

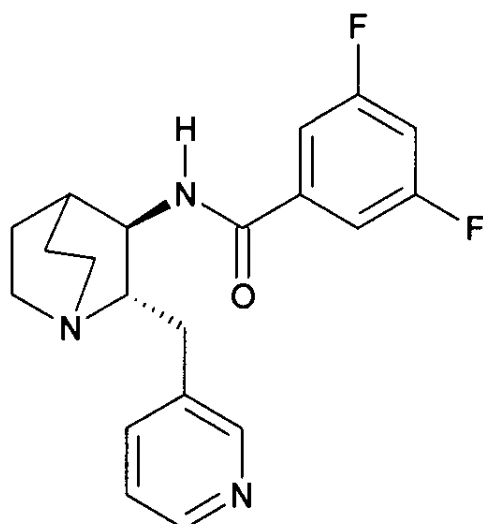


УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **105204** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)**C07D 453/02** (2006.01)**A61K 31/439** (2006.01)**A61P 3/00****A61P 25/02** (2006.01)**A61P 25/04** (2006.01)**A61P 25/06** (2006.01)**A61P 25/28** (2006.01)**A61P 29/00**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2011 10371****(22)** Дата подання заявки: **25.01.2010****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.04.2014****(31)** Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **61/147,260****(32)** Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **26.01.2009****(33)** Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **US****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **25.11.2011, Бюл.№ 22****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2014, Бюл.№ 8****(86)** Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/US2010/021926,
25.01.2010****(72)** Винахідник(и):**Беншеріф Меруан (US),
Федоров Ніколай (US),
Хаузер Террі (US),
Джордан Крістен (US),
Летчуорт Шерон Рей (US),
Мазуров Анатолій (US),
Муньос Хуліо А. (US),
Спик Джейсон (US),
Йоханнес Деніел (US)****(73)** Власник(и):**TARGACEPT, ІНК.,
200 East First Street, Suite 300, Winston-
Salem, NC 27101, United States of America
(US)****(74)** Представник:**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:**US 2004/002513 A1 (MAZUROV ANATOLY A
[US] ET AL), 01.01.2004
WO 2009/140201 A1 (TARGACEPT INC [US];
TOLER STEVE [US]; LIPPIELLO PATRICK M
[US]; CULLIS), 19.11.2009****(54) (2S,3R)-N-2((3-ПІРИДИНІЛ)МЕТИЛ)-1-АЗАБІЦИКЛО[2.2.2]ОКТ-3-ИЛ)-3,5-ДИФТОРБЕНЗАМІД ТА
ЙОГО ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ****(57)** Реферат:

Даний винахід стосується сполук, що зв'язуються з нейронними нікотинними ацетилхоліновими рецепторами і модулюють їхню активність, способів одержання зазначених сполук, фармацевтичних композицій, що містять дані сполуки, і способів застосування цих сполук для лікування широкої розмаїтості станів і розладів, включаючи ті, котрі пов'язані з дисфункцією центральної нервової системи (ЦНС).

UA 105204 C2



Галузь, до якої належить винахід

Даний винахід належить до сполук, що зв'язуються з нейронними нікотинними ацетилхоліновими рецепторами і модулюють їх, до способів одержання зазначених сполук, до фармацевтичних композицій, що містять дані сполуки, і до способів застосування цих сполук для лікування широкої розмаїтості станів і розладів, включаючи ті, які зв'язані з дисфункцією центральної нервової системи (ЦНС).

Попередній рівень техніки

Терапевтичний потенціал сполук, що націлені на нейронні нікотинні рецептори (NNR), також відомі як нікотинні ацетилхолінові рецептори (nAChR), був предметом декількох оглядів (дивіться, наприклад, Breining et al., Ann. Rep. Med. Chem. 40: 3 (2005), Hogg and Bertrand, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 3: 123 (2004), Suto and Zacharias, Expert Opin. Ther. Targets 8: 61 (2004), Dani et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 1837 (2004), Bencherif and Schmitt, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 349 (2002)). Серед видів показань, із приводу яких ліганди NNR були запропоновані як лікувальні засоби, є когнітивні розлади, включаючи хворобу Альцгеймера, розлад з дефіцитом уваги і шизофренія (Newhouse et al., Curr. Opin. Pharmacol. 4: 36 (2004), Levin and Rezvani, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 423 (2002), Graham et al., Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 387 (2002), Ripoll et al., Curr. Med. Res. Opin. 20(7): 1057 (2004), і McEvoy and Allen, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 433 (2002)); біль і запалення (Decker et al., Curr. Top. Med. Chem. 4(3): 369 (2004), Vincler, Expert Opin. Invest. Drugs 14(10): 1191 (2005), Jain, Curr. Opin. Inv. Drugs 5:76 (2004), Miao et al., Neuroscience 123: 777 (2004)); депресія і тривога (Shytle et al., Mol. Psychiatry 7: 525 (2002), Damaj et al., Mol. Pharmacol. 66: 675 (2004), Shytle et al., Depress. Anxiety 16:89 (2002)); нейродегенерація (O'Neill et al., Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 399 (2002), Takata et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 306: 772 (2003), Marrero et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 309:16 (2004)); хвороба Паркінсона (Jonhala and Buccafusco, J. Neurosci. Res. 66: 565 (2001)); аддикція (Dwoskin and Crooks, Biochem. Pharmacol. 63: 89 (2002), Coe et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 15(22): 4889 (2005)); ожиріння (Li et al., Curr. Top. Med. Chem. 3: 899 (2003)); і синдром Туретта (Sacco et al., J. Psychopharmacol. 18(4): 457 (2004), Young et al., CHn. Then 23(4): 532 (2001)).

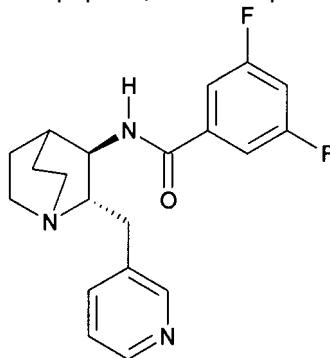
Існує гетерогенний розподіл підтипів nAChR і в центральній, і в периферичній нервовій системі. Наприклад, підтипами nAChR, що переважають у мозку хребетних, є підтипи $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ і $\alpha 3\beta 2$, тоді як підтипом, що переважає у вегетативних гангліях, є $\alpha 3\beta 4$, а переважними підтипами нервово-м'язових синапсів є $\alpha 1\beta 1\delta \gamma$ і $\alpha 1\beta 1\delta \epsilon$ (дивіться Dwoskin et al., Exp. Opin. Ther. Patents 10: 1561 (2000) і Holliday et al. J. Med. Chem. 40(26), 4169 (1997)).

Обмеженням використання деяких нікотинних сполук є те, що вони зв'язані з різноманітними небажаними побічними ефектами внаслідок неспецифічного зв'язування з множиною підтипів nAChR. Наприклад, зв'язування з м'язовими і гангліонарними підтипами nAChR, і їхня стимуляція може привести до побічних ефектів, що можуть обмежити застосовність конкретної сполуки, що зв'язується з нікотинними рецепторами, як терапевтичного засобу.

Сполуки за даним винаходом виявляють високий ступінь специфічного зв'язування з підтипом $\alpha 7$ nAChR і низьку афінність до підтипу $\alpha 4\beta 2$, а також гангліонарних і м'язових підтипів nAChR. Таким чином, дані сполуки можуть служити як терапевтичні модулятори $\alpha 7$ nAChR у пацієнтів, що потребують такого лікування, не викликаючи побічних ефектів, визначуваних неспецифічним зв'язуванням з підтипами nAChR.

Короткий опис суті винаходу

Даний винахід включає (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятну сіль.



Формула I

Сполука за даним винаходом зв'язується з високою афінністю з NNR підтипу $\alpha 7$ і виявляє

селективність до даного підтипу щодо підтипу $\alpha 4\beta 2$ NNR, а також відносно гангліонарних і м'язових підтипів.

Даний винахід включає фармацевтичні композиції, що містять сполуку по даному винаходу або її фармацевтично прийнятну сіль. Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть застосовуватися для лікування або профілактики широкої розмаїтості станів або розладів, включаючи ті розлади, що характеризуються дисфункцією нікотинової холінергічної нейропередачі або дегенерацією нікотинових холінергічних нейронів.

Даний винахід включає спосіб лікування або профілактики розладів і дисфункцій, таких як розлади і дисфункції ЦНС, запалення, запальної реакції, зв'язаної з бактеріальною і/або вірусною інфекцією, болю, метаболічного синдрому, аутоімунних розладів або інших розладів, більш детально описаних у даній заявці. Даний винахід включає спосіб модулювання неоваскуляризації. Способи включають введення суб'єкту терапевтично ефективної кількості сполуки за даним винаходом, включаючи її сіль, або фармацевтичну композицію, що включає такі сполуки. Крім того, даний винахід включає сполуки, що можуть застосовуватися як діагностичні агенти і в дослідженнях зв'язування рецепторів, як описано в даній заявці.

Зазначені вище й інші аспекти даного винаходу в подальших деталях пояснюються нижче в докладному описі і представлених прикладах.

Короткий опис креслень

На фіг. 1 зображене розпізнавання нового об'єкту (NOR) залежно від дози (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі. Статистично значний ефект спостерігався для доз, таких низьких, як 0,1 мг/кг.

На фіг. 2 зображені дані, використовувані для визначення мінімальної ефективної дози для розпізнавання нового об'єкту (NOR) після введення (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі. Статистично значний ефект спостерігався для доз, таких низьких, як 0,03 мг/кг.

На фіг. 3 зображене розпізнавання нового об'єкту (NOR) у динаміці в часі після 3-го введення 0,1 мг/кг (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі. Статистично значний ефект спостерігався для доз до 6 год. після введення.

На фіг. 4 зображене розпізнавання нового об'єкту (NOR) у динаміці в часі після 3-го введення 0,3 мг/кг (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі. Статистично значний ефект спостерігався для доз до 18 год. після введення.

На фіг. 5 зображена залежність реакції від дози для кожної зі сполуки А і сполуки В при взаємодії з нікотиновими рецепторами $\alpha 7$.

На фіг. 6 зображена електрофізіологічна реакція на спільне застосування кожної зі сполуки А і сполуки В з ацетилхоліном (ACh).

На фіг. 7А, 7В і 7С зображена електрофізіологічна реакція для взаємодії сполуки А з ACh, відносно активації нікотинового рецептора $\alpha 7$.

На фіг. 8А, 8В і 8С зображена електрофізіологічна реакція для взаємодії сполуки В з ACh, відносно активації нікотинового рецептора $\alpha 7$.

Фіг. 9 представляє рентгенограму для моногідрохлориду сполуки А.

Фіг. 10 представляє кристалічну структуру моногідрохлориду сполуки А.

Фіг. 11 представляє рентгенограму для гемі-галактарату сполуки А.

На фіг. 12 ілюструється накладення шести (6) різних рентгенограм для солей по скринінгу солей сполуки А.

Фіг. 13 ілюструє результати оцінки (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду при термічній гіпералгезії, викликаній CFA (повним ад'ювантом Фрейнда). Кожну з тестованої речовини, морфіну і носія, вводили підшкірно групам з 8 щурів SD через 24 години після ін'єкції CFA. Термічну гіпералгезію виконували перед ін'єкцією CFA (pre-CFA), перед лікуванням і через 1 годину після підшкірної ін'єкції. Для порівняння груп лікування і контрольної групи, що одержувала носій, використовували односторонній варіаційний аналіз ANOVA з наступним застосуванням критерію Даннетта. Відмінності вважалися значимими при рівні $*P < 0,05$.

Фіг. 14 ілюструє результати оцінки по фон Фрею, що вказують на те, що (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід ефективний у зменшенні діабетичного нейрпатичного болю в дозах 1 мг/кг і 10 мг/кг, у порівнянні з групою, яка одержувала носій.

Фіг. 15 ілюструє порівняння збільшення маси тіла як значно нижчу в гладких мишей, що отримували лікування (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-

дифторбензамідом («db-тестована сполука»). Слід зазначити, що у тварин, яким спільно вводили MLA з (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом, не вдалося виявити зниження збільшення маси тіла, що виявлялося в страждаючих на ожиріння щурів, яким вводили один (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід.

Фіг. 16 ілюструє, що середнє споживання корму було значно нижче в гладких мишей, що отримували лікування (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом («db-тестована сполука»), ніж у страждаючих на ожиріння контролів. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід («db-тестована сполука») не впливав на споживання корму худими мишами. У тварин, яким спільно вводили MLA з (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом, не вдалося виявити зниженого добового середнього споживання корму, що виявлялося страждаючими на ожиріння щурами, яким вводили один (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід.

Фіг. 17 ілюструє, що (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно інгібував рівні глюкози в плазмі натще в страждаючих на ожиріння мишей («db-тестована сполука»). Однак цей ефект не усувався спільним введенням з MLA.

Фіг. 18 ілюструє, що (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно інгібував рівні глікозилизованого HbA1c у страждаючих на ожиріння мишей («db-тестована сполука»). Зниження глікозилизованого HbA1c (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом послаблялося спільним введенням MLA.

Фіг. 19 ілюструє, яка (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно знижував вміст протизапального цитокіну TNF альфа (фактор пухлинного некрозу альфа) у страждаючих на ожиріння мишей («db-тестована сполука»). Ці ефекти інгібувались спільним введенням альфа7 антагоніста MLA.

Фіг. 20 ілюструє, що (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід приводив до значно нижчих рівнів тригліцеридів у страждаючих на ожиріння мишей («db-тестована сполука»), у порівнянні з контролями «db», які лікувалися носієм. Зниження вмісту тригліцеридів (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом не послаблювалося спільним введенням з MLA.

Фіг. 21 ілюструє вплив (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на % змін реакції Penh на провокаційну пробу метахоліном у сенсibilізованих овальбуміном мишей. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останню дозу вводили за 30 хв до провокаційної проби з MCh (метахоліном) на 26-й день. Визначали величини Penh. Застосовували односторонній варіаційний аналіз ANOVA з наступним застосуванням критерію Даннетта для порівняння імунізованих OVA груп, що одержували носій, і груп, що одержувала інші види лікування. *P<0,05, у порівнянні з контролем OVA-носія.

Фіг. 22 ілюструє вплив (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на кількості лейкоцитів і лейкоцитарні формули в мишей, сенсibilізованих овальбуміном. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останню дозу вводили за 30 хв до збирання рідини бронхоальвеолярного лаважу на 26-й день. Визначали загальну кількість лейкоцитів і лейкоцитарні формули. Застосовували односторонній варіаційний аналіз ANOVA з наступним застосуванням критерію Даннетта для порівняння імунізованих OVA груп, що одержували носій, і груп, що одержувала інші види лікування. *P<0,05 у порівнянні з контролем OVA-носія.

Фіг. 23 ілюструє вплив (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на % кількості лейкоцитів і лейкоцитарні формули в мишей, сенсibilізованих овальбуміном. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останню дозу вводили за 30 хв до збирання рідини бронхоальвеолярного лаважу на 26-й день. Визначали загальну кількість лейкоцитів і лейкоцитарні формули. Застосовували односторонній варіаційний аналіз ANOVA з наступним застосуванням критерію Даннетта для порівняння імунізованих OVA груп, що одержували носій, і груп, що одержувала інші види лікування.

*P<0,05 у порівнянні з контролем OVA-носія.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Визначення

Наступні визначення призначені для роз'яснення, а не обмеження, визначуваних термінів.

5 Якщо конкретний термін, використовуваний у даному описі, спеціально не визначений, то такий термін не повинен вважатися невизначеним. Скоріше, терміни використовуються в їхніх прийнятих значеннях.

Використовуваний у даному описі термін «сполука (сполуки)» може використовуватися для позначення форми вільної основи або, альтернативно, сольової форми (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, залежно від контексту, що

10 буде повністю очевидно. Фахівці в даній галузі зможуть диференціювати відмінність.

Для полегшення посилання, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятна сіль, також називається сполукою А. Крім того, структурний аналог використовується в даному описі з метою порівняння

15 (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-4-фторбензамід або його фармацевтично прийнятна сіль називається сполукою В. Сполука В являє собою один ізомер рацемічної суміші, як описано в публікації WO 04/76449, включеній в даний опис шляхом посилання.

Використовуваний у даному описі термін «фармацевтично прийнятний» стосується носія (носіїв), розріджувача (розріджувачів), ексципієнта (ексципієнтів) або сольових форм сполуки за даним винаходом, що сумісні з іншими інгредієнтами композиції і не чинять шкідливого впливу фармацевтичної композиції на реципієнта.

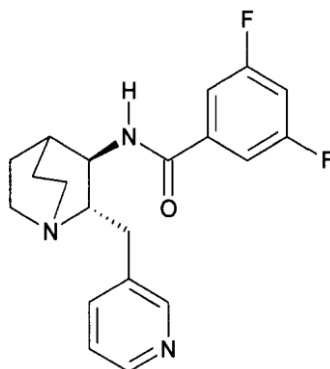
Використовуваний у даному описі термін «фармацевтична композиція» належить до сполуки за даним винаходом, необов'язково змішаної з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або ексципієнтами. Фармацевтичні композиції переважно виявляють такий ступінь стійкості до умов навколишнього середовища, що робить їх прийнятними для цілей промислового виробництва і продажу.

Використовуваний у даному описі термін «ефективна кількість», «терапевтично ефективна кількість», «терапевтична кількість» або «ефективна доза» належить до кількості сполуки за даним винаходом, достатньому для викликання бажаних фармакологічних або терапевтичних ефектів, приводячи, таким чином, до ефективного запобігання або лікування розладу. Запобігання розладу може проявлятися затримкою або запобіганням прогресування розладу, а також початку симптомів, пов'язаних з розладом. Лікування розладу може проявлятися зменшенням або усуненням симптомів, інгібуванням або усуненням прогресування розладу, а також будь-яким іншим внеском у гарне самопочуття пацієнта.

Як більш детально буде обговорено нижче і з посиланням на фіг. 1, 2, 3 і 4, статистично значний ефект спостерігається при настільки низьких дозах сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, як 0,03 мкг/кг, включаючи ефекти, що спостерігаються протягом періоду до 18 год. після введення. Ефективна доза може варіюватися залежно від таких факторів, як стан пацієнта, тяжкість симптомів розладу і спосіб введення фармацевтичної композиції. Таким чином, використовувана в даному винаході ефективна доза може складати менше ніж 100 мг, переважно, менше ніж 50 мг, більш переважно, менше ніж 10 мг, а найбільш переважно, менше ніж 1 мг. Зазначені ефективні дози звичайно представляють кількість, що вводиться у вигляді однієї дози, або у вигляді однієї або більше доз, уведених протягом 24-годинного періоду.

45 Сполуки

Один аспект даного винаходу включає сполуку (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятну сіль.



Формула I

В одному варіанті здійснення, сполука по суті не містить один або більше з (2R,3S)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, (2R,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду і (2S,3S)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду.

В одному варіанті здійснення, сполука являє собою кислотну-адитивну сіль, де кислота вибрана з хлористоводневої кислоти, метансульфонової кислоти, малеїнової кислоти, фосфорної кислоти, 1-гідрокси-2-нафтоєвої кислоти, маленової кислоти, L-винної кислоти, фумарової кислоти, лимонної кислоти, L-яблучної кислоти, R-мигдальної кислоти, S-мигдальної кислоти, бурштинової кислоти, 4-ацетамідбензойної кислоти, адипінової кислоти, галактарової кислоти, ди-п-толуол-D-винної кислоти, щавлевої кислоти, D-глюкуронової кислоти, 4-гідроксибензойної кислоти, 4-метоксибензойної кислоти, (1S)-(+)-10-камфорсульфонової кислоти, (1R,3S)-(+)-камфорної кислоти і п-толуолсульфонової кислоти, або їхнього гідрату або сольвату. У ще одному варіанті здійснення, молярне відношення кислоти до (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду складає 1:2 або 1:1.

Інший аспект даного винаходу включає сполуку, вибрану з:

моногідрохлориду (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату;
 монофосфату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату;
 моно-4-гідроксибензоату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату; і
 гемі-4-гідроксибензоату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату.

Інший аспект даного винаходу включає сполуку, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід або його фармацевтично прийнятну сіль, що містить менше ніж 25%, переважно, що містить менше ніж 15%, переважно, що містить менше ніж 5%, переважно, що містить менше ніж 2%, переважно, що містить менше ніж 1 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

Інший аспект даного винаходу включає сполуку, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятну сіль, яка є по суті кристалічною. Інший аспект включає поліморфну форму гідрохлориду (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, що характеризується рентгенограмою, яка містить один або більше піків у межах $\pm 0,5$ градуса 2θ наступних піків:

20
8,4
8,8
11,9
13,2
15,2
16,0
17,6

18,4
18,9
19,9
20,1
21,3
23,1
25,4
26,2

Інший аспект даного винаходу являє собою поліморфну форму гідрохлориду (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, що характеризується рентгенограмою, яка по суті відповідає фіг. 9.

Інший аспект даного винаходу включає застосування сполуки за даним винаходом при одержанні лікарського засобу для лікування або профілактики захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$. Інший аспект даного винаходу включає спосіб лікування або профілактики захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$, що включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки за даним винаходом. Інший аспект даного винаходу включає сполуку за даним винаходом для застосування при лікуванні або профілактиці захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$. В одному варіанті здійснення, захворювання або дисфункція вибрані з групи, яка складається з:

i) болю, включаючи один або більше з гострого, неврологічного, запального, нейропатичного, хронічного болю, сильного хронічного болю, післяопераційного болю, болю, зв'язаного зі злоякісними новоутвореннями, стенокардією, нирковою або печінковою колькою, менструацією, мігренню, подагрою, артритом, ревматоїдним захворюванням, тендо-синовіїтом, васкулітом, тригемінальною або герпетичною невралгією, болю при діабетичній нейропатії, каузалгії, болю в поперековій області, синдромах деаферентації й авульсії плечового сплетення;

ii) метаболічного синдрому, збільшення маси тіла, цукрового діабету I типу, цукрового діабету II типу або діабетичної нейропатії;

iii) запалення, включаючи одне або більше захворювань із псоріазу, астми, атеросклерозу, ідіопатичного пневмосклерозу, хронічного і гострого запалення, ендотоксемії, подагри, гострої псевдоподагри, гострого подагричного артрити, артрити, ревматоїдного артрити, остеоартрити, відторгнення алотрансплантата, хронічного відторгнення трансплантата, астми, атеросклерозу, легеневого ушкодження, залежного від мононуклеарів-фагоцитів atopічного дерматиту, хронічного обструктивного легеневого захворювання, гострого респіраторного дистрес-синдрому дорослих, гострого торакального синдрому при серповидноклітинному захворюванні, запальних кишкових захворювань, хвороби Крона, виразкового коліту, гострого холангіту, афтозного стоматиту, дивертикуліту, гломерулонефриту, вовчакового нефриту, тромбозу і реакції трансплантат проти хазяїна; і

iv) когнітивних порушень, включаючи одне або більше з вікового порушення пам'яті, незначного когнітивного порушення, пресенільної деменції, хвороби Альцгеймера з раннім початком, сенільної деменції, деменції типу Альцгеймера, деменції типу Альцгеймера від легкого до помірного ступеня тяжкості, деменції з тільцями Леві, судинної деменції, хвороби Альцгеймера, інсульту, комплексу деменції при СНІДі, розлади з дефіцитом уваги, розлади гіперактивності з дефіцитом уваги, дислексії, шизофренії, шизофреніформного розладу, шизоафективного розладу, когнітивного дефіциту при шизофренії і когнітивної дисфункції при шизофренії.

Інший аспект даного винаходу включає фармацевтичну композицію, що містить сполуку за даним винаходом, і один або більше фармацевтично прийнятних носіїв.

Інший аспект даного винаходу включає спосіб посилення викликаного ацетилхоліном потоку, що включає введення ефективної кількості сполуки за даним винаходом.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід або його фармацевтично прийнятну сіль з посиланням на будь-який із прикладів.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід або його фармацевтично прийнятну сіль для застосування як активної терапевтичної речовини.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає спосіб модулювання NNR у суб'єкта, що цього потребує, за допомогою введення (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі.

Обсяг даного винаходу включає комбінації аспектів і варіантів здійснення.

Поки немає інших вказівок, зображені в даному описі структури також призначені для включення сполук, що відрізняються тільки присутністю одного або більше ізотопно збагачених атомів. Наприклад, сполуки, що мають структуру за даним винаходом, за винятком заміни атома водню дейтерієм або тритієм, або заміни атома вуглецю атомами ^{13}C або ^{14}C , або заміною атома азоту атомом ^{15}N , або заміною атома кисню атомом ^{17}O або ^{18}O , знаходяться в межах обсягу винаходу. Такі ізотопно мічені сполуки можуть застосовуватися як інструменти дослідження або діагностики.

Даний винахід включає сіль або сольват (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, включаючи їхні комбінації, такі як сольват або сіль. Сполуки за даним винаходом можуть існувати в сольватованій, наприклад, гідратованій, а також несольватованій формах, і даний винахід охоплює всі такі форми.

Звичайно, але не абсолютно, солі за даним винаходом являють собою фармацевтично прийнятні солі. Солі, охоплювані терміном «фармацевтично прийнятні солі», належать до нетоксичних солей сполук за даним винаходом.

Приклади прийнятних фармацевтично прийнятних солей включають адитивні солі неорганічних кислот, такі як хлорид, бромід, сульфат, фосфат і нітрат; адитивні солі органічний кислот, такі як ацетат, галактарат, пропіонат, сукцинат, лактат, глікоглат, малат, тартрат, цитрат, малеат, фумарат, метансульфонат, п-толуолсульфонат і аскорбат; солі з кислотними амінокислотами, такі як аспартат і глутамат; солі лужних металів, такі як сіль натрію і сіль калію; солі лужноземельних металів, такі як сіль магнію і сіль кальцію; сіль амонію; органічні основні солі, такі як сіль триметиламіну, сіль триетиламіну, сіль піридину, сіль піколіну, сіль дициклогексиламіну і сіль N,N'-добензилетилендіаміну; і солі з основними амінокислотами, такі як сіль лізину і сіль аргініну. Солі можуть у деяких випадках являти собою гідрату або етанолсольвати.

Як відзначено в даному описі, даний винахід включає визначені сполуки, які конкретно ідентифіковані в даному описі. Сполуки за даним винаходом можуть бути отримані різноманітними способами, включаючи добре відомі стандартні синтетичні способи. Ілюстративні стандартні синтетичні способи викладені нижче, і потім визначені сполуки за винаходом одержують у робочих прикладах.

У всіх описаних нижче прикладах, за необхідності, відповідно до загальних принципів синтетичної хімії, для чутливих або реактивних груп використовуються захисні групи. Маніпуляції з захисними групами здійснюються відповідно до стандартних способів органічного синтезу (дивіться, наприклад, публікацію T.W. Green and P. G.M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, 3^d Edition, John Wiley & Sons, New York (1999)). Ці групи видаляють на зручній стадії синтезу сполуки з використанням способів, які повністю очевидні для фахівців у даній галузі. Вибір способів, а також умов реакції і порядку їхнього виконання, повинні узгоджуватися з одержанням сполук за даним винаходом.

Даний винахід також належить до способу синтезу сполук, які можуть застосовуватися як проміжні сполуки при одержанні сполук за даним винаходом, поряд зі способами їхнього одержання.

Сполуки можуть бути отримані відповідно до таких способів з використанням доступних вихідних матеріалів і реагентів. У цих реакціях можуть використовуватися варіанти, що самі по собі відомі фахівцям у даній галузі, але не згадуються більш детально.

Сольові форми

Один аспект даного винаходу належить до нових сольових форм (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду.

(2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у формі вільної основи являє собою тверду речовину з обмеженою розчинністю у воді. Однак вільна основа взаємодіє і з неорганічними, і з органічними кислотами для одержання визначених кислотно-адитивних солей, що мають фізичні властивості, які мають переваги для одержання фармацевтичних композицій, такі як кристалічність, розчинність у воді і стійкість відносно хімічного розкладання. Звичайно, зазначені сольові форми являють собою фармацевтично прийнятні солі.

Даний винахід включає фармацевтично прийнятні солі (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду. Приклади придатних фармацевтично прийнятних солей включають адитивні солі неорганічних кислот, такі як хлорид, бромід, сульфат, фосфат і нітрат; адитивні солі органічний кислот, такі як ацетат, галактарат, пропіонат, сукцинат, лактат, глікоглат, малат, тартрат, цитрат, малеат, фумарат, метансульфонат, п-толуолсульфонат і аскорбат; солі з кислотними амінокислотами, такі як аспартат і глутамат; солі лужних металів, такі як сіль натрію і сіль калію; солі лужноземельних металів, такі як сіль магнію і сіль кальцію; сіль амонію; органічні основні солі, такі як сіль триметиламіну, сіль триетиламіну, сіль піридину, сіль піколіну, сіль дициклогексиламіну і сіль N,N'-добензилетилендіаміну; і солі з основними амінокислотами, такі як сіль лізину і сіль аргініну. Солі можуть у деяких випадках являти собою гідрати або етанолсольвати.

Один аспект даного винаходу включає кислотно-адитивні солі (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, де кислота вибрана з хлористоводневої кислоти, метансульфонової кислоти, малеїнової кислоти, фосфорної кислоти, 1-гідрокси-2-нафтоїної кислоти, маленової кислоти, L-винної кислоти, фумарової кислоти, лимонної кислоти, L-яблучної кислоти, R-мигдальної кислоти, S-мигдальної кислоти, бурштинової кислоти, 4-ацетамідбензойної кислоти, адипінової кислоти, галактарової кислоти, ди-п-толуіл-D-винної кислоти, щавлевої кислоти, D-глюкуронової кислоти, 4-гідроксибензойної

кислоти, 4-метоксибензойної кислоти, (1S)-(+)-10-камфорсульфонової кислоти, (1R,3S)-(+)-камфорної кислоти і п-толуолсульфонової кислоти. Даний винахід також включає гідрати і сольвати зазначених сольових форм.

5 Стехіометрія солей, що входять у даний винахід, може варіюватися. Наприклад, звичайно молярне відношення кислоти до (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду складає 1:2 або 1:1, але можливі інші співвідношення, такі як 3:1, 1:3, 2:3, 3:2 і 2:1.

10 В одному варіанті здійснення даного винаходу, сіль має стехіометрію кислоти до (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду 1:2. В іншому варіанті здійснення, сіль має стехіометрію кислоти до (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду 1:1.

15 Як відзначено в даному описі, залежно від способу, яким утворені солі, описані в даній заявці, солі можуть мати кристалічні структури, які оклюднують розчинники, що присутні під час утворення солі. Так, солі можуть зустрічатися у вигляді гідратів і інших сольватів стехіометрії розчинника, що варіюється, відносно (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід або його гідрат або сольват.

20 Інший варіант здійснення даного винаходу включає моногідрохлорид (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрат або сольват.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає монофосфат (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрат або сольват.

Інший варіант здійснення даного винаходу включає моно-4-гідроксибензоат (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрат або сольват.

25 Інший варіант здійснення даного винаходу включає гемі-4-гідроксибензоат (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрат або сольват.

Ще один аспект даного винаходу включає способи одержання солей. Точні умови, у яких утворюються солі, можуть визначатися емпірично. Солі можуть бути отримані кристалізацією в регульованих умовах.

30 Один варіант здійснення даного винаходу включає спосіб одержання (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі, що містить менше ніж 25%, переважно, менше ніж 15%, більше переважно, менше ніж 5%, ще більше переважно, менше ніж 2%, а найбільше переважно, менше ніж 1 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

Спосіб одержання сольових форм може варіюватися. Одержання сольових форм (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду звичайно включає:

40 (i) змішування вільної основи або розчину вільної основи прийнято чистого (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в прийнятному розчиннику з кожної з кислот у чистій або формі у вигляді розчину кожної з кислот у прийнятному розчиннику, звичайно від 0,5 до 1 екв. кислоти;

(ii) (a) за необхідності, охолодження отриманого сольового розчину, щоб викликати осадження;

або

45 (ii) (b) додавання прийнятного антирозчинника, щоб викликати осадження;

або

(ii) (c) випарювання першого розчинника і додавання нового розчинника і повторення стадії

(ii) (a) або стадії (ii) (b);

i

50 (iii) фільтрацію і збирання солі.

Використовувані характеристики: стехіометрія, суміш розчинників, концентрація розчинених речовин і температура можуть варіюватися. Репрезентативні розчинники, що можуть використовуватися для одержання або перекристалізації сольових форм, включають без обмеження етанол, метанол, пропанол, ізопропіловий спирт, ізопропілацетат, ацетон, етилацетат, толуол, воду, метилетилкетон, метилізобутилкетон, простий трет-бутилметиловий ефір, тетрагідрофуран, дихлорметан, н-гептан і ацетонітрил.

60 Декілька з зазначених солей демонструють стійкість, достатню для встановлення їхньої перспективності при одержанні фармацевтичних препаратів. Така стійкість може бути продемонстрована різноманітними шляхами. Схильність до нагромадження і вивільнення атмосферної вологи може оцінюватися динамічною сорбцією пари (DVS).

Загальні способи синтезу

Синтез (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду досягається опосередкованим О-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N,1-тетраметилуронійгексафторфосфатом (HBTU) сполученням (2S,3R)-3-аміно-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]октану (отриманого, як описано в документі РСТ/US08/71872, включеному в даний опис шляхом посилання відносно такого синтезу) і 3,5-дифторбензойної кислоти, як ілюструється на схемі 1.

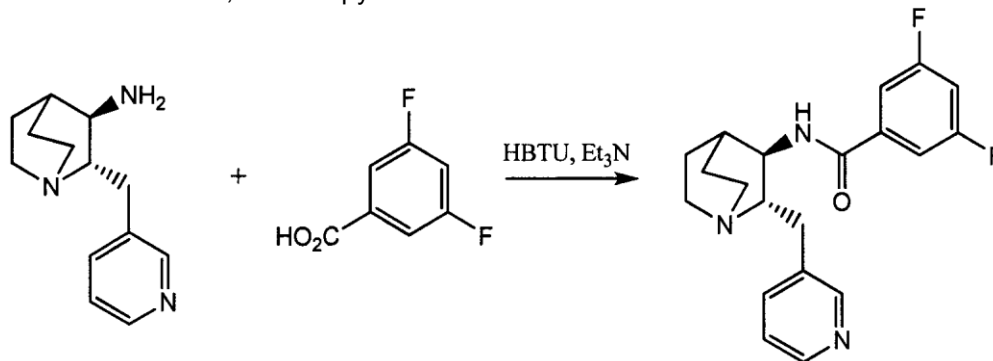


Схема 1

Синтез (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду може бути аналогічним чином досягнутий шляхом використання інших агентів для активації карбонової кислоти. Наприклад, використання таких активуючих агентів, як N,N'-дициклогексилкарбодіїмід (DCC), (бензотриазол-1-ілокси)трис(диметиламіно), гексафторфосфат (BOP), (бензотриазол-1-ілокси)трипіролідинофосфонійгексафторфосфат (PyBOP), О-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-біс(тетраметилен)уроній гексафторфосфат (HBPYU), О-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуроній гексафторфосфат (HBTU), О-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуроній тетрафторборат (TBTU) і (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід) (EDCI), з 1-гідроксибензотриазолом (HOBt), а також сполуки, описані, наприклад, у публікації Kiso and Yajima, *Peptides*, pp 39-91, Academic Press, San Diego, CA (1995), також добре відомі фахівцям у даній галузі.

Способи лікування

Сполуки за даним винаходом здатні селективно зв'язуватися з $\alpha 7$ NNR і модулювати їхню активність. Отже, дані сполуки можуть застосовуватися для профілактики або лікування різних станів або розладів, для яких були запропоновані інші типи нікотинових сполук, або, як показано, можуть застосовуватися як терапевтичні засоби для лікування таких захворювань, як розлади ЦНС, запалення, запальна реакція, зв'язана з бактеріальною і/або вірусною інфекцією, біль, метаболічний синдром, аутоімунні розлади або інші розлади, більш детально описані далі в даній заявці. Ці сполуки можуть застосовуватися для модулювання неоваскуляризації і як діагностичні засоби в дослідженнях зв'язування рецепторів (in vitro і in vivo). Такі терапевтичні й інші положення описані, наприклад, у публікаціях Williams et al., *Drug News Perspec.* 7(4): 205 (1994), Arneric et al., *CNS Drug Rev.* 1(1): 1-26 (1995), Arneric et al., *Exp. Opin. Invest. Drugs* 5(1): 79-100 (1996), Bencheh et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1413 (1996), Lippielto et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279: 1422 (1996), Damaj et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 390 (1999); Chiari et al., *Anesthesiology* 91: 1447 (1999), Lavand'homme and Eisenbach, *Anesthesiology* 9T. 1455 (1999), Holladay et al., *J. Med. Chem.* 40(28): 4169-94 (1997), Bannon et al., *Science* 279: 77 (1998), РСТ WO 94/08992, РСТ WO 96/31475, РСТ WO 96/40682, і в патентах США: № 5583140, виданому Bencherif et al., № 5597919, виданому Dull et al., № 5604231, виданому Smith et al., і № 5852041, виданому Cosford et al., і інших посиланнях, раніше перерахованих у даному описі.

Розлади ЦНС

Сполуки за винаходом і їхні фармацевтичні композиції можуть застосовуватися при лікуванні або профілактиці різноманітних розладів ЦНС, включаючи нейродегенеративні розлади, нейропсихіатричні розлади, неврологічні розлади і різні види аддикції. Сполуки за винаходом і їхні фармацевтичні композиції можуть застосовуватися для лікування або профілактики когнітивних дефіцитів і дисфункцій, вікових і інших; розладів уваги і деменцій, включаючи ті, котрі викликані інфекційними агентами або метаболічними розладами; для забезпечення нейропротекції; для лікування судом і множинних церебральних інфарктів; для лікування розладів настрою, компульсивних і зв'язаних з наркотичною й іншою залежністю видів поведінки; для забезпечення анальгезії; для боротьби з запаленням, таким як опосередковане цитокінами і ядерним фактором каппа В; для лікування запальних розладів; для забезпечення полегшення болю; і для лікування інфекцій, як антиінфекційні засоби для лікування

бактеріальних, грибкових і вірусних інфекцій. Серед розладів, захворювань і станів, для профілактики яких можуть застосовуватися сполуки і фармацевтичні композиції за даним винаходом є: вікове порушення пам'яті (AAMI), незначне когнітивне порушення (MCI), вікове зниження когнітивної функції (ARCD), пресенільну деменцію, хворобу Альцгеймера з раннім початком, сенільну деменцію, деменції типу Альцгеймера, хвороби Альцгеймера, когнітивне порушення без деменції (CIND), деменцію з тільцями Леві, деменцію при ВІЛ інфекції, комплекс деменції при СНІДі, судинну деменцію, синдром Дауна, травму голови, травматичне ураження мозку (TBI), деменцію, викликану повторними травмами голови, хворобу Крейтцфельда-Якоба і пріонові захворювання, інсульт, ішемію, розлад з дефіцитом уваги, розлад дефіциту уваги з гіперактивністю, дислексію, шизофренію, шизофреніформний розлад, когнітивну дисфункцію при шизофренії, когнітивні дефіцити при шизофренії, паркінсонізм, включаючи хворобу Паркінсона, постенцефалітичний паркінсонізм, паркінсонізм-деменцію Гаума, лобово-скроневу деменцію типу Паркінсона (FTDP), хворобу Піка, хворобу Неймана-Піка, хворобу Хантінгтона, хорея Хантінгтона, повільну дискінезію, гіперкінезію, прогресуючий супрануклеарний параліч, синдром неспокійних ніг, хвороба Крейтцфельда-Якоба, розсіяний склероз, бічний аміотрофічний склероз (ALS), захворювання рухових нейронів (MND), множинну системну атрофію (MSA), кортикобазальну дегенерацію, синдром Гіллена-Барре (GBS), і хронічну запальну демієлінуючу полінейропатію (CIDP), епілепсію, аутосомну домінуючу нічну лобночасткову епілепсію, манію, тривогу, депресію, передменструальну дисфорію, панічні розлади, булімію, анорексію, нарколепсію, надлишкову сонливість у денний час, біполярні розлади, генералізований тривожний розлад, нав'язливий компульсивний розлад, спалахи люті, розлад у вигляді неслухняності і ворожості в дітей і підлітків, синдром Туретта, аутизм, наркотичну й алкогольную залежність, тютюнову залежність, ожиріння, кахексію, псоріаз, вовчак, гострий холангіт, афтозний стоматит, виразки, астму, виразковий коліт, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, спастичну дистонію, діарею, запор, дивертикуліт, вірусний пневмоніт, артрит (включаючи ревматоїдний артрит і остеоартрит), ендотоксемію, сепсис, атеросклероз, ідіопатичний пневмосклероз, гострий біль, хронічний біль, нейропатії, нетримання сечі, цукровий діабет і новоутворення.

Когнітивні порушення або дисфункції можуть бути зв'язані з психіатричними розладами або станами, такими як шизофренія й інші психотичні розлади, включаючи без обмеження психотичний розлад, шизофреніформний розлад, шизоафективний розлад, розлад з маренням, короткий психотичний розлад, розділений психотичний розлад (подвійний психоз) і психотичні розлади внаслідок загальних медичних станів, деменції й інші когнітивні розлади, включаючи без обмеження слабке когнітивне порушення, пресенільну деменцію, хворобу Альцгеймера, сенільну деменцію, деменцію типу Альцгеймера, вікове порушення пам'яті, деменцію з тільцями Леві, судинну деменцію, комплекс деменції при СНІДі, дислексію, паркінсонізм, включаючи хворобу Паркінсона, когнітивне порушення і деменцію при хворобі Паркінсона, когнітивне порушення розсіяного склерозу, когнітивне порушення, викликане травматичним ушкодженням мозку, деменції внаслідок інших загальних медичних станів, тривожні розлади, включаючи без обмеження панічний розлад без агорафобії, панічний розлад з агорафобією, агорафобію без анамнезу панічного розлади, специфічну фобію, соціальну фобію, нав'язливо-компульсивний розлад, посттравматичний стресовий розлад, гострий стресовий розлад, генералізований тривожний розлад і генералізований тривожний розлад внаслідок загального медичного стану, розлади настрою, включаючи без обмеження великий депресивний розлад, дистимічний розлад, біполярну депресію, біполярну манію, біполярний розлад I типу, депресію, зв'язану з манічними, депресивними або змішаними епізодами, біполярний розлад II типу, циклотимічний розлад і розлади настрою внаслідок загальних медичних станів, розлади сну, включаючи без обмеження розлади у вигляді дисомнії, первинне безсоння, первинну гіперсомнію, нарколепсію, розлади у вигляді парасомнії, розлад у вигляді кошмарів, розлад у вигляді нічних страхів, переважно в дітей, і лунатизм, затримку розумового розвитку, розлади навчання, розлади рухових навичок, комунікаційні розлади, первазивні розлади розвитку, дефіцит уваги і розлади соціальної поведінки, розлад дефіциту уваги, розлад дефіциту уваги з гіперактивністю, розлади годування і споживання їжі дитячого віку, дитячого віку або в дорослих, тикові розлади, розлади дефекації і сечовипускання, розлади, пов'язані з вживанням різних речовин, включаючи без обмеження залежність від речовин, зловживання речовинами, інтоксикацію речовинами, абстиненцію внаслідок припинення впливу речовин, розлади, пов'язані з алкоголем, розлади, пов'язані з амфетаміном, або розлади, подібні зв'язаним з амфетаміном, розлади, пов'язані з кофеїном, розлади, пов'язані з маріхуаною, розлади, пов'язані з кокаїном, розлади, пов'язані з галюциногенами, розлади, пов'язані з інгаляційними речовинами, розлади, пов'язані з нікотиним, розлади, пов'язані з опіоїдами, розлади, пов'язані з фенциклідіном, або

розлади, подібні зв'язаним з фенциклідіном, і розлади, пов'язані із седативними, снодійними або анксиолітичними засобами, розлади особистості, включаючи без обмеження нав'язливо-компульсивний розлад особистості і розлади контролю імпульсивності.

Когнітивну функцію можна оцінити по обґрунтованій когнітивній шкалі, такі як, наприклад, когнітивна субшкала Шкали Оцінки Хвороби Альцгеймера (ADAS-cog). Один показник ефективності сполук за даним винаходом в плані поліпшення когнітивної функції може включати вимірювання ступеня зміни стану пацієнта відповідно до такої шкали.

Зазначені вище стани і розлади більш докладно обговорюються, наприклад, у посібнику American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision, Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000. На даний посібник можна також послатися для більш детального опису симптомів і діагностичних ознак, зв'язаних із застосуванням, зловживанням і залежністю від речовин.

Запалення

Відомо, що нервова система, головним чином через блукаючий нерв, регулює величину уродженої імунної відповіді інгібуванням вивільнення макрофагального фактора некрозу пухлини (TNF). Фізіологічний механізм відомий як «холінергічний протизапальний шлях» (дивіться, наприклад, публікацію Tracey, "The inflammatory reflex", Nature 420: 853-9 (2002)). Надлишкове запалення і синтез фактора некрозу пухлини викликають захворюваність і навіть смертність при різноманітних захворюваннях. Ці захворювання включають без обмеження ендотоксемию, ревматоїдний артрит, остеоартрит, псоріаз, астму, атеросклероз, ідіопатичний пневмосклероз і запальне кишкове захворювання.

Запальні стани, які можна лікувати або запобігати введенням сполук описаних у даній заявці, включають, без обмеження, хронічне і гостре запалення, псоріаз, ендотоксемию, подагру, гостру псевдоподагру, гострий подагричний артрит, артрит, ревматоїдний артрит, остеоартрит, відторгнення алотрансплантата, хронічне відторгнення алотрансплантата, астму, атеросклероз, легеневе ушкодження, залежне від мононуклеарів-фагоцитів, ідіопатичний пневмосклероз, atopічний дерматит, хронічне обструктивне легеневе захворювання, респіраторний дистрес-синдром дорослих, гострий торакальний синдром при серповидноклітинному захворюванні, запальне захворювання кишечника, хворобу Крона, виразковий коліт, гострий холангіт, афтозний стоматит, дивертикуліт, гломерулонефрит, вовчаковий нефрит, тромбоз реакцію трансплантат проти хазяїна.

Запальна реакція, зв'язана з бактеріальною і/або вірусною інфекцією

Багато бактеріальних і/або вірусних інфекцій зв'язані з побічними ефектами, що викликаються утворенням токсинів і природної реакції організму на бактерії або віруси і/або токсини. Реакція організму на інфекцію часто включає генерування значної кількості TNF і/або інших цитокінів. Надлишкова експресія цих цитокінів може привести до значного ушкодження, такого як септичний шок (коли бактерії є септичними) ендотоксичний шок, уросепсис і синдром токсичного шоку.

Експресія цитокінів опосередковується NLR і може інгібуватися введенням агоністів або часткових агоністів цих рецепторів. Сполуки, описані в даній заявці, що є агоністами або частковими агоністами цих рецепторів, можуть, отже, застосовуватися для мінімізації запальної реакції, зв'язаної з бактеріальною інфекцією, а також з вірусною і грибковою інфекціями. Приклади таких бактеріальних інфекцій включають сибірську виразку, ботулізм і сепсис. Деякі з цих сполук можуть також мати протимікробні властивості.

Зазначені сполуки можуть також застосовуватися як допоміжна терапія в комбінації з існуючими терапевтичними засобами для усунення бактеріальної, вірусної і грибкової інфекцій, такими як антибіотики, противірусні і протигрибкові засоби. Антитоксини можуть також застосовуватися для зв'язування токсинів, що продукуються інфекційними агентами, і забезпечують можливість проходження зв'язаних токсинів через організм без генерування запальної реакції. Приклади антитоксинів описані, наприклад, у патенті США № 6310043, виданому Bundle et al. Інші агенти, що ефективні проти бактеріальних і інших токсинів, можуть бути ефективні, і їхній терапевтичний ефект може доповнюватися спільним введенням зі сполуками, описаними в даній заявці.

Біль

Сполуки за винаходом можуть вводитися для лікування і/або запобігання болю, включаючи гострий, неврологічний, запальний, нейропатичний і хронічний біль. Аналгетична активність сполук, описаних у даній заявці, може бути продемонстрована на моделях стійкого запального болю і нейропатичного болю, виконуваних, як описано в опублікованій заявці на патент США № 20010056084 A1 (Allgeier et al.) (наприклад, механічна гіпералгезія на моделі запального болю в щурів з використанням повного ад'юванта Фрейнда і механічної гіпералгезії на моделі

нейропатичного болю в мишей шляхом часткової перев'язки сідничного нерва).

Аналгетичний ефект підходить для лікування болю різного генезу або етіології, зокрема, при лікуванні болю при запаленні і зв'язаної з нею гіпералгезії, нейропатичного болю і зв'язаної з нею гіпералгезії, хронічного болю (наприклад, сильного хронічного болю, післяопераційного болю і болю, зв'язаного з різними станами, включаючи злоякісні новоутворення, стенокардію, ниркову або печінкову кольку, менструацію, мігрень і подагру). Біль при запаленні може мати різноманітний генез, включаючи артрит і ревматоїдне захворювання, тендосиновіт і васкуліт. Нейропатичний біль включає невралгію трійчатого нерва або герпетичну невралгію, біль при діабетичній нейропатії, каузалгію, біль у поперековій області і синдрому деаферентації, такі як авульсія плечового сплетення.

Неоваскуляризація

$\alpha 7$ NNR зв'язаний з неоваскуляризацією. Інгібування неоваскуляризації, наприклад, введенням антагоністів (або у визначених дозуваннях, часткових агоністів) $\alpha 7$ NNR може лікувати або запобігати станам, що характеризуються небажаною неоваскуляризацією або ангіогенезом. Такі умови можуть включати ті, що характеризуються запальним ангіогенезом і/або викликаним ішемією ангіогенезом. Неоваскуляризація, зв'язана з ростом пухлини, може також інгібуватися введенням сполук, описаних у даній заявці, що функціонують як антагоністи або часткові агоністи $\alpha 7$ NNR.

Специфічний антагонізм відносно $\alpha 7$ NNR-специфічної активності зменшує ангіогенну реакцію на запалення, ішемію і неоплазію. Керівництво стосовно відповідних систем експериментальних моделей на тваринах для оцінки сполук, описаних у даній заявці, можна знайти, наприклад, у публікації Heeschen, C. et al., "A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors", J. CHn. Invest. 110(4):527-36 (2002).

Репрезентативні типи пухлин, які можна лікувати з використанням сполук, описаних у даній заявці, включають NSCLC (недрібноклітинну легеневу карциному), рак яєчників, рак підшлункової залози, карциному молочних залоз, карциному ободової кишки, карциному прямої кишки, карциному легенів, карциному ротоглотки, карциному гортанної частини глотки, карциному стравоходу, карциному шлунка, карциному підшлункової залози, карциному печінки, карциному жовчного міхура, карциному жовчних проток, карциному тонкої кишки, карциному сечовивідних шляхів, карциному нирок, карциному сечового міхура, карциному уротелію, карциному жіночих статевих органів, карциному матки, карциному яєчників, хоріокарциному, трофобластичної хвороби при вагітності, карциному чоловічих статевих органів, карциному передміхурової залози, карциному насінних пухирців, карциному сім'яників, зародковоклітинні пухлини, карциному ендокринних залоз, карциному щитовидної залози, карциному надниркових залоз, карциному гіпофіза, карциному шкіри, гемангіоми, меланому, саркоми, саркому кісток і м'яких тканин, саркому Капоші, пухлини мозку, пухлини нервів, пухлини очей, пухлини мозкових оболонок, астроцити, гліоми, гліобластоми, ретинобластоми, невроми, нейробластоми, шваноми, менінгіоми, солідні пухлини, що виникають з гематопоетичних злоякісних захворювань (таких як лейкози, хлоромі, плазмацитоми і бляшки і пухлини фунгоїдного мікозу і шкірної Т-клітинної лімфоми/лейкозу), і солідні пухлини, що виникають з лімфом.

Сполуки можуть також вводитися в сполученні з іншими формами лікування злоякісних новоутворень, включаючи спільне введення з антинеопластичними, протипухлинними засобами, такими як цисплатин, адриаміцин, дауноміцин і тому подібні, і/або засоби проти VEGF (судинного ендотеліального фактора росту), по суті, відомі в даній галузі.

Сполуки можуть уводитися таким чином, щоб вони були націлені на пухлинну ділянку. Наприклад, сполуки можуть вводитися в мікросферах, мікрочастинках або ліпосомах, кон'югованих з різними антитілами, що спрямовують мікрочастинки в пухлину. Крім того, сполуки можуть бути присутніми у мікросферах, мікрочастинках або ліпосомах, що мають відповідний розмір, для проходження через артерії і вени, але застрягати в капілярних ложах, що оточують пухлини, і вводити сполуки місцево в пухлину. Такі пристрої доставки лікарських засобів відомі в даній галузі.

Інші розлади

На додаток до лікування розладів ЦНС, запалення і небажаної неоваскуляризації і болю, сполуки за даним винаходом можуть також застосовуватися для профілактики або лікування визначених інших станів, захворювань і розладів, при яких відіграють роль NNR. Приклади включають аутоімунні розлади, такі як вовчак, розлади, пов'язані з вивільненням цитокінів, кахексію, викликану інфекцією (наприклад, як відбувається при СНІДі, пов'язаному зі СНІДом комплексі і неоплазії), ожиріння, пухирчатку, нетримання сечі, хвороби сітківки, інфекційні захворювання, міастенію, синдром Ітона-Ламберта, гіпертонію, остеопороз, звуження судин, розширення судин, серцеві аритмії, цукровий діабет I типу, булімію, анорексію, а також ті

показання, що викладені в опублікованій заявці РСТ WO 98/25619. Сполуки за даним винаходом можуть також вводитися для лікування судом, таких як судоми, що є симптоматичними при епілепсії, і для лікування таких станів як сифіліс і хвороба Крейтцфелда-Якоба.

5 Види діагностичного застосування

Сполуки за винаходом можуть застосовуватися в діагностичних композиціях, таких як зонди, зокрема, коли вони модифікуються для включення відповідних міток. Зонди можуть використовуватися, наприклад, для визначення відносного числа і/або функції специфічних рецепторів, зокрема, підтипів $\alpha 7$ рецепторів. Для цієї мети, сполуки за даним винаходом
10 найбільш переважно мітаються радіоактивною ізотопною групою, такою як ^{11}C , ^{18}F , ^{76}Br , ^{123}I або ^{125}I .

Введені сполуки можуть бути виявлені з використанням відомих способів виявлення, що відповідають використовуваній мітці. Приклади способів виявлення включають позитронно-емісійну томографію (PET) і однофотонну емісійну комп'ютерну томографію (SPECT). Описані
15 вище радіоактивні можу використовуватися при візуалізації PET (наприклад, ^{11}C , ^{18}F або ^{76}Br) і SPECT (наприклад, ^{123}I), з періодами напіввиведення приблизно 20,4 хв для ^{11}C , приблизно 109 хв для ^{18}F , приблизно 13 годин для ^{123}I , і приблизно 16 годин для ^{76}Br . Висока питома активність бажана для візуалізації вибраних підтипів рецепторів у не насичуючих концентраціях. Уведені дози звичайно нижчі токсичного діапазону і забезпечують висококонтрастні зображення.
20 Очікується, що сполуки за винаходом здатні до введення в нетоксичних рівнях. Визначення дози проводиться способом, відомим фахівцю в галузі візуалізації з використанням радіоактивних міток. Дивіться, наприклад, патент США № 5969144, виданий London et al.

Сполуки за винаходом можуть вводитися з використанням відомих методик. Дивіться, наприклад, патент США № 5969144, виданий London et al. Сполуки за винаходом можуть
25 вводитися в препаративних формах у вигляді композицій, що включають інші інгредієнти, такі як ті типи інгредієнтів, що можуть використовуватися при складанні діагностичної композиції. Сполуки, що можуть використовуватися відповідно до здійснення даного винаходу, найбільш переважно використовуються у формах високої чистоти. Дивіться патент США № 5853696, виданий Elmalch et al.

Після введення сполук за винаходом суб'єкту (наприклад, людині), присутність зазначеної сполуки в організмі суб'єкта може візуалізуватися і кількісно аналізуватися відповідними методиками для вказування присутності, кількості і функціональності вибраних підтипів NNR. Крім людей, сполуки за винаходом можуть також вводитися тваринам, таким як миші, щури, собаки і мавпи. Візуалізація SPECT і PET може проводитися з використанням будь-якої
35 відповідної технології й апарату. Дивіться публікацію Villemagne et al., In: Arneric et al. (Eds.) Neuronal Nicotinic Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities, 235-250 (1998) і патент США № 5853696, виданий Elmalch et al.

Мічені радіоактивними ізотопами сполуки з високою афінністю зв'язуються із селективними підтипами NNR (наприклад, $\alpha 7$) і переважно виявляють неспецифічне зв'язування з іншими
40 підтипами нікотинових холінергічних рецепторів яким можна зневажати (наприклад, $\alpha 4\beta 2$ і ті підтипи рецепторів, що зв'язані з м'язами і гангліями). По суті, сполуки за винаходом можуть використовуватися як агенти для неінвазивної візуалізації підтипів нікотинових холінергічних рецепторів усередині організму суб'єкта, зокрема, усередині мозку, для діагностики захворювань і розладів, зв'язаних із ЦНС.

В одному аспекті, діагностичні композиції можуть застосовуватися в способі діагностики захворювання в суб'єкта, такого як людина, що страждає на захворювання. Спосіб включає введення пацієнту міченої сполуки, що виявляється, як описано в у даній заявці, і виявлення зв'язування зазначеної сполуки з вибраними підтипами NNR (наприклад, $\alpha 7$ підтипи рецептора). Фахівці в галузі використання діагностичних інструментів, таких як PET і SPECT, можуть
50 використовувати мічені радіоактивними ізотопами сполуки, описані в даному винаході, для діагностики широкої розмаїтості станів і розладів, включаючи стани і розлади, пов'язані з дисфункцією центральної і вегетативної нервових систем. Такі розлади включають широку розмаїтість захворювань і розладів ЦНС, включаючи хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона і шизофренію. Зазначені й інші репрезентативні захворювання і розлади, що можуть оцінюватися, включають ті, які викладені в патенті США № 5952339, виданому Bencherif et al.

В іншому аспекті, діагностичні композиції можуть використовуватися в способі моніторингу підтипів селективних нікотинових рецепторів суб'єкта, такого як людина, що страждає на захворювання або розлад. Спосіб включає введення міченої сполуки, що виявляється, як описано в даній заявці, пацієнту і виявлення зв'язування зазначеної сполуки з підтипами, а
60 саме, підтипом $\alpha 7$ рецептора.

Зв'язування з рецепторами

Сполуки за даним винаходом можуть використовуватися як еталонні ліганди в аналізах зв'язування для сполук, що зв'язуються з підтипами NNR, зокрема, підтипом $\alpha 7$ рецептора. З цією метою, сполуки за даним винаходом переважно мітяться радіоактивною ізотопною групою, такою як ^3H , або ^{14}C . Приклади таких аналізів зв'язування детально описані нижче.

Фармацевтичні композиції

Хоча можна вводити сполуку за даним винаходом у формі основної маси активної хімічної речовини, переважне введення сполуки у формі фармацевтичної композиції або препаративної форми. Таким чином, один аспект даного винаходу включає фармацевтичні композиції, що містять сполуку за даним винаходом й один або більше фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або ексципієнтів. Інший аспект винаходу належить до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає змішування сполуки за даним винаходом з одним або більше з фармацевтично прийнятних носіїв, розріджувачів або ексципієнтів.

Спосіб введення сполуки за даним винаходом може варіюватися. Сполука за даним винаходом вводиться переважно перорально. Переважні фармацевтичні композиції для перорального введення включають таблетки, капсули, каплетти, сиропи, розчини і суспензії. Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути надані в дозованих формах модифікованого вивільнення, таких як таблетка з вивільненням протягом визначеного періоду часу і капсульні препаративні форми.

Фармацевтичні композиції можуть також вводитися за допомогою ін'єкцій, а саме, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно, внутрішньоочеревинно, внутрішньоартеріально, підболонокво і інтрацеребровентрикулярно. Внутрішньовенне введення є переважним способом ін'єкції. Прийнятні носії для ін'єкції добре відомі фахівцям у даній галузі і включають 5% розчини декстрази, сольовий розчин і сольовий розчин з фосфатним буфером.

Препаративні форми можуть також вводитися з використанням інших засобів, наприклад, ректального введення. Препаративні форми, що можуть застосовуватися для ректального введення, такі як супозиторії, добре відомі фахівцям у даній галузі. Сполуки за винаходом можуть також вводитися інгаляцією, наприклад, у формі аерозолі; місцево, наприклад, у формі лосьйону; трансдермально, наприклад, з використанням трансдермальної системи (наприклад, шляхом використання технології, що випускається компанією Novartis and Alza Corporation), шляхом порошкової ін'єкції або шляхом букального, сублінгвального або інтраназального усмоктування.

Фармацевтичні композиції можуть складатися в одиничну дозовану форму або в множинні або дробові дози.

Уведення фармацевтичної композиції, описаної в даній заявці, може бути переривчастим або з поступовою, безперервною, постійною або регульованою швидкістю. Фармацевтичні композиції можуть вводитися теплокровній тварині, наприклад, ссавцю, такому як миша, щур, кішка, кролик, собака, свиня, корова або мавпа; але фармацевтична композиція переважно вводиться людині. Крім того, час доби і число раз введення на добу фармацевтичної композиції можуть варіюватися.

Сполука за даним винаходом може застосовуватися для лікування різноманітних розладів і станів і, по суті, може застосовуватися в комбінації з різноманітними іншими прийнятними терапевтичними засобами, застосовуваними при лікуванні або профілактиці зазначених розладів або станів. Таким чином, один варіант здійснення даного винаходу включає введення сполуки за даним винаходом в комбінації з іншими терапевтичними сполуками. Наприклад, сполука за даним винаходом може застосовуватися в комбінації з іншими лігандами NNR (такими як вареніклін), антиоксидантами (такими як акцептори вільних радикалів), протибактеріальними засобами (такими як пеніцилінові антибіотики), противірусними засобами (такими як аналоги нуклеозидів, подібні до зидовудину й ацикловірусу), антикоагулянтами (такими як варфарин), протизапальними засобами (такими як NSAID (нестероїдні протизапальні лікарські засоби)), антипіретичними засобами, анальгетиками, анестетиками (такими як застосовувані в хірургії), інгібіторами ацетилхолінестерази (такими як донепезил і галанатмін), антипсихотичними засобами (такими як галоперидол, клозапін, оланзапін і кветіапін), імуносупресантами (такими як циклоспорин і метотрексат), нейропротективними засобами, стероїдами (такими як стероїдні гормони), кортикостероїдами (такими як дексаметазон, преднізон і гідрокортизон), вітамінами, мінералами, поживними речовинами, антидепресантами (такими як іміпрамін, флуоксетин, пароксетин, есциталопрам, серталін, венлафаксин і дулоксетин), анксиолітичними засобами (такими як алпрозолам і бупірон), протисудомними засобами (такими як фенітоїн і габапентин), судинорозширювальними засобами (такими як

празосин і силденафіл), стабілізаторами настрою (такими як вальпроат і арипіразол), лікарськими засобами проти злоякісних захворювань (такими як антипроліферативні засоби), гіпотензивними засобами (такими як атенолол, клонідин, аплопідин, верапаміл і олмесартан), проносними засобами, засобами, що пом'якшують випорожнення, діуретиками (такими як фуросемід), спазмолітичними засобами (такими як дицикломін), засобами проти дискінезії і протівіразовими лікарськими засобами (такими як езомепразол). Така комбінація фармацевтично активних засобів може вводитися разом або окремо і, при введенні окремо, введення може відбуватися одночасно або послідовно, у будь-якому порядку. Кількості сполук або засобів і відносний час введення вибираються для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Введення в комбінації сполуки за даним винаходом з іншими терапевтичними засобами може здійснюватися в комбінації введенням одночасно в: (1) одній фармацевтичній композиції, що включає обидві сполуки; або (2) окремих фармацевтичних композиціях, кожна з яких включає одну зі сполук. Альтернативно, комбінація може вводитися окремо послідовним чином, де один лікувальний засіб вводиться першим, а інший - другим. Таке послідовне введення може відбуватися через короткий або тривалий проміжок часу.

Інший аспект даного винаходу включає комбіноване лікування, що включає введення суб'єкту терапевтично або профілактично ефективної кількості сполуки за даним винаходом й одного або більше інших видів лікування, включаючи хіміотерапію, променеву терапію, генну терапію або імунотерапію.

ПРИКЛАДИ

Наступні приклади представлені для ілюстрації даного винаходу і не повинні розглядатися як обмежуючі його. Поки немає інших вказівок, у даних прикладах, усі частини і процентні частки представлені по масі.

Ядерно-магнітнорезонансна (ЯМР) спектроскопія

ЯМР спектри одержували або на апараті Varian Unity 300 МГц, або на апараті Bruker 400 МГц, обладнаних автосамплером і регульованих консоллю DRX400. Автоматизовані експерименти проводили з використанням версії програмного забезпечення ICONNMR версії 4.0.4 (build 1), що працює з версією Topspin версії 1.3 (рівень patch 8) з використанням стандартних протоколів експериментів, завантажених компанією Bruker. Для нестандартної спектроскопії, дані одержували за допомогою користування однієї Topspin.

Точка плавлення

Використовували прилад Фішера-Джонса для визначення температури плавлення гарячою екстракцією, при установці параметрів, що відповідає швидкості нагрівання приблизно 5°C на хв.

Диференціальна скануюча калориметрія (DSC)

Дані DSC одержували на приладі Mettler DSC 823e, обладнаному автосамплером з 50 положеннями. Прилад калібрували по енергії і температурі з використанням сертифікованого індю. Звичайно, 0,5-1,5 мг кожного зразка, в алюмінієвій посудині з дуже маленьким отвором нагрівали зі швидкістю 10°C·хв⁻¹ від 25 до 300°C. Продування азотом зі швидкістю 50 мл/хв⁻¹ підтримували над зразком. Регулювання приладу й аналіз даних виконували з використанням пакету програмного забезпечення stare версії 9.10.

Порошкова дифракція рентгенівських променів (XRPD)

Спосіб 1

Рентгенограми одержували на дифрактометрі Siemens D5000 з використанням випромінювання Cu K α (40 кв, 40 мА), гоніометра θ - θ , розбіжність V20 і приймальних ґрат, графітного вторинного монохроматора і сцинтиляційного лічильника. Робота приладу перевірялася з використанням сертифікованого Корундового стандарту (NIST 1976). Програмне забезпечення, використовуване для збирання даних, являло собою Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1, і дані аналізували і представляли з використанням версій Diffrac P/tvs EVA версії 11.0.0.2 або версії 13.0.0.2.

Зразки досліджували в навколишніх умовах як зразки у вигляді плоских пластин з використанням порошку в міру одержання. Приблизно 30 мг зразка обережно упаковували в порожнину, врізану в поліровану, що має нульовий фон (510) силіконову облатку. Зразок під час аналізу обертали в його власній площині. Деталі збирання даних є:

- Кутовий діапазон: від 2 до 42° 2 θ
- Розмір кроку: 0,05° 2 θ або 0,1° 2 θ
- Час збирання: 4 с.крок⁻¹

Спосіб 2

Рентгенограми одержували на дифрактометрі Bruker AXS C2 GADDS з використанням випромінювання Cu K α (40 кв, 40 мА), автоматичної стадії XYZ, лазерного відео мікроскопа для

автоматичного розташування зразка і 2-вимірний детектор площі HiStar. Рентгенівська оптика складається з одного багат шарового дзеркала Gobel, з'єднаного з коліматором з дуже маленьким отвором 0,3 мм.

Розбіжність пучка, тобто ефективний розмір пучка рентгенівських променів на зразку, склав приблизно 4 мм. Безперервний режим сканування θ - θ використовувався зі зразком - відстань детектора 20 см, що дає ефективний діапазон 2θ 3,2-29,7°. Звичайно, зразок піддавався би впливу пучка рентгенівських променів протягом 120 секунд. Програмне забезпечення, використовуване для збирання даних, являло собою GADDS для WNT 4.1.16, і дані аналізували і представляли з використанням програм Diffrac Plus EVA версії 9.0.0.2 або версії 13.0.0.2.

Зразки досліджували в навколишніх умовах як зразки у вигляді плоских пластин з використанням порошку в міру одержання без помелу. Приблизно 1-2 мг зразка легко притискали до скляного предметного скла для одержання плоскої поверхні. Зразки, оброблені не в навколишніх умовах, поміщали на силіконову облатку з теплопровідною сполукою. Потім зразок нагрівали до відповідної температури зі швидкістю приблизно $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{хв}^{-1}$ і надалі тримали в ізотермічних умовах протягом 1 хв перед початком збирання даних.

Дифракція рентгенівських променів на монокристалі (SCXD)

Дані одержували на дифрактометрі Bruker AXS 1 K SMART CCD, обладнаному охолоджувальним пристроєм Oxford Cryosystems Cryostream. Структури визначали з використанням програм або SHELXS, або SHELXD і уточнювали програмою SHELXL як частиною комплексу Bruker AXS SHELXTL. Поки немає інших указівок, атоми водню, приєднані до атома вуглецю, були розміщені геометрично і забезпечили можливість уточнення параметром керування ізотопного зсуву. Атоми водню, приєднані до гетероатому, розташовувалися при різницевому синтезі Фур'є, і їм була забезпечена можливість уточнення параметром ізотопного зсуву.

Приклад 1. Синтез (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До суспензії (2S,3R)-3-аміно-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]октану (20 мг, 0,092 ммоль, отриманого, як описано в документі PCT WO 09/018505, включеному в дану заявку шляхом посилання відносно такого синтезу), о-(бензотриазол-1-іл)-N,N,N,1-тетраметилуроніюгексафторфосфату (HBTU, 41,7 мг, 0,110 ммоль) і 3,5-дифторбензойної кислоти (17,4 мг, 0,110 ммоль) у N,N-диметилформаміді (DMF, 2 мл) додавали триетиламін (28 мг, 0,28 ммоль) при кімнатній температурі. Реакційну суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі, розбавляли етилацетатом (200 мл) і промивали 20% водяним карбонатом калію. Залишок очищали хроматографією на силікагелі елюентом метанол:триетиламін 300:1. Розчинник видаляли для одержання (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду (30 мг, 76%), чистота визначена ВЕРХ: 100% (214 нм), 98,2% (254 нм);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,48 (д, $J=2,0$ Гц, 1H), 8,36 (дд, $J=1,7$ Гц, $J=4,9$ Гц, 1H), 7,56-7,60 (м, 1H), 7,14-7,20 (м, 1H), 7,05-7,14 (м, 2H), 6,87-6,96 (м, 1H), 6,23 (д, $J=7,8$ Гц, 1H), 3,88-3,96 (м, 1H), 3,02-3,13 (м, 1H), 2,82-3,00 (м, 4H), 2,65-2,82 (м, 2H), 1,97-2,05 (м, 1H), 1,58-1,84 (м, 3H), 1,43-1,55 (м, 1H);

ESI-MS 358,1 (МН) $^{+}$.

Приклад 2. Синтез фумарату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину 3,5-дифторбензойної кислоти (9,36 м, 59,2 ммоль), хлороформу (200 мл) і триетиламіну (16,34 г, 161,5 ммоль) при 25°C додавали HBTU (22,5 г, 59,2 ммоль). Суміш нагрівали до 40-42°C протягом 45 хв, що приводило до утворення суспензії білого кольору. Суспензію проохолоджували до 10°C і додавали розчин (2S,3R)-3-аміно-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]октану (11,7 г, 53,8 ммоль) у хлороформі (50 мл) протягом періоду 15-20 хв і перемішували протягом 1,5 год. Реакційну суміш нагрівали до 40-42°C і додавали ще 3,5-дифторбензойну кислоту (2,0 г, 13 ммоль) у HBTU (4 г, 11 ммоль), з наступним перемішуванням при 40-42°C протягом 2 год. і потім при навколишній температурі протягом 16 год. Реакційну суміш швидко гасили водою (200 мл), і при перемішуванні, рН водного шару доводили до рН=10-11 10 мас. % водного гідроксиду натрію. Шари розділяли, і органічний шар двічі промивали водою (100 мл). Розчинник видаляли у вакуумі для одержання 22,9 г важкої твердої речовини жовтогарячого кольору. Міцність продукту в неочищеній олії визначали при 66,0 мас. % кількісної ВЕРХ у порівнянні з еталонним стандартом; це відповідає виходу 15,1 г (78%). Масло розчиняли в метилетилкетоні (50 мл), що надалі відганяли у вакуумі; даний процес повторювали всього три рази. Тригорлу колбу ємністю 500 мл із круглим дном, обладнану підвісною мішалкою, температурним датчиком, краплинною лійкою і зворотним холодильником,

завантажували фумаровою кислотою (4,9 г, 42 ммоль) і метилетилкетон (150 мл). Суспензію нагрівали до 78°C, що приводило до повного розчинення кислоти. Повільно додавали розчин (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в метилетилкетоні (50 мл), утримуючи внутрішню температуру вище 75°C. Після завершення додавання, суспензію перемішували протягом 30-45 хв при 78°C і джерело нагрівання відключали. Суспензію перемішували протягом ночі, фільтрували і корж після фільтрації сушили при 50°C у вакуумі протягом 16 год. для одержання фумарату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду у вигляді кристалічної твердої речовини яскраво-жовтого кольору (чистота 99,6% за даними ВЕРХ), точка плавлення 208-210°C. Вихід: 65% для двох стадій.

¹H-ЯМР (D₂O, 400 МГц): δ 8,30 (д, J=5,6 Гц, 1H), 8,06 (д, J=7,5 Гц, 1H), 7,48 (дд, J=8,7 Гц, J=5,6 Гц, 1H), 6,97-7,06 (м, 1H), 6,75-6,85 (м, 2H), 6,49 (с, 2H), 4,15 (д, J=7,5 Гц, 1H), 3,69-3,81 (м, 1H), 3,40-3,59 (м, 2H), 3,17-3,40 (м, 4H), 2,03-2,18 (м, 2H), 1,91-2,03 (м, 2H), 1,78-1,91 (м, 1H).

Приклад 3. Синтез моногідрохлориду (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

Процедура А: До розчину 250 мг (0,7 ммоль) (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в 10 мл ізопропілацетату додавали водну хлористоводневу кислоту (65 мкл 37% (мас./мас.), 0,78 ммоль). Розчин нагрівали до 50°C і охолоджували до 0°C протягом періоду 4 год. Зразок моногідрохлориду являли собою суміш смоли і порошку білого кольору при 0°C. Потім зразок нагрівали до 20°C і знову проохолоджували до 0°C (швидкість охолодження 5°C/хв). Отримані тверді речовини збирали і сушили у вакуумі при 25°C протягом 24 год. Точка плавлення (DSC)=274,8°C.

Процедура В: Концентровану хлористоводневу кислоту (0,54 мл 37% (мас./мас.), 6,6 ммоль) додавали по краплях при охолодженні крижаною банею до тетрагідрофурану (ТГФ, приблизно 4 мл) і розбавляли до об'єму 5 мл ТГФ. Даний розчин додавали по краплях (протягом періоду 5 хв) до теплого (45-50°C) розчину (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду (2,43 г з чистотою 96,8%, 6,58 ммоль) в ацетоні (20 мл). Тверді речовини починали осаджуватися. Суміш нагрівали майже до кипіння протягом 15 хв, охолоджували до навколишньої температури і давали можливість осісти протягом 16 год. Тверді речовини збирали фільтрацією з відсмоктуванням в атмосфері азоту, промивали ацетоном і сушили у вакуумній печі (85°C, 3 год.). Це давало 2,26 г матеріали, що мав чистоту 93% при РХ-МС. Весь зразок обробляли гарячим (майже киплячим) 2-пропанолом (25 мл) протягом 10 хв. Суміш охолоджували до навколишньої температури і давали можливість відстоятися протягом 3 год. Тверді речовини збирали фільтрацією з відсмоктуванням в атмосфері азоту і сушили у вакуумній печі (85°C, 2,5 год.). Отримані білі кристали мали чистоту >99% за даними ВЕРХ, масу 2,03 г (вихід 78,4%) і плавився при 273-276°C.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,45 (шир. с, 1H), 8,66 (д, 1H), 8,54 (с, 1H), 8,28 (д, 1H), 7,76 (д, 1H), 7,41 (м, 1H), 7,24 (м, 3H), 4,14 (м, 1H), 4,07 (м, 1H), 3,46 (м, 2H), 3,10-3,35 (м, 4H), 2,06 (м, 3H), 1,90 (м, 1H), 1,69 (м, 1H).

Елементний аналіз: розрахований для C₂₀H₂₁ON₃F₂ HCl (C, 60,99%; H, 5,63%, N, 10,67%); знайдено (C, 60,94%, 60,91%; H, 5,64%, 5,66%; N, 10,63%, 10,67%).

Приклад 4. Синтез монофосфату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину 250 мг (0,7 ммоль) (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в 5 мл ізопропілового спирту додавали 780 мкл (0,78 ммоль, 1,1 екв.) 1 М фосфорної кислоти в розчині ТГФ. Розчин нагрівали до 50°C і охолоджували до 0°C протягом 4-годинного періоду. Нерухома кашкоподібна суспензія білого кольору утворювалася при 0°C, що залишалася після зігрівання зразка до кімнатної температури. Випарювання розчинника давало кристалічний матеріал, що збирали і сушили у вакуумі при 25°C протягом 24 год. Точка плавлення (DSC)=219,2°C.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,48 (с, 1H), 8,34 (д, 1H), 8,28 (д, 1H), 7,68 (д, 1H), 7,43 (м, 1H), 7,24 (м, 3H), 5,04 (шир. с), 3,84 (м, 1H), 2,70-3,35 (м, 7H), 1,60-1,90 (м, 4H), 1,40 (м, 1H).

Приклад 5. Синтез моно-4-гідробензоату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину 250 мг (0,70 ммоль) (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в 5 мл ізопропілацетату додавали 780 мкл (0,78 ммоль, 1,1 екв.) 1 М 4-гідроксибензойної кислоти в розчині ТГФ. Розчин нагрівали до 50°C і охолоджували до 0°C протягом 4-годинного періоду. Моно-4-гідроксибензоат одержували у вигляді смоли. Кристалізацію одержували після осадження гемі-4-гідробензоатом і 48 годин дозрівання від 50°C до кімнатної температури (4-годинний цикл) випареної суміші смоли і розчинника

(залишалася лише чверть вихідного обсягу). Потім тверду речовину виділяли випарюванням розчинника в атмосфері азоту. Отримані тверді речовини збирали і сушили у вакуумі при 25°C протягом 24 год. Точка плавлення (DSC)=144,0°C.

5 Приклад 6. Синтез гемі-4-гідробензоату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину 71,5 мг (0,20 ммоль) (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в 3,5 мл ізопропілацетату додавали 100 мкл (0,1 ммоль, 0,5 екв.) 1 М 4-гідроксибензойної кислоти в розчині ТГФ. Ізопропілацетат випарювали для виходу моно-4-гідроксибензоату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду у вигляді твердої речовини, що збирали і сушили у вакуумі при 25°C протягом 24 год. Точка плавлення (DSC)=106,0°C.

¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,23 (шир. с), 8,43 (с, 1H), 8,29 (с, 1H), 8,28 (с, 1H), 7,78 (д, 1H), 7,61 (м, 1H), 7,41 (м, 3H), 7,22 (м, 1H), 6,80 (д, 1H), 3,66 (м, 1H), 2,70-3,20 (м, 7H), 1,50-1,90 (м, 4H), 1,20 (м, 1H).

15 Приклад 7. Синтез моногідрату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду (993 мг, 2,80 ммоль) у воді (5 мл) додавали хлороформ (15 мл). рН водного шару доводили до рН=10-11 10 мас. % гідроксиду натрію. Двофазну суміш енергійно струшували, і шарам давали можливість розділитися. Хлороформний шар виділяли, і водяний шар екстрагували ще один раз хлороформом (9 мл). Об'єднані хлороформні шари однократно промивали водою (7 мл), фільтрували над шаром безводного сульфату магнію і концентрували у вакуумі для одержання безбарвного, прозорого масла з тенденцією до спінювання. Матеріал обробляли простим метил-трет-бутиловим ефіром (MTBE, 10-15 мл) з наступним відгоном розчинника у вакуумі; даний процес повторювали ще один раз. Матеріал розчиняли в MTBE (10-15 мл) і додавали гептан доти, доки не з'являлося біле помутніння розчину. У цей момент починали повільний відгін летких речовин при 50-55°C при навколишній температурі, і відокремлювали додатковий твердий матеріал. Дистилат нагрівали, і матеріал збирали фільтрацією і промивали невеликою кількістю гептану. Матеріал сушили у вакуумі при 55°C у вакуумі/при відбиранні азоту протягом 60 год. і при 70-85°C протягом 40 год. для одержання 400 мг моногідрату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду у вигляді крихкої твердої речовини білого кольору: α_D^{26,6°C}=40°; елементний аналіз, розраховано: С (63,99); Н (6,18); N (11,19), Н₂О (4,8 мас. %), знайдено: С (64,23); Н (6,27); N (11,18); Н₂О (4,48).

35 ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 8,46 (д, J=2 Гц, 1H), 8,35 (дд, J=4,8 Гц, J=2 Гц, 1H), 7,56-7,61 (м, 1H), 7,08-7,19 (м, 3H), 6,87-6,95 (м, 1H), 6,32 (д, J=8,1 Гц, 1H), 3,89-3,95 (м, 1H), 3,00-3,12 (м, 1H), 2,84-2,99 (м, 4H), 2,68-2,84 (м, 2H), 1,98-2,04 (м, 1H), 1,83 (с, 2H), 1,58-1,79 (м, 3H), 1,44-1,54 (м, 1H).

Розкладається при 240°C.

40 Приклад 8. Синтез гемі-галактарату (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

До розчину (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду (357 мг, 1,00 ммоль) в абсолютному етанолі (10 мл) при 70-72°C невеликими порціями додавали галатарову кислоту (чисту) (105 мг, 0,50 ммоль). Нагрівання продовжували протягом ще 15 хв після завершення додавання кислоти. Розчин повільно прохолоджували до навколишньої температури. Після відстоювання протягом 2 год., тверді речовини збирали вакуумною фільтрацією, промивали етанолом і сушили під азотним дифуззором протягом 30 хв. Отриманий матеріал сушили протягом 3 год. при 75°C у вакуумній печі для видалення залишкового етанолу. Результати аналізу XRPD показані на фіг. 11.

50 Приклад 9. Скринінг солі (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду

Основні розчини вільної основи (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду одержували в такий спосіб:

- 20 мг/мл у IPA (ізофталевій кислоті), 25 мг/мл у розчиннику i-ProAc - протиіони 1-12
- 55 - 25 мг/мл у розчиннику i-ProAc - протиіони 13-20

У кожен флакон завантажували 2 мл основного розчину вільної основи в навколишніх умовах (40-50 мг вільної основи/флакон). Потім у кожен флакон додавали відповідні об'єми основного розчину кислоти, (якщо немає інших указівок, 1 М у ТГФ) у або кількості 1,1, або 2,2 екв. у навколишніх умовах. Нерозчинні кислоти додавали відповідно як тверді речовини. Усі зразки нагрівали до 50°C перед охолодженням до 0°C протягом 10 годин. Всі аморфні тверді

речовини, включаючи смоли й масла, поміщали після дозрівання (навколишні умови - 50°C 4-годинними циклами протягом 2 днів) з наступним повторним аналізом XRPD. До тих зразкам, що залишалися аморфними після дозрівання, додавали 2 мл метилетилкетону, і зразки додатково дозрівали протягом 3 днів. Прозорі розчини послідовно випарювали приблизно до половини і потім до чверті об'єму при 50°C. Розчини, що залишаються, далі охолоджували до 5°C перед повним видаленням розчинника у вакуумі. Всі отримані тверді речовини аналізували XRPD, і будь-які кристалічні зразки з незвичайними типами XRPD далі аналізували ¹H-ЯМР/іонною хроматографією, визначенням стійкості при 40°C/відносній вологості 75% протягом 1 тижня і розчинності у воді (ціль 10 мг/мл при 25°C, незабуференій)

Кислотні протиіони, вибрані для дослідження вибору солей

№	Кислота	Клас	pKa			LogP	Молекулярна маса
			1	2	3		
1	Хлористоводнева кислота 37 мас.% (12 M)	1	- 6,10			-	36,46
2	Сірчана кислота	1	- 3,00	1,92		-1,03	98,08
3	Метансульфонова кислота	2	- 1,20			-1,89	96,10
4	Малеїнова кислота	1	1,92	6,23		-0,01	116,07
5	Фосфорна кислота	1	1,96	7,12	12,32	-2,15	98,00
6	L-винна кислота	1	3,02	4,36		-1,43	150,09
7	Фумарова кислота, що використовується в вигляді порошку	1	3,03	4,38		-0,01	116,07
8	Лимонна кислота	1	3,13	4,76	6,40	-1,72	192,12
9	L-яблучна кислота	1	3,46	5,10		-1,26	134,09
10	1-гідрокси-2-нафтоєва кислота, яка використовується у вигляді порошку	2	2,70	13,50		3,29	188,17
11	4-гідроксибензойна кислота	2					
12	1 M бурштинова кислота в MeOH	1	4,21	5,64		-0,59	118,09
13	Бензолсульфонова кислота	2	0,70			0,47	158,18
14	1 M п-толуолсульфонова кислота в EtOH	2	- 1,34			0,93	190,22
15	Гіпурова кислота, яка використовується у вигляді порошку	1	3,55			0,31	179,17
16	50% D-глюконова кислота у воді	1	3,76			-3,18	196,16
17	Оцтова кислота	1	4,76			-0,29	60,05
18	1 M бензойна кислота в IPA	2	4,19				
19	Пропіонова кислота	2	4,87			0,25	74,07
20	L-аспарагінова кислота, яка використовується у вигляді порошку	1	1,88	3,65		-0,67	133,11

Таблиця

Резюме скрінингу солей

Протион	Розчинник	Цільова стехіометрія	Спостереження по додаванню кислоти при комнатній температурі	Спостереження при 0°C	Аналіз XRPD після фільтрації	Аналіз XRPD через 48 годин дозрівання	XRPD після випарювання і дозрівання в MEK	Спостереження по 2-му дозріванню
Гідрохлорид	2-пропанол	Моносінь	Прозорий розчин	Білий порошок	Кристалічний♣	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Кристалічний♣	n/a
	Ізопропілацетат	Моносінь	Осад	Білий порошок	Кристалічний♣	Кристалічний♣	n/a	n/a

		Подвійна сіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	Кристалічний♣	n/a	n/a
Сульфат	2-пропанол	Моносіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Осад	Смола	Смола♣	Смола	Смола	Смола
	Ізопропіл-ацетат	Моносіль	Осад	Білий порошок	Аморфний♣	Аморфний♣	Аморфний♣	Білий порошок
		Подвійна сіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
Мезилат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	n/a	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Аморфний♣	Аморфний♣	Білий порошок
	Ізопропіл-ацетат	Моносіль	Осад	Смола	n/a	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Осад	Смола	n/a	Кристалічний♣	n/a	n/a
Малеат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	n/a	Смола
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	n/a	Смола
	Ізопропіл-ацетат	Моносіль	Смола	Смола	n/a	Смола♣	n/a	Смола
		Подвійна сіль	Смола	Смола	n/a	Смола♣	n/a	Смола
Фосфат	2-пропанол	Моносіль	Осад	Білий порошок	n/a недостатньо матеріалу	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	Білий порошок	Аморфний♣	Білий порошок
	Ізопропіл-ацетат	Моносіль	Осад	Смола	n/a	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Осад	Смола	n/a	Кристалічний♣	n/a	n/a

Протион	Розчинник	Цільова стехіометрія	Спостереження по додаванню кислоти при кімнатній температурі	Спостереження при 0°C	Аналіз XRPD після фільтрації	Аналіз XRPD через 48 годин дозрівання	XRPD після випарювання і дозрівання в МЕК	Спостереження по 2-му дозріванню
Фумарат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Кристалічний♣	n/a
		Подвійна сіль	Зупинений експеримент♥					
	ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Преципітат	Головним чином, аморфний♣	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Преципітат	Смола♣	Кристалічний♣	n/a	n/a
Цитрат	2-пропанол	Моносіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	n/a	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	n/a	Смола♣	Смола♣
	ізопропілацетат	Моносіль	Осад	Білий порошок	Аморфний♣	Аморфний♣	Аморфний♣	Білий порошок
		Подвійна сіль	Преципітат	Білий порошок	Аморфний♣	Аморфний♣	Аморфний♣	Білий порошок
Малат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
	ізопропілацетат	Моносіль	Осад	Білий порошок	Аморфний♣	Аморфний	Аморфний♣	Білий порошок

		Подвійна сіль	Осад	Білий порошок	Смола♣	Низька кристалічність♣	n/a	n/a
Ксинофоат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
	ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
4-гідрокси бензоат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
	ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Кристалічний♣	n/a	n/a
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
Сукцинат	2-пропанол	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
	ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣
		Подвійна сіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣

Протіон	Розчинник	Цільова стехіометрія	Спостереження по додаванню кислоти при кімнатній температурі	Спостереження при 0°C	Аналіз XRPD після фільтрації	Аналіз XRPD через 48 годин дозрівання	XRPD після випарювання і дозрівання в MEK	Спостереження по 2-му дозріванню	XRPD після випарювання і зберігання при 5°C
Бензилат	Ізопропілацетат	Моносіль	Осад	Білий порошок	Аморфний♣	Низька кристалічність♣	n/a	n/a	n/a
Тозилат	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Кристалічна♣	n/a	n/a
Гіпурат	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣	n/a
Глюконат	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣	n/a
Ацетат	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣	n/a
Бензоавт	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣	Кристалічна♣
Пропіонат	Ізопропілацетат	Моносіль	Прозорий розчин	Прозорий розчин	n/a	Прозорий розчин	Смола♣	Смола♣	n/a
Аспартат	Ізопропілацетат	Моносіль	Не розчинився	Не розчинився	Кристалічна, так як кислота♥	Кристалічна, так як кислота♥	Кристалічна, так як кислота♥	n/a	n/a

Ключ:

♣ - Кристалічний(а)

♣ - Аморфний(а)

♥ - подальший аналіз не виконувався

n/a - Незастосовно

Таблиця

Характеристика після первинного скринінгу солей

Сіль	Цільова стехіометрія	XRPD після фільтрації	Стехіометрія (кислота:основа)		XRPD 40°C/75% відн. волог. 1 тиждень (дивіться фіг.12)	Розчинність в воді
			¹ H-NMR	Іонна хроматографія		
Гідрохлорид	Моносолі	Тип 1	Підтвердження утворення солі	1,0:1	Тип 1♣	>10 мг/мл
	Подвійні соли	Тип 2 Тип 3	Підтвердження утворення солі	n/a	Гігроскопічна♣	n/a
Фосфат	Моносолі	Тип 1	Підтвердження утворення солі	1,0:1	Тип 1♣	>10 мг/мл
	Моно-подвійні соли	Тип 2	Підтвердження утворення солі	n/a	Тип 1♣ + Тип 2♣	>10 мг/мл
Фумарат	Моносіль	Тип 1	Підтвердження утворення моносолі 1,0:1	1,0:1	Тип 1♣	>10 мг/мл
	Подвійна сіль	Тип 2	Підтвердження утворення подвійної солі 1,0:1	n/a	Тип 2♣	>10 мг/мл
4-Гідроксибензоат	Моносіль	Тип 1	Підтвердження утворення гемісолі 0,5:1	n/a	Тип 1♣	>10 мг/мл
Бензоат	Моносіль	Тип 1	Підтвердження утворення моносолі	n/a	Тип 2♣	0,8 мг/мл
Сульфат	Моносіль	Тип 1	Підтвердження утворення солі	n/a	Гігроскопічна♣	n/a
Мезилат	Моно-подвійні соли	Тип 1	Підтвердження утворення моносолі	n/a	Гігроскопічна♣	n/a
Малат	Подвійна сіль	Тип 1 Низька кристалічність	Підтвердження утворення солі 1,4:1	n/a	Гігроскопічна♣	n/a
Тозилат	Моносіль	Тип 1	Підтвердження утворення солі 1:1	n/a	Гігроскопічна♣	n/a

Ключ:

♣ - Кристалічний(а)

♠ - Аморфний(а)

♥ - Подальший аналіз не виконувався

n/a - Незастосовно

Приклад 10. Кристалічна структура гідрохлориду

Кристали гідрохлориду одержували дозріванням від кімнатної температури до 50°C розчину в метанолі моногідрохлориду (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду. Дані структури монокристалу зазначені в таблиці нижче. Зразок перевіряли на репрезентативність продукту в цілому.

Структура монокристалу моногідрохлориду

Молекулярна формула	$C_{20}H_{22}ClF_2N_3O$				
Молекулярна маса	393,86				
Система кристалу	Моноклінічний				
Просторова група	P2 ₁	a	10,049(1)Å	α	90°
		b	8,872(1)Å	β	94,088(3)°
		c	10,491(1)Å	γ	90°
V	933,07(15)Å ³				
Z	2				
D _c	1,402 г·см ⁻³				
μ	0,239 мм ⁻¹				
Джерело, λ	Mo-K(альфа), 0,71073 Å				
F(000)	412				
T	120(2)K				
Кристал	безбарвна призма, 0,3×0,15×0,11 мм				
Дані усічені до	0,80 Å				
θ_{max}	26,37°				
Повнота	99,4%				
Відображення	7986				
Незвичайні відображення	3750				
R _{int}	0,0135				
Показник Флека	-0,04(3)				
R _{all}	0,0236				
R ₁	0,0231				

Рішення за структурою було отримано прямими способами, повною-матричною обробкою даних з використанням мінімального квадратичного відхилення по F^2 зі зважуванням $w^1 = \sigma^2(F_o^2) + (0,0435P)^2 + (0,1500P)$, де $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$; застосовували параметри анізотропічного зсуву, емпіричної абсорбційної корекції; абсолютне значення структурного параметра дорівнює -0,04(3). Кінцеве значення $wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0,0636$ для всіх даних, звичайно, $R_1 = 0,0231$ по величинах F 3684 відображень при $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,004$ для всіх даних і 252 параметрів. Скінченна величина $\Delta/\sigma(\max)$ 0,001, Δ/σ (середня), 0,000. Карта кінцевого відмінності між +0,195 і -0,136 е А⁻³.

Абсолютна величина структурного параметра забезпечила можливість визначення конфігурації хіральних центрів. Дана конфігурація зазначена на фіг. 10.

Приклад 11. Біологічні аналізи

Зв'язування міченого радіоактивним ізотопом ліганду з підтипом CNS nAChRs $\alpha 4\beta 2$ NNR

Одержання мембран з кори щурів: Щурів (самок, Sprague-Dawley) з масою тіла 150-250 г утримували при 12-годинному циклі світла/темряви, і їм був дозволений вільний доступ до води і корму, що постачається компанією PMI Nutrition International, Inc. Тварин наркотизували 70% CO₂, і потім проводили декапітацію. Головний мозок видаляли і поміщали на крижану платформу. Кору головного мозку видаляли і поміщали в 20 об'ємів (маса:об'єм) крижаного препаративного буфера (137 mM NaCl, 10,7 mM KCl, 5,8 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES (вільні кислоти), 5 mM йодацетаміду, 1,6 mM EDTA (етилендіамінтетраоцтової кислоти), pH 7,4); додавали PMSF (фенілметансульфонілфторид), розчинений у метанолі до кінцевої концентрації 100 мкМ, і суспензію гомогенізували Polytron. Гомогенат центрифугували при 18000×g протягом 20 хв при 4°C, і отриманий після центрифугування осад ресуспендували в 20 об'ємах крижаної води. Після 60 хв інкубації на льоду, збирали новий осад після центрифугування при 18000×g протягом 20 хв при 4°C. Кінцевий осад після центрифугування ресуспендували в 10 об'ємах буфера і зберігали при -20°C.

Одержання мембран з SH-EP1/людських клональних клітин $\alpha 4\beta 2$

Клітинний осад після центрифугування з 40 культуральних чашок діаметром 150 мм об'єднували і гомогенізували Polytron (Kinematica Gmb, Switzerland) у 20 мл крижаного препаративного буфера. Гомогенат центрифугували при 48000×g протягом 20 хв при 4°C. Отриманий клітинний осад після центрифугування ресуспендували в 20 мл крижаного препаративного буфера і зберігали при -20°C.

На день аналізу мембрани відтавали і центрифугували при 48000×g протягом 20 хв.

Супернатант декантували і видаляли. Клітинний осад після центрифугування ресуспендували в сольовому розчині Дульбекко з фосфатним буфером (PBS, Life Technologies) pH 7,4 і гомогенізували Polytron протягом 6 секунд. Концентрації білка визначали з використанням набору для білкового аналізу Pierce BCA Protein Assay Kit, з використанням бичачого сироваткового альбуміну як стандарту (Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

Препарати мембран (приблизно 50 мкг для людського і 200-300 мкг білка для щурячого $\alpha 4\beta 2$) інкубували в PBS (відповідно в 50 мкл і 100 мкл) у присутності конкурентної сполуки (від 0,01 нМ до 100 мкМ) і 5 нМ [^3H]нікотину протягом 2-3 годин на льоду. Інкубацію припиняли швидкою фільтрацією на багатопатрубковому збирачі тканини (Brandel, Gaithersburg, MD) з використанням фільтрів GF/B, попередньо просоченому в 0,33% поліетиленіміні (мас/об) для зменшення неспецифічного зв'язування. Тканину промивали 3 рази в PBS, pH 7,4. Сцинтиляційну рідину додавали у фільтри, що містять промиту тканину, і давали можливість зрівноважитися. Потім підраховували число імпульсів від фільтрів для визначення радіоактивності, зв'язаної з мембранами, підрахунком імпульсів сцинтиляцій рідини (2200CA Tri-Carb LSC, Packard Instruments, ефективність 50% або Wallac Trilux 1450 MicroBeta, ефективність 40%, Perkin Elmer).

Дані представляли у вигляді розпадів на хвилину (DPM). У межах кожного аналізу, кожна точка мала 2-3 повторення. Повторення для кожної точки усереднювали і наносили на графік залежності від логарифма концентрації лікарського засобу. IC_{50} , що являє собою концентрації сполуки, що дає інгібування зв'язування на 50%, визначали мінімальною квадратичною нелінійною регресією. Величини K_i розраховували з використанням рівняння Cheng-Prussoff (1973):

$$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + N/K_d),$$

де N представляє концентрацію [^3H]нікотин і K_d представляє спорідненість нікотину (3 нМ, визначену в окремому експерименті).

Підтип $\alpha 7$ NNR

Щурів (самок, Sprague-Dawley) з масою тіла 150-250 г, утримували при 12-годинному циклі світла/темряви і давали можливість вільного доступу до води і корму, що постачається компанією PMI Nutrition International, Inc. Тварин наркотизували 70% CO_2 , і потім декапітували. Головний мозок щурів видаляли і поміщали на крижану платформу. Гіпокамп видаляли і поміщали в 10 об'ємів (маса:об'єм) крижаного препаративного буфера (137 мМ NaCl, 10,7 мМ KCl, 5,8 мМ KH_2PO_4 , 8 мМ Na_2HPO_4 , 20 мМ HEPES (вільна кислота), 5 мМ йодацетаміду, 1,6 мМ EDTA, pH 7,4); додавали PMSF (фенілметансульфонілфторид), розчинений у метанолі, до кінцевої концентрації 100 мкМ, і суспензію тканини гомогенізували Polytron. Гомогенат центрифугували при 18000×g протягом 20 хв при 4°C, і отриманий після центрифугування осад ресуспендували в 10 об'ємах крижаної води. Після 60 хв інкубації на льоду, новий осад після центрифугування збирали центрифугуванням при 18000×g протягом 20 хв при 4°C. Кінцевий осад після центрифугування ресуспендували в 10 об'ємах буфера і зберігали при -20°C. На день аналізу, тканину відтавали, центрифугували при 18000×g протягом 20 хв і потім ресуспендували в крижаному PBS (сольовому розчині з фосфатним буфером Дульбекко, 138 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ KH_2PO_4 , 8,1 мМ Na_2HPO_4 , 0,9 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ MgCl_2 , Invitrogen/Gibco, pH 7,4) до кінцевої концентрації приблизно 2 мг білка/мл. Вміст білка визначали способом Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265 (1951), використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Зв'язування [^3H]MLA вимірювали з використанням модифікації способів Davies et al., Neuropharmacol. 38: 679 (1999). [^3H]MLA (питома активність дорівнює 25-35 Кі/ммоль) одержували від компанії Tocris. Зв'язування [^3H]MLA визначали з використанням 2-годинної інкубації при 21°C. Інкубації проводили в 48-ямкових титрувальних мікропланшетах, і вони містили приблизно 200 мкг білка на ямку в кінцевому об'ємі інкубації 300 мкл. Інкубаційний буфер являв собою PBS, і кінцева концентрація [^3H]MLA складала 5 нМ. Реакцію зв'язування припиняли фільтрацією зв'язаного ліганду, що містить білок, через скловолоконні фільтри (GF/B, Brandel) з використанням збирача тканини Brandel Tissue Harvester при кімнатній температурі. Фільтри вимочували в деіонізованій воді, що містить 0,33% поліетиленімін, для зниження неспецифічного зв'язування. Кожен фільтр промивали PBS (3×1 мл) при кімнатній температурі. Неспецифічне зв'язування визначали включенням 50 мкМ нерадіоактивного MLA в вибрані ямки.

Інгібування зв'язування [^3H]MLA тестованими сполуками визначали включенням семи різних концентрацій тестованої сполуки в вибрані ямки. Кожну концентрацію повторювали в трьох повтореннях. Величини IC_{50} оцінювали як концентрацію сполуки, що інгібувала на 50% специфічне зв'язування [^3H]MLA. Константи інгібування (величини K_i), представлені в нМ,

розраховували по величинах IC_{50} , використовуючи спосіб Cheng et al., *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108 (1973).

Селективність відносно периферичних nAChR рецепторів

Взаємодія в підтипі nAChR рецепторів м'язової тканини людини

5 Активацію nAChR рецепторів м'язового типу встановлювали на людській колональній клітинній лінії TE671/RD, що походить з ембріональної рабдоміосаркоми (Stratton et al., *Carcinogen* 10: 899 (1989)). Зазначені клітини експресують рецептори, що мають фармакологічні (Lukas, J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 175 (1989)), електрофізіологічні (Oswald et al., *Neurosci. Lett.* 96: 207 (1989)), і молекулярні біологічні профілі (Luther et al., *J. Neurosci.* 9: 1082 (1989)), аналогічні nAChR рецепторам м'язового типу.

10 Клітини TE671/RD підтримували в проліферативній фазі росту відповідно до звичайних протоколів (Bencherif et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 2: 52 (1991) and Bencherif et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 946 (1991)). Клітини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (Gibco/BRL) з 10% кінською сироваткою (Gibco/BRL), 5% фетальною телячою сироваткою (HyClone, Logan UT), 1 mM піруватом натрію, 4 mM L-глутаміну і 50000 одиниць пеніциліну-стрептоміцину (Irvine Scientific). Коли клітини досягали злиття на 80%, їх висівали на 12-ямкові полістирольні планшети (Costar). Експерименти проводили, коли клітини досягали злиття 100%.

20 Функцію нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR) оцінювали з використанням відтоку $^{86}\text{Rb}^+$, відповідно до способу, описаного Lukas et al., *Anal. Biochem.* 175: 212 (1988). На день експерименту, ростове середовище обережно видаляли з ямки, і в кожну ямку додавали ростове середовище, що містить хлорид $^{86}\text{Rb}^+$ (10^6 мкКі/мл). Клітини інкубували при 37°C протягом мінімум 3 год. Після періоду завантаження, надлишок $^{86}\text{Rb}^+$ видаляли, і клітини двічі промивали сольовим розчином, що не містить мітку, з фосфатним буфером Дульбекко (138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , Invitrogen/Gibco, pH 7,4), дотримуючи обережності, щоб не зашкодити клітини. Потім клітини 25 піддавали впливу або 100 мкМ тестованої сполуки, 100 мкМ L-нікотину (Acros Organics), або одного буфера протягом 4 хв. Після періоду впливу, супернатант, який містить $^{86}\text{Rb}^+$, що вивільнився, видаляли і переносили в сцинтиляційні флакони. Додавали сцинтиляційну рідину, і радіоактивність, що вивільняється, вимірювали підрахунком імпульсів, які випускаються 30 рідиною, сцинтиляційним лічильником.

У межах кожного аналізу, кожна точка мала 2 повторення, що уесреднювались. Кількість $^{86}\text{Rb}^+$, що вивільняється, порівнювали і з позитивним контролем (100 мкМ L-нікотину), і з негативним контролем (один буфер) для визначення процентного вивільнення щодо вивільнення з L-нікотину.

35 При доцільності, визначали криві залежності реакції від дози тестованої сполуки. Максимальну активацію для окремих сполук (E_{max}) визначали у вигляді процентної частки максимальної активації, викликаной L-нікотиним. Також визначали концентрацію сполуки, що приводить до половини максимальної активації (EC_{50}) специфічного іонного потоку.

Взаємодія в підтипі nAChR щурячих гангліонарних рецепторів

40 Активацію щурячих гангліонарних nAChR рецепторів устанавлювали на клональній клітинній лінії феохромоцитоми PC12, що являє собою безперервну клональну клітинну лінію, що походить з нервового валіка, отриманого з пухлини мозкового шару надниркової залози щура. Зазначені клітини експресують подібні гангліонарним nAChR рецептори (дивіться Whiting et al., *Nature* 327: 515 (1987); Lukas, J. *Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 175 (1989); Whiting et al., *Mol. Brain Res.* 10:61 (1990)).

45 Щурячі клітини PC12 підтримували в проліферативній фазі росту, відповідно до звичайних протоколів (Bencherif et al., *Mol. Cell. Neurosci.* 2:52 (1991) і Bencherif et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 946 (1991)). Клітини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (Gibco/BRL) з 10% кінською сироваткою (Gibco/BRL), 5% фетальною телячою сироваткою (HyClone, Logan UT), 1 mM пірувату натрію, 4 mM L-глутаміну і 50000 одиниць пеніциліну-стрептоміцину (Irvine Scientific). Коли клітини досягали злиття на 80%, їх висівали в 12-ямкові планшети Nunc (Nunc) і покривали 0,03% поло-L-лізином (Sigma, розчиненим у 100 mM борної кислоти). Експерименти проводили, коли клітини досягали злиття 80%.

50 Функцію нікотинових ацетилхолінових рецепторів (nAChR) оцінювали з використанням відтоку $^{86}\text{Rb}^+$, відповідно до способу, описаного Lukas et al., *Anal. Biochem.* 175: 212 (1988). На день експерименту, ростове середовище обережно видаляли з ямки й у кожну ямку додавали ростове середовище, що містить хлорид $^{86}\text{Rb}^+$ (10^6 мкКі/мл). Клітини інкубували при 37°C протягом мінімум 3 год. Після періоду завантаження, надлишок $^{86}\text{Rb}^+$ видаляли, і клітини промивали двічі сольовим розчином, що не містить мітку, з фосфатним буфером Дульбекко 60 (138 mM NaCl, 2,67 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , 0,9 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 ,

Invitrogen/Gibco, pH 7,4), дотримуючи обережності, щоб не зашкодити клітини. Потім клітини піддавали впливу або 100 мкМ тестованої сполуки, 100 мкМ нікотину, або одного буфера протягом 4 хв. Після періоду впливу, супернатант, який містить $^{86}\text{Rb}^+$, що вивільнився, видаляли і переносили в сцинтиляційні флакони. Додавали сцинтиляційну рідину, і радіоактивність, що вивільняється, вимірювали підрахунком імпульсів, що випускаються рідиною, сцинтиляційним лічильником.

У межах кожного аналізу, кожна точка мала 2 повторення, що усереднювались. Кількість $^{86}\text{Rb}^+$, що вивільняється, порівнювали і з позитивним контролем (100 мкМ нікотину), і з негативним контролем (один буфер) для визначення процентного вивільнення щодо вивільнення з L-нікотину.

При доцільності, визначали криві залежності реакції від дози тестованої сполуки. Максимальну активацію для окремих сполук (E_{max}) визначали у вигляді процентної частки максимальної активації, викликаной L-нікотинном. Також визначали концентрацію сполуки, що приводить до половини максимальної активації (EC_{50}) специфічного іонного потоку.

Розпізнавання нового об'єкту (NOR)

Пам'ять оцінювали з використанням тесту розпізнавання нового об'єкту в трьох дослідженнях. У перший день (дослідницьке дослідження), щурам давали можливість досліджувати відкриту площадку (44,5×44,5×30,5 см) протягом 6 хв. В другий день (дослідження збирання інформації), щурам надавали можливість досліджувати ту ж площадку в присутності двох ідентичних об'єктів (обидва об'єкти А) протягом 3 хв. У третій день (дослідження утримування в пам'яті або згадування), виконання оцінювали наданням тій же тварині досліджувати площадку протягом 3 хв у присутності двох різних об'єктів: знайомого об'єкту А і нового об'єкту В. Між трьома дослідженнями NOR встановлювали інтервал 24 години. Пам'ять розпізнавання оцінювали порівнянням часу, витраченого на обстеження нового (об'єкту В) у порівнянні зі знайомим (об'єктом А) об'єктом під час дослідження згадування. Показник розпізнавання оцінювали для кожної тварини і виражали у вигляді відношення ((час В/час А+час В)×100).

Резюме біологічних даних

Фармакологія in vitro

Резюме первинних фармакологічних даних (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі представлено в таблиці 1 і детально обговорюються нижче.

Первинна фармакологія і селективність: (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід інгібував зв'язування [^3H]метилікаконітину (MLA) із щурячими нативними $\alpha 7$ рецепторами в мембранах гіпокампа щурів з K_i 100 нМ.

(2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід інгібував зв'язування [^3H]-нікотину з людськими рекомбінантними $\alpha 4\beta 2$ нікотинними рецепторами з K_i 1470 нМ і [^3H]епібатидину з щурячими нативними $\alpha 4\beta 2$ рецепторами з K_i 4120 нМ. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід також виявляв знижену афінність до людських нативних нікотинних рецепторів гангліонарного типу (імовірно, $\alpha 3\beta 4$), інгібуючи зв'язування [^3H]епібатидину з рецепторами в мембранах SH-SY5Y з K_i 48 мкМ, і знижували афінність до людських нативних нікотинних рецепторів м'язового типу (імовірно, $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$), інгібуючи зв'язування [^3H]епібатидину з рецепторами в мембранах TE-671 з K_i 136 мкМ. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід інгібував зв'язування [^3H]епібатидину з людськими рекомбінантними нікотинними рецепторами $\alpha 4\beta 4$ у мембранах SH-EP1 з K_i 19 мкМ.

Таблиця 1

Резюме фармакології (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду in vitro

Цільова афінність і активація	
Щурячий гіпокамп ($\alpha 7$), K_i	0,1 мкМ
Зв'язування в корі головного мозку щурів, K_i	4,12 мкМ
Зв'язування з людськими рекомбінантними (SH-EP1) $\alpha 4\beta 2$, K_i	1,47 мкМ
Людські гангліонарні (SH-SY5Y), K_i	48 мкМ
Людський (TE671/RD) м'яз, K_i	136 мкМ
Людські рекомбінантні (SH-EP1) $\alpha 4\beta 4$, K_i	19 мкМ

Фармакологія in vivo

Резюме даних фармакології in vivo (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі представлені в таблиці 2 і детально обговорені нижче.

5

Таблиця 2

Резюме результатів NOR для (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його фармацевтично прийнятної солі

Модель розпізнавання нового об'єкту (NOR)	Результати
Мінімальна ефективна доза (MED)	MED=0,084 мкмоль/кг
Тривалість ефекту	Тривалість 6 год. (при 0,1 мг/кг) Тривалість 18 год. (при 0,3 мг/кг)

(2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід поліпшував довгострокову зорову епізодичну/декларативну пам'ять, по оцінках задачі розпізнавання нового об'єкту (NOR) після перорального введення в здорових щурів. Результати даних досліджень представлені на фіг. 1. Показник розпізнавання групи, що одержував носій, через 24 год. після дослідження збирання інформації склав $54 \pm 1\%$, демонструючи нездатність даної групи розпізнавати знайомий об'єкт після даної затримки. Навпаки, тварини, що одержували (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід, виявляли показники розпізнавання $70 \pm 4\%$ при рівні дози 0,84 мкмоль/кг і $74 \pm 3\%$ при рівні дози 0,28 мкмоль/кг.

10

15

У контрольному дослідженні NOR (фіг. 2), було визначено, що рівень мінімальної ефективної дози (MED) (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду складав 0,084 мкмоль/кг, свідчаючи про те, що щури здатні розпізнавати знайомий об'єкт при усіх досліджуваних рівнях доз. У дослідженні «тільки згадування», підгрупі тварин перорально вводили воду в 1-й день (тобто етап обстеження) і 2-й день (тобто етап збирання інформації) і потім перорально вводили 0,28 мкмоль/кг (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в 3-й день (тобто, етап згадування). Навіть після одного перорального введення, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід демонстрував стимулюючі когнітивну функцію ефекти на даному рівні доз. (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід виявляв показники розпізнавання, що значно перевищують контролю, указуючи на розпізнавання знайомого об'єкту після однократного введення. Пунктирна лінія на рівні 65% позначає критерії заявників біологічної активності посилення когнітивної функції. * $P < 0,05$.

20

25

Оцінювали тривалість ефекту (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду при задачі NOR у здорових щурів. Результати даних досліджень представлені на фіг. 3. Показник розпізнавання в групі, що одержувала носій, через 0,5 год. і 24 год. після введення при дослідженні згадування склав відповідно $51 \pm 1\%$ і $53 \pm 4\%$, демонструючи нездатність даної групи впізнавати знайомий об'єкт після зазначеної затримки. Навпаки, у тварин, що одержували (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (0,28 мкмоль/кг перорально) виявлялися показники впізнавання $68 \pm 4\%$ через 0,5 год., $71 \pm 2\%$ через 2 год. і $62 \pm 2\%$ через 6 год., свідчаючи про те, що щури здатні впізнавати знайомий об'єкт протягом періоду до 6 год. після введення.

30

35

Крім того, у тварин, що одержували (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (0,84 мкмоль/кг перорально), виявлялися показники дізнання $59 \pm 2\%$ через 0,5 год., $63 \pm 2\%$ через 2 год., $68 \pm 3\%$ через 6 год. і $68 \pm 3\%$ через 18 год., свідчаючи про те, що щури здатні впізнавати знайомий об'єкт протягом періоду до 18 год. після введення на даному рівні дози (фіг. 4). Пунктирна лінія на рівні 65% позначає критерії заявників біологічної активності посилення когнітивної функції. * $P < 0,05$.

40

Електрофізіологія

Сполука А, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід, і сполука В, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-4-фторбензамід є частковими агоністами $\alpha 7$ NNR. Однак є різкі відмінності між двома сполуками в їх здатності викликати так звані «горбаті» потоки. «Горбаті» потоки визначаються як хвостові потоки, що спостерігаються під час спільного застосування ендogenous ACh (ацетилхоліну) після видалення агоніста. Як продемонстровано в даному описі, сполука А забезпечує поліпшений профіль і більший потенціал модуляції функції $\alpha 7$ при таких станах, як психотичні

45

50

розлади, де дана нейропередача порушена.

Аналізували залежність реакції від дози сполук А і В з $\alpha 7$ нікотиновими ACh рецепторами. І сполука В, і сполука А є частковими агоністами $\alpha 7$ нікотинових рецепторів ($EC_{50}=664$ нМ, $1,6$ мкМ і $E_{MAX}=46,6\%$, $54,4\%$). Як показано на фіг. 5, і EC_{50} , і E_{MAX} порівнянні в даних лігандів.

Однак спільне застосування сполук з ACh виявило істотні відмінності між цими двома лігандами, як ілюструється на фіг. 6. Сполука В інгібувала потік, що викликається ACh, приблизно внаслідок конкурентного інгібування, тоді як сполука А підсилювала викликаний ACh потік. Одна гіпотеза даного посилення полягає в здатності сполуки А до ортостеричної модуляції.

Крім того, були виявлені істотні відмінності, коли ACh спільно застосовувався з наномолярними концентраціями сполуки В або сполуки А, як показано на фіг. 7 і 8.

На фіг. 7А представлена структура експерименту завантаження чіпа Dynaflo для вимірювання взаємодії ліганду (сполуки А, 200 нМ) з ацетилхоліном (100 мкМ) відносно активації нікотинового $\alpha 7$ рецептора. Канали одержували в такий спосіб: контрольний розчин (канал #2), сам ліганд, що подається (канал #3), подача самого ацетилхоліну (канал #1), і подача суміші ацетилхоліну і ліганду (канал #4).

На фіг. 7В показані чотири репрезентативні криві потоку, отримані при різних послідовностях подачі:

Крива 1, фіг. 7В: Смуга над кривою вказує час подачі ACh. Крива представляє потік, викликаний подачею протягом однієї секунди 70 мкМ ACh. Крива ілюструє результат переміщення комірки з каналу #2 у канал #1 протягом 1 секунди подачі ACh і назад у канал 2 (вимивання). Подача ACh викликала виражену активацію потоку зі швидким відновленням після вимивання.

Крива 4, фіг. 7В: Крива 4 представляє повторення кривої 1 наприкінці вимірювань після подачі ліганду і суміші ACh/ліганду (відновлення).

Крива 2, фіг. 7В: Спрямовані вниз/нагору стрілки вказують час подачі. Крива 2 представляє подачу протягом 5 секунд 200 нМ сполуки А. Крива ілюструє результат переміщення комірки з каналу #2 у канал #3 на 5 секунд. Одна сполука А концентрації 200 нМ не викликає виражених макропотоків.

Крива 3, фіг. 7В: Крива 3 представляє взаємодію подачі ACh і сполуки А. Крива 3 ілюструє результати переміщення комірки з каналу #2 у #3 (2 сек), у #4 (1 сек) і назад у #3 (2 сек) і назад у #2 (вимивання). Глибокий «горбатий» потік створюється внаслідок подачі сполуки А після подачі ACh. Даний потік не був результатом ACh, як видно при порівнянні кривих 1 і 4, або сполуки А, як видно на кривій 2, активації одних $\alpha 7$ рецепторів. Скоріше крива 3 ілюструє приклад взаємодії подачі і ACh, і сполуки А.

На фіг. 7С представлена середня ($n=4$) абсолютних величин «горбатих» потоків, отриманих при різних концентраціях сполуки А (у діапазоні $100-500$ нМ). Заявники спостерігали залежне від концентрації збільшення потоку ($EC_{50}=120$ нМ) з E_{MAX} на рівні приблизно 500 нМ.

Алогічним чином, фіг. 8А, 8В і 8С представляють результати, отримані для сполуки В. Після порівняння фіг. 7А-С з фіг. 8А-С, можуть бути відзначені істотні відмінності, коли ACh спільно застосовувався зі сполукою А, у порівнянні зі сполукою В. Сполука А підсилює потік, викликаний ACh.

Формаліновий тест

Однієї з найбільш клінічно значних прогностичних моделей скринінгу гострого болю є формаліновий тест у мишей (LeBars et al., 2001). У даному тесті, спочатку описаному Dubuisson і Dennis (1977), розведений розчин формаліну ін'єктується в підшовну поверхню задньої лапи суб'єкта (щура або миші) і вимірюється викликана больовим відчуттям поведінка; наприклад, лизання і покусання ін'єктованої лапи. Спостерігаються дві фази реакції. Спочатку рання фаза, що починається безпосередньо після ін'єкції і яка триває $5-10$ хвилин, за якою йде пізня фаза, що може тривати від 15 до 60 хв після ін'єкції. Больова реакція належить на рахунок прямої хімічної стимуляції на ранній фазі і запалення/стійкого болю на пізній фазі (Dubuisson and Dennis, 1977). Реакція на пізній фазі залежить від змін обробки інформації в спинному мозку внаслідок різного загородження протягом ранньої фази (Coderre et al., 1990). Перевага тесту полягає в тому, що два різні типи стимулів використовуються в тому самому аналізі для дослідження можливості варіювання аналгетичних ефектів лікарського засобу в двох фазах тесту (Tjølsen and Hole, 1997).

Експериментальних тварин (дорослих самців мишей CD-1 (Charles River, Raleigh, NC) з масою тіла приблизно $20-25$ г) видаляли з клітки, у якій вони утримувалися, і зважували, потім поміщали в прозору камеру спостереження Plexiglas™ на період акліматизації тривалістю $20-30$ хв. Потім мишей видаляли з камери спостереження і вводили (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-

азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (у вигляді гідрохлориду в 0,9% сольовому розчині) (1,3 або 10 мг/кг підшкірно (у розрахунку щодо вільної основи)), морфін (5 мг/кг; підшкірно) або носій у вигляді 0,9% сольового розчину вводили підшкірно в об'ємі 1 мл/кг. Потім мишей повертали в камеру на заданий період часу попереднього лікування 30 хв (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом і морфіном.

Після періоду попереднього лікування тестованою сполукою, тваринам ін'єктували розчин формаліну (2,5%, отриманий у вигляді розведення 1:4 10% розчину формаліну з фосфатним буфером (Sigma); дистильованої води). Лапу тварини, що підлягає ін'єкції, обережно захоплювали, і розчин формаліну ін'єктували в лапу інтрадермально посередині з дорзальної сторони. Після ін'єкції, тварину відразу повертали в камеру спостереження і включали таймер для оцінки початку I фази. Протягом усього 40-хвилинного сеансу вели відео запис кожної тварини. При бальній оцінці відеозаписів, кожна тварина спостерігали протягом 1 хв через 5-хвилинні інтервали протягом 40-хвилинного сеансу. Реєстрували час, витрачений на лизання ін'єктованої лапи, і відзначали наявність або відсутність переважного використання здорової лапи.

Для аналізів даних, I фазу тесту визначали як від 0 до 5 хв після ін'єкції формаліну, а II фазу визначали як від 20 до 40 хв після ін'єкції формаліну. Реєстрували час, витрачений на лизання, протягом 1-хвилинних інтервалів, і наносили на графік у вигляді середньої величини \pm S.E.M. (стандартна помилка середньої). Для порівнянь груп лікування, однобічні варіаційні аналізи (ANOVA) виконували для кожної фази сеансу при використанні виду лікування як залежної змінної величини. При доцільності виконували аналізи з використанням post-hoc тесту для визначення відмінностей визначених груп.

Отримані результати демонструють, що хоча не було статистично значимої дози (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, що зменшує час, витрачений на лизання лапи в I фазі, проте, (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у дозі 10 мг/кг значно зменшував час, витрачений на лизання лапи, у II фазі формалінового тесту ($P < 0,05$). Позитивний морфіновий контроль (5 мг/кг; підшкірно) був ефективний в обох фазах тесту. Представлені дані вказують на те, що (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід має анагетичний потенціал відносно хімічно викликаного запалення/стійкого болю.

Наступний аналіз початкових відеозаписів, де проводили бальну оцінку кожної тварини протягом усього періоду часу для I фази (0-5 хв після ін'єкції формаліну) і II фази (20-40 хв), виявив аналогічну тенденцію для отриманих даних, але не зміг досягти статистичної значимості для ефекту (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на зменшення часу, витраченого на лизання підданої ін'єкції лапи й у I фазі, і в II фазі.

Формаліновий тест описаний у наступних публікаціях, що включені в даний опис шляхом посилання:Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R (1990), Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection, Brain Res. 535:155-158; Dubuisson D and Dennis SG (1977), The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, Pain 4: 161-174; Malmberg AB and Bannan AW (2002), Unit 8.9: Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents, Current Protocols in Neuroscience; and Tjølsen A and Hole K (1997), Animal models of analgesia, In: Handbook of Experimental Pharmacology Volume 130: The Pharmacology of Pain (Eds. A. Dickenson and J.-M. Besson), Springer Verlag, New York pp. 1-20.

Термічна гіпералгезія, викликана повним ад'ювантом Фрейнда (CFA)

Ін'єкція повного ад'юванта Фрейнда (CFA) у щурів звичайно використовується для оцінки сполук з потенціалом застосування як лікарських засобів при лікуванні моноартриту (остеоартриту) і інших запальних станів. Ознаки гіпералгезії розвиваються в межах 24 год. (Schaible and Grubb, 1993).

(2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід оцінювали відносно можливого анагетичного ефекту в тесті термічної гіпералгезії, викликаній CFA у щурів, з використанням способів, аналогічних способам, описаним Walker і співробітниками (2003). Коротко, дорослі самці щурів Sprague-Dawley (BioLasco, Taiwan) з масою тіла 180 ± 20 г при одержанні, були методом випадкової вибірки включені в групи лікування по 8 тварин на групу. Кожна тварина одержувала підпідшовну ін'єкцію (0,1 мл) CFA (DIFCO, 264010; 0,1% розчин) у праву задню лапу за 24 год. до експериментального тестування. Термічну гіпералгезію тестували з використанням вимірника аналгезії при подразненні лап/хвоста (IITC Model-336G, MTC, USA) з термічно регульованою склянню підлогою, температура якого встановлена на 30°C. Тварину поміщали усередину пластикової камери на підвищену скляну підлогу, і пучок світлових променів, що проходить під склянню підлогою, спрямовували на

підшовну поверхню правої задньої лапи. Автоматично реєструвався час, необхідний для того, щоб тварина відсмикнула лапу від термічного подразника. Інтенсивність світла регулювали для виклику середньогрупової вихідної латентності від 12 до 14 секунд (перед CFA) і вводили відсічення латентності 20 секунд. Величину латентності відсмикування лапи одержували для

5 кожного щура і визначали як термічний больовий поріг.

Через 24 год. після ін'єкції CFA, тварин попередньо відбирали (по виразній присутності термічної гіпералгезії) для експериментування, тільки якщо тенденція до відсмикування лапи складала менше ніж 75% вихідного рівня. Тестована речовина, морфін і носій вводили підшкірної (s. c.) ін'єкцією під час 0. Потім рівень термічної гіпералгезії після лікування

10 вимірювали через 60 хв після лікування. Для порівняння груп, що одержували лікування тестованою речовиною, і групи контролю з уведенням носія, застосовували односторонній дисперсійний аналіз ANOVA з наступним критерієм Dunnett. Активність вважали значимою при рівні $P < 0,05$.

У цілому, підшкірне (s. c.) введення (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду в дозі 0,1, 1 або 10 мг/кг не було зв'язано з яким-небудь значимим анальгетичним ефектом через 1 годину після введення на викликану CFA термічну гіпералгезію в щурів, у порівнянні з контрольною групою, що одержувала носій (0,9 % сольовий розчин). Навпроти, одночасно застосовуваний еталонний стандарт морфін (3 мг/кг s. c.) викликав значиму анальгетичну активність через 1 год. після введення. Дивіться фіг. 13. Як посилення

20 приводяться публікації: Schaible H-G and Grubb BD (1993), Afferent and spinal mechanisms of joint pain, Pain 55: 5-54; і Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ and McIntyre P (2003), The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain, JPET 304: 56-62.

Діабетична нейропатія, викликана стрептозотоцином (STZ) (про що свідчить алодинія)

25 Периферична нейропатія, основне ускладнення цукрового діабету, часто приводить до спонтанного болю або сприйняття болю від контакту зі звичайно не больовим подразником. Такий нейропатичну біль випробовують 20-24% страждаючих діабетом пацієнтів або приблизно 30 мільйонів людей в усьому світі (Schmader, 2002). Модель викликаного стрептозотоцином (STZ) цукрового діабету в щурів забезпечує засіб для оцінки ефективності тестованих сполук,

30 які перспективні відносно можливого лікування з приводу периферичної нейропатії, і для розуміння їх передбачуваного механізму дії. На даній моделі, однократна ін'єкція STZ, антибіотика, що імітує клінічний цукровий діабет, викликаючи необоротне ушкодження панкреатичних β і α -клітин, приведе до хронічної гіперглікемії, нервової дисфункції і больової чутливості. У даному дослідженні використовується модель діабетичної нейропатії, викликаной

35 STZ у щурів, для дослідження впливів (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на механічну алодинію як оцінку болю.

Розвиток діабету викликали ін'єкцією 0,5 мл стрептозотоцину (60 мг/кг), розчиненого в цитратному буфері (pH=6), у хвостову вену кожного щура. Розвиток цукрового діабету підтверджували вимірюванням рівнів глюкози в крові (BGL) у всіх тварин на 3-й день дослідження (BGL > 300 мг/дкл). BGL вимірювали знову на 14-й день дослідження і тільки тварин, що виявили тактильну алодинію, знову тестували для визначення їхнього BGL на 21-й

40 день дослідження. BGL вимірювали на 16-й день у тварин, що не виявили тактильну алодинію на 14-й день дослідження. Цих тварин тестували знову для визначення їхнього BGL на 23-й день дослідження.

45 (2S,3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (0,1, 1 або 10 мг/кг перорально) вводили у вигляді розчину гідрохлориду у воді один раз на день, починаючи на 14-й день дослідження або 16-й день дослідження і продовжуючи відповідно до 21-го або 23-го дня дослідження включно. Контрольний препарат габапентин (у 0,9% сольовому розчині, 150 мг/кг внутрішньоочеревинно) вводили тільки в дні тестування алодинії. Уведення

50 тестованої сполуки, носія або контрольного препарату було оснований на оцінці алодинії на 14-й день дослідження. Якщо алодинія була відсутня на 14-й день дослідження, то оцінку у тварини проводили знову на 16-й день дослідження. Больову реакцію вимірювали або на 14-й і 21-й дні дослідження, або на 16-й і 23-й дні через 30 хв після введення тестованої сполуки.

Для оцінок алодинії, використовували тверді нитки або волоски фон Фрея відповідно до способів Chaplan і співробітників (1994). Коротко, щурів поміщали в замкнутий простір і ставили на металеву ґратчасту сітку, але їм була надана можливість вільного руху. Кабінки щурів покривали червоним целофаном для зменшення розподілів у навколишнє середовище. Тест починали після припинення дослідницької поведінки.

60 Гризуни виявляли рефлекс відсмикування лапи, коли відбувався несподіваний дотик до їх лапи. Коли кінчик волоска фон Фрея даної довжини і діаметра придавлювали до шкіри під

прямими кутами, сила накладання збільшувалася, поки дослідник продовжував просувати зонд до згинання волоска. Після згинання волоска, зонд просували, викликаючи більше згинання волоска, але без додаткової сили, що прикладається. Тварина виявляла відчуття відсмикування своєї лапи. За відсутності реакції відсмикування лапи на спочатку вибраний волосок, робили сильніше подразнення; у випадку відсмикування лапи, вибирали наступний слабший подразник. Таким чином, отриманий у результаті тип позитивних і негативних реакцій використовували для визначення порога відсмикування лапи.

Набір монофіламентів фон Фрея забезпечує приблизну логарифмічну шкалу даної сили і лінійну шкалу інтенсивності болю, що сприймається. Нижче представлена таблиця, що показує силу (г) і відповідний їй розмір монофіламентів.

Розмір	1,65	2,36	2,44	2,83	3,22	3,61	3,84	4,08	4,17	4,31	4,56	4,74	4,93	5,07	5,18	5,46	5,88	6,10	6,45	6,65
Сила (г)	0,008	0,02	0,04	0,07	0,16	0,40	0,60	1,00	1,40	2,00	4,00	6,00	8,00	10	15	26	60	100	180	300

Усі нормально розподілені дані представлені у вигляді середніх величин \pm SEM, а також у вигляді окремих величин у тварин з наступним Т-критерієм Стьюдента (Програмне забезпечення: Microsoft® Excel). Величина $p < 0,05$ вважається такою, що представляє значиму відмінність. Унаслідок ненормального розподілу даних алодинії, опису цих даних надані й у вигляді середніх величин (\pm SEM), і медіанних величин для представлення їхньої неточної природи і спотвореного розподілу.

Дані фон Фрея представлені у вигляді мінімальної сили (г), необхідної для відсмикування кожної задньої лапи. Зменшення больового порога реєстрували через 14/16 днів після ін'єкції STZ. Дане зменшення було виражено у вигляді збільшення чутливості тварини до волосків фон Фрея. Середня і групова медіанна сила відсмикування у тварин, що одержували носій, у вихідному стані перед ін'єкцією STZ складала $57,57 \pm 2,43$ (групова медіана дорівнює 60 г). У дні дослідження 14/16, медіана сили відсмикування лапи була значно нижча ($20,5\text{--}22,14 \pm 2,36$ г; $p < 0,01$ у порівнянні з вихідним рівнем; медіана дорівнює 20,5 г), вказуючи на наявність тактильної алодинії перед лікуванням (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом. При завершенні дослідження (дні дослідження 21/23), тактильна алодинія ще спостерігалася після лікування ($20,46 \pm 3,31$ г; $p < 0,01$, у порівнянні з вихідним рівнем; медіана дорівнює 8 г).

У цілому, лікування 1 мг/кг (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду інгібувало алодинію через 30 хв після його введення в дні дослідження 14/16, у порівнянні з попереднім лікуванням ($p < 0,01$) або з контролем носія ($p < 0,05$). Лікування (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом у дозі 10 мг/кг інгібувало алодинію через 30 хв після його введення в дні дослідження 14/16, у порівнянні з попереднім лікуванням ($p = 0,012$). Лікування (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом у дозі 1 мг/кг інгібувало алодинію через 30 хв після його введення в дні дослідження 21/23, у порівнянні з попереднім лікуванням ($p = 0,012$). Лікування (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом у дозі 10 мг/кг (група 11M) інгібувало алодинію через 30 хв після його введення в дні дослідження 21/23, у порівнянні з контролем носія ($p < 0,05$). Лікування позитивним контролем, препаратом габапентин, значно усувало тактильну алодинію в усі дні лікування, у порівнянні з попереднім лікуванням (дні дослідження 14/16 і 21/23; $p < 0,01$) або, у порівнянні з контролем носія (дні дослідження 21/23; $p < 0,01$). При закінченні дослідження (день дослідження 21/23), аналізували рівні інсуліну в сироватці. Значні відмінності рівнів інсуліну не спостерігалися. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у всіх дозах вводили щодня, починаючи з 14-го або 16-го дня дослідження відповідно до 21-го або 23-го дня дослідження включно. Больовий тест виконували перед ін'єкцією тестованої сполуки (ін'єкція перед TI) і через 30 хвилин після введення тестованої сполуки (ін'єкція після TI). Позитивний контроль, габапентин, вводили за 2 години до больового тестування в дні дослідження 14 або 16 і 21 або 23. Лікування позитивним контролем, габапентином, значно усувало тактильну алодинію в усі дні лікування, у порівнянні з попереднім лікуванням і з носієм: $22,77 \pm 3,77$ г (медіана дорівнює 15 г), у порівнянні з $45,62 \pm 4,24$ г (медіана дорівнює 60 г) відповідно перед і після лікування в дні дослідження 14/16, $p < 0,01$; $28,23 \pm 4,91$ г (медіана дорівнює 20,5 г), у порівнянні з $50,88 \pm 4,12$ г (медіана дорівнює 60 г) відповідно до і після лікування в дні дослідження 21/23, $p < 0,01$; $45,62 \pm 4,24$ г (медіана дорівнює 60 г), у порівнянні з $26,61 \pm 4,41$ г (медіана дорівнює 15 г) у групі носія у дні дослідження 14/16, $p < 0,01$; $50,88 \pm 4,12$ г (медіана дорівнює 60 г), у порівнянні з $20,46 \pm 3,31$ г (медіана дорівнює 10 г) у групі носія в дні дослідження 21/23, $p < 0,01$.

Негайно після тестування фон Фрея, у дні закінчення дослідження, у тварин брали кров. Наприкінці дослідження, проводили евтаназію тварин розчином кетаміну/ксилазину (внутрішньоочеревинно). Приблизно 0,5-0,7 мл крові брали за допомогою проколювання серця в пробірки, що містять антикоагулянт (КЗ EDTA). Зразки крові тримали охолодженими на льоду і центрифугували в межах 30 хв після узяття. Для одержання плазми кров центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв. Плазму переносили в марковані пробірки і зберігали у вертикальному положенні і замороженими приблизно при -20°C до транспортування. Кожен зразок маркували номером сполуки і номером тварини.

Усі тварини під час дослідження набрали масу тіла. Не було значних відмінностей збільшення маси тіла між групами.

Середні рівні глюкози крові збільшилися у всіх тварин. Вихідний рівень склав $108,86 \pm 1,03$ мг/дкл і збільшився до $390,99 \pm 6,47$ мг/дкл на 3-й день дослідження. Між групами не було виявлено статистичних відмінностей. Високі рівні глюкози були також виміряні на 14/16 і 21/23 дні дослідження, на підставі результатів виявлення алодинії на 14-й день дослідження. Наприкінці дослідження (21 і 23-й дні дослідження) середній рівень глюкози крові склав $403,86 \pm 8,45$ мг/дкл.

При закінченні дослідження, аналізували рівні інсуліну в сироватці. Рівень інсуліну в групі контролю носія при закінченні дослідження склав $0,79 \pm 0,41$ мкг/л. Між групами лікування не спостерігалися статистично значні відмінності рівнів інсуліну.

Результати оцінки по фон Фрею вказують на те, що (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід ефективний у зменшенні болю при діабетичній нейропатії в дозах 1 мг/кг і 10 мг/кг, у порівнянні з групою, що одержувала носій. Дивіться фіг. 14.

Як посилання приводяться публікації: Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994), Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, J. Neurosci. Methods 53: 55-63; Schumader KE (2002), Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy, Clinical Journal of Pain 18: 350-354; і Sommer C (2003). Painful neuropathies, Curr. Opin. Neurol. 16: 623-628.

Мишача модель цукрового діабету II типу

Миша db/db, загальноновизнана модель діабету 2 типу, являє собою лептин-дефіцитний мутант, що експресує страждаючий на ожиріння фенотип, а також звичайно експресує симптоми, що включають гіперглікемію, гіперліпідемію і гіперінсулінемію (Halaas et al., 1995 and Lee et al., 1996). Дана експериментальна модель діабету у тварини використовувалася в дослідженні, призначеному для визначення ефектів (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на масу тіла і декілька додаткових метаболічних параметрів.

У даному дослідженні, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід вводили повторно перорально (за допомогою примусового годування) у дозі 1,0 мг/кг один раз на день, починаючи з віку приблизно 3 тижнів, і продовжуючи протягом усього 7-тижневого дослідження. Не страждаючі на діабет гетерозиготні однопиплідні миші (db/+; позначені як "Db") використовувалися як контролі. Маса тіла і споживання корму визначали двічі в тиждень. $\alpha 7$ антагоніст метиллікаонтин (MLA) також вводили одночасно примусовим годуванням в дозі 3 мг/кг на день вибраним когортам мишей db/db (позначених як "db") або db/+. Наприкінці 7-тижневої схеми введення, розраховували загальну швидкість росту (загальне збільшення маси тіла) і середнє добове споживання корму. Крім того, рівні глюкози оцінювали в мишей, що голодували протягом ночі. Крім того, аналізовані зразки крові в мишей, що голодували протягом ночі, брали для вимірювань фактора пухлинного некрозу- α (TNF- α), тригліцеридів і глікозильованого гемоглобіну (HbA1c). Усі дані виражені у вигляді середньої величини \pm SEM. Для кожного дослідженого параметра, відмінності серед усіх груп порівнювали одношляховим варіаційним аналізом ANOVA post-hoc тестом множинного порівняння Neuman-Keuls.

У цілому, щоденне введення протягом 7-тижневого курсу (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду страждаючим на ожиріння мишам db/db привело до значимого зменшення всіх виміряних параметрів, у порівнянні з контрольними, страждаючими на ожиріння мишами db/db, що одержували лікування носієм. Відносно загальної маси тіла, середнього добового споживання корму, рівнів глікозильованого HbA1c і концентрації TNF- α у плазмі, спільне введення MLA послаблювало ефект. Хоча зниження рівня глюкози і тригліцеридів плазми не було статистично значимим під дією спільного введення MLA з (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом, малася тенденція в напрямку зазначеного зниження.

Як показано на фіг. 15, наприкінці семи тижнів лікування, у віці від 3 до 10 тижнів, загальне збільшення маси тіла в контрольних, що одержували носій, страждаючих на ожиріння ("db") було значно більшим, ніж збільшення маси тіла в худих контрольних тварин, що одержували носій ("Db"). При порівнянні, збільшення маси тіла було значно нижче в страждаючих на ожиріння мишей ("db-тестована сполука"). Слід зазначити, що у тварин, яким спільно вводили MLA з (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом, не вдалося виявити знижене збільшення маси тіла, що виявлялася в страждаючих на ожиріння щурів, яким вводили один (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід.

Як показано на фіг. 16, добове споживання корму в контрольній гладкій групі, що одержувала носій ("db"), було значно більше, ніж у худих контролів, що одержували носій ("Db"). Середнє споживання їжі було значно нижче в отримуючих лікування TC-(2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом гладких мишей ("db-досліджувана сполука"), ніж у гладких контролів. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід не впливав на споживання корму худими мишами ("Db-досліджувана сполука"). У тварин, яким спільно вводили MLA з (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом, не вдалося виявити зниженого добового середнього споживання їжі, що проявлялось гладкими щурами, яким вводили один (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід.

Як показано на фіг. 17, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно інгібував рівні глюкози в плазмі натще в гладких мишей ("db-досліджувана сполука"). Однак даний ефект не усувався спільним введенням з MLA.

Як показано на фіг. 18, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно інгібував рівні глікозильованого HbA1c у гладких мишей ("db-досліджувана сполука"). Зниження рівня глікозильованого HbA1c (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом послаблювалося спільним введенням MLA.

Як показано на фіг. 19, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід значно знижував вміст прозапального цитокіну TNF альфа в гладких мишей ("db-досліджувана сполука"). Ці ефекти інгібувалися спільним введенням альфа7 антагоніста MLA.

Як показано на фіг. 20, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід приводив до значно нижчих рівнів тригліцеридів у гладких мишей ("db-досліджувана сполука"), у порівнянні з контролями, що одержували носій ("db"). Зниження вмісту тригліцеридів (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамідом не послаблювалося спільним введенням MLA.

Гіперчутливість легенів, дихальних шляхів, вимірювання Penh

Використовуючи спосіб Hamelmann et al, (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід оцінювали відносно можливого інгібування гіперчутливості дихальних шляхів у мишей. Коротко, сенсibilізованих овальбуміном (OVA) тварин, по 12 тварин на групу, піддавали антигенній стимуляції аерозолем 5 % OVA протягом 25 хв на 21-й, 23-й і 25-й дні. Мишам вводили носій або (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід підшкірно (s. c.) двічі на день з 21-го по 26-ий день або один раз на день інтратрахеально (i. t.), за 30 хвилин до аерозольної антигенної стимуляції в 21-й, 23-й і 25-й дні, а також провокаційної проби з метахоліном або збиранням рідини бронхоальвеолярного лаважа (BALF) на 26-ий день. Дексаметазон, еталонний стандарт, вводили в дозі 3 мг/кг перорально (p. o.) один раз на день за 60 хв до антигенної стимуляції OVA на 21-й, 23-й і 25-й день і за 60 хв до провокаційної проби з метазхоліном або збиранням BALF на 26-ий день. Неінвазивні вимірювання реактивності дихальних шляхів виконували з використанням плетизмографії всього тіла, при якій збільшення посиленої паузи (Penh) служить як показник обструкції дихальних шляхів. Реакції на вдихуваний метахолін вимірювали і розраховували у вигляді процентної частки відповідних вихідних величин. Непарний критерій Стюдента використовували для порівняння контролю при введенні носія з хібно маніпульованою групою; односторонній варіаційний аналіз ANOVA і post-hoc аналіз Dunnett застосовували для порівняння контролю з носієм і групами лікування. Статистична значимість вважається при $P < 0,05$.

Фіг. 21 ілюструє ефект (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід на % змін реакції Penh на провокаційну пробу з метахоліном у сенсibilізованих овальбуміном мишей. Реакція Penh на метахолін (10 і 30 мг/мл) значно

підсилювалася в сенсibilізованих OVA, у порівнянні з помилковим контролем. Дексаметазон у дозі 3 мг/кг перорально викликав значне інгібування викликаного метахоліном (10 і 30 мг/мл) збільшення величин Penh, і в абсолютних, і в % величинах, у порівнянні з тваринами, що одержували OVA, указуючи на ефективність проти гіперчутливості дихальних шляхів. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у дозі 0,1, 1 і 10 мг/кг 2 рази на день підшкірно викликав значиме інгібування викликаного метахоліном наростання величин Penh; інтратрахеальне введення в дозі 10 мг/кг також було зв'язано зі значимим інгібуванням.

Вплив (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на кількість лейкоцитів/лейкоцитарну формулу і % кількості лейкоцитів/лейкоцитарної формули в сенсibilізованих овальбуміном мишей ілюструється відповідно на фіг. Y і Z. Значне збільшення загального числа лейкоцитів, нейтрофілів, лімфоцитів, моноцитів і еозинофілів було відзначено в BALF у сенсibilізованих OVA тварин у порівнянні з хибно лікуванням контролем, у якому значиме інгібування було викликано дексаметазоном. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у дозі 0,1 і 1 мг/кг підшкірно, але не в дозі 10 мг/кг підшкірно, значно знижував загальну кількість лейкоцитів і еозинофілів у BALF; (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у дозі 10 мг/кг підшкірно зменшував вміст моноцитів, лімфоцитів; лімфоцити знижувалися при дозі 0,1 і 1 мг/кг підшкірно, а також при дозі 10 мг/кг інтратрахеально.

Дані результати демонструють, що (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід у дозі 0,1, 1 і 10 мг/кг підшкірно й у дозі 10 мг/кг інтратрахеально в порівнянні з дексаметазоном забезпечує значний захист проти гіперреактивності дихальних шляхів на моделі сенсibilізованих OVA мишей (про що свідчить знижена реакція Penh на провокаційну пробу з метахоліном з використанням плетизмографії всього тіла в мишей) і пов'язаний зі значимим зниженням вмісту еозинофілів і лейкоцитів у BALF (який, однак, не має погодженого зв'язку між реакцією і дозою).

Фіг. 21 ілюструє вплив (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на % змін реакції Penh на провокаційну пробу з метахоліном у мишей, сенсibilізованих овальбуміном. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го дня по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останнє введення виконували за 30 хв до провокаційної проби з метахоліном на 26-ий день. Визначали величини Penh. Для порівняння імунізованих OVA груп носія й інших видів використовували односторонній варіаційний аналіз лікування з наступним критерієм Даннетта. *P<0,05 у порівнянні з імунізованим OVA контролем носія.

Фіг. 22 ілюструє вплив (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на загальну кількість лейкоцитів і лейкоцитарну формулу в мишей, сенсibilізованих овальбуміном. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го дня по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останнє введення здійснювали за 30 хв до збирання рідини бронхоальвеолярного лаважа на 26-ий день. Визначали загальне число лейкоцитів і лейкоцитарну формулу. Для порівняння імунізованих OVA груп носія й інших видів використовували односторонній варіаційний аналіз лікування з наступним критерієм Даннетта. *P<0,05 у порівнянні з імунізованим OVA контролем носія.

Фіг. 23 ілюструє вплив (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду на % загальної кількості лейкоцитів і лейкоцитарної формули в мишей, сенсibilізованих овальбуміном. (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід і носій вводили підшкірно 2 рази на день або вводили інтратрахеально 4 рази на день протягом 6 послідовних днів з 21-го дня по 25-й день за 30 хв до антигенної стимуляції OVA, і останнє введення здійснювали за 30 хв до збирання рідини бронхоальвеолярного лаважа на 26-ий день. Визначали загальне число лейкоцитів і лейкоцитарну формулу. Для порівняння імунізованих OVA груп носія й інших видів використовували односторонній варіаційний аналіз лікування з наступним критерієм Даннетта. *P<0,05 у порівнянні з імунізованим OVA контролем носія.

Як посилання приводиться публікація: Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, and Gelfand EW, Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography, Am J Respir Crit Care Med, 156:766-775, 1997.

Тестовані сполуки для експериментів, описаних у даній заявці, використовували у вільній або сольовій формі. Поки немає інших уточнень, сполука, надана для тестування in vivo, являла

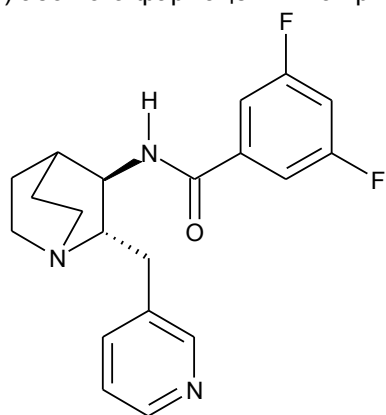
собою гідрохлорид (2S, 3R)-N-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, причому кількість дози, що вводиться, визначали допущенням, що уводиться форма вільної основи.

Визначені фармакологічні реакції, що спостерігаються, можуть варіюватися відповідно до й залежно від конкретної вибраної активної сполуки або від того, чи присутні фармацевтичні носії, а також від типу використовуваної препаративної форми і шляху введення, і такі очікувані зміни або відмінності результатів передбачені відповідно до здійснення даного винаходу.

Хоча в даній заявці ілюструються і детально описані визначені варіанти здійснення даного винаходу, винахід не обмежується ними. Представлені вище детальні описи ілюструють даний винахід і не повинні розглядатися як складаючі які-небудь обмеження винаходу. Передбачається, що модифікації винаходу будуть очевидні для фахівців у даній галузі, і всі модифікації, що не відходять від суті винаходу, включені в обсяг прикладеної формули винаходу.

15 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятна сіль



20 формула I

2. Сполука за п. 1, яка по суті вільна від одного або більше з

(2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, (2R,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду і (2S,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду.

3. Сполука за п. 1 або 2 у вигляді кислотно-адитивної солі, де кислота вибрана з хлористоводневої кислоти, метансульфонової кислоти, малеїнової кислоти, фосфорної кислоти, 1-гідрокси-2-нафтоїної кислоти, маленової кислоти, L-винної кислоти, фумарової кислоти, лимонної кислоти, L-яблучної кислоти, R-мигдальної кислоти, S-мигдальної кислоти, бурштинової кислоти, 4-ацетамідбензойної кислоти, адипінової кислоти, галактарової кислоти, ди-п-толуол-D-винної кислоти, щавлевої кислоти, D-глюкуронової кислоти, 4-гідроксибензойної кислоти, 4-метоксибензойної кислоти, (1S)-(+)-10-камфорсульфонової кислоти, (1R,3S)-(+)-камфороної кислоти і п-толуолсульфонової кислоти, або її гідрат або сольват.

4. Сполука за п. 3, де молярне відношення кислоти до (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду складає 1:2 або 1:1.

35 5. Сполука, вибрана з групи:

моногідрохлориду (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату;

монофосфату (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату;

40 моно-4-гідроксибензоату (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату і

гемі-4-гідроксибензоату (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду або його гідрату або сольвату.

45 6. (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід або його фармацевтично прийнятна сіль, що містить менше ніж 25 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

7. Сполука за п. 6, що містить менше ніж 15 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

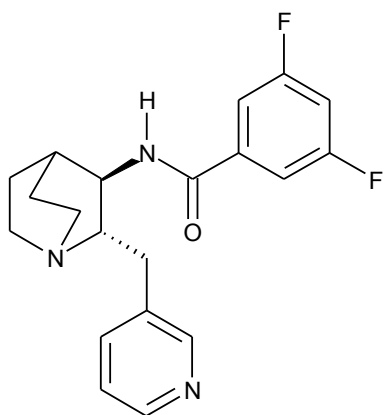
5 8. Сполука за п. 6, що містить менше ніж 5 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

9. Сполука за п. 6, що містить менше ніж 2 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

10 10. Сполука за п. 6, що містить менше ніж 1 мас. % (2R,3R)-, (2S,3S)- або (2R,3S)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, або окремо, або в комбінації.

11. (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід (формула I) або його фармацевтично прийнятна сіль

15



формула I

який є по суті кристалічним.

20 12. Поліморфна форма гідрохлориду (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, що характеризується рентгенограмою, що містить один або більше піків у межах $\pm 0,5$ градуса 2θ наступних піків:

20
8,4
8,8
11,9
13,2
15,2
16,0
17,6
18,4
18,9
19,9
20,1
21,3
23,1
25,4
26,2

25 13. Поліморфна форма гідрохлориду (2S,3R)-N-(2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензаміду, що характеризується рентгенограмою, що по суті відповідає фіг. 9.

14. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-13 при одержанні лікарського засобу для лікування або профілактики захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$.

15. Спосіб лікування або профілактики захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$, що включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-13.

16. Сполука за будь-яким з пп. 1-13 для застосування при лікуванні або профілактиці захворювань або дисфункцій, опосередкованих $\alpha 7$.

17. Застосування сполуки за будь-яким з пп. 1-13 при одержанні лікарського засобу для лікування або профілактики захворювання або дисфункції, що вибрано з групи, яка складається з:

i) болю, включаючи один або більше з гострого, неврологічного, запального, нейропатичного, хронічного болю, сильного хронічного болю, післяопераційного болю, болю, пов'язаного зі злоякісними новоутвореннями, стенокардією, нирковою або печінковою колькою, менструацією, мігренню, подагрою, артритом, ревматоїдним захворюванням, тендосиновітом, васкулітом, тригемінальною або герпетичною невралгією, болю при діабетичній нейропатії, каузалгії, болю в поперековій області, синдромів деаферентації й авульсії плечового сплетення;

ii) метаболічного синдрому, збільшення маси тіла, цукрового діабету I типу, цукрового діабету II типу або діабетичної нейропатії;

iii) запалення, включаючи одне або більше захворювань із псоріазу, астми, атеросклерозу, ідіопатичного пневмосклерозу, хронічного і гострого запалення, ендотоксемії, подагри, гострої псевдоподагри, гострого подагричного артриту, артриту, ревматоїдного артриту, остеоартриту, відторгнення алотрансплантата, хронічного відторгнення трансплантата, астми, атеросклерозу, легеневого ушкодження, залежного від мононуклеарів-фагоцитів, atopічного дерматиту, хронічного обструктивного легеневого захворювання, гострого респіраторного дистрес-синдрому дорослих, гострого торакального синдрому при серповидноклітинному захворюванні, запальних кишкових захворювань, хвороби Крона, виразкового коліту, гострого холангіту, афтозного стоматиту, дивертикуліту, гломерулонефриту, вовчакового нефриту, тромбозу і реакції трансплантат проти хазяїна; і

iv) когнітивних порушень, включаючи одне або більше з вікового порушення пам'яті, незначного когнітивного порушення, пресенільної деменції, хвороби Альцгеймера з раннім початком, сенільної деменції, деменції типу Альцгеймера, деменції типу Альцгеймера від легкого до помірного ступеня тяжкості, деменції з тільцями Леві, судинної деменції, хвороби Альцгеймера, інсульту, комплексу деменції при СНІДі, розладу з дефіцитом уваги, розладу гіперактивності з дефіцитом уваги, дислексії, шизофренії, шизофреніформного розладу, шизоафективного розладу, когнітивних дефіцитів при шизофренії і когнітивної дисфункції при шизофренії.

18. Спосіб лікування або профілактики захворювання або дисфункції, що включає введення терапевтично ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-13, де захворювання або дисфункцію вибрано з групи, яка складається з:

i) болю, включаючи один або більше з гострого, неврологічного, запального, нейропатичного, хронічного болю, сильного хронічного болю, післяопераційного болю, болю, пов'язаного зі злоякісними новоутвореннями, стенокардією, нирковою або печінковою колькою, менструацією, мігренню, подагрою, артритом, ревматоїдним захворюванням, тендосиновітом, васкулітом, тригемінальною або герпетичною невралгією, болю при діабетичній нейропатії, каузалгії, болю в поперековій області, синдромів деаферентації й авульсії плечового сплетення;

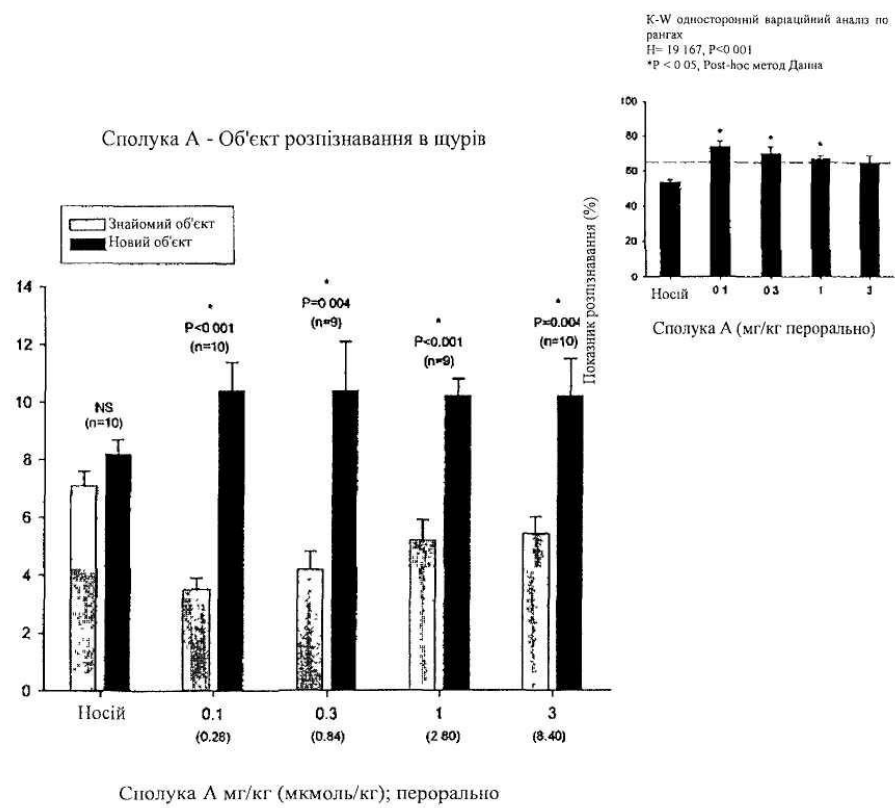
ii) метаболічного синдрому, збільшення маси тіла, цукрового діабету I типу, цукрового діабету II типу або діабетичної нейропатії;

iii) запалення, включаючи одне або більше захворювань із псоріазу, астми, атеросклерозу, ідіопатичного пневмосклерозу, хронічного і гострого запалення, ендотоксемії, подагри, гострої псевдоподагри, гострого подагричного артриту, артриту, ревматоїдного артриту, остеоартриту, відторгнення алотрансплантата, хронічного відторгнення трансплантата, астми, атеросклерозу, легеневого ушкодження, залежного від мононуклеарів-фагоцитів, atopічного дерматиту, хронічного обструктивного легеневого захворювання, гострого респіраторного дистрес-синдрому дорослих, гострого торакального синдрому при серповидноклітинному захворюванні, запальних кишкових захворювань, хвороби Крона, виразкового коліту, гострого холангіту, афтозного стоматиту, дивертикуліту, гломерулонефриту, вовчакового нефриту, тромбозу і реакції трансплантат проти хазяїна; і

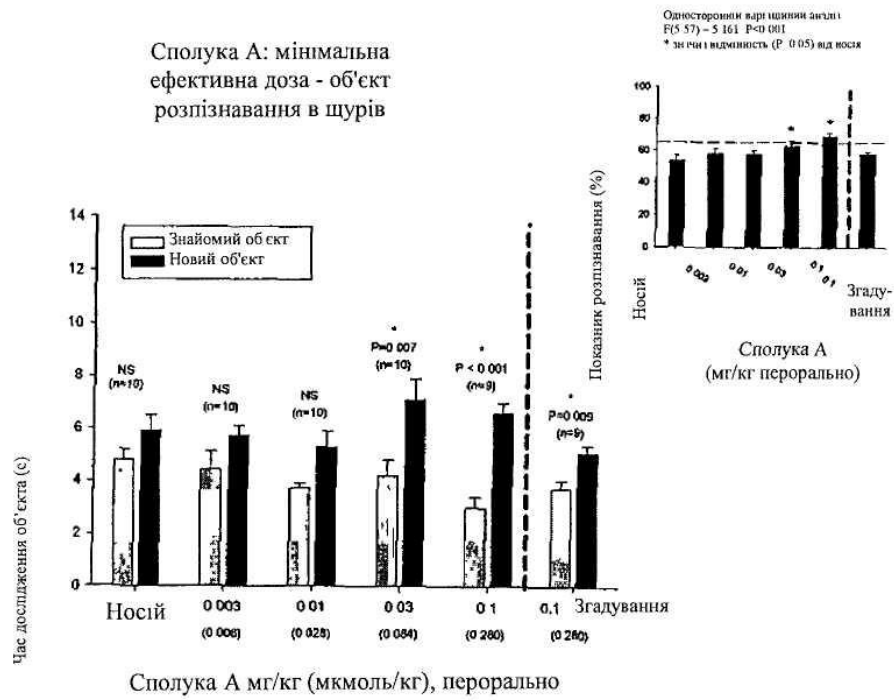
iv) когнітивних порушень, включаючи одне або більше з вікового порушення пам'яті, незначного когнітивного порушення, пресенільної деменції, хвороби Альцгеймера з раннім початком, сенільної деменції, деменції типу Альцгеймера, деменції типу Альцгеймера від легкого до помірного ступеня тяжкості, деменції з тільцями Леві, судинної деменції, хвороби Альцгеймера, інсульту, комплексу деменції при СНІДі, розладу з дефіцитом уваги, розладу гіперактивності з дефіцитом уваги, дислексії, шизофренії, шизофреніформного розладу, шизоафективного розладу, когнітивних дефіцитів при шизофренії і когнітивної дисфункції при шизофренії.

19. Сполука за будь-яким з пп. 1-13 для застосування при лікуванні чи профілактиці захворювання або дисфункції, де захворювання або дисфункцію вибрано з групи, яка складається з:

- 5 i) болю, включаючи один або більше з гострого, неврологічного, запального, нейропатичного, хронічного болю, сильного хронічного болю, післяопераційного болю, болю, пов'язаного зі злоякісними новоутвореннями, стенокардією, нирковою або печінковою колькою, менструацією, мігренню, подагрою, артритом, ревматоїдним захворюванням, теносиновітом, васкулітом, тригемінальною або герпетичною невралгією, болю при діабетичній нейропатії, каузалгії, болю в поперековій області, синдромів деаферентації й авульсії плечового сплетення;
- 10 ii) метаболічного синдрому, збільшення маси тіла, цукрового діабету I типу, цукрового діабету II типу або діабетичної нейропатії;
- 15 iii) запалення, включаючи одне або більше захворювань із псоріазу, астми, атеросклерозу, ідіопатичного пневмосклерозу, хронічного і гострого запалення, ендотоксемії, подагри, гострої псевдоподагри, гострого подагричного артриту, артриту, ревматоїдного артриту, остеоартриту, відторгнення алотрансплантата, хронічного відторгнення трансплантата, астми, атеросклерозу, легеневого ушкодження, залежного від мононуклеарів-фагоцитів, atopічного дерматиту, хронічного обструктивного легеневого захворювання, гострого респіраторного дистрес-синдрому дорослих, гострого торакального синдрому при серповидноклітинному захворюванні, запальних кишкових захворювань, хвороби Крона, виразкового коліту, гострого холангіту, афтозного стоматиту, дивертикуліту, гломерулонефриту, вовчакового нефриту, тромбозу і реакції трансплантат проти хазяїна; і
- 20 iv) когнітивних порушень, включаючи одне або більше з вікового порушення пам'яті, незначного когнітивного порушення, пресенільної деменції, хвороби Альцгеймера з раннім початком, сенільної деменції, деменції типу Альцгеймера, деменції типу Альцгеймера від легкого до помірного ступеня тяжкості, деменції з тільцями Леві, судинної деменції, хвороби Альцгеймера, інсульту, комплексу деменції при СНІДі, розладу з дефіцитом уваги, розладу гіперактивності з дефіцитом уваги, дислексії, шизофренії, шизофреніформного розладу, шизоафективного розладу, когнітивних дефіцитів при шизофренії і когнітивної дисфункції при шизофренії.
- 25 20. Фармацевтична композиція, що містить сполуку за будь-яким з пп. 1-13 і один або більше фармацевтично прийнятних носіїв.
- 30 21. Спосіб посилення викликаного ацетилхоліном потоку, що включає введення ефективної кількості сполуки за будь-яким з пп. 1-13.

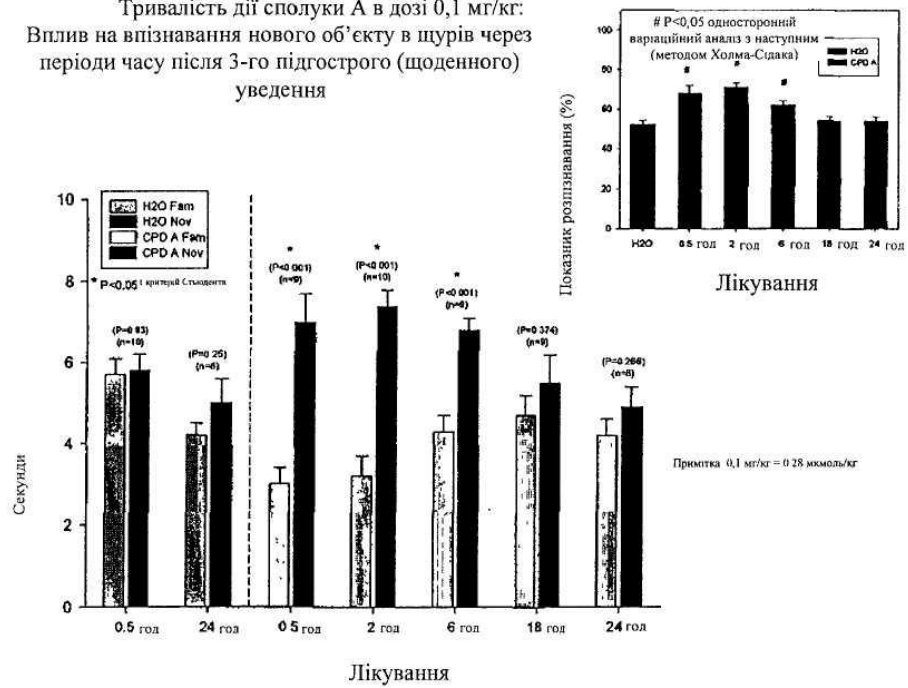


Фіг. 1

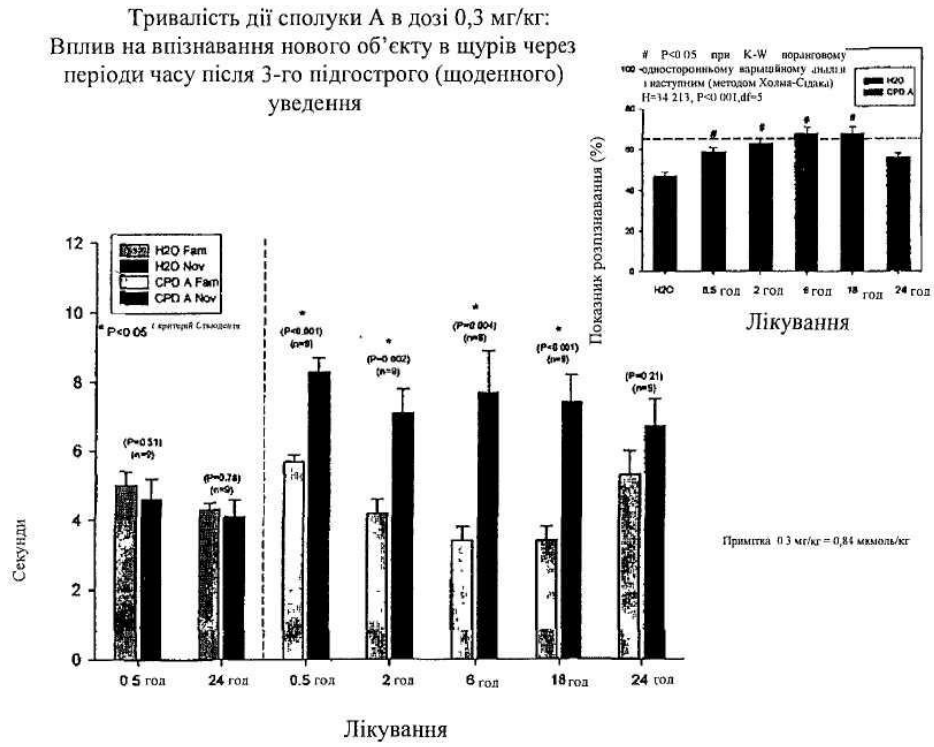


Фіг. 2

Тривалість дії сполуки А в дозі 0,1 мг/кг:
Вплив на впізнавання нового об'єкту в щурів через
періоди часу після 3-го підгострого (щоденного)
уведення



Фіг. 3



Фіг. 4

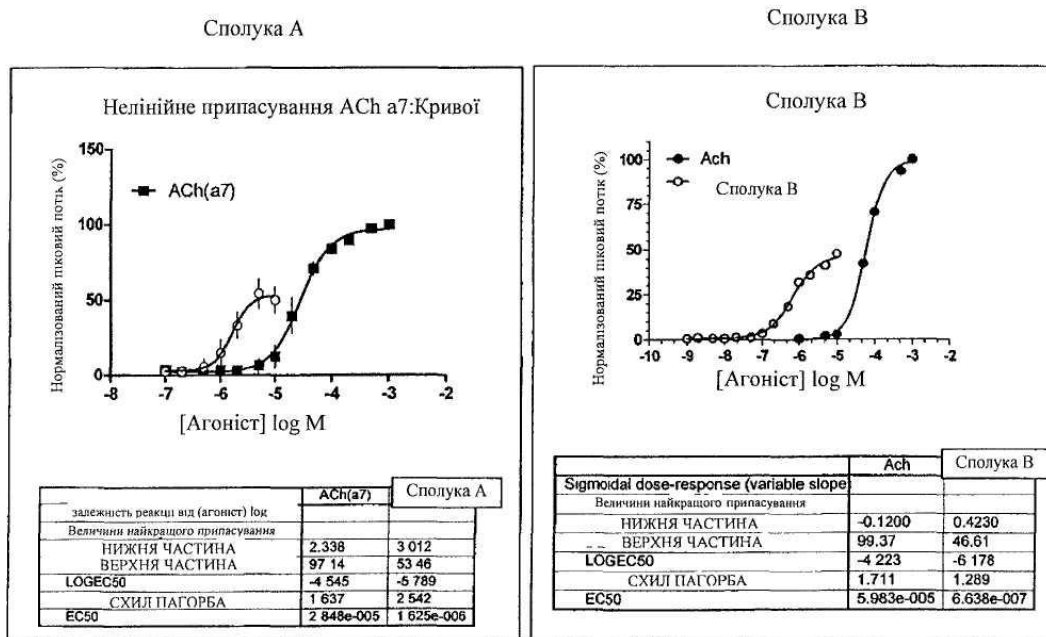
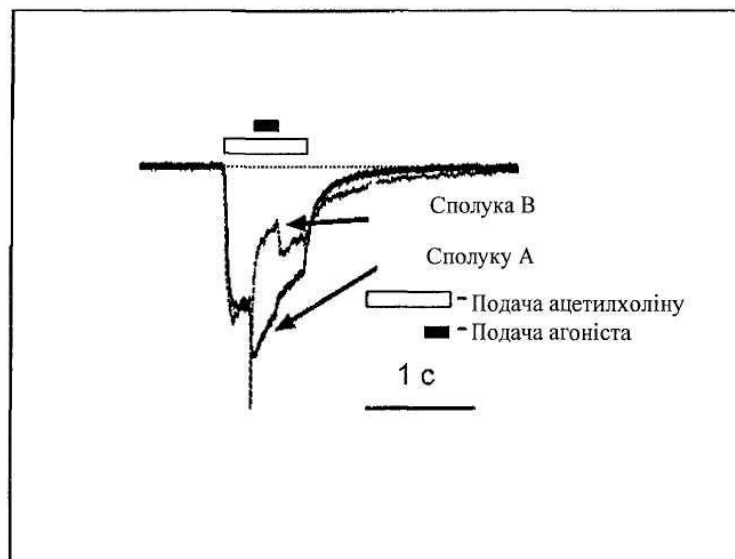


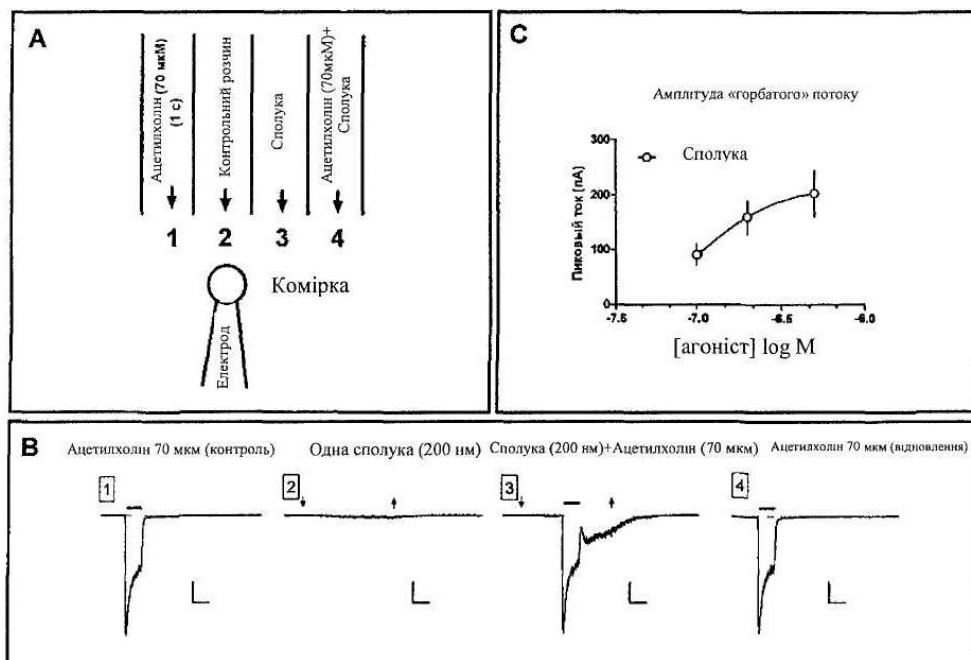
Fig. 5

Відмінності блокування реакцій ацетилхоліну сполукою А і
сполукою В



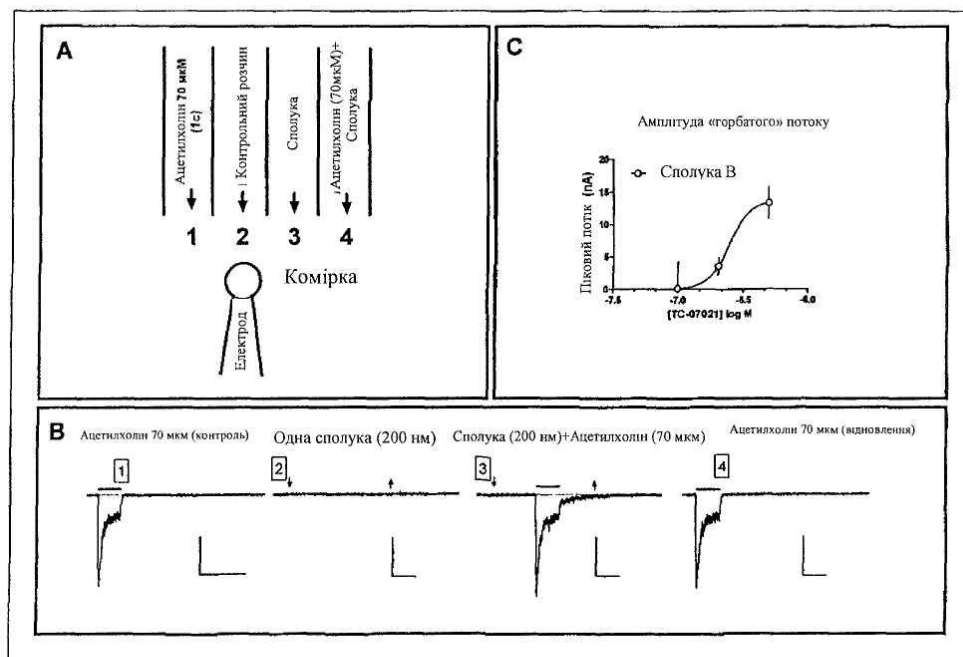
Фіг. 6

Сполуку А



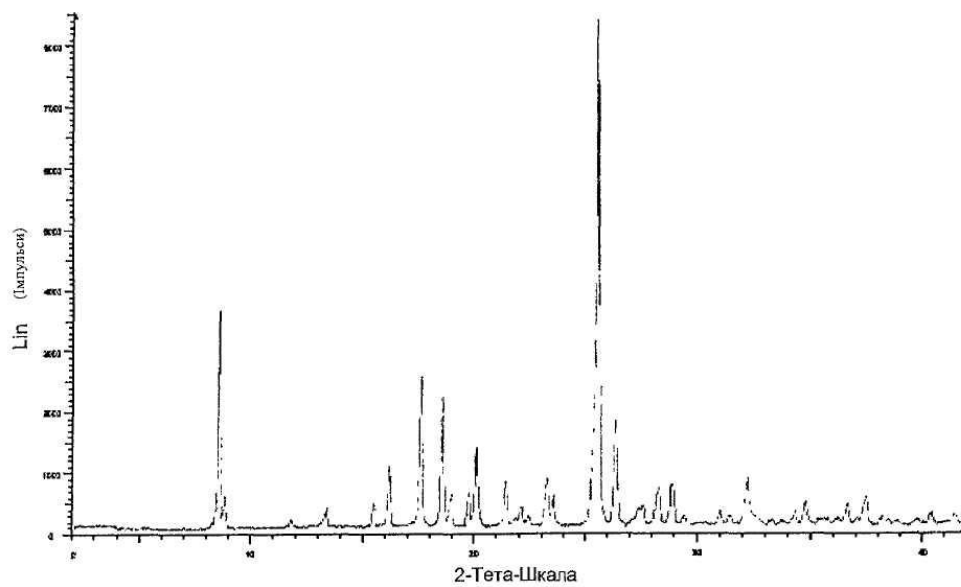
Фіг. 7

Сполуку В



Фіг. 8

Рентгенограма моногідрохлориду



Фіг. 9

Структура кристалу моногідрохлориду

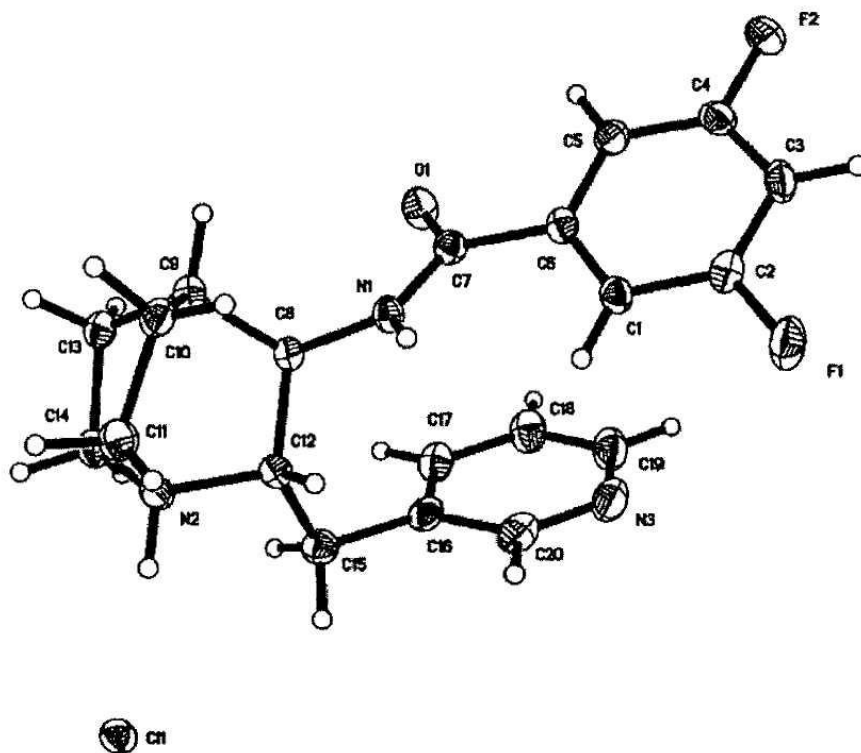
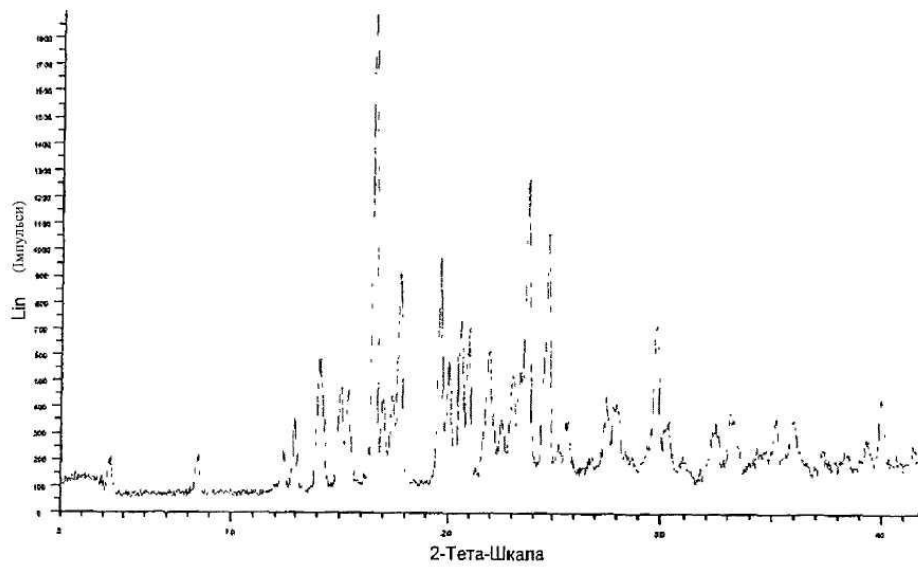


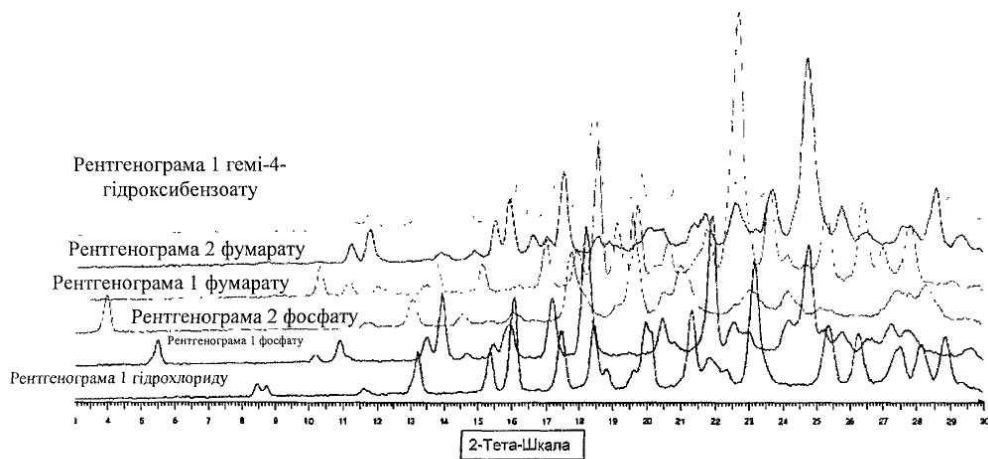
Fig. 10

Рентгенограма гемі-галактарату



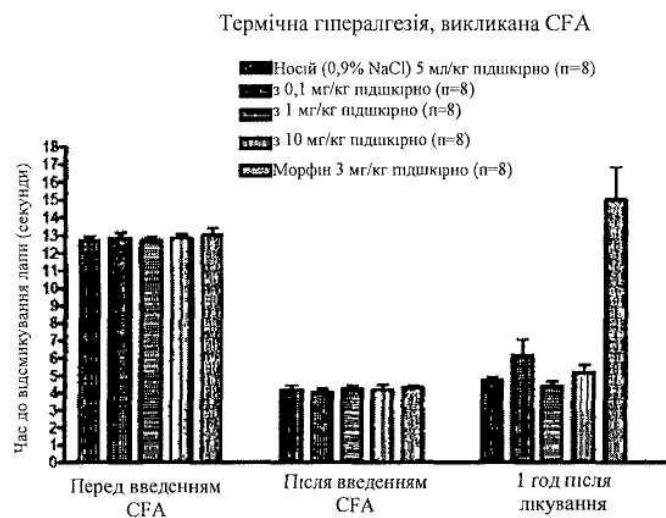
Фіг. 11

Накладання рентгенограм по первинному скринінгу солей 1 тижня при 40°C/відносній вологості 75%



Фіг. 12

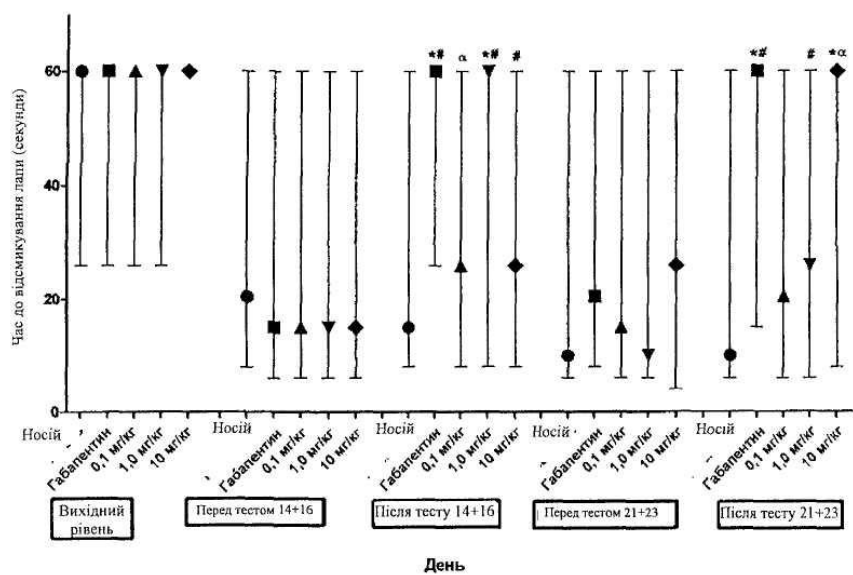
Термічна гіпералгезія, викликана CFA



✓

Лікування

Фіг. 13



* $P < 0,05$, у порівнянні з групою носіїв для зазначеного дня тестування (варіаційний аналіз по рангах)

$P < 0,05$, у порівнянні з відповідною реакцією перед тестом у тій же групі лікування (ранговий критерій значимості відмінності)

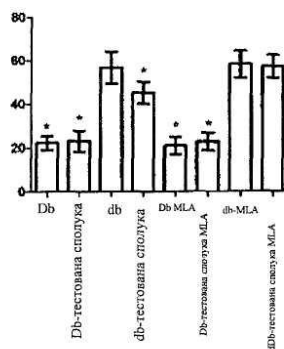
α $P = 0,06$, у порівнянні з відповідною реакцією перед тестом у тій же групі лікування (ранговий критерій значимості відмінності)

Символ указує медіану групи

«Вуса» указують груповий діапазон

Фіг. 14

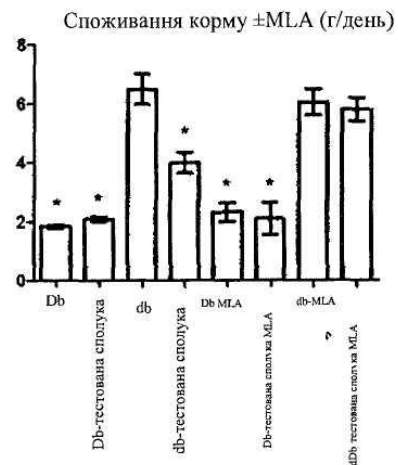
Маса тіла \pm MLA (г)



• $P < 0,01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

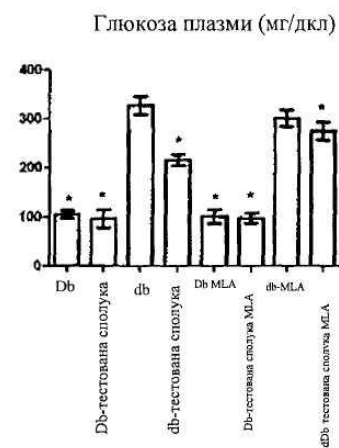
• Тестована сполука = (25,3К)-М-2-((3-піридиніл)метил)-1-азабіцикло[2.2.2]окт-3-ил)-3,5-дифторбензамід

Фіг. 15



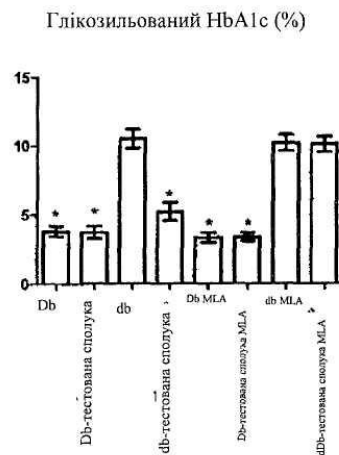
* $P < 0.01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

Фіг. 16



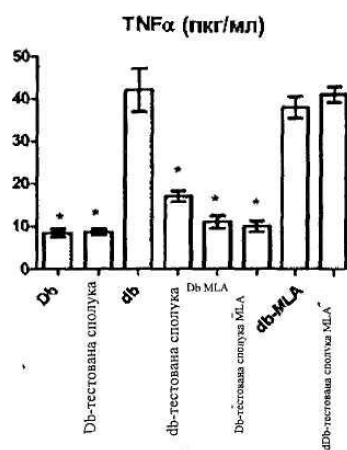
* $P < 0.01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

Фіг. 17



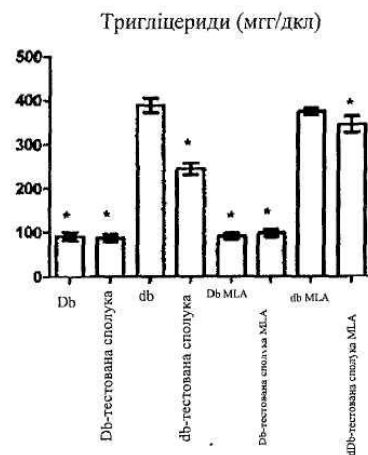
* $P < 0,01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

Фіг. 18



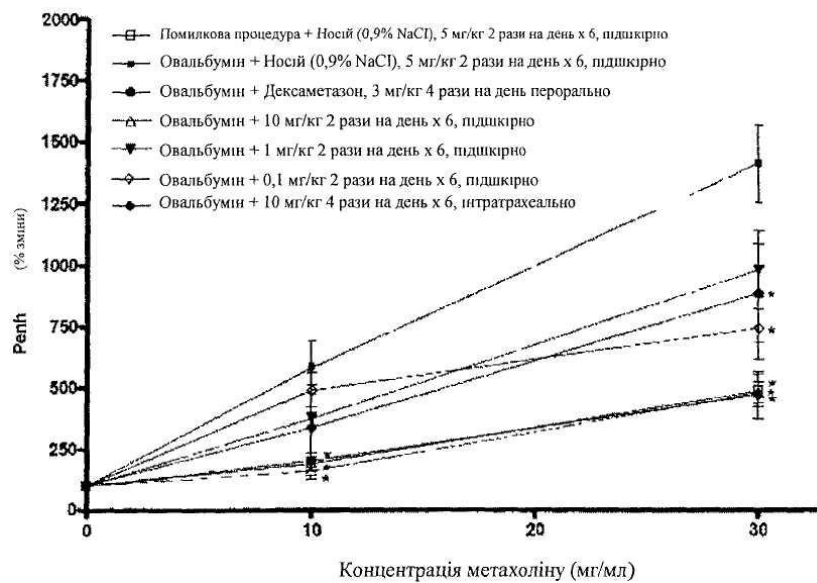
* $P < 0,01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

Фіг. 19

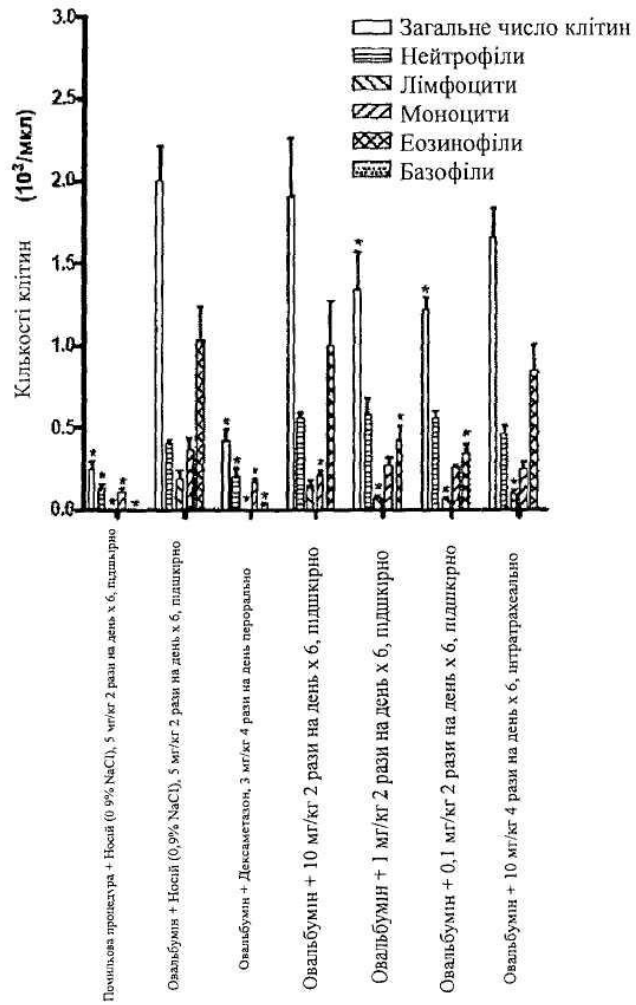


* $P < 0,01$, у порівнянні з гладкими мишами, що одержували носій («db»).

Фіг. 20

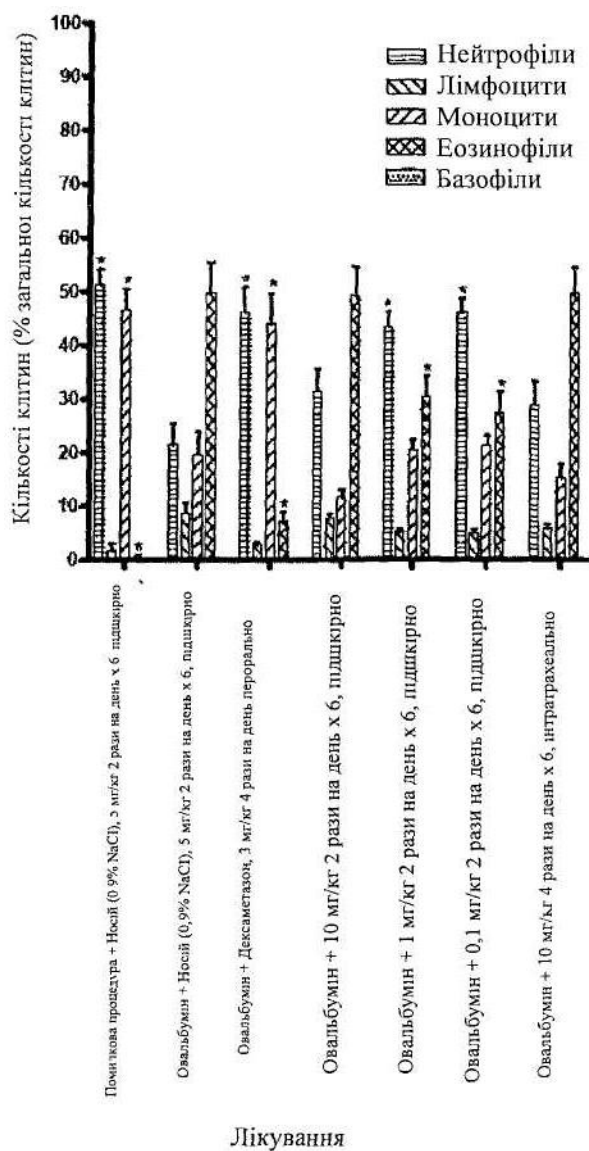


Фіг. 21



Лікування

Фіг. 22



Фіг. 23