



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42835 (13) C2

(51) 7 A61K31/445

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

(54) СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ МІГРАЦІЇ КЛІТИН ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ СУДИН

(21) 97115726

(22) 30.05.1996

(24) 15.11.2001

(31) 08/457,700

(32) 01.06.1995

(33) US

(86) PCT/US96/08037, 30.05.1996

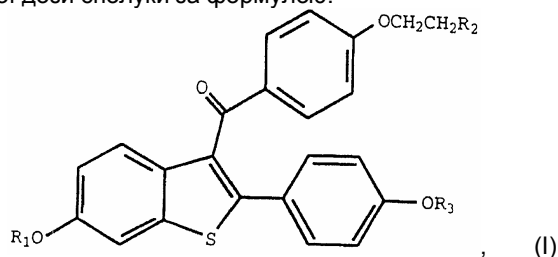
(46) 15.11.2001, Бюл. № 10, 2001 р.

(72) Сінгх Джай Пол, ІН, Верніцкі Тодд Р., US

(73) ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ, US

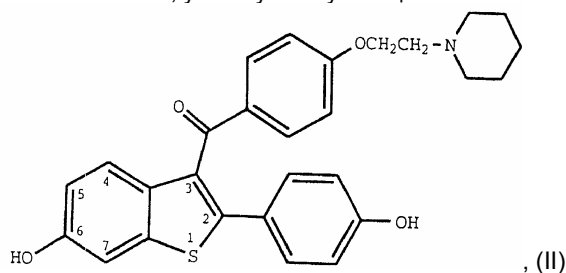
(56) US, A, № 5457113, 10.10.1995

(57) 1. Спосіб інгібування міграції клітин гладеньких м'язів судин, що полягає у введенні людині або іншому ссавцеві, що потребує лікування, ефективної дози сполуки за формулою:

у якій R₁ та R₃, незалежно один від одного, -водень, -CH₃, $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—(C}_1\text{—C}_6\text{ алкіл)}$ або $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—Ar}$, де Ar - довільно заміщений феніл;R₂ - це піролідино, гексаметиленіміно або піперидино; та її фармацевтично прийнятні солі та сольвати.

2. Спосіб за п. 1, де зазначена сполука - це її хлористоводнева сіль.

3. Спосіб за п. 1, у якому сполука - це



або її хлористоводнева сіль.

4. Спосіб за п. 1, у якому введення препарату здійснюється з метою перешкоджання розвитку атеросклерозу, рестенозу, запалення або втягнення у процес розвитку злоякісної пухлини.

Міграція клітин відіграє важливу роль у загоєнні ран, при запаленні, респіраторному дистрес-синдромі у дорослих, залученні до злоякісного процесу (Savani et al., J. Clin. Invest. 95: 1158-1168, 1995; Kullmann et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8: 83-88, 1993; Brooks et al., Cell. 79, 1157-1164, 1994). Міграція гладеньких м'язових клітин із середньої до внутрішньої оболонки (інтими) судин відіграє дуже важливу роль в утворенні неоінтими, що призводить до патогенезу судинних захворювань, таких як атеросклероз, рестеноз після черешкірної черешкірної реконструкції коронарних судин, а також атеросклероз унаслідок обхідного венозного шунтування (Jackson et al., Arteriosclerosis and Thrombosis 13: 1218-1226, 1993; Brown et al., Cardiovascular Res. 28: 1815-1820, 1995; Bell and Madri, Am. J. Pathol. 137: 7-12, 1990). На модельних тваринах з пошкодженням судин було встановлено, що застосування антитіл до факторів росту, що стимулюють міграцію гладеньких м'язових клітин, або пептидів, що блокують міграцію клітин,

опосередковану інтегрином, пригнічує процес утворення неоінтими (Ferns et al., Science 253: 1129-1132, 1991; Choi et al., J. Vasc. Surg. 19: 125-135, 1994).

Виявилось, що рестеноз судин після черешкірної черешкірної реконструкції коронарних судин (PTCA) представляє собою тканинну реакцію, що має початкову та кінцеву фази. Тромбоз і/або вазоспазм можуть траплятись на початковій фазі і мати місце через кілька годин або днів після черешкірної черешкірної реконструкції коронарних судин. Під час кінцевої фази переважають міграція гладеньких м'язових клітин (SMC), проліферація та реконструкція судин. При цьому захворюванні підвищена концентрація гладеньких м'язових клітин, спричинена їх міграцією з середньої оболонки до інтими, значною мірою впливає на патогенез захворювання. Надмірна проліферація та міграція гладеньких м'язових клітин судин можуть бути головним механізмом реоклюзії коронарних судин після черешкірної черешкірної реконструкції

(13) C2

(11) 42835

(19) UA

коронарних судин, атеректомії, лазерної пластики судин та реконструктивної артеріальної хірургії (див. "Intimal Proliferation of Smooth Muscle Cells as An Explanation for Recurrent Coronary Artery Stenosis After Percutaneous Transluminal Coronary Angionlasty", Austin et al., Journal of the American College of Cardiology 8: 369-375 (серпень 1985 р.).

Рестеноз судин залишається головним довгостроковим ускладненням після хірургічної операції на закупорених артеріях шляхом черезшкірної черепрозвітної реконструкції коронарних судин, атеректомії, лазерної пластики судин та реконструктивної артеріальної хірургії. Приблизно у 35% пацієнтів, що перенесли черезшкірну черепрозвітну реконструкцію коронарних судин, реоклюзія має місце у період від трьох до шести місяців після операції. До відомих засобів подолання рестенозу судин належить механічне розширення за допомогою спеціальних пристроїв, таких як стенти, та лікування фармацевтичними засобами, у тому числі гепарином, гепарином з низькою молекулярною масою, кумарином, аспірином, риб'ячим жиром, антагоністом кальцію, стероїдами та простагліцином. Цими засобами не вдалося сповільнити темпів реоклюзії і вони виявилися неефективними для лікування та запобігання рестенозу судин (див. "Prevention of Restenosis after Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty: The Search for a "Magic Bullet", Hermans et al., American Heart Journal 122: 171-187, (липень 1991 р.).

У патогенезі рестенозу надмірна проліферація та міграція клітин є наслідками впливу факторів росту, що продукуються клітинними компонентами крові та пошкодженою стінкою артеріальної судини, які опосередковують проліферацію гладеньких м'язових клітин при рестенозі судин.

Речовини, що інгібують процес міграції гладеньких м'язових клітин, можуть використовуватися для лікування та профілактики рестенозу. Цим винаходом передбачається застосування сполук як інгібіторів міграції гладеньких м'язових клітин.

Цей винахід надає спосіб інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин судин у людей та інших ссавців, що полягає у введенні їм фармацевтично ефективної дози сполуки за формулою:



$\text{—C(=O)—(C}_1\text{—C}_2\text{ алкіл) або —C(=O)—Ar}$, де: Ar - факультативно заміщений феніл; R₂ - піролідино, гексаметиленіміно, або піперидино; та її фармацевтично прийнятних солей та сольватів.

Цей винахід стосується відкриття, яке полягає у тому, що певна група сполук, а саме сполуки за формулою (I), можуть застосовуватися для інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин. Способи лікування, які надаються цим винаходом, передбачають введення людині або іншому ссав-

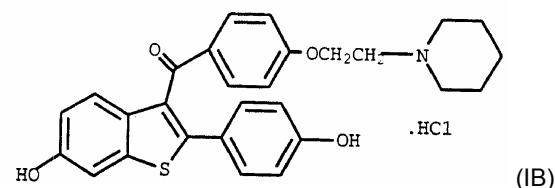
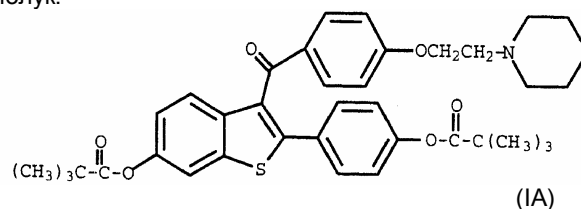
цю, що потребує лікування, певної дози сполуки за формулою (I) або (II), або її фармацевтично прийнятної солі або сольвату, що здатні інгібувати процес міграції гладеньких м'язових клітин судин.

Термін "інгібування" має своє загальноприйнятне значення, яке припускає здійснення профілактичних заходів щодо людей, організм яких є схильним до виникнення міграції гладеньких м'язових клітин, а також контролювання та/або лікування наявної міграції гладеньких м'язових клітин. Тому пропонується спосіб передбачає як консервативне лікування, так і/або профілактику, відповідно до конкретного випадку.

Звичайно, сполука вводиться до складу лікарської форми разом із загальновідомими домішками, розріджувачами або носіями та пресується у таблетки або вводиться до складу еліксирів або розчинів для зручного перорального прийому, або ж вводиться внутрішньом'язово чи внутрішньовенно. Сполука може вводиться черезшкірно та може виготовлятися у вигляді стандартних дозованих форм з уповільненим вивільненням лікарського засобу.

Сполуки за формулою (I), які використовуються у способах за цим винаходом, можуть виготовлятися відповідно до установлених технологій, наприклад, як ті, що докладно описані у патентах США №№ 4.133.814, 4.418.068 та 4.380.635. Усі вони включені до цього опису через посилання. Взагалі процес починається з бензо[б]тіофену, що містить 6-гідроксильну групу та групу 2-(4-гідроксифенілу). Початкова сполука блокується, алкілується та деблокується з одержанням сполук за формулою (I). Приклади одержання таких сполук наведені у вищезазначених патентах США.

Винаходом передбачене застосування таких сполук:



Заміщений феніл - це феніл, заміщений один раз чи двічі C₁-C₆ алкільною групою, C₁-C₄ алкокси-, гідрокси-, нітрогрупою, хлором, фтором або три(хлор чи фтор)метилом.

Фармацевтично прийнятні солі сполук, які використовують у способах за цим винаходом, одержують шляхом додання різноманітних органічних та неорганічних кислот та основ і включають фізіологічно прийнятні солі, що часто застосовуються у фармацевтичній хімії. Такі солі також є частиною цього винаходу. До типових неорганічних кислот, які використовують для одержання таких солей, належать хлористоводнева, бромистоводнева, йодистоводнева, азотна, сірчана, фосфорна, фосфорнувата та інші кислоти. Можуть використовуватися також солі, одержані за допомогою органіч-

них кислот, таких як монокарбонова та дикарбонова кислоти аліфатичного ряду, феніл-заміщені алканові кислоти, оксиалканові та оксиалкандіонові кислоти, кислоти ароматичного ряду, сульфокислоти аліфатичного та ароматичного рядів. Таким чином, до таких фармацевтично прийнятних солей належать ацетат, фенілацетат, трифторацетат, акриллат, аскорбат, бензоат, хлорбензоат, динітробензоат, гідроксибензоат, метоксибензоат, метилбензоат, о-ацетоксибензоат, нафталін-2-бензоат, бромід, ізобутират, феніл-бутират, β-гідроксибутират, бутин-1,4-діоат, гексин-1,4-діоат, капрат, каприлат, хлорид, ефір коричної кислоти, цитрат, форміат, фумарат, гліколят, гептаноат, піпурат, лактат, малат, малеат, гідроксималеат, малонат, сіль мигдалевої кислоти, мезилат, нікотинат, ізонікотинат, нітрат, оксалат, фталат, терафталат, фосфат, кислий монофосфат, кислий дифосфат, метафосфат, пірофосфат, пропіолат, пропіонат, фенілпропіонат, саліцилат, себаат, сукцинат, суберат, сульфат, бісульфат, піросульфат, сульфід, бісульфід, сульфонат, бензолсульфонат, р-бромфенілсульфонат, хлорбензолсульфонат, етансульфонат, 2-гідроксиетансульфонат, метансульфонат, нафталін-1-сульфонат, нафталін-2-сульфонат, р-толуолсульфонат, ксилосульфат, тарترات та ін. Перевага надається хлорідрату.

Фармацевтично прийнятні солі, одержані доданням кислоти, звичайно одержують шляхом реагування сполуки за формулою (I) з еквімолярною або надлишковою кількістю кислоти. Реагенти звичайно поєднують у одному розчиннику, наприклад, діетиловому ефірі або бензолі. Звичайно сіль випадає з розчину до осадку протягом приблизно від однієї години до 10 днів і може бути відокремлена фільтруванням або розчин може десорбуватися звичайними засобами.

До основ, що звичайно використовуються для одержання солей, належать гідроксид амонію та гідроксиди, карбонати та бікарбонати лужних та лужноземельних металів, а також аліфатичні та ароматичні аміни, аліфатичні діаміни та гідроксиалкіламіни. До основ, яким надається перевага при одержанні солей шляхом додання основ, належить гідроксид амонію, карбонат калію, бікарбонат натрію, гідроксид кальцію, метиламін, діетиламін, етилендіамін, циклогексиламін та етаноламін.

Фармацевтично прийнятні солі звичайно мають кращу розчинність у порівнянні зі сполукою, з якої їх одержали, і таким чином, є більш придатними для одержання препаратів у вигляді рідин або емульсій.

Фармацевтичні препарати можна одержувати за технологіями, відомими фахівцям. Наприклад, сполуки можна вводити до складу фармацевтичних препаратів разом зі звичайними домішками, розріджувачами або носіями та надавати їм вигляд таблеток, капсул, суспензій, порошоків і т.ін. Прикладами домішок, розріджувачів та носіїв, придатних для одержання таких лікарських форм, є: наповнювачі та розріджувачі, такі як крохмаль, цукри, маній- та кремнійвмішувальні похідні; в'язучі речовини, такі як карбоксиметилцелюлоза та інші похідні целюлози, альгірати, желатин та полівінілпіролідон; зволожуючі речовини, такі як гліцерин; речовини, які сприяють розпаду, такі як агар-агар,

карбонат кальцію та бікарбонат натрію; речовини для уповільнення розчинення, такі як парафін; речовини, що прискорюють резорбцію, такі як сполуки четвертинного амонію; поверхнево-активні речовини, такі як цетиловий спирт, моностеарат гліцерину; адсорбційні носії, такі як каолін та бентоніт; та зм'якшувачі, такі як тальк, стеарат кальцію та магнію та тверді поліетиленгліколі.

Зазначені сполуки можуть також вводитись до складу еліксирів та розчинів для зручного перорального введення або розчинів для парентерального введення, наприклад, шляхом внутрішньо-м'язових, підшкірних та внутрішньовенних ін'єкцій. Крім того, ці сполуки добре придатні для введення до складу стандартних дозованих лікарських форм з уповільненим виділенням лікарської речовини і т.ін. Лікарські форми можуть мати таку будову, що активний інгредієнт буде вивільнятися тільки або переважно у конкретній частині кишкового тракту, можливо, через деякий час. Покриття, оболонки та захисні матриці можуть виготовлятися, наприклад, з полімерних речовин або парафінів.

Конкретна доза сполуки за формулою (I), потрібна для інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин за цим винаходом, буде залежати від тяжкості стану, шляху застосування та інших факторів, що будуть визначатися штатним лікарем лікарні. Звичайно, прийнятна та ефективна денна доза становить від приблизно 0,1 до приблизно 1000 мг/день, більш прийнятна - від приблизно 50 до приблизно 200 мг/день. Такі дози вводять пацієнту, який потребує лікування, від одного до трьох разів на день або частіше, при необхідності ефективного інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин.

Місцеве введення інгібуючих доз активної сполуки з метою лікування міграції гладеньких м'язових клітин судин або рестенозу може здійснюватися різними способами, які забезпечують введення сполуки до ураженої ділянки або біля неї. Приклади способів місцевого введення не обмежують, а ілюструють існуючі способи. До них належать катетери для місцевого введення, місцеспецифічні носії, імпланти, пряма ін'єкція, або пряме нанесення.

Місцеве введення за допомогою катетера дозволяє вводити фармацевтичний препарат безпосередньо до ураженої ділянки. Приклади місцевого введення за допомогою катетера-балона Фогарті наведені у заявці на Європейський патент № 383492 A2 та у патенті США № 4.636.195 (Wolinsky, 13 січня 1987 року).

Місцеве введення за допомогою імплантату передбачає хірургічне введення матриці з фармацевтичним препаратом до ураженої ділянки. Імплантована матриця вивільняє фармацевтичний препарат шляхом дифузії, хімічної реакції або за допомогою розчинників-активаторів. Lange, Science 249: 1527-1533 (вересень 1990 року).

Прикладом місцевого введення шляхом імплантації є використання стенту. Стенти призначені для механічного запобігання спадіння стінок та реоклюзії коронарних артерій. Введення фармацевтичного препарату до стенту забезпечує його попадання безпосередньо до ураженої ділянки. Місцеве введення цим способом описане Kohn, Pharmaceutical Technology (жовтень 1990 року).

Ще один приклад - система введення ліків, у якій полімер, що містить фармацевтичний препарат, шляхом ін'єкції потрапляє до ураженої ділянки у вигляді рідини. Полімер потім твердне та утворює імплантат in situ. Цей спосіб описаний у Міжнародній заявці № WO 90/03768 (Donn, 19 квітня 1990 року).

Ще один приклад - введення фармацевтичного препарату за допомогою полімерної внутрішньопросвітної пломби. Згідно з цим методом, для введення полімерного імплантату на внутрішню поверхню просвіту застосовують катетер. Фармацевтичний препарат, що міститься у полімерному імплантаті, який піддається біологічному розкладу, вивільняється, таким чином, на місці хірургічного втручання. Це описано у Міжнародній заявці № WO 90/01969 (Schindler, 23 серпня 1989 року).

Останнім прикладом місцевого введення за допомогою імплантату є пряма ін'єкція бульбашок або мікрочастинок до ураженої ділянки. Ці мікрочастинки можуть складатися з таких речовин як білки, ліпіди, вуглеводи або синтетичні полімери. Фармацевтичний препарат міститься усередині цих мікрочастинок або зверху у вигляді покриття. Системи введення мікрочастинок описані у Lange, Science 249: 1527-1533 (вересень, 1990) та Mathiowitz, et al., J. App. Poly. Sci., 26: 809 (1981).

Місцеве введення за допомогою місцеспецифічних носіїв передбачає розташування фармацевтичного препарату на носіїві, який спрямовує ліки до ураженої ділянки. До прикладів такого способу введення належать застосування таких носіїв як білковий ліганд або моноклональне антитіло. Lange, Science 249: 1527-1533 (вересень, 1990).

До місцевого введення фармацевтичного препарату шляхом прямого накладення відносять також застосування місцевого нанесення. Прикладом місцевого введення шляхом прямого нанесення є введення фармацевтичного препарату безпосередньо до обхідного артеріального шунту під час хірургічної операції.

Звичайно перевага надається введенню сполуки за формулою I у вигляді солі, яку одержують шляхом додання кислоти, як це звичайно робиться у разі введення фармацевтичних препаратів, що містять основну групу, наприклад, піперидинове кільце. Також бажано, щоб така сполука вводилася перорально людям похилого віку (наприклад, жінкам постклімактеричного віку). З цієї метою існують стандартні дозовані лікарські форми для перорального введення, які наведено далі.

У подальшому описі лікарських форм термін "активний інгредієнт" означає сполуку за формулою (I).

Лікарська форма 1: Желатинові капсули.

Тверді желатинові капсули виготовляються із застосуванням таких речовин:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	0,1-1000
Крохмаль, додання до Американської Фармакопеї	0-650
Плинна крохмальна пудра	0-650
Силіконова рідина, 350 сантистоксів	0-15

Інгредієнти змішують, просіюють крізь сито № 45 (0,353 мм) та розфасовують до твердих желатинових капсул.

Далі наведені приклади специфічних лікарських форм із сполукою за формулою (I), замкнених до капсул, де згадану сполукою є ралоксифен.

Лікарська форма 2: Капсула ралоксифену:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Ралоксифен	1
Крохмаль, додання до Американської Фармакопеї	112
Плинна крохмальна пудра	225,3
Силіконова рідина, 350 сантистоксів	1,7

Лікарська форма 3: Капсула ралоксифену:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Ралоксифен	5
Крохмаль, додання до Американської Фармакопеї	108
Плинна крохмальна пудра	225,3
Силіконова рідина, 350 сантистоксів	1,7

Лікарська форма 4: Капсула ралоксифену:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Ралоксифен	10
Крохмаль, додання до Американської Фармакопеї	103
Плинна крохмальна пудра	225,3
Силіконова рідина, 350 сантистоксів	1,7

Лікарська форма 5: Капсула ралоксифену:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Ралоксифен	50
Крохмаль, додання до Американської Фармакопеї	150
Плинна крохмальна пудра	397
Силіконова рідина, 350 сантистоксів	3,0

Вищезазначені лікарські форми можуть бути змінені відповідно до передбачених прийнятих змін.

Таблетовану лікарську форму виготовляють із використанням наведених далі інгредієнтів.

Лікарська форма 6: Таблетки:

Інгредієнт	Кількість (мг/таблетку)
Активний інгредієнт	0,1-1000
Целюлоза, мікрокристалічна	0-650
Діоксид кремнію, слідова кількість	0-650
Стеаринова кислота	0-15

Компоненти змішують та пресують з одержанням таблеток. За альтернативним варіантом, таблетки, кожна з яких містить 0,1-1000 мг активного інгредієнта, виготовляють таким чином:

Лікарська форма 7: Таблетки:

Інгредієнт	Кількість (мг/таблетку)
Активний інгредієнт	0,1-1000
Крохмаль	45
Целюлоза, мікрокристалічна	35
Полівінілпіролідон (у вигляді 10% розчину у воді)	4
Натрійкарбоксиметилцелюлоза	4,5
Стеарат магнію	0,5
Тальк	1

Активний інгредієнт, крохмаль та целюлозу пропускають крізь сито № 45 (0,353 мм) та ретельно перемішують. Розчин полівінілпіролідону змішують з одержаними порошками, які потім пропускають крізь сито № 14 (1,41 мм). Одержані таким чином гранули висушують при температурі 50°-60°C та просіюють крізь сито № 18 (1,00 мм). Натрійкарбоксиметилцелюлозу, стеарат магнію та тальк, попередньо просіяні крізь сито № 60 (0,248 мм), додають потім до гранул, які після змішування пресують на таблеточній машині з одержанням таблеток.

Суспензії, кожна з яких містить 0,1-1000 мг ліків на дозу 5 мл, виготовляють таким чином:

Лікарська форма 8: Суспензії:

Інгредієнт	Кількість (мг/5 мл)
Активний інгредієнт	0,1-1000 мг
Натрійкарбоксиметилцелюлоза	50 мг
Сироп	1,25 мг
Розчин бензойної кислоти	0,10 мл
Ароматизатор	за потребою
Барвник	за потребою
Дистильована вода до	5 мл

Лікарський препарат просіюють крізь сито № 45 (0,353 мм) та змішують з натрійкарбоксиметилцелюлозою та сиропом з утворенням однорідної пасти. Розчин бензойної кислоти, ароматизатор та барвник розбавляють деякою кількістю води та додають з перемішуванням. Потім додають воду у кількості, достатній для одержання потрібного об'єму.

Сполуки за цим винаходом здатні інгібувати процес міграції гладеньких м'язових клітин судин, про що свідчать такі факти:

Гладенькі м'язові клітини аорти свиней:

Свинячі аорти одержували від кабанів, щойно забитих на місцевій бойні. Гладенькі м'язові клітини препарували за методом, опис якого було наведено раніше (Bonin et al., 1989). Стисло: аорту розрізали у повздовжньому напрямку, ендотелій видалили обережним зіскрябуванням з поверхні просвіту за допомогою леза для гоління. Потім аорту декілька разів промивали стерильним живильним середовищем, до складу якого входило модифіковане за способом Дульбекко середовище

Ігла (DMEM), 10% фетальної бичачої сироватки, L-глутамін (2 мМ), пеніцилін (100 Од/мл) та стрептомицин (100 мкг/мл). Потім смужки гладеньких м'язових клітин середньої оболонки відокремлювали від адвентиції та розрізали на шматочки розміром 1-2 мм. Після цього експлантати вміщували до 24-лункових чашок для культивування з вищезгаданим живильним середовищем. Ріст клітин від експлантатів спостерігали протягом 5-7 днів. Через 10-14 днів експлантати видаляли, клітини трипсинізували та субкультивували у матрацах T75, що містили по 15 мл живильного середовища.

Гладенькі м'язові клітини людини.

Гладенькі м'язові клітини коронарних судин та аорти людини придбали від компанії Clonetics Corporation (Сан-Дієго, Каліфорнія). Клітини обох типів культивували у живильному середовищі за описом, який було наведено для гладеньких м'язових клітин свиней.

Аналіз міграції гладеньких м'язових клітин.

За допомогою модифікованої камери Бойдена (система 96 наскрізних лунок та полікарбонатні фільтри з отворами діаметром 8 мкм) (компанія Neuro Probe, Inc., Cabin John, Нью-Джерсі) здійснили спрямовану міграцію гладеньких м'язових клітин, які були одержані з артерій свині та людини, за градієнтом тромбоцитарного фактора росту. Гладенькі м'язові клітини, які були вирощені у матрацах T75, переносили до суміші модифікованого за способом Дульбекко середовища Ігла, вільного від фенолового червоного, та F12 (DMEM/F12), що містила 2% фетальної бичачої сироватки, L-глутамін (2 мМ), пеніцилін (100 Од/мл) та стрептомицин (100 мкг/мл). Через 24 години клітини трипсинізували за допомогою трипсину, вільного від фенолового червоного/етиленадіамінтетраоцтової кислоти (компанія Gibco, BRL). Клітини ($2,5 \times 10^6$ клітин/мл) суспендували у суміші модифікованого за способом Дульбекко середовища Ігла, вільного від фенолового червоного, та F12 (DMEM/F12), що містила 1% плазми з низьким вмістом тромбоцитів та різні концентрації сполук за формулою (I). До верхніх лунок модифікованої камери Бойдена вносили сто мікролітрів суспензії клітин. Лунки нижньої камери заповнювали 43 мкл DMEM/F12, що містила 1% плазми з низьким вмістом тромбоцитів, тромбоцитарний фактор росту (5 нг/мл) та сполуки у різних концентраціях. Камери інкубували при температурі 37°C у 5% CO₂ протягом 5 годин. Міграційну мембрану з камери виймали і клітини з верхнього боку мембрани видаляли бавовняним тампоном. Клітини, що мігрували до нижнього боку мембрани, фіксували метанолом та фарбували забарвлюючим розчином Diff-Quick (компанія Baxter). Кількісний аналіз міграції клітин здійснили за допомогою спектрометрії з застосуванням апарату для читання титраційних мікропланшетів (ThermoMax, компанія Molecular Dynamics, Inc.), або шляхом рахування клітин у полі зору інвертованого мікроскопа (компанія Nikon, Inc.) під великим збільшенням (40X).

Для експериментів, що передбачали попереднє інкубування клітин із сполукою, лікарський засіб вносили до середовища для попередньої обробки у зазначених концентраціях, до окремих матраців, та інкубували протягом 18 годин. Умови аналізу клітин під час здійснення експериментів з

попередньою обробкою були такі самі (табл. 1), як і під час експериментів, які здійснювали для визначення ефекту великої дози лікарського препарату.

Вищенаведена активність вказує на те, що сполуки за цим винаходом мають потенціал інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин судин (табл. 2) та його наслідків.

Таблиця 1

Стимулювання міграції гладеньких м'язових клітин (SMC) аорти свині тромбоцитарним фактором росту (PDGF)

PDGF (нг/мл)	Міграція SMC (оптична густина при 650 нм)
0,04	0,016±0,008
0,80	0,009±0,003
1,50	0,013±0,007
3,00	0,028±0,008
6,00	0,058±0,010
12,0	0,052±0,007
25,0	0,047±0,009

Таблиця 2

Інгібування процесу міграції гладеньких м'язових клітин (SMC) аорти свині, індукованого тромбоцитарним коефіцієнтом росту (PDGF), сполукою А* та β-естрадіолом (Оптична густина при 650 нм)

Концентрація (нМ)	Сполука А	β-естрадіол
0,0	0,053±0,015	0,053±0,015
0,1	0,035±0,005	0,032±0,003
1,0	0,030±0,005	0,023±0,003
10	0,032±0,007	0,034±0,006

* - Сполука А - за Формулою (I), де R₁ та R₃ - водень, R₁ - піролідино.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
