



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61916 (13) C2

(51) 7 A61K31/215, A61P13/06

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

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ НЕТРИМАННЯ СЕЧІ ЗА ДОПОМОГОЮ (S)-ОКСИБУТИНІНУ І (S)-ДЕЗЕТИЛОКСИБУТИНІНУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА ФОРМА (ВАРІАНТИ)

1

(21) 99010429
(22) 27 06 1997
(24) 15 12 2003
(86) PCT/US97/11570, 27 06 1997
(31) 08/671,976
(32) 28 08 1996
(33) US
(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р
(72) Еберг Гуннар, US, Мак Каллоу Джон, US
(73) СЕПРАКОР, ІНК, US
(56) WO, A, 9509007, 06 04 1995
WO, A, 9623492, 08 08 1996
US, A, 5 532 278, 02 07 1996
(57) 1 Спосіб лікування нетримання сечі з відвертанням супутньої схильності до негативних ефектів, що включає введення ссавцю, що потребує такого лікування, від приблизно 100 мг/день до приблизно 1 г/день сполуки, вибраної з групи, до якої входять (S)-оксибутинін, (S)-дезетилоксибутинін або фармацевтично прийнятна сіль будь-якого з них, по суті вільної від її (R) енантіомера
2 Спосіб за п. 1, де кількість (S)-оксибутиніну, (S)-дезетилоксибутиніну або фармацевтично прийнятної солі будь-якого з них, що вводиться, становить від приблизно 240 мг/день до приблизно 750 мг/день
3 Спосіб за п. 2, де кількість (S)-оксибутиніну, (S)-дезетилоксибутиніну або фармацевтично прийнятної солі будь-якого з них, що вводиться, становить від приблизно 300 мг/день до приблизно 600 мг/день
4 Спосіб за п. 1, де (S)-оксибутинін, (S)-дезетилоксибутинін або фармацевтично прийнята сіль будь-якого з них вводиться парентерально,

2

черезшкірно, ректально, перорально або шляхом вдихання

5 Спосіб за п. 4, де (S)-оксибутинін, (S)-дезетилоксибутинін або фармацевтично прийнята сіль будь-якого з них вводиться перорально або черезшкірно

6 Фармацевтична стандартна дозована лікарська форма у формі таблетки або м'якої еластичної желатинової капсули, яка містить фармацевтично прийнятний носій і від 0,1 мг до 500 мг сполуки, вибраної з групи, до якої входять (S)-оксибутинін, (S)-дезетилоксибутинін або фармацевтично прийнята сіль будь-якого з них, по суті вільної від її (R) енантіомера

7 Фармацевтична стандартна дозована лікарська форма за п. 6, де вміст (S)-оксибутиніну, (S)-дезетилоксибутиніну або фармацевтично прийнятної солі будь-якого з них становить від приблизно 25 мг до приблизно 250 мг

8 Фармацевтична стандартна дозована лікарська форма за п. 7, де вміст (S)-оксибутиніну, (S)-дезетилоксибутиніну або фармацевтично прийнятної солі будь-якого з них становить від приблизно 100 мг до приблизно 200 мг

9 Фармацевтична дозована лікарська форма у формі засобу для черезшкірної доставки, який включає в себе фармацевтично прийнятний носій і від приблизно 100 мг до 500 мг сполуки, вибраної з групи, до якої входять (S)-оксибутинін, (S)-дезетилоксибутинін або фармацевтично прийнята сіль будь-якого з них, по суті вільної від її (R) енантіомера

10 Фармацевтична дозована лікарська форма за п. 9, яка відрізняється тим, що зазначений фармацевтично прийнятний носій включає в себе підсилювач проникнення

Цей винахід відноситься до способу і лікарських форм для лікування нетримання сечі за допомогою оптично чистих (S)-оксибутиніну (S-OXY) і (S)-дезетилоксибутиніну (S-DEO)

Передумови створення винаходу

Рацемічний оксибутинін (OXY) знаходить терапевтичне застосування при лікуванні неперітонеї кишечника і при лікуванні нетримання сечі внаслідок

док нестійкого функціонування м'язу, що виштовхує сечу. Рацемічний оксибутинін виявляє безпосередній спазмолітичний вплив на гладкі м'язи і пригнічує вплив, що виявляє на згадані м'язи ацетилхоліном. У випадку впливу на м'язи, що виштовхують сечу у кроликів, рацемічний оксибутинін демонструє всього лише п'яту частину активності атропіну, однак за анти спазматичною активністю

(19) UA (11) 61916 (13) C2

він переважає останній в чотири-десять раз. Рацемічний оксibuтинін відрізняється надзвичайним розпізнаванням стосовно до мускаринових рецепторів в присутності нікотинівих рецепторів і, як наслідок цього, в скелетних нервово-м'язових сигналах або вегетативних гангліях повністю будуть відсутні ефекти блокування.

Рацемічний оксibuтинін розслаблює гладку мускулатуру сечового міхура, і у пацієнтів з захворюваннями, що характеризуються мимовільними скороченнями сечового міхура, цистометричні дослідження показали, що рацемічний оксibuтинін збільшує місткість сечового міхура, зменшує частоту мимовільних скорочень м'язу, що виштовхує сечу, і затримує первісний позив до сечовипускання. Завдяки цьому рацемічний оксibuтинін виявляється придатним для лікування і профілактики як нетримання сечі, так і частого довольного сечовипускання. Ефективність впливу рацемічного оксibuтиніна на міхур пояснюється поєднанням антимускаринового, безпосереднього

спазмолітичного і місцевого анестезуючого впливу на гладкий м'яз, що виштовхує сечу. Внаслідок антимускаринові активності рацемічного лікарського засобу надто розповсюдженими побічними явищами, що втягують мускаринові холінергічні рецептори, є ксеростомія (сухість в роті) і мідріаз (розширення зіниць). Фактично як мінімум один дослідник згадує "неминучі симптоми - мідріаз, ксеростомію, тахікардію тощо, якими супроводжується введення рацемічного оксibuтиніна [Ліш (Lish) і інші, *Arch Int Pharmacodyn* 156 467-488 (1965), 48]. Висока частота антихолінергічних побічних ефектів (від 40 до 80%) часто викликає зниження дозування або переривання курсу лікування.

Результати фармакологічних досліджень окремих енантіомерів дозволяють зробити припущення, що ефективним є R-енантіомер Норона-Блоб (Noronha-Blob) і інші [J Pharmacol Exp Ther 256 562-567 (1991)] прийшли до висновку, що холінергічний антагонізм рацемічного оксibuтиніна (що визначається *in vitro* за його спорідненістю до підтипів рецепторів M1, M2 і M3 *in vivo* за різноманітними фізіологічними реакціями) може пояснюватися, головним чином, активністю (R)-енантіомера. За всіма реакціями, виявленими вказаними дослідниками, ранжована активність рацемічного оксibuтиніна і його енантіомерів виявилася однаковою, а саме, активність (R)-оксibuтиніна виявилася більшою або рівною активності рацемічного оксibuтиніна і набагато більшою у порівнянні з активністю (S)-оксibuтиніна, причому активність (S)-оксibuтиніна виявилася на 1-2 порядку менше активності (R)-оксibuтиніна.

Стисле викладення суті винаходу

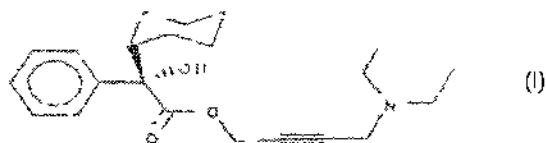
Несподівано виявили, що, по суті, оптичне чистий (S)-енантіомер оксibuтиніна і його деетил-овий метаболіт являють собою чудовий лікарський засіб для лікування нетримання сечі.

Оптично чисті (S)-оксibuтинін (S-OXY) і (S)-деетил-оксibuтинін (S-DEO) забезпечують можливість подібного лікування з одночасним істотним зниженням частоти негативних явищ, що є слідством, головним чином, антихолінергічної активності, і пов'язані з введенням рацемічного оксibuтині-

на. До їхнього числа відносяться, однак ними не обмежуються, ксеростомія, мідріаз, сонливість, нудота, запори, учащене серцебиття і тахікардія. Полегшення негативного впливу рацемічного оксibuтиніна на серцево-судинну систему, наприклад, тахікардії і учащеного серцебиття, шляхом введення (S)-оксibuтиніна або S-DEO, являє собою особливу терапевтичну, цінність.

Активними сполуками цих композицій і засобів є оптичні ізомери оксibuтиніна і деетил-оксibuтиніна. Спосіб отримання рацемічного оксibuтиніна описаний в описі винаходу до патенту Великобританії №940540. З хімічної сторони, активними сполуками є (1) S енантіомер 4-(діетиламіно)-2-бутиніл α -ціклогексил- α -гідроксibenзолацетат, відомий також як 4-(діетиламіно)-2-бутинілфенілциклогексипікто, поименований далі оксibuтиніном, і (2) S енантіомер 4-(етиламіно)-2-бутиніл α -циклогексил- α -гідроксibenзолацетат, поименований далі деетил-оксibuтиніном. Радою по хімічній номенклатурі США хлористоводневої солі рацемічного оксibuтиніна присвоєна родова назва хлорид оксibuтиніна, він продається під торговою назвою Ditrpan®.

Згаданий ізомер оксibuтиніна, що має S абсолютну стереохімію (Регістр №119618-22-3), є правообертаючим і представлений Формулою I,



S-енантіомер деетил-оксibuтиніна представлений Формулою II,



Синтез (S)-оксibuтиніна описаний [Качур (Kachur) і інші, J Pharmacol Exp Ther 247 867-872 (1988)], однак сам (S)-оксibuтинін в теперішній час комерційно недосяжний. Всі клінічні результати, про які повідомлялося, були отримані за допомогою рацемічної суміші, хоча фармакологія окремих енантіомерів була описана на морських свинках і щурах [дивись, Качур і інші, J Pharmacol Exp Ther 247 867-872 (1988) і Норона-Блоб і ін., J Pharmacol Exp Ther 256 562-567 (1991)]. Синтез і фармакологія (S)-деетил-оксibuтиніна були описані авторами цього винаходу в міжнародній заявці WO 96/23492.

Згідно одному з своїх аспектів, цей винахід відноситься до способу лікування нетримання сечі з відвертанням супутньої схильності до негативних явищ, що включає введення людині, потребуючій подібного лікування, терапевтичне ефективної кількості (S)-оксibuтиніна, (S)-деетил-оксibuтиніна або фармацевтичне прийнятної солі будь-якого з них, по суті, вільних від відповідного R-енантіомера.

Згідно іншому аспекту, цей винахід надає фармацевтичні композиції, до складу яких входить

(S)-оксибутинін, (S)-деетилоксибутинін або фармацевтично прийнятна сіль будь-якого з них, по суті, вільні від (R)-енантіомера, і фармацевтичне прийнятний носій Терміни "по суті, вільних від R-енантіомера" і "по суті, вільних від відповідного R-енантіомера", що використовуються в цьому описі, означають, що до складу згаданих композицій входить, як мінімум, 90% (мас.) (S)-оксибутиніна або (S)-деетилоксибутиніна і 10% (мас.) або менше (R)-оксибутиніна або (R)-деетилоксибутиніна, відповідно У більш прийнятному варіанті здійснення цього винаходу, до складу згаданих композицій входить, як мінімум, 99% (мас.) S енантіомера і 1% або менше R енантіомера

По суті, оптичне чистий (S)-оксибутинін або (S)-деетилоксибутинін можуть вводитися парентерально, ректально, внутрішньом'язово, через шкірно, перорально або за допомогою аерозолі Перевага віддається пероральному і через шкірному введенню в дозі, від, приблизно, 0,1 мг в день до, приблизно, 1 граму в день

Згідно іншому аспекту, цей винахід відноситься до фармацевтичної стандартної лікарської форми у вигляді таблетки, м'якої еластичної желатинової капсули або пристрою для через шкірного введення, до складу яких входить терапевтичне ефективна кількість (S)-оксибутиніна, (S)-деетилоксибутиніна або

фармацевтичне прийнятної солі будь-якого з них, по суті, вільних від відповідного R стереоізомера, і фармацевтичне прийнятний носій Згадані лікарські форми в вигляді таблеток або м'яких еластичних желатинових капсул можуть вироблятися традиційними способами, добре відомими в даній галузі техніки, причому кількість (S)-оксибутиніна, (S)-деетилоксибутиніна або фармацевтичне прийнятної солі будь-якого з них в кожній стандартній лікарській формі складає, в прийнятному варіанті, приблизно, від 0,1 мг до 500 мг, в більш прийнятному варіанті, приблизно, від 25 мг до 250 мг і в ще більш прийнятному варіанті, приблизно, від 100 мг до 200 мг Ефективність через шкірного введення підвищується шляхом включення підсилювача проникнення до складу пристрою для через шкірної доставки лікарського засобу

Докладний опис винаходу

S енантіомери оксибутиніна і DEO можуть бути отримані шляхом розчинення проміжного продукту мигдалевої кислоти, з наступною етерифікацією Етерифікація може здійснюватися, як описано Качуром і іншими (згадана робота) для ОХУ або вдосконаленим способом, описаним в міжнародній заявці WO 96/23492 В альтернативному варіанті, S енантіомер ОХУ і DEO може бути отриманий шляхом розчинення рацемічного оксибутиніна або DEO за допомогою традиційних способів, наприклад, фракціонованої кристалізації діастереомерних солей хіральноїми кислотами Крім того, можуть бути використані інші стандартні способи розчинення, відомі фахівцям в даній галузі, в тому числі, однак не обмежуючись ними, проста кристалізація і хроматографія на хіральної субстраті

Графічні зображення рацемічних, амбіскалемічних і скалемічних або енантіомерно чистих сполук, використаних в цьому описі, взяті з Мер

(Maehr J Chem Ed 62 114-120 (1985) Так, суцільні або ламані клини (наприклад, як показано в формулі I), використовуються для позначки абсолютної конфігурації хірального елементу, обрис клинів і пунктирні або ламані лінії означають енантіомерно чисті сполуки невизначеної абсолютної конфігурації

Величина профілактичної або терапевтичної дози (S)-оксибутиніна або S-DEO при негайній або тривалій терапії захворювання буде змінюватися в залежності від тяжкості і природи стану, що підлягає лікуванню, і шляху введення Згадана доза і, можливо, частота введення дози, будуть змінюватися індивідуально в залежності від віку, маси тіла і реакції пацієнта В цілому, загальний діапазон денної дози (S)-оксибутиніна або S-DEO для станів, описаних тут, складає, приблизно, від 0,1 мг до 1 граму, в переважному варіанті, приблизно, від 0,4 мг до 600 мг, в більш прийнятному варіанті, приблизно, від 100 мг до 1 г, в ще більш прийнятному варіанті, приблизно, від 240 мг до 750 мг, і в найбільш прийнятному варіанті, від 300 до 600 мг в вигляді разових доз або же, в переважному варіанті, поділеної на курс лікування загальної дози При лікуванні пацієнта процес повинен починатися з меншої дози, що складає, приблизно, 80 мг, з її підвищенням, в залежності від загальної реакції пацієнта, наприклад, приблизно, до 600 мг/день

Додатково рекомендується, щоб пацієнти старші 65 років і пацієнти з порушеною функцією нирок або печінки спочатку одержували невеликі дози, по повинні титруватися, виходячи з індивідуальної реакції(-ій) і рівня(-ів) в крові В деяких випадках може виникнути необхідність використання дозувань, що виходять за межі згаданих діапазонів, що буде очевидним фахівцям в даній галузі Додатково слідє відзначити, що лікар, що лікує буде знати, як і коли перервати, відкоректувати або закінчити курс лікування в залежності від індивідуальної реакції пацієнта Терміни "терапевтичне ефективна кількість" і "кількість, достатня для лікування нетримання, однак, недостатнє для того, щоб викликати негативні дії" охоплюються описаними вище діапазонами дозувань і схемою застосування лікарського препарату

Для забезпечення пацієнта ефективною дозою (S)-оксибутиніна або S-DEO може бути використаний будь-який підходящий шлях введення Можуть, наприклад, бути використані пероральна, ректальна, парентеральна (підшкірна, внутрішньом'язова, внутрішньовенна), через шкірна, аерозольна і подібні форми введення Додатково згаданий лікарський препарат може вводиться безпосередньо в сечовий міхур через сечовипускний канал, як описано для рацемічного оксибутиніна Масадом (Massad) і іншими, [J Urol 148, 595-597 (1992)] До лікарських форм відносяться таблетки, коржіки, дисперсії, суспензії, розчини, капсули, системи через шкірної доставки лікарського засобу тощо

До складу фармацевтичних композицій, відповідних цьому винаходу, входять (S)-оксибутинін або S-DEO, як активний інгредієнт, або їхня фармацевтичне прийнятна сіль, і може також входити фармацевтичне прийнятний носій, і, факультативно, інші терапевтичні інгредієнти

Терміни "фармацевтичне прийнятні солі" або

"іхні фармацевтичне прийнятні солі" означають солі, отримані за допомогою фармацевтичне прийнятних нетоксичних кислот. До числа підхожих фармацевтичних прийнятних солей згаданої сполуки, отриманих доданням кислоти, відповідних цьому винаходу, відносяться солі, отримані доданням оцтової, бензолсульфонової, бензойної, камфорсульфонової, лимонної, етансульфонової, фумарової, глюконової, глутамінової, бромистоводневої, хлористоводневої, ізетіонової, молочної, малеїнової, яблучної, мигдалевої, метансульфонової, слизової, азотної, памової, пантотенової, фосфорної, бурштинової, сірчаної, винної, р-толуолсульфонової і тому подібних кислот. Особливо придатним є гідрохлорид і це, фактично, була та сама сіль, яку використовували при проведенні описаних досліджень.

До числа композицій, відповідних цьому винаходу, відносяться суспензії, розчини, еліксири або тверді лікарські форми. Носії, наприклад, крохмалі, цукри і мікрокристалічна целюлоза, розбавителі, гранулюючі речовини, змащуючі речовини, в'язучі речовини, речовини, сприяючі розпаду тощо, придатні в випадку пероральних твердих препаратів (наприклад, порошків, капсул і таблеток) і твердим пероральним препаратам віддається перевага, у порівнянні з рідкими пероральними препаратами. Завдяки простоті введення, таблетки і капсули представляють одну з найбільш переважних стандартних пероральних лікарських форм. В цьому випадку застосовуються тверді фармацевтичні носії. В випадку необхідності, на таблетки, за допомогою стандартних водних або безводних технологічних засобів, може наноситися покриття.

В більш прийнятному варіанті здійснення, фармацевтичні композиції, відповідні цьому винаходу, можуть виготовлятися в вигляді стандартної лікарської форми в м'яких еластичних желатинових капсулах за допомогою традиційних засобів, добре відомих в даній галузі (дивись, наприклад, Еберт (Ebert), *Pharm Tech*, 1 (5) 44-50 (1977)). М'які еластичні желатинові капсули мають м'яку кулеподібну желатинову оболонку, товщина якої дещо перевищує товщину твердих желатинових капсул, причому желатина пластифікується доданням гліцерину, сорбіту або подібного поліола. Твердість оболонки капсули може змінюватися шляхом зміни типу желатини і кількості пластифікатора і води. До складу м'яких желатинових оболонок може входити консервант для запобігання зростання грибів, наприклад, метил- і пропілпарабени і сорбінова кислота. Згаданий активний інгредієнт може розчинятися або суспендуватися в рідкому носії або розбавителі, наприклад, рослинних або мінеральних маслах, гліколях, наприклад,

поліетиленгліколі і пропіленгліколі, тригліцеридах, поверхнево-активних речовинах, наприклад, полісорбатах або їхніх комбінаціях. В стандартній фармацевтичній лікарській формі в вигляді м'якої еластичної желатинової капсули, відповідної цьому винаходу, (S)-оксибутинін або (S)-деетилоксибутинін, в переважному варіанті, присутній в кількості, приблизно, від 0,1мг до 500мг, в більш переважному варіанті, в кількості, приблизно, від 25мг до 250мг і, в ще більш переважному варіанті, в кількості, приблизно, від 100мг до 200мг.

Поряд з традиційними лікарськими формами, згаданими раніше, сполуки, відповідні цьому винаходу, можуть також вводитися за допомогою інших способів контрольованого виділення і приладів доставки лікарських препаратів, відомих фахівцям в даній галузі техніки.

Фармацевтичні композиції, відповідні цьому винаходу, придатні для перорального введення, можуть бути репрезентовані в вигляді дискретних одиниць, наприклад, капсул, каше або таблеток, до складу кожної з яких входить наперед визначена кількість активного інгредієнта в вигляді порошку або гранул, або м'яких еластичних желатинових капсул, де активний інгредієнт розчинений або суспендирований в рідкому носії, або представлений в вигляді розчину або суспензії в водному середовищі, неводному середовищі, емульсії масла в воді або емульсії води в маслі. Такі композиції можуть бути отримані за допомогою будь-якого фармацевтичного способу, однак, всі способи включають етап об'єднання згаданого активного інгредієнта з вказаним носієм, що може включати один або декілька необхідних інгредієнтів. В цілому, згадані композиції одержують шляхом однорідного і ретельного змішування згаданого активного інгредієнта з рідкими носіями або тонко подрібненими твердими носіями, або з тими і іншими, з наступним, в випадку необхідності, наданням згаданому продукту необхідної форми таким же способом, що відомий для рацемічної суміші.

Гідна подиву придатність (S)-енантіомера як ОХУ, так і DEO, була встановлена за допомогою досліджень, опис яких наведений далі.

ЕНАНТІОМЕРИ ОКСИБУТИНІНА

Зв'язування (S)- і (R)-оксибутиніна з підтипами мускаринового рецептора M1, M2, M3 і M4 людини.

Джерело білка

Експерименти проводили на мембранах, отриманих з клітин SF9, інфікованих бакуловірусами для експресії рекомбінантних підтипів мускаринового рецептора M1, M2, M3 і M4.

Реакції зв'язування

Таблиця 1

Рецептор	Радіоізотопний ліганд	Концентрація	Неспецифічне зв'язування	Інкубування	Еталонна сполука
M _{1H}	[³ H] прензеплін	2нМ	Атропін (1мкМ)	60 хвилин, 27°C	прензеплін
M _{2H}	[³ H] AF-DX 384	2нМ	Атропін (1мкМ)	60 хвилин, 27°C	метоктрамін
M _{3H}	[³ H] 4-дезоксаденілова кислота	0,9нМ	Атропін (1мкМ)	60 хвилин, 27°C	4-дезоксаденілова кислота
M _{4H}	[³ H] 4-дезокс-аденілова кислота	0,3нМ	Атропін (1мкМ)	60 хвилин, 27°C	4-дезоксаденілова кислота

Після інкубування згадані реакційні проби швидко фільтрували під вакуумом через скловолоконні біологічні фільтри (GF/B) (компанія Whatman) і промивали льодяним буфером за допомогою брандєлівського харвестера клітин. Рівень зв'язаної радіоактивності визначали за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника (LS 6000, компанія Beckman) з використанням рідкої сцинтиляційної суміші (Формула 99, компанія DuPont NEN).

Протокол експерименту

Для отримання конкурентних кривих згадані сполуки випробували на кожному рецепторі в 10 концентраціях з повторенням. В процесі здійснення кожного експерименту, для отримання конкурентної кривої для оцінки результатів експерименту,

одночас в 8 концентраціях з повторенням випробували еталонну сполуку для рецептора, що піддавався дослідженню.

Аналіз і вираження результатів

Специфічне зв'язування кожного рецептора радіоізотопним лігандом визначали, як різницю між загальним зв'язуванням і неспецифічним зв'язуванням, що визначалися в присутності надлишку ліганду без радіоактивної мітки. Значення IC_{50} (концентрації, необхідні для пригнічення 50% специфічного зв'язування) визначали шляхом нелінійного регресійного аналізу згаданих конкурентних кривих. Згадані параметри були отримані шляхом підбору емпіричної кривої за допомогою програми Sigmaplot™. IC_{50} для R- і S-OXY наведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Зв'язування R-оксибутиніна і S-оксибутиніна з підтипами мускариноворецептора M1-M4 людини

Рецептор	R-OXY IC_{50} (нМ)	S-OXY IC_{50} (нМ)	IC_{50} еталонної сполуки (нМ)
M1	0,99	47,6	пірензепін 11,9
M2	9,9	178	метоктрамін 14,6
M3	1,8	149	4-дезоксиденілова кислота 1,6
M4	1,2	100	4-дезоксиденілова кислота 0,87

Ці результати свідчать про те, що S-OXY має меншу спорідненість до підтипів мускаринового рецептора, у порівнянні з R-OXY.

Зв'язування (S)- і (R)-оксибутиніна з кальцевими каналами

Реакції зв'язування

Таблиця 3

Реакції зв'язування здійснювали за допомогою наступних способів

Рецептори	Мембрани	Еталонні сполуки	Посилання
кальцевий канал (Т-тип+L-тип, дільниця зв'язування дилтазема)	кора головного мозку щурів	дилтазем	Шумейкер (Schoemaker) і Панкр (Langer) (1985)
кальцевий канал (Т-тип+L-тип, дільниця зв'язування верапамілу)	Кора головного мозку щурів	D600	Рейнольдс (Reynolds) і інші (1986)

Таблиця 4

Умови здійснення згаданого експерименту були такими

Рецептори	Ліганди	Концентрації	Неспецифічне зв'язування	Інкубування
кальцевий канал (Т-тип+L-тип, дільниця зв'язування дилтазема)	[3H] дилтазем	5нМ	дилтазем (10мкМ)	120 хвилин, 25°C
кальцевий канал (Т-тип+L-тип, дільниця зв'язування верапамілу)	[3H] D 888	0,5нМ	D600(10 мкМ)	60 хвилин, 22°C

Після інкубування згадані реакційні проби швидко фільтрували під вакуумом через скловолоконні біологічні або хімічні фільтри (GF/B або GF/C) (компанія Whatman) і промивали льодяним буфером за допомогою брандєлівського харвестера клітин. Рівень зв'язаної радіоактивності визначали за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника (LS 6000, компанія Beckman) з використанням рідкої сцинтиляційної суміші (Формула 989, компанія DuPont NEN).

Протокол експерименту

Згадані сполуки випробували з повторенням на кожному рецепторі в концентрації $10^{-5}M$. В процесі здійснення кожного експерименту, для отримання конкурентної кривої для оцінки результатів

експерименту, одночас в 8 концентраціях з повторенням випробували еталонну сполуку для рецептора, що піддавався дослідженню.

Аналіз і вираження результатів

Специфічне зв'язування кожного рецептора радіоізотопним лігандом визначали, як різницю між загальним зв'язуванням і неспецифічним зв'язуванням, що визначалися в присутності надлишку ліганду без радіоактивної мітки. Середні значення, як ступінь пригнічення в процентному вираженні, представлені в Таблиці 5. Значення IC_{50} (концентрації, що необхідні для пригнічення 50% специфічного зв'язування) визначали шляхом нелінійного регресійного аналізу згаданих конкурентних кривих. Згадані параметри були отримані шляхом

Таблиця 5

Зв'язування (R)- і (S)-оксибутиніна з кальцевими каналами
(Пригнічення (в %) зв'язування дилтазема і верапаміла з рецепторами кальцевих каналів)

Рецептор	R-OXY (10^{-5} М)	S-OXY (10^{-5} М)	IC ₅₀ еталонної сполуки (нМ)
кальцій (дилтазем)	86	59	дилтазем 55,8
кальцій (верапаміл)	86	68	D600 36,4

Наведені результати свідчать про те, що S-OXY має активність блокування кальцевих каналів, подібну активності R-OXY

ЕНАНТИОМЕРИ ДЕЕТИЛОКСИБУТИНІНА

Основним метаболітом рацемічного оксибутиніна є RS-деетилоксибутинін (DEO). Перед проведенням наших досліджень, R і S енантіомери DEO не були описані і антиспазмолітична активність R- і S-DEO, а також їхня активність блокування кальцевих каналів відомими не були. Ми синтезували ці енантіомери і на моделях зв'язування рецепторів і функціонування сечового міхура досліджували їхню антимускаринову і спазмолітичну активність, а також активність блокування кальцевих каналів. Ми встановили, що кожний енантіомер згаданого метаболіту зберігає відносний фармакологічний

профіль свого "батьківського" оксибутинінового енантіомера

Зв'язування на підтипах мускаринового рецептора

Ступінь пригнічення (в процентному вираженні) специфічного зв'язування радіоізотопного ліганду, індуковану трьома концентраціями кожної сполуки (R-, S- і RS-DEO), випробували на підтипах (M1-M4) клонованого мускаринового рецептора людини, як описувалося раніше для енантіомерів оксибутиніна. В наступних таблицях (Таблиці 6 і 7) в процентному відношенні представлений ступінь пригнічення на кожному підтипі. Крім того, для підтипів M1 і M2 мускаринового рецептора людини були визначені значення IC₅₀, що представлені в Таблиці 6

Таблиця 6

	M _{1H}				M _{2H}			
	10 ⁻⁹ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁵ М	IC ₅₀ (нМ)	10 ⁻⁹ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁵ М	IC ₅₀ (нМ)
R-DEO	63	100	100	1,2	21	97	102	14,7
S-DEO	-	82	101	25,4	-	36	101	177
RS-DEO	43	100	100	1,8	-	94	99	7,0

Таблиця 7

	M _{1H}			M _{2H}		
	10 ⁻⁹ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁹ М	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁵ М
R-DEO	58	100	100	58	100	99
S-DEO	-	63	99	-	43	99
RS-DEO	36	99	101	34	99	95

Наведені результати свідчать про те, що S-DEO має меншу спорідненість до підтипів мускаринового рецептора, ніж R- або рацемічний DEO

Зв'язування на кальцевих каналах

Ступінь пригнічення (в процентному вираженні) специфічного зв'язування радіоізотопного ліганду, індуковану кожною сполукою (R-, S- і RS-DEO), випробували на дільницях зв'язування дилтазема і верапаміла кальцевого каналу L-типу. Результати представлені в Таблиці 8

Таблиця 8

Рецептор	R-DEO 10 ⁻⁵ М	S-DEO 10 ⁻⁵ М	RS-DEO 10 ⁻⁵ М
Кальцій (дилтазем)	86	72	88
Кальцій (верапаміл)	96	76	89

Наведені результати свідчать про те, що S-DEO має активність блокування кальцевих каналів, подібну активності R- або рацемічного DEO

Визначення функціональних характеристик антимускаринової/антиспазмолітичної активності

Ефекти R-, S- і RS-оксибутиніна (OXY), і R-, S- і RS-DEO вивчалися *in vitro* на моделі функціонування сечового міхура. Як описано далі, виділені смужки гладкого м'язу сечового міхура морської свинки розміщували в препаративну ванночку і викликали їхні скорочення за допомогою мускаринового агоніста карбахола або за допомогою підвищених концентрацій калію, що надходив з зов-

нішнього джерела

Смужки сечового міхура. Експерименти здійснювали способами, подібними способам, описаним Качуром і іншими, 1988 і Норона-Блобом і Качуром, 1991. З сечового міхура статевозрілих морських свинок лінії Hartley масою 400-600г (компанія Elm Hill Breeding Laboratories, Челмсфорд, Массачусетс) вирізали смужки тканини (приблизно, довжиною 10мм і шириною 1,5мм). Тканину суспендували в насиченому киснем буфері наступного складу, в мМ: NaCl, 133, KCl, 4,7, CaCl₂, 2,5, MgSO₄, 0,6, NaH₂PO₄, 1,3, NaHCO₃, 16,3, і глюкоза, 7,7. Смужки витримували при температурі 37,5°C. Скорочення реєстрували за допомогою ізометрич-

них датчиків (Модель FT-10) і багатоканального чорнильного самописця (Модель 7) (компанія Astro-Med, Inc, філія Grass Instrument Div, Уест-Барвік, Род Айленд) Всі згадані смужки постійно підтримувалися під напругою спокою 0,5 граму

В кожному експерименті з одного сечового міхура нарізали до семи смужок, суспендували їх в окремих тканинних камерах і зрівнювали розчином для препарувальних ванночок на протязі однієї години перед подальшим проведенням експерименту

Скорочення, індуковані карбахолом Одна серія експериментів була присвячена антихолінергічній дії оксibuтиніна Скорочення тканинних смужок в цих експериментах, для оцінки життєздатності кожної з них і для наступного використання в якості еталонної основи, спочатку реєстрували, як реакцію на вплив тканевого живильного середовища, в якому NaCl був заміщений KCl для отримання концентрації KCl в середовищі на рівні 137,7мМ Після цього повернулися до стандартного живильного середовища, в наступному згадані тканинні смужки піддавали впливу концентрацій карбахола, що поступово збільшувалися, причому вплив кожної концентрації тривав лише до реєстрації максимальної реакції Після цього, залишивши одну смужку без обробки і/або одну смужку під впливом 17мМ розчину етанолу для використання як контрольної тканини(-ин), кожну з тканинних смужок, що залишалися на протязі однієї години піддавали впливу однієї з концентрацій антагоніста Контрольні смужки, що зберігалися в розчині етанолу, використовувались в тому випадку, коли по причині поганої розчинності концентровані розчини експериментальних речовин повинні були готуватися в етанолі, внаслідок чого в препарувальних ванночках справді виявлявся 17мМ розчин етанолу В кінцевому рахунку, в другий раз реєструвалися реакції на підвищені концентрації карбахола, з наступним впливом 137,7мМ розчину KCl

Скорочення, індуковані калієм Друга серія експериментів була присвячена спазмолітичній дії досліджуваних речовин Скорочення реєструвалися, як реакція на послідовно зростаючу концентрацію калію в живильному середовищі

Аналіз даних Для визначення, чи знижують антагоністи максимальну реакцію на агоністів, максимальну напругу, що розвивається кожній смужкою при здійсненні другої серії визначення, виражали в вигляді відсотка від максимальної напруги, що розвивалася в процесі першого визначення

залежності між концентрацією і ефектом Після цього, дані, отримані для кожного антагоніста, аналізували на відмінності, зв'язані з обробкою, за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) Оскільки кожна смужка сечового міхура піддавалася впливу лише однієї концентрації антагоніста, для визначення pA_2 і нахилу регресії Шильда використовували методики Арунлакшана (Arunlakshana) і Шильда (Schild) (1959) в модифікованому вигляді Передусім, для кожної смужки, за даними другої серії експериментів ю визначенню залежності між концентрацією і ефектом, визначали концентрації агоніста, що викликають напівмаксимальну реакцію (EC_{50}) EC_{50} визначали за кривими лінійної регресії, підібраним за логарифмом концентрації лікарського препарату і реакціям, що обмежують напівмаксимальний рівень реакції обома ч Для кожної тканинної смужки, обробленої препаратом, "коефіцієнт концентрації" (CR) обчислювали, як коефіцієнт EC_{50} обробленої тканини, поділений на EC_{50} необробленої тканини Для кожного експерименту, в якому дві або більше тканинних смужок піддавалися впливу однієї і тєї ж хімічної речовини, але в різноманітних концентраціях, викреслювали "графіки Шильда", тобто графіки залежності логарифма згаданого коефіцієнта мінус 1 [тобто $\log (CR-1)$] від логарифма концентрації антагоніста, впливу якого піддавалася тканинна смужка Для визначення pA_2 і нахилу лінії регресії використовували регресійний аналіз, що зв'язує $\log (CR-1)$ з логарифмом концентрації згаданого антагоніста І, нарешті, дані експериментів групували за хімічними речовинами для обчислення середнього значення \pm середня квадратична помилка pA_2 і нахилу кривої 95% довірчі рівні (CL) для згаданої кривої визначали по середній квадратичній помилці за допомогою стандартних способів Для експериментів, в яких впливу даної хімічної речовини піддавалася всього одна тканинна смужка, pK_D обчислювали, як (концентрація антагоніста)/(CR-1), після чого від'ємний логарифм K_D об'єднували зі значеннями pA_2 для отримання розширеної множини значень pA_2

Вплив рацемічного оксibuтиніна і DEO, а також їхніх відповідних енантіомерів на скорочення, індуковане карбахолом, в узагальненому вигляді представлений в наведений далі Таблиці 9 Наведені значення являють собою узагальнені дані аналізів Шильда, що дадуть значення pA_2 [середнє значення \pm середня квадратична помилка] і нахилу [середнє значення \pm середня квадратична помилка]

Таблиця 9

Антагоніст	Число експериментів	pA_2	Нахил кривої
R-OXY	4	8,800 \pm 0,27	1,290 \pm 0,26
S-OXY	4	7,090 \pm 0,13	1,130 \pm 0,17
RS-OXY	5	8,810 \pm 0,29	1,340 \pm 0,15
R-DEO	4	9,040 \pm 0,32	1,180 \pm 0,11
S-DEO	4	7,310 \pm 0,35	0,870 \pm 0,11
RS-DEO	4	8,550 \pm 0,32	1,350 \pm 0,25

Наведені результати свідчать, що як S-OXY, так і S-DEO є більш слабкими антагоністами мускаринових рецепторів сечового міхура, ніж R- і рацемічний OXY, а також R- і рацемічний DEO Вплив рацемічного оксibuтиніна і його енантіомерів на скорочення, індуковані калієм, в уза-

гальненому вигляді представлені в наведений далі Таблиці 10 (Наведені значення являють собою величину скорочення, індуковану 137,7мМ K^+ після 60-хвилинного впливу сполуки, поділену на величину скорочення, індуковану перед впливом лікарського препарату)

Таблиця 10

Антагоніст	Середній % перед обробкою \pm середня квадрат помилка (n=3)
R-OXY	328 \pm *
S-OXY	269 \pm *
RS-OXY	201 \pm *
R-DEO	365 \pm *
S-DEO	425 \pm *
RS-DEO	478 \pm *

* Що істотно відрізняється від відповідного значення для необроблених тварин ($p < 0,01$)

Ці результати свідчать про те, що оксипутинін і його енантіомери, а також деетилпосипутинін і його енантіомери мають рівну силу впливу, як спазмолітичний мускулатури сечового міхура.

В той час як добре відомо, що випорожнення сечового міхура опосередковується холінергічними механізмами, нестабільність функціонування сечового міхура, що спостерігається у пацієнтів, що страждають нетриманням сечі, зв'язується, по всій видимості, з нехолінергічними скороченнями сечового міхура. Андерсон (Andersson) і інші [Neurologi Urologi 5, 579-586 (1986)] продемонстрували на тваринах, що м'яз, що виштовхує сечу, чутливий до впливу атропіну, володіє високою чутливістю до антагоністів кальцію. Вивчення описаного раніше рецепторозв'язуючої спорідненості (R)- і (S)-оксипутиніна до рецепторних ділянок інгібіторів кальцієвих каналів, ділтіазема і верапаміла, дозволяє зробити висновок про те, що S-оксипутинін і (S)-деетилпосипутинін виявляють терапевтичний вплив на мимовільне сечовипускання, в той же час (на відміну від R-ізомерів і рацематів) виявляючи надто незначний вплив на механізм нормального спорожнення сечового міхура. Як S-OXY, так і S-DEO демонструють також істотно знижений рівень антихолінергічних побічних дій, у порівнянні з відповідним R-ізомером і рацематом. Особливу увагу слід звернути на відсутність побічних ефектів відносно серцево-судинної системи, що є слідством антихолінергічної дії рацемічного оксипутиніна. Автори винаходу прийшли до висновку, що S-оксипутинін і S-деетилпосипутинін є ефективними лікарськими засобами для лікування нетримання сечі у людей зі значно зменшеними побічними ефектами, у порівнянні з рацематами або чистими R-енантіомерами.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Пероральна лікарська форма

Капсули	Кількість на капсулу в мг		
Склад	A	B	C
S-DEO	50	100	200

Лактоза	230	280	330
Кукурудзяний крохмаль	65	65	65
Стеарат магнію	5	5	5
Маса, що пресується	350	450	600

S-DEO, лактозу і кукурудзяний крохмаль змішують до отримання однорідного складу, після цього до отриманого порошку додають стеарат магнію, утворену масу просіюють і за допомогою відповідного обладнання засипають в двохчасткові тверді желатинові капсули відповідного розміру. Інші дози можуть бути отримані шляхом зміни маси порошку, що засипається і, в випадку необхідності, відповідної зміни розміру капсули.

Оскільки, як мінімум, одна кристалічна форма згаданих сполук, відповідних цьому винаходу, нагадує голки, активний інгредієнт необхідно розмолоти або піддати гранулюванню для отримання сипкого порошку для таблетування або засипання в капсули з використанням прийомів роботи з сухими порошками.

Приклад 2

Пероральна лікарська форма

Таблетки	Кількість на таблетку в мг		
Склад	A	B	C
S-OXY	30	100	200
Лактоза	205	243	245
Кукурудзяний крохмаль	30	50	50
Вода (на тисячу таблеток)	300мл	500мл	500мл
Кукурудзяний крохмаль	80	100	100
Стеарат магнію	5	5	5
Маса, що пресується	350	600	600

Вода в процесі виготовлення випаровується.

S-OXY змішують з лактозою до отримання однорідної суміші. Меншу кількість кукурудзяного крохмалю змішують з водою, одержуючи крохмальний клейстер. Після цього згаданий крохмальний клейстер змішують зі згаданою однорідною сумішшю до отримання однорідної вологої маси. Кукурудзяні (й крохмаль, що залишався, додають до утвореної вологої маси і перемішують до утворення однорідних гранул. Після цього згадані гранули просіюють через відповідний подрібнювач, використовуючи сито з нержавіючої сталі з величиною чарунки 1/4 дюйма (6,35мм). Подрібнені гранули сушать в відповідній сушильній печі до отримання необхідного рівня змісту вологи. Після цього висушені гранули пропускають через відповідний подрібнювач і отриману суміш пресують в таблетки необхідної форми, товщини, твердості і розсипаємості. Таблетки з іншим вмістом активних речовин можна отримати шляхом зміни співвідношення між активними інгредієнтами і наповнювачами або кінцевою масою таблетки.