

(11) Patent numeris: **4602** (51) Int. Cl.⁶: **A61K 31/41**

(21) Paraiškos numeris: **99-016**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 02 23**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1999 10 25**

(45) Patent paskelbimo data: **2000 01 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/DE97/00701**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1997 04 07**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 02 23**

(31, 32, 33) Prioritetas: **8/225512, 1996 08 27, JP**

(72) Išradėjas:

Ikuro Maruyama, JP
Kazuhiro Abeyama, JP
Hiroyuki Masayasu, JP

(73) Patent savininkas:

A. Nattermann & Cie. GmbH, Nattermannallee 1, 50829 Koeln (Cologne), DE

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žaboiienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-ono panaudojimas Alchaimerio ligos gydymui skirtai farmacinei kompozicijai gauti

(57) Referatas:

Šis išradimas yra susijęs su farmacine kompozicija, skirta Alchaimerio ligos gydymui. Farmacinės kompozicijos sudėtyje veikia medžiaga yra 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas (junginys A), kurios veiksmingumas paremtas baltymo β -amiloido indukuoto neuronų toksiškumo sumažinimu.

Šis išradimas yra skirtas profilaktinei ir/arba terapinei Alchaimerio ligai gydyti skirtai farmacinei kompozicijai, kurioje kaip veiklioji medžiaga yra 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas; be to, ši veiklioji medžiaga sumažina toksiškumą neuronams, kurį sukelia baltymas β -amiloidas.

Kai kuriose šalyse kaip profilaktiniai ir/arba terapiniai vaistai nuo Alchaimerio ligos yra naudojami acetilcholinesterazės inhibitoriai, tokie kaip pvz. fizostigminas arba tetrahidroaminoakridinas (THA). Tačiau jie rezultatų nedavė. Taip pat buvo bandyta panaudoti nervų sistemą veikiančius 5-HT-antagonistus, bet jų poveikio mechanizmas dar nėra visiškai ištirtas.

Yra žinoma (žr. S. J. Stohs, J. of Basic and Clin. Phys. and. Pharm., 1995, 6: 205-228 apžvalgą), kad su amžiumi susijusių ligų, įskaitant Alchaimerio ligą ir kitus neurologinius sutrikimus, patofiziologijoje didelį vaidmenį vaidina reakingos deguonies formos (laisvieji radikalai). Jų metabolinėje detoksikacijoje dalyvauja fermentas - glutationperoksidazė.

Patologiniai Alchaimerio ligos požymiai apima senilines plokšteles ir PTH (suporuotų spiralinių skaidulų) sankaują smegenyse.

β -Amiloidas (toliau žymimas $A\beta$), kuris yra senilinių plokštelių pagrindinė sudėtinė dalis, yra netirpus peptidas, susidedantis iš maždaug 40 aminorūgščių liekanų. Buvo nustatyta, kad $A\beta$ biochemiškai kenkia neuronams ir kad šį poveikį ypatingai sukelia koaguluotas netirštęs $A\beta$.

Todėl buvo norima surasti medžiagą, kuri tikėtų Alchaimerio tipo senatvinės silpnaprotystės progresavimo profilaktikai ir/arba gydymui ir sukurti kompoziciją, kuri slopintų toksinio $A\beta$ sukeltą neuronų žuvimą, bei neutralizuotų oksidacinio streso sukeltus laisvuosius radikalus.

Yra žinoma, kad 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas (arba ebselenas) *in vivo* pasižymi panašiu į glutationperoksidazę aktyvumu (A. Muller et al., Biochem. Pharmacol. 1984, 33: 3235; (A. Muller et al., Biochem.

Pharmacol. 1985, 34: 1185; H. Sies, Free Radical. Biol. Med. 1993, 14:313) ir gali naikinti aukščiau minėtus laisvuosius radikalus. Ebselenas veikia prieš hipoksijos/išemijos sukeltą neuronų pažeidimą (S. Knollema et al., Neuroscience Res. Comm., 1996, 19: 47-56), pasižymi neuroapsauginėmis savybėmis prieš smegenų pažeidimus, sukeltus žiurkėms panaudojant trumpalaikės židininės smegenų išemijos modelį (D. A. Dawson et al., Neurosci. Lett., 1995, 185: 65-69), sumažina kepenų intoksikaciją, hemoraginį pankreatitą (H. Johshita et al., Acta Neurochir., suppl. 1990, 51:239). PCT paraiškoje WO 92/02221 aprašytas ebseleno panaudojimas cis-platinos šalutinių poveikių (nefrotoksiškumo ir neurotoksiškumo) sumažinimui ir profilaktikai.

Šio išradimo autoriai atliko du plačius tyrimus, ir netikėtai surado, kad 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas (ebselenas) (toliau žymimas junginys A) inhibuoja neuronų žuvimą, kurį sukelia Aβ. Tokiu būdu šiame išradime siūloma panaudoti junginį A, kaip profilaktinę ir/arba terapinę farmacinę priemonę Alzheimerio ligai gydyti.

Aβ buvo identifikuotas kaip patologinio Alzheimerio ligos požymio senilinių plokštelių pagrindinė sudedamoji dalis. Jis susideda iš 39-40 aminorūgščių liekanų. Be to, yra žinoma, kad Aβ turi neurotoksinį poveikį ir tuo būdu sukelia ląstelės žuvimą. Visai neseniai buvo rasta, kad neurotoksinio Aβ sukeltas PC12 ląstelių žuvimas, esant Aβ, slopinamas, kai įvedamas junginys A (ebselenas). Todėl galima manyti, kad junginys A yra puiki profilaktinė ir/arba terapinė priemonė Alzheimerio ligos gydymui.

Šiame išradime naudojamas junginys A gali būti susintetintas Japonijos patente (kokoku) Nr. 2-38591 (Japonijos patentinė publikacija (kokai) Nr. 57-67568) aprašytu būdu.

Junginys A gali būti paruošiamas vartojimui įvairiomis vaistinėmis formomis, tokiomis, kaip pavyzdžiui, tabletės, kapsulės, milteliai, granulės, sirupai arba injekcijoms skirtos formos, panaudojant žinomas vaistų gaminimo metodikas ir priedus, nešiklius, rišančias medžiagas, tabletes ardančias medžiagas bei tirpiklius.

Toliau duodamoje lentelėje pateikiama, pavyzdžiui, tabletės sudėtis:

junginys A	25 mg
karboksimetilceliuliozė	25 mg
krakmolas	5 mg
kristalinė celiuliozė	40 mg
<u>magnio</u> stearatas	2 mg
Iš viso:	122 mg

Junginys A turi aukščiau aprašytą poveikį bet kokių vartojimo būdu, pavyzdžiui, įprastu peroraliniu būdu arba parenteriniu būdu, pvz. injekcijomis.

Naudojant peroraliniu būdu, junginio A dozė suaugusiam yra 100-2000 mg/dienai ribose, geriausia 200-1000 mg/dienai ribose; be to, priklausomai nuo paciento klinikinės būklės, ji gali būti atitinkamai padidinta arba sumažinta.

Tiriant junginio A toksiškumą, buvo nustatyta LD_{50} vertė pelėms ir žiurkėms. Pagal išradėjų duomenis nustatytos LD_{50} vertės pelėms yra ≥ 6810 mg/kg, įvedant peroraliniu būdu, ir 740 mg/kg - įvedant intraperitoniniu būdu. Nustatytos LD_{50} vertės žiurkėms yra ≥ 6810 mg/kg, įvedant peroraliniu būdu, ir 580 mg/kg - įvedant intraperitoniniu būdu. Šios LD_{50} vertės rodo, kad junginys A yra labai netoksiškas.

Taigi, kai pelėms ir žiurkėms buvo duodama didelė junginio A dozė, nebuvo stebima jokių problemų sukeliančių šalutinių poveikių.

Toliau šis išradimas aprašytas pavyzdžiais, kurie neapriboja jo apimtys.

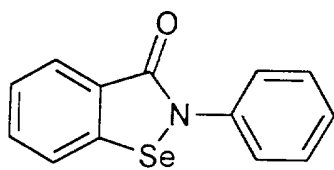
1 pavyzdys

Junginio A, kaip $A\beta$ sukulto neuronų žuvimo inhibitoriaus, poveikis, esant $A\beta$

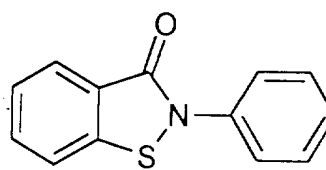
Išaugintos PC12 ląstelės (iš žiurkių, chromafininis auglys) buvo vėl auginamos 100 mm lėkštelėje (Corning gaminyje), kuri padengta polilizinu ir į kurią įpilta DMEM terpės, turinčios 10 % FCS ir 5 % arklio serumo (Sigma produktas). Kitaip tariant, PC12 ląstelės (1×10^6 ląstelių/lėkštei) buvo

auginamos polilizinu padengtoje 100 mm lėkštelėje. Skirtingai nuo nurodymų PC12 ląstelėms, šios PC12 ląstelės buvo auginamos 7 dienas DMEM terpėje, kurioje buvo 5 % FCS, 50 ng/ml NGF ir 1 % arklio serumo. Norint gauti ląstelių suspensiją, PC12 ląstelės susiurbiamos pipete ir suspenduojamos tinkamoje terpėje. Ląstelių suspensija išpilstoma į polilizinu padengtą plokštelę su 96 duobutėmis po 1×10^4 ląstelių/duobutei. Į duobutes pridedama Aβ (Bachem Feinchemikalien AG), kad galutinė jo koncentracija būtų 10 μM. Po to pridedamas junginys A, kad jo galutinė koncentracija būtų 0,1, 1,0 arba 2,5 μM. Kaip kontrolinė medžiaga naudojamas junginys B (junginys A, kuriame Se pakeistas sierą, neturintis į glutationoksidazę panašaus poveikio; 2-fenil-1,2-benzotiazol-3(2H)-onas; gautas iš Nattermann) lygiai tokios pačios koncentracijos ir tokiu pačiu būdu. Pridėjus junginio A arba junginio B, ląstelės buvo auginamos 48 val.

Į taip apdorotas ląsteles pridedama MTT reagento (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido). Inkubuojama 4 val., ir ląstelės lizuojamos. Toliau apdorojama panaudojant taip vadinamą MTT būdą, kuris paremtas kolorimetriškai nustatoma reagento redukcijos reakcija, ir iš to įvertinamas suspensijoje esančių ląstelių gyvybingumas (Behl, C. et al., Cell, 77: 817-827).



Junginys A



Junginys B

1 lentelė

Junginių A ir B poveikis į PC12 neuronų ląstelių žuvimą

Pridėta medžiaga (μM)			Ląstelių gyvybingumas (%) nuo kontrolės)	T-testas (Stjudento)
A β	Junginys A	Junginys B		
1h.10				
10	-	-	15 $\pm$ 9,5	-
10	0,1	-	45 $\pm$ 2,1	*
10	-	0,1	14 $\pm$ 4,5	
10	1,0	-	59 $\pm$ 14,5	**
10	-	1,0	13 $\pm$ 1,0	
10	2,5	-	66 $\pm$ 4,5	***
10	-	2,5	10 $\pm$ 5,0	

* : $P \leq 0,01$, ** : $P \leq 0,002$, *** : $P \leq 0,0001$, $n=6$.T testas skaičiuojamas grupėms, kuriose buvo pridėtas A β (10 μM).

Kaip galima vienareikšmiškai matyti iš 1 lentelės, neuronų žuvimą sukėlė A β , be to, junginys B žuvimo greičio nepaveikė. Tačiau pridėjus 0,1 μM , 1 μM arba 2,5 μM junginio A, visais atvejais žymiai inhibuojamas neuronų žuvinimas ($P \leq 0,0082$, $P \leq 0,0018$ ir $P \leq 0,0001$).

2 pavyzdys

Išaugintos PC12 ląstelės (iš žiurkių, chromafininis auglys) buvo vėl auginamos 100 mm lėkštelėje (Corning gaminyje), kuri padengta polilizinu ir į kurią įpilta DMEM terpės, turinčios 10 % FCS ir 5 % arklio serumo (Sigma produktas). Kitaip tariant, PC12 ląstelės (1×10^6 ląstelių/lėkštei) buvo auginamos polilizinu padengtoje 100 mm lėkštelėje. Skirtingai nuo nurodymų PC12 ląstelėms, šios PC12 ląstelės buvo auginamos 7 dienas DMEM terpėje, kurioje buvo 5 % FCS, 50 ng/ml NGF ir 1 % arklio serumo. Norint gauti ląstelių suspensiją, PC12 ląstelės susiurbiamos pipete ir suspenduojamos

tinkamoje terpėje. Ląstelių suspensija išpilstoma į 60 mm polilizinu padengtą lėkštelę su 96 duobutėmis po 1×10^4 ląstelių/duobutei. Kai ląstelės prilipo, buvo atliktas toks bandymas.

Tokios prilipusios PC12 ląstelės patalpinamos į DMEM terpę, pridedama 10 μ M SNAP ir 2,5 μ M junginio A. Į kontrolinę grupę pridedama tik SNAP. Kiekvienas bandinys inkubuojamas 3 val. Kiekvienas PC12 turintis bandinys sumaišomas su paruoštu DCFH-DA tirpalu (Molecular Probes, Inc.) DMSO (1 mg/413 μ l), kad galutinė jo koncentracija būtų 5 μ M. Po to bandiniai inkubuojami 30 min. Ląstelės pašalinamos panaudojant tripsiną-EDTA ir vėl surenkamos centrifuguojant (1000 aps. x 5 min.) Vėl surinktos ląstelės suspenduojamos 50 μ l PBS(-) šaldant ledu. Viduląstelinio vandenilio peroksido kiekis nustatomas srovės citometru. Atliekamas ląstelių suspensijos FACS (fluorescencinis aktyvuotų ląstelių rūšiavimas) ir išmatuojamas peroksidu oksiduotos fluorescuojančios medžiagos - 2',7'-dichlorfluoresceino (DCFH) - kiekis. Buvo nustatyta, kad pridėjus SNAP pasigamino 1,3-1,4 kartus daugiau vandenilio peroksido, negu tuo atveju, kai SNAP nebuvo pridėta. Šis padidintas vandenilio peroksido susidarymas dėl SNAP pridėjimo yra aiškiai slopinamas, kai pridedama 2,5 μ M junginio A ($P \leq 0,0015$).

2 lentelė

Junginio A poveikis, mažinant NO sukėto vandenilio peroksido kiekio susidarymą (sumaišytose su SNAP PC12 ląstelėse)

Paveikta:		Gautas H ₂ O ₂ kiekis (% log fluorescencija pagal kontrolę)
SNAP (μ M)	Junginys A	
0	0	100,0
10	0	135,8 $\pm$ 5,25
10	2,5	45,7 $\pm$ 6,03

SNAP: S-nitrozo-N-acetil-DL-penicilinaminas

****:** $P \leq 0,0015$ [pagal Stjudento t-testą SNAP (10 μM) atžvilgiu; $n=3$].

Čia turima omenyje tai, kad iš $\text{A}\beta$ atsiradęs NO pagreitina vandenilio peroksido susidarymą. Tačiau, kaip matyti iš 2 lentelės, vandenilio peroksido susidarymas yra gana gerai slopinamas pridėjus 2,5 μM junginio A.

Neseniai buvo pabrėžiama, kad esant Alchaimerio ligai, apoptozė turi ryšį su neuronų žuvimu. Dėl to vėliau buvo teigiama, kad $\text{A}\beta$ sukelia neuronų žuvimą ir kad vandenilio peroksido susidarymas yra neurotoksiškumo priežastis (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90: 7951-7955, 1993).

Kaip aprašyta aukščiau, $\text{A}\beta$ sukeltas vandenilio peroksido susidarymas yra aiškiai slopinamas, pridėjus junginio A. Todėl galima teigti, kad junginys A turi turėti puikų profilaktinį arba terapinį poveikį gydant Alchaimerio ligą. Taigi, šiame išradime aptariamas junginys A yra ypatingai tinkamas profilaktinei arba terapinei kompozicijai, skirtai senatvinės silpnaprotystės, ypač Alchaimerio ligos, gydymui gauti.

Išradimo aprašyme naudojami tokie sutrumpinimai:

Polilizinas - lizino polipeptidas, turintis įvairaus ilgio grandines;

DMEM - Delbecco modifikuota Eagle terpė;

DCFH - 2',7'-dichlorfluoresceinas;

FCS - fetalinis veršiuko serumas;

DMSO - dimetilsulfoksidas;

Tripsino EDTA - kompleksas etilendiaminotetraacto rūgšties pagrindu;

NO - azoto oksidas.

Taigi, šis išradimas yra skirtas farmacinei kompozicijai Alchaimerio ligos gydymui. Išradime siūlomoje farmacinėje kompozicijoje, kaip veiklioji medžiaga, yra 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas (junginys A), kurio poveikis pagrįstas β -amiloido sukulto neurotoksiškumo sumažinimu.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. 2-Fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-ono panaudojimas farmacinei kompozicijai, skirtai silpnaprotystės profilaktikai ir/arba gydymui, pagaminti.

2. Panaudojimas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ši farmacinė kompozicija yra skirta senatvinės silpnaprotystės profilaktikai ir/arba gydymui.

3. Panaudojimas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ši farmacinė kompozicija yra skirta Alchaimerio tipo senatvinės silpnaprotystės profilaktikai ir/arba gydymui.

4. Farmacinė kompozicija, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje kaip veiklioji medžiaga yra 2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2H)-onas, ir ši kompozicija yra skirta Alchaimerio ligos profilaktikai ir/arba gydymui.

5. Vaistas pagal bet kurį iš aukščiau apibrėžtų punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra vartojamas tablečių, kapsulių, miltelių, granulių, sirupo arba injekcijoms skirtų vaistinių formų pavidalu.