формули винаходу.

### СПОЛУКА 3 Є НЕЙРООЗАХИСНОЮ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ НАПАДУ НА КУЛЬТУРІ КЛІТИН



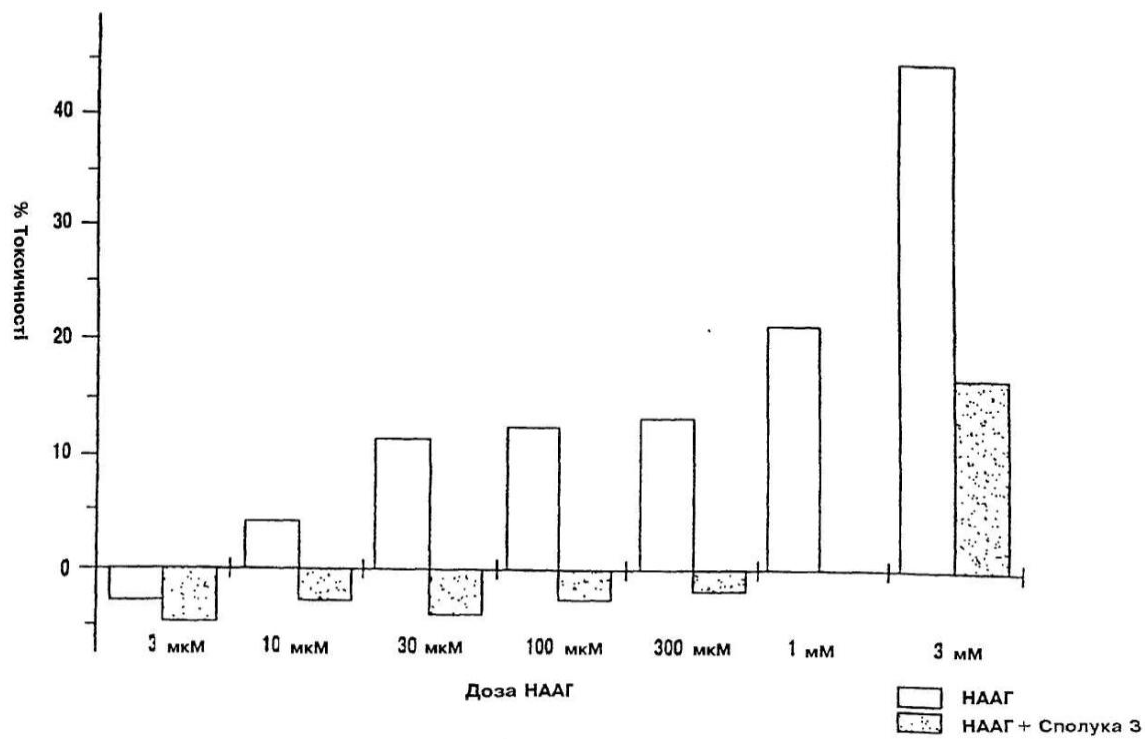
Фіг.1

## ТОКСИЧНІСТЬ НААГ

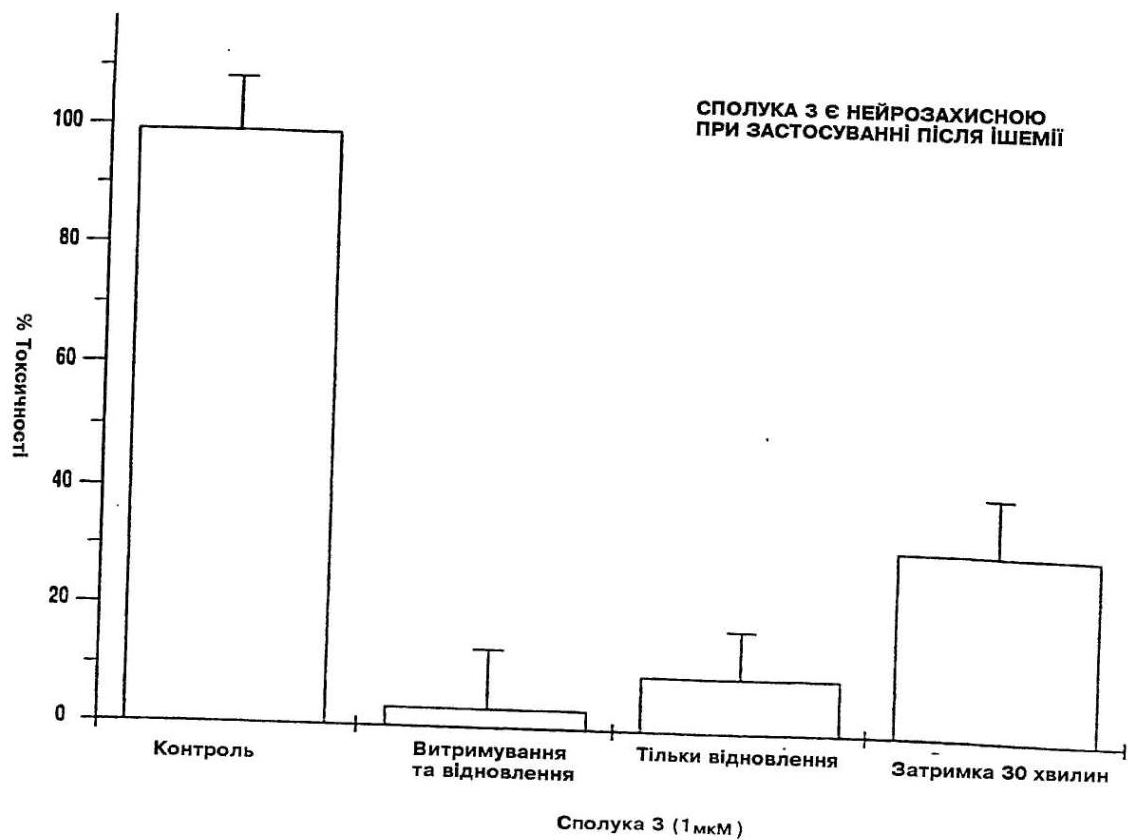


Фіг.2

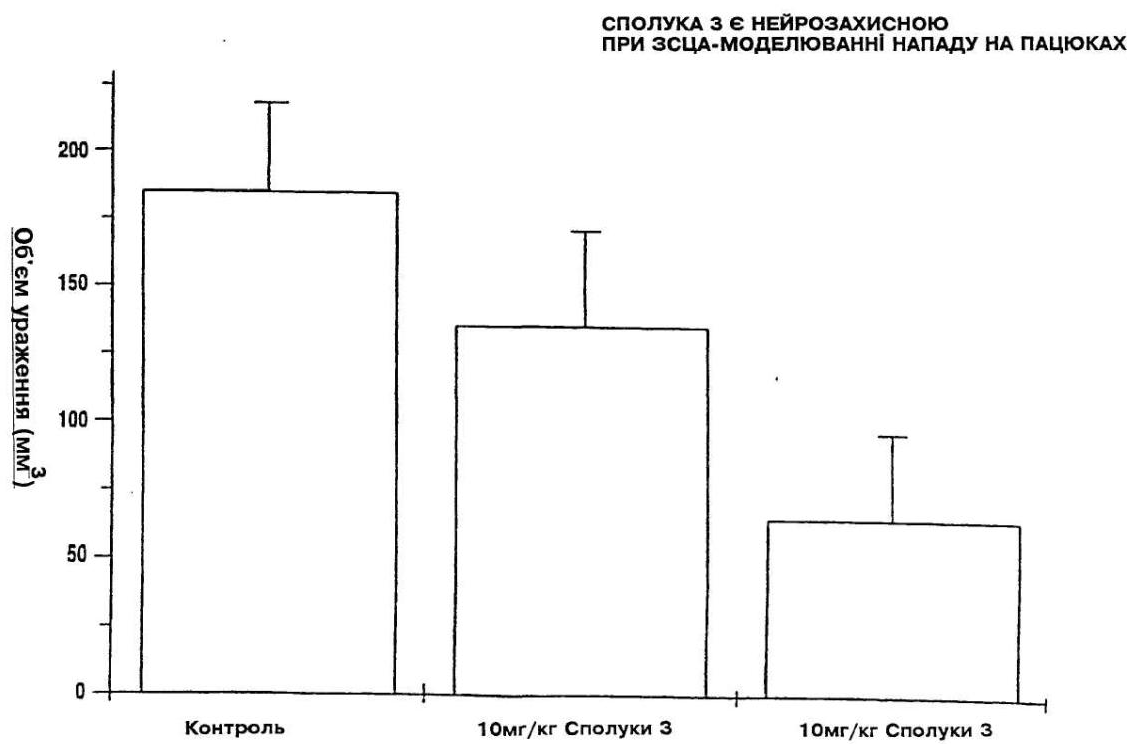
## БЛОКУВАННЯ ТОКСИЧНОСТІ НААГ СПЛУКОЮ 3



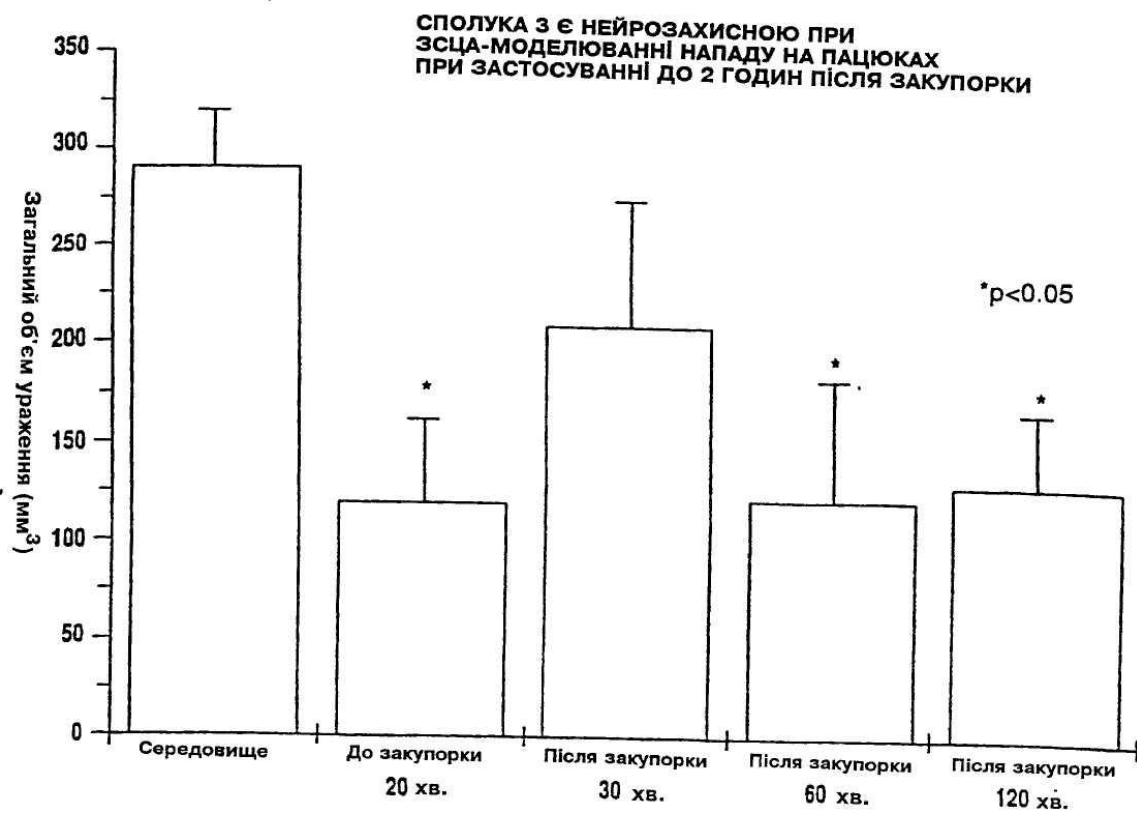
Фіг.3



Фіг.4

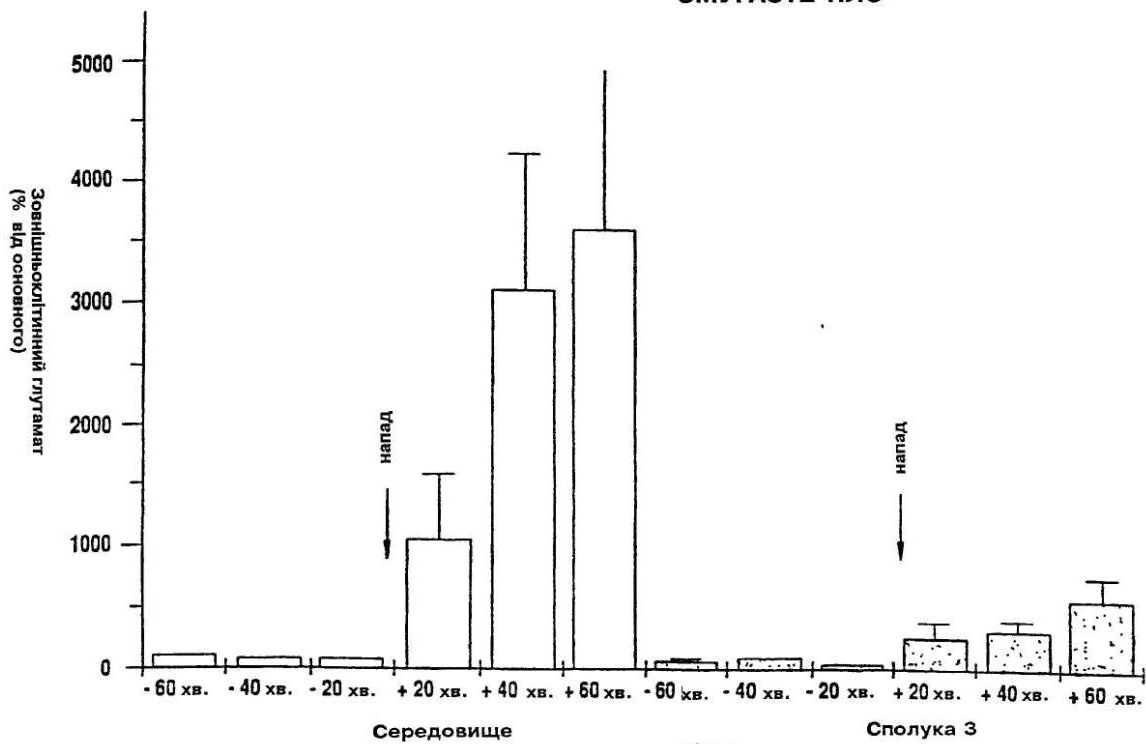


Фіг.5

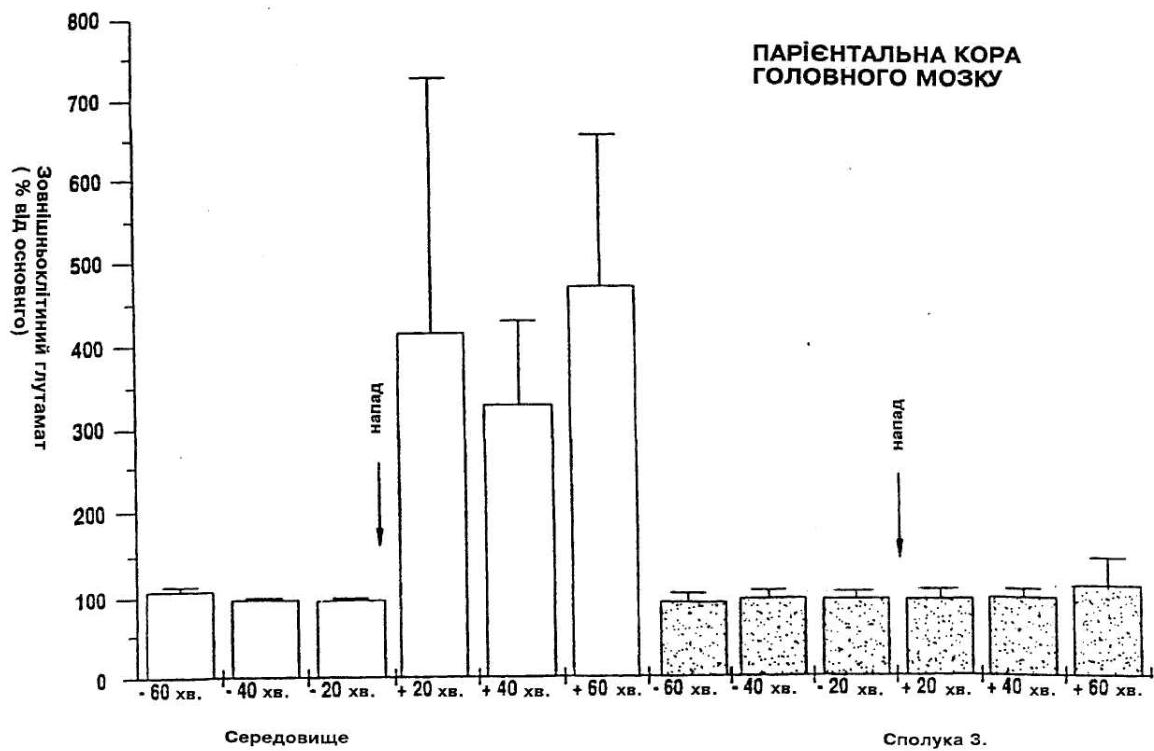


Фіг.6

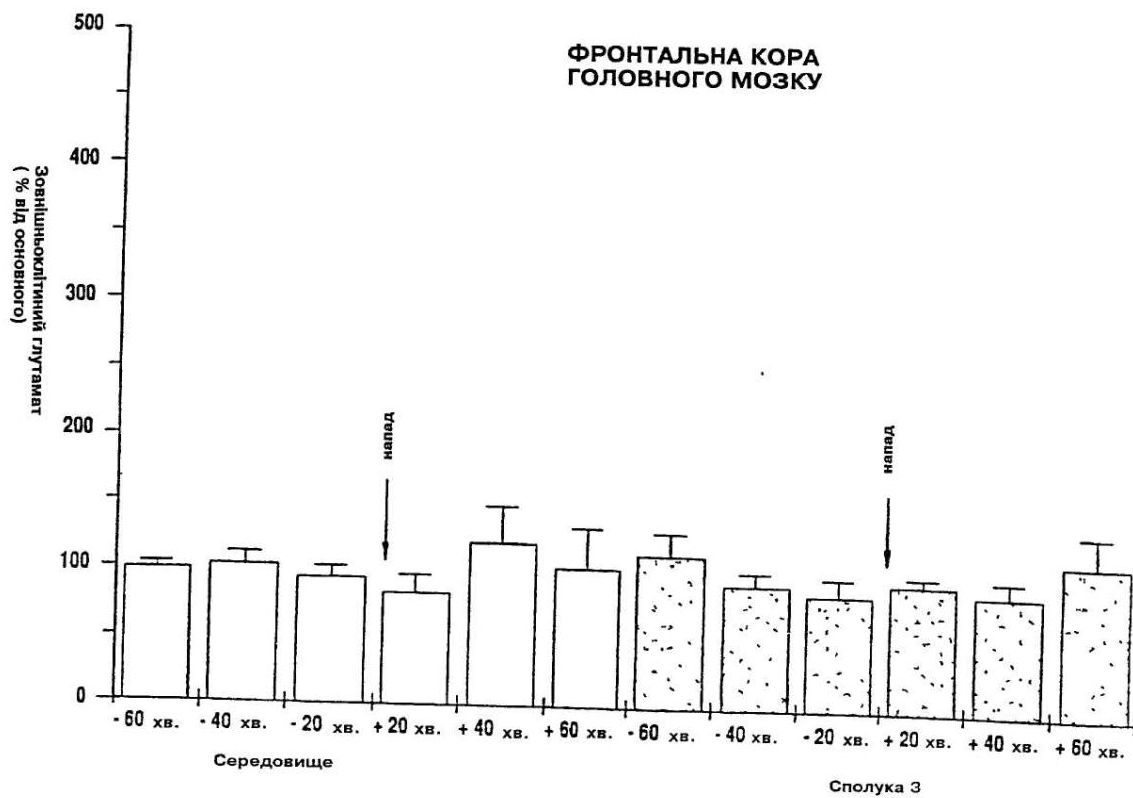
**СМУГАСТЕ ТІЛО**



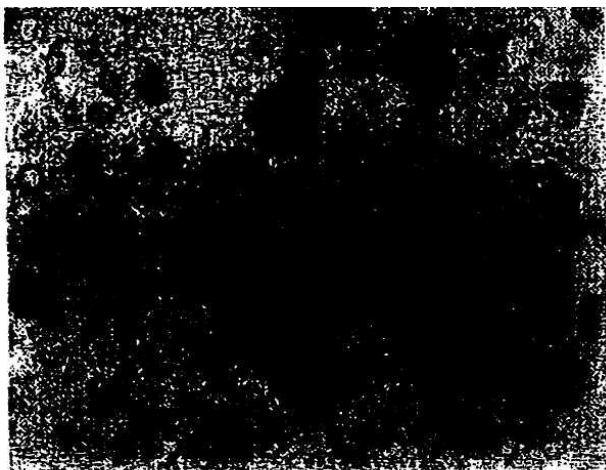
Фіг.7



Фіг.8

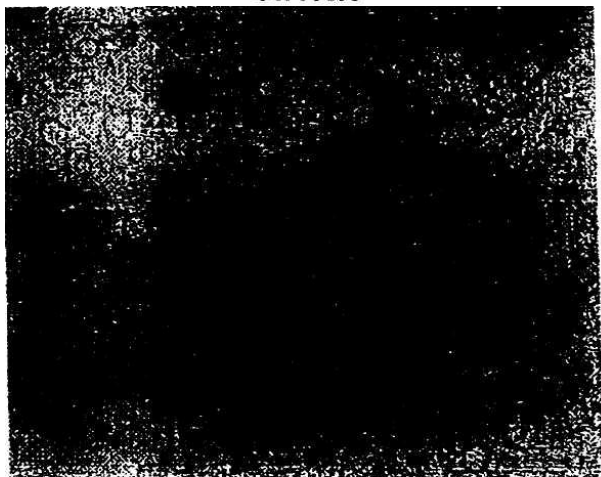


Фіг.9



**ПОЛІМЕРНЕ СЕРЕДОВИЩЕ**

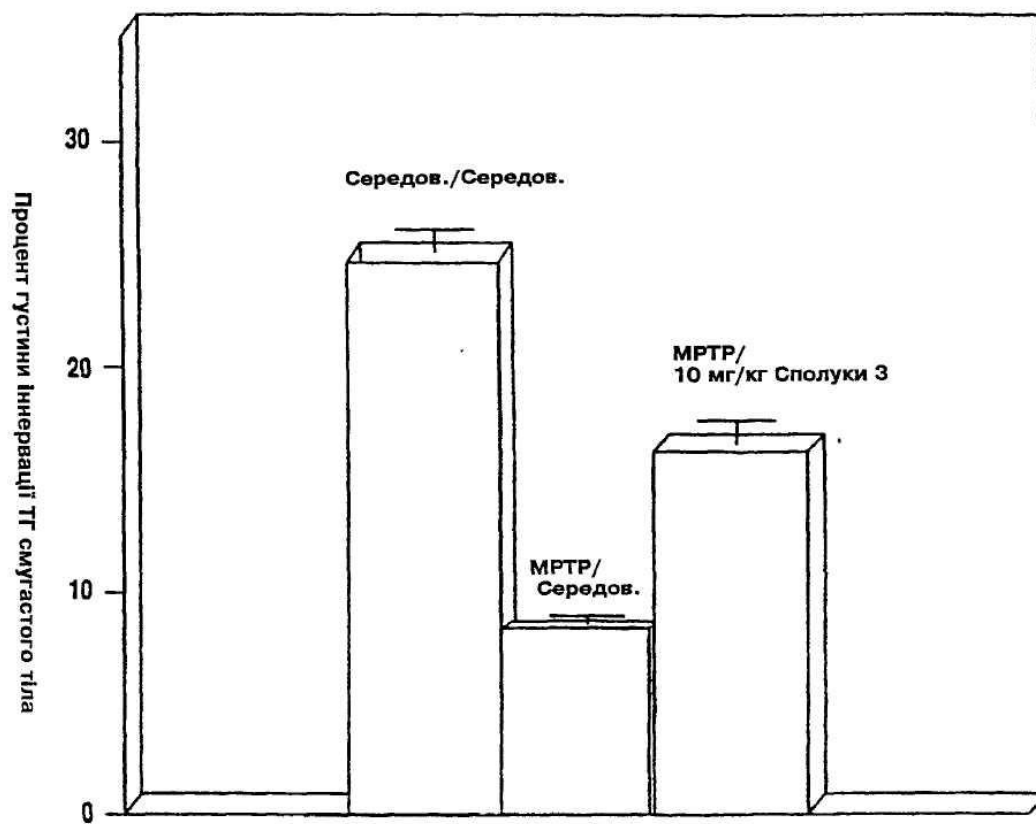
**Фіг.10А**



**GRI 5000 + ПОЛІМЕР  
2 МКГ/ДОБУ**

**Фіг.10Б**

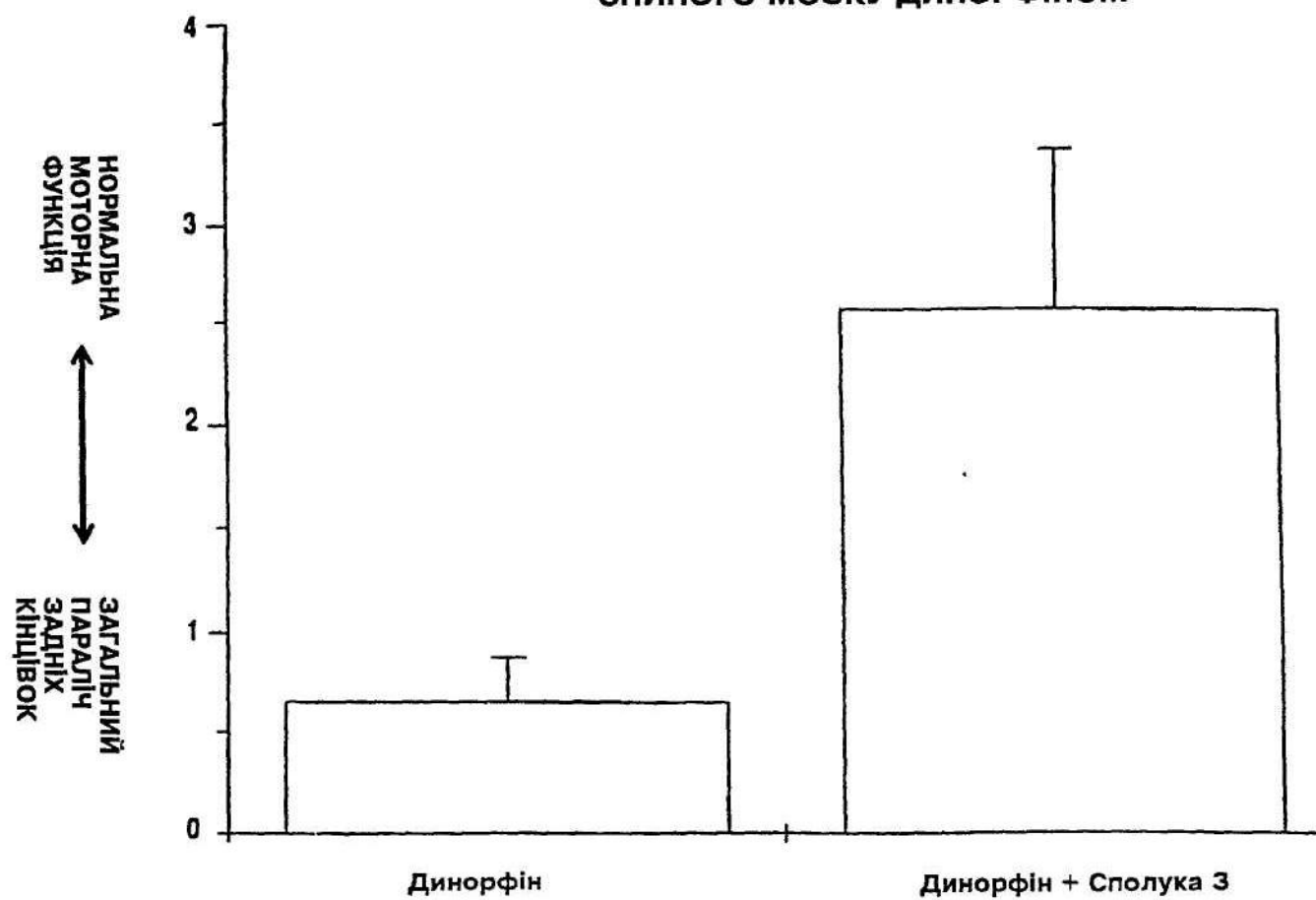
# СПОЛУКА 3 ЗАХИЩАЄ МИШЕЙ CD1 ВІД МРТР-ТОКСИЧНОСТІ



Фіг.11

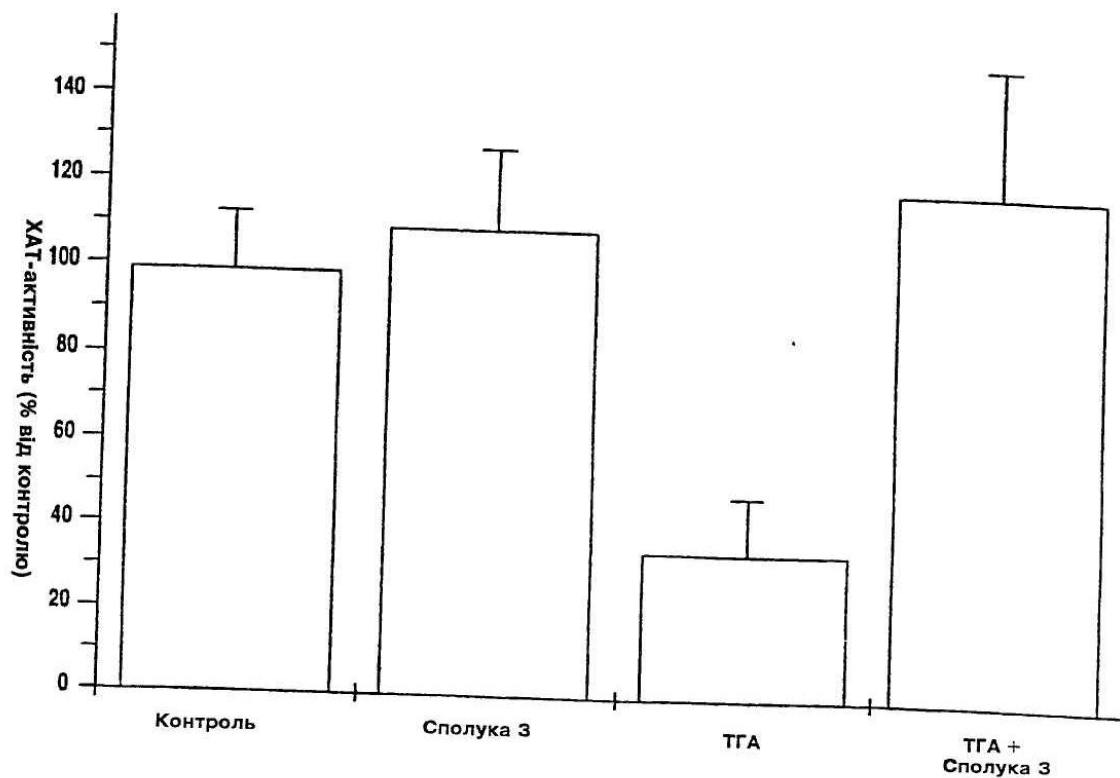


СПОЛУКА 3 Є НЕЙРОЗАХИСНОЮ  
ПРИ МОДЕЛЮВАННІ УРАЖЕННЯ  
СПИНОГО МОЗКУ ДИНОРФІНОМ



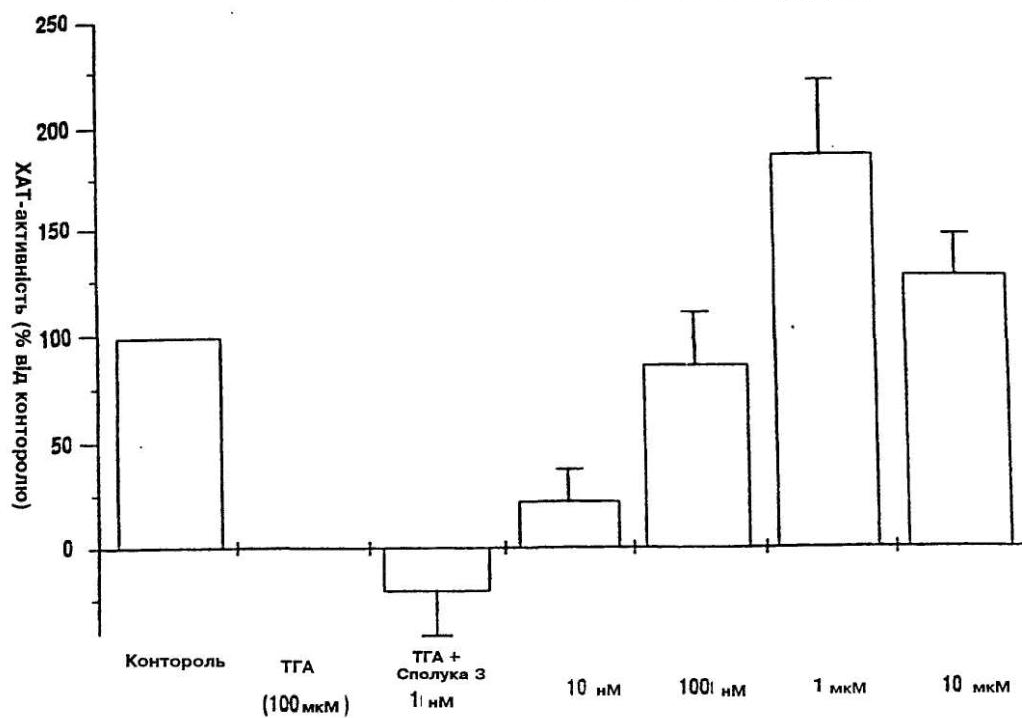
ФІГ.12

**СПОЛУКА 3 Є НЕЙРОЗАХИСНОЮ  
ПРИ МОДЕЛЮВАННІ БАС НА  
КУЛЬТУРІ СПИННОГО МОЗКУ**



Фіг.13

**СПОЛУКА 3 Є НЕЙРОЗАХИСНОЮ ПРИ  
МОДЕЛЮВАННІ БАС НА ОРГАНОТИПІЧНІЙ  
КУЛЬТУРІ СПИННОГО МОЗКУ :  
ВИВЧЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ДОЗИ**



Фіг.14

