



(51) МПК
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/4422 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010117634/15, 03.10.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 03.10.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 05.10.2007 US 60/977,953
 18.04.2008 US 61/046,109

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2011 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 20.08.2013 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: US 2005009885 A1, 13.01.2005. US 5508413
 A, 16.04.1996. EP 0321636 A2, 28.06.1989.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 05.05.2010

(86) Заявка РСТ:
 US 2008/078786 (03.10.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2009/046323 (09.04.2009)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
 ООО "Юридическая фирма Городиский и
 Партнеры", пат.пов. А.В.Мицу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

**МУЛЛАН Майкл Дж. (US),
 ПАРИ Даниель (US),
 АЙВИ Роберт А. Ш (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**АЛЬЦГЕЙМЕРС ИНСТИТЮТ ОФ
 АМЕРИКА, ИНК. (US)**

**(54) СПОСОБ УМЕНЬШЕНИЯ ОТЛОЖЕНИЯ АМИЛОИДА, АМИЛОИДНОЙ
 НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ И МИКРОГЛИОЗА С ПОМОЩЬЮ (-)-ЭНАНТИОМЕРА
 НИЛВАДИПИНА**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине. Способ уменьшения отложения Аβ, Аβ нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, включающий введение животному или человеку терапевтически эффективного количества энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина. Предлагаемые далее способы представляют собой способы снижения риска отложения Аβ, Аβ нейротоксичности и микроглиоза у

животного или человека, страдающего травматическим поражением головного мозга, путем введения (-)-нилвадипина после травматического поражения головного мозга, затем продолжая лечение в течение предписанного периода времени. Фармацевтическая композиция для уменьшения отложения Аβ, Аβ нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, содержащая терапевтически эффективное количество

оптически активного нилвадипина и фармацевтически приемлемый носитель, при этом фармацевтическая композиция содержит избыток (-)-нилвадипина по сравнению с (+)-нилвадипином, в частности, по меньшей

мере 90% по сравнению с (+)-нилвадипином. Группа изобретений обеспечивает повышение эффективности лечения. 5 н. и 17 з.п. ф-лы, 10 пр., 19 ил.

RU 2 4 9 0 0 1 4 C 2

RU 2 4 9 0 0 1 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/4422 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010117634/15, 03.10.2008**

(24) Effective date for property rights:
03.10.2008

Priority:

(30) Convention priority:
05.10.2007 US 60/977,953
18.04.2008 US 61/046,109

(43) Application published: **10.11.2011 Bull. 31**

(45) Date of publication: **20.08.2013 Bull. 23**

(85) Commencement of national phase: **05.05.2010**

(86) PCT application:
US 2008/078786 (03.10.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/046323 (09.04.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364

(72) Inventor(s):

MULLAN Majkl Dzh. (US),
PARI Daniel' (US),
AJVI Robert A. III (US)

(73) Proprietor(s):

AL'TsGEJMER'S INSTIT'JuT OF AMERIKA,
INK. (US)

(54) METHOD OF REDUCING AMYLOID DEPOSITION, AMYLOID NEUROTOXICITY AND MICROGLYOSIS BY (-)-ENANTIOMER NILVADIPINE

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine. A method of reducing A β , A β deposition, neurotoxicity and microglyosis in an animal or a human suffering a cerebral amyloidogenic disease, involving administering a therapeutically effective amount of enantiomer-rich (-)-nilvadipine into the animal or human. The further methods represent methods of reducing a risk of A β , A β deposition, neurotoxicity and microglyosis in the animal or human suffering the traumatic cerebral affection by administering (-)-nilvadipine following the traumatic cerebral affection with the treatment continued for a

specified period of time. A pharmaceutical composition for reducing A β , A β deposition, neurotoxicity and microglyosis in the animal or human suffering a cerebral amyloidogenic disease containing the therapeutically effective amount of optically active nilvadipine and a pharmaceutically acceptable carrier with the pharmaceutical composition containing a residue of (-)-nilvadipine as compared to (+)-nilvadipine, particularly at least 90% as compared to (+)-nilvadipine.

EFFECT: invention provides higher clinical effectiveness.

22 cl, 10 ex, 18 dwg

Для данной заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 60/977953, поданной 5 октября 2007 г., и предварительной заявке на патент США 61/046109, поданной 18 апреля 2008 г.; содержание каждой заявки полностью включено в данное описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способу лечения патофизиологических эффектов церебральных амилоидогенных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера. Более конкретно, способ включает введение (-)-энантиомера нилвадипина для противодействия патофизиологическим эффектам в головном мозге животных или людей, пораженных заболеваниями, связанными с церебральным амилоидозом, такими как болезнь Альцгеймера, при уменьшенных по сравнению с рацемической смесью нилвадипина антигипертензивных побочных эффектах.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Описание предшествующего уровня техники

Болезнь Альцгеймера (AD) представляет собой наиболее распространенное нейродегенеративное расстройство, возникающее при старении, поражающее приблизительно 1% населения в возрасте после 65 лет. Отличительные черты заболевания включают прогрессирующее накопление внутриклеточных нейрофибриллярных клубков, внеклеточных паренхимальных сенильных бляшек и цереброваскулярных отложений в головном мозге. Основным компонентом сенильных бляшек и цереброваскулярных отложений является β -амилоидный белок (A β), имеющий 39-43 аминокислоты, получаемый протеолизом белка амилоидного предшественника (APP), трансмембранного гликопротеида.

APP представляет собой единый трансмембранный белок с внеклеточным аминокотерминальным доменом из 590-680 аминокислот и с цитоплазматическим хвостом из приблизительно 55 аминокислот. Информационная РНК APP гена на хромосоме 21 претерпевает альтернативный сплайсинг, с образованием восьми возможных изоформ, три из которых (изоформы, имеющие 695, 751 и 770 аминокислот) доминируют в головном мозге. APP претерпевает протеолитический процессинг под действием ферментативной активности трех секретаз, а именно α -, β - и γ -секретаз. Альфа-секретеза расщепляет APP на аминокислоте 17 A β домена, таким образом, высвобождая для секреции большой растворимый аминокотерминальный фрагмент α -APP. Так как α -секретеза расщепляет A β домен изнутри, это расщепление предотвращает образование A β . Альтернативно APP может подвергаться расщеплению β -секретазой, чтобы определить аминоконцы A β и чтобы генерировать растворимый аминокотерминальный фрагмент β -APP. Последующее расщепление с помощью γ -секретазы внутриклеточного карбоксикотерминального домена приводит к образованию многочисленных пептидов; два наиболее распространенных представляют собой A β , имеющий 40 аминокислот (A β 40), и A β , имеющий 42 аминокислоты (A β 42). В A β 40 содержится 90-95% секретированного A β , и он является доминирующим видом, выделяемым из спинномозговой жидкости (Seubert et al., Nature, 359:325-7, 1992). В противоположность, менее 10% секретированного A β представляет собой A β 42. Несмотря на относительно малое количество продуцируемого A β 42, A β 42 представляет преобладающий вид, обнаруженный в бляшках, и осаждается в начальной стадии, возможно вследствие его способности образовывать нерастворимые амилоидные агрегаты быстрее, чем A β 40 (Jarrett et al., Biochemistry, 32:4693-7, 1993). Полагают, что аномальное накопление A β в головном мозге происходит вследствие или сверхэкспрессии APP, или измененного

процессинга APP.

Таким образом, полагают, что Аβ пептиды играют решающую роль в патологии AD (болезнь Альцгеймера), так как все мутации, связанные с семейной формой AD, приводят к измененному процессингу этих пептидов из APP.

5 Действительно, отложения нерастворимых или агрегированных фибрилл Аβ в головном мозге являются важным невропатологическим признаком всех форм AD, независимо от генетической предрасположенности пациента.

Совместно с отложением Аβ происходит сильная активация воспалительных процессов в головном мозге больного AD, включая продуцирование провоспалительных цитокинов и реактантов острой фазы внутри и вблизи Аβ отложений (McGeer et al., *J Leukocyte Biol*, 65:409-15, 1999). Полагают, что активация иммунных клеток, постоянно присутствующих в мозге с рождения, микроглия, непосредственно включена в воспалительный каскад. Было показано, что реактивная микроглия продуцирует провоспалительные цитокины, такие как воспалительные белки и реактанты острой фазы, такие как альфа-1-антихимотрипсин, трансформирующий фактор роста β, аполипопротеин Е и факторы комплемента, которые, как было показано, все локализованы у Аβ бляшек и ускоряют уплотнение или созревание Аβ бляшек (Nilsson et al., *J. Neurosci.* 21:1444-5, 2001), и которые ускоряют нейродегенерацию при высоких уровнях. Эпидемиологические исследования показали, что у пациентов, использующих нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAIDs), риск заболевания AD снижается до 50% (Rogers et al., *Neurobiol. Aging* 17:681-6, 1996), и посмертное исследование больных AD, которых подвергали лечению NSAID, показало, что снижение риска связано с уменьшением количества активированной микроглии (Mackenzie et al., *Neurology* 50:986-90, 1998). Кроме того, когда Tg APP_{SW} мышам (представляющим собой мышиную модель болезни Альцгеймера) давали NSAID (ибупрофен), у этих животных наблюдали уменьшение отложений Аβ, астроцитоза и дистрофического неврита. Это коррелирует с уменьшением активации микроглии (Lim et al., *J. Neurosci.* 20:5709-14, 2000). Следовательно, продукты воспалительного процесса в головном мозге больного AD могут обострять патологию AD. Более того, есть свидетельство того, что активированная микроглия в головном мозге больного AD вместо клиринга Аβ является патогенной, ускоряя образование Аβ фибрилл с последующим их отложением в виде сенильных бляшек (Wegiel et al., *Acta Neuropathol. (Berl.)* 100:356-64, 2000).

Также предполагают, что развитие патологического процесса при AD обусловлено нейротоксическими свойствами Аβ. Цитотоксичность Аβ впервые была установлена в первичных клеточных культурах из головного мозга грызунов, а также в человеческих клеточных культурах. В работе Mattson et al. (*J. Neurosci.*, 12:376-389, 1992) указывают, что Аβ в присутствии глутамата, возбуждающего нейромедиатора, вызывает немедленный патологический рост внутриклеточного кальция, который считается очень токсичным для клетки, по причине его значительно возросшей активности вторичного мессенджера.

В заявке на патент США № 2005/0009885 (13 января, 2005) (Mullan et al.) раскрывают способ уменьшения отложений Аβ, использующий нилвадипин, а также способы диагностирования церебральных амилоидогенных заболеваний, использующие нилвадипин. Однако в патенте США № 4338322 описаны антигипертензивные эффекты нилвадипина. В Ирландии нилвадипин (NIVADIL™) получил официальное одобрение для лечения гипертензии в дозировке 8 мг в день или 16 мг в день, если при 8 мг в день не получают адекватный антигипертензивный

эффект. См. также патент США № 5508413, в котором раскрыты антигипертензивные эффекты (+)-энантиомера нилвадипина. Рацемический нилвадипин и его воздействие на церебральный региональный мозговой кровоток у испытуемых людей описаны в работе Hanyu et al. (Nuclear Medicine Communications, vol. 28, no. 4, pages 281-287, April 2007).

Несмотря на сообщения, приведенные выше, существует необходимость в профилактике неумолимо прогрессирующей дегенерации головного мозга, являющейся признаком AD; где профилактика направлена на A β отложения, A β нейротоксичность, воспаление, активированное микроглией, и измененную экспрессию или сверхэкспрессию APP, что наблюдают у больных AD при терапевтически эффективном лечении с минимальными побочными эффектами, такими как нежелательное или чрезмерное понижение кровяного давления.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Чтобы обеспечить эту потребность, в настоящем изобретении предложены способы уменьшения A β отложений, A β нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, таким как болезнь Альцгеймера (AD), вводя животному или человеку терапевтически эффективные количества энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина. В частности, в настоящем изобретении предлагают вводить энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин со сниженным гипотензивным эффектом, по сравнению таким же количеством рацемического нилвадипина. В дополнение, введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина дает возможность, благодаря снижению гипотензивного эффекта, увеличить дозировку по сравнению с введением рацемического нилвадипина или (+)-нилвадипина. Например, представленные здесь данные демонстрируют для (-)-энантиомера исходный уровень аортальной контракции, вызванной FPL64176, что коррелирует с пониженной вазоактивностью (-)-энантиомера, по сравнению с рацемической смесью или (+)-энантиомером, которые демонстрируют вазоактивность (то есть антагонизм по отношению к индуцируемой вазоконстрикции). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения (-)-энантиомер во вводимой композиции присутствует в избытке; и избыток энантиомера предпочтительно составляет 90% или более, 95% или более и, более предпочтительно, 98% или более, включая 100%, вплоть до определяемого предела степени чистоты.

В настоящем изобретении дополнительно предложены способы снижения опасности отложения A β , A β нейротоксичности и микроглиоза у животных или людей, страдающих от травматического повреждения головного мозга, посредством введения животному или человеку после черепно-мозговой травмы терапевтически эффективного количества энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина, и впоследствии продолжая лечение энантиомерно-обогащенным (-)-нилвадипином в течение предписанного периода времени. В частности, в настоящем изобретении предусматривают введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина, обладающего пониженным гипотензивным эффектом по сравнению с таким же количеством рацемического нилвадипина. В дополнение, введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина дает возможность, благодаря снижению гипотензивного эффекта, увеличить дозировку по сравнению с введением рацемического нилвадипина. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения (-)-энантиомер присутствует в избытке во вводимой композиции, и избыток энантиомера предпочтительно составляет 90% или более, 95% или более и, более предпочтительно, 98% или более, включая 100%, вплоть до определяемого

предела степени чистоты.

Также в настоящем изобретении предложены способы снижения риска развития или замедления начала или прогрессирующего развития церебрального амилоидогенного заболевания или состояния, или стабилизации его симптомов у животных и людей, у которых диагностирован риск развития церебрального амилоидогенного заболевания или состояния. Эти способы включают введение животному или человеку терапевтически эффективного количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина, где введение энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина начинают после диагностирования риска развития церебрального амилоидогенного заболевания или состояния. В частности, в настоящем изобретении предусматривают введение энантимерно-обогащенного (-) нилвадипина, обладающего сниженным гипотензивным эффектом по сравнению с таким же количеством рацемического нилвадипина. В дополнение, введение энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина дает возможность, благодаря снижению гипотензивного эффекта, увеличения дозировки по сравнению с введением рацемического нилвадипина. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения (-)-энантиомер во вводимой композиции присутствует в избытке; и избыток энантиомера предпочтительно составляет 90% или более, 95% или более и, более предпочтительно, 98% или более, включая 100%, вплоть до определяемого предела степени чистоты.

В настоящем изобретении предусматривают лечение церебрального амилоидогенного заболевания с клинической картиной, охватывающей один или несколько, или все из когнитивных и поведенческих признаков, связанных с церебральным амилоидогенным заболеванием. Например, в том, что касается AD, эти признаки могут включать, кроме прочих, перечень таких симптомов, как глубокую потерю памяти, трудности при выполнении привычных работ, проблемы с речью, нарушение ориентации, сниженную способность к суждениям, нарушение абстрактного мышления, изменения личности, перемены настроения или поведения и/или характерное количество набранных очков в наборе когнитивных тестов. Такие когнитивные тесты включают Wechsler Memory Scale Revised (Шкалу памяти Векслера с внесенными поправками) (WMS-R), Clinical Dementia Rating (Клиническую оценку уровня деменции) (CDR), Mini-Mental State Examination (MMSE) (Мини-диагностику психического состояния) и/или Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS) (Шкалу оценки болезни Альцгеймера - когнитивную подшкалу).

В настоящем изобретении предусматривается лечение энантимерно-обогащенным (-)-нилвадипином, которое может привести к особым клиническим результатам. Одним конечным результатом лечения является измеряемое улучшение одного или нескольких симптомов заболевания у больных, пораженных церебральным амилоидогенным заболеванием. Улучшение может привести к отсутствию у пациента симптомов заболевания или может отражать улучшение дееспособности по сравнению с одним или несколькими симптомами, наблюдающимися до проведения лечения. Альтернативно одним конечным результатом лечения может быть поддержание исходного уровня симптоматики. Другими словами, такой конечный результат представляет собой долговременную стабилизацию заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания, или стабилизацию на некоторый период времени. В добавление, один конечный результат лечения может представлять собой снижение скорости прогрессирования заболевания по сравнению с контролем, не подвергавшимся лечению. Более того, лечение может включать предварительное лечение человека, которого считают подверженным риску

развития церебрального амилоидогенного заболевания, но до клинического проявления одного или нескольких симптомов. Ссылки на лечение заболевания также охватывают лечение одного или нескольких симптомов, когда лечение не излечивает, а временно смягчает симптомы.

5 В настоящем изобретении также предложены способы обработки пригодных для трансплантации нейрональных стволовых клеток, включающие введение некоторого количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина в нейрональные стволовые клетки перед трансплантацией стволовых клеток в центральную нервную систему животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, таким как AD. Введенное количество представляет собой количество, с помощью которого достигают требуемого цитопротекторного эффекта. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения (-)-энантиомер во вводимой композиции присутствует в избытке; и избыток энантиомера предпочтительно составляет 90% или более, 95% или более и, более предпочтительно, 98% или более, включая 100%, вплоть до определяемого предела степени чистоты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фиг. 1 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект постоянного введения нилвадипина на A β отложение (поражение A β) в разных участках головного мозга TgAPP_{sw} мышей. Был применен метод иммуноокрашивания с использованием иммунной метки 4G8.

На фиг. 2 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект постоянного введения нилвадипина на активацию микроглии в трех участках головного мозга TgAPP_{sw} мышей. Была применена техника иммуноокрашивания с использованием иммунной метки CD45, которая определяет число CD45+ микроглии.

На фиг. 3 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект нилвадипина на активацию микроглии в N9 мышечных микроглиальных клетках, активируемых в течение 24 часов *in vitro* липополисахаридом (LPS). Активацию микроглии определяли по продуцированию TNF- α (пг/мл), измеряемому с помощью иммуноферментного анализа ELISA.

На фиг. 4 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект введения нилвадипина на A β нейротоксичность, используя HPNC клетки, обработанные 30 мкМ предварительно агрегированного A β 1-40 (AgA β) в течение трех дней. Нейротоксичность оценивали, измеряя количество лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой из клеток.

На фигурах 5A и 5B представлены столбчатые диаграммы, которые иллюстрируют эффект введения нилвадипина на процессинг APP, где используют клетки глиобластомы человека, трансфицированные APP_{sw}. Клетки 24 часа (фиг. 5A) и 48 часов (фиг. 5B) обрабатывали 50 нМ и 250 нМ нилвадипина. Продуцирование A β 1-40 в культуральной среде измеряли с помощью ELISA.

На фиг. 6 представлена кривая дозозависимости, демонстрирующая эффект чистых энантиомерных форм нилвадипина (нилвадипина 1 и нилвадипина 2), а также смеси 2-х энантиомеров, взятых в равном соотношении (N1+N2), на продуцирование A β 1-40 клетками яичников китайского хомячка 7W WT APP751 после 24-часовой обработки. Оба энантиомера, по-видимому, аналогичным образом дозозависимо ингибируют продуцирование A β 1-40.

На фиг. 7 представлена кривая дозозависимости, демонстрирующая эффект чистых энантиомерных форм нилвадипина (нилвадипина 1 и нилвадипина 2), а также смеси 2-х энантиомеров, взятых в равном соотношении (N1+N2), на продуцирование A β 1-42

клетками яичников китайского хомячка 7W WT APP751 после 24-часовой обработки. Заметим, что чистый энантиомер нилвадипина 2, а также рацемическая смесь нилвадипина (N1+N2) в низкой дозе незначительно стимулируют $A\beta$ 1-42, тогда как энантиомер нилвадипина 1 не имеет такого эффекта.

На фиг. 8 представлено осуществленное хиральным хроматографом разделение энантиомеров нилвадипина. «Nilva_Peak_1» соответствует (-)-нилвадипину (нилвадипину 1); «Nilva Peak_2» соответствует (+)-нилвадипину (нилвадипину 2). Пик «Nilva_10», относится к исходной рацемической смеси нилвадипина, включенной в иллюстративных целях.

На фиг. 9 представлен эффект (-)-нилвадипина (нилвадипина 1) и (+)-нилвадипина (нилвадипина 2) на вазоконстрикцию аорт крыс, индуцированную FPL64176. Данные показывают, что (+)-нилвадипин действует как полный антагонист вазоконстрикции, индуцированной FPL64176, тогда как (-)-нилвадипин не влияет на вазоактивный эффект агониста кальциевого канала L-типа. Это демонстрирует то, что (+)-нилвадипин является блокатором кальциевого канала L-типа, тогда как (-)-нилвадипин не проявляет такого эффекта.

На фиг. 10 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект (-)-нилвадипина на мозговые уровни $A\beta$ 1-40 и $A\beta$ 1-42 у 93-недельных Tg APP_{sw} мышей. Животных ежедневно в течение четырех дней обрабатывали (внутрибрюшинно) (-)-нилвадипином (10 мг/кг массы тела).

На фиг. 11 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект медленного высвобождения (-) нилвадипина на мозговые уровни $A\beta$ 1-42 у 70-недельных Tg APP_{sw} мышей. Животных обрабатывали в течение 26 дней, используя биоразлагаемые пилюли, которые имплантировали подкожно.

Фиг. 12 иллюстрирует *in vitro* модель гематоэнцефалического барьера, используя 24-луночные полупрозрачные 0,4-мкм мембранные вставки, содержащие слой капиллярных эндотелиальных клеток мозга человека (НВМЕС). Миграцию флуоресцеин-бета-амилоида 1-42 в апикальное отделение оценивали в разные моменты времени.

На фиг. 13 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект *in vitro* (-)-нилвадипина на мозговой клиренс $A\beta$ через гематоэнцефалический барьер. А = апикальный, В = базолатеральный.

На фиг. 14 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект *in vitro* (-)-нилвадипина, в сопоставлении с рацемической смесью нилвадипина, на мозговой клиренс $A\beta$ через гематоэнцефалический барьер. А = апикальный, В = базолатеральный.

На фиг. 15 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект *in vivo* (-)-нилвадипина на мозговой клиренс $A\beta$ через гематоэнцефалический барьер, измеряемый по плазменным $A\beta$ уровням мышей.

На фиг. 16 представлена столбчатая диаграмма, которая иллюстрирует эффект *in vivo* биоразлагаемой гранулы (-)-нилвадипина на мозговой клиренс $A\beta$ через гематоэнцефалический барьер.

На фигурах 17А и 17В показаны вазоактивные свойства (+)-нилвадипина на интервале дозирования лекарственных средств в сопоставлении с (-)-нилвадипином.

ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены профилактические и терапевтические способы, обращенные на неумолимо прогрессирующую дегенерацию головного

мозга, что является признаком некоторых церебральных амилоидогенных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (AD), у животных и людей, осуществляемые посредством введения энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина (изопропил-3-метил-2-циано-1,4-дигидро-6-метил-4-(м-нитрофенил)-3,5-
5 пиридиндикарбоксилата; молекулярной массы (MW) 385,4). Способы по изобретению охватывают лечение, предотвращение и ослабление симптомов заболевания.

Если не оговорено особо, термин «нилвадипин», используемый здесь, обозначает рацемическую смесь. Термин «энантимерно обогащенный», используемый здесь,
10 обозначает соединение, которое является смесью энантимеров, в которой (-)-энантиомер присутствует в избытке и предпочтительно составляет вплоть до 90% или более, 95% или более и, более предпочтительно, до 98% или более, включая 100%, вплоть до определяемого предела чистоты. Например, чистота может быть
15 определена с использованием методов хиральной ВЭЖХ (HPLC). В одном варианте осуществления изобретения избыток энантиомера вычисляют, вычитая компонент, присутствующий в малом количестве, из основного компонента, (присутствующего в большом количестве). Например, для смеси энантимеров, содержащей 98% (-)-энантиомера и 2% (+)-энантиомера, вычисляют, что избыток (-)-энантиомера
20 составляет 96%.

В частности, в одном варианте осуществления изобретения предлагают способ уменьшения Аβ отложений, Аβ нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием или состоянием, в котором вводят животному или человеку терапевтически эффективные
25 количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина. Так как большинство церебральных амилоидогенных заболеваний, таких как AD, являются хроническими, прогрессирующими, трудноизлечимыми мозговыми деменциями, то считают, что продолжительность лечения энантимерно-обогащенным (-)-нилвадипином будет
30 длиться вплоть до конца жизни животного или человека. Церебральные амилоидогенные заболевания или состояния включают, кроме прочих, болезнь Альцгеймера, травматическое повреждение мозга и церебральную амилоидную ангиопатию.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение предлагает способ
35 лечения инфекционной губчатой энцефалопатии, скрепи или синдрома Gerstmann-Straussler-Scheinker.

В еще одном варианте осуществления изобретения способ предусматривает уменьшение риска отложения Аβ, Аβ нейротоксичности и микроглиоза у животных
40 или людей, страдающих травматическим поражением головного мозга, (ТВИ), посредством введения после ТВИ животному или человеку терапевтически эффективного количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина и дальнейшего продолжения лечения энантимерно-обогащенным (-)-нилвадипином в течение предписанного периода времени. Полагают, что продолжительность лечения
45 энантимерно-обогащенным (-) нилвадипином этих животных или людей, страдающих от ТВИ, может продолжаться от приблизительно одного часа до пяти лет, предпочтительно от приблизительно до двух недель до трех лет и, наиболее предпочтительно, от приблизительно шести месяцев до двенадцати месяцев.

В еще одном варианте осуществления изобретения способ предусматривает лечение
50 церебрального амилоидогенного заболевания с клинической картиной, охватывающей один или несколько, или все из когнитивных и поведенческих особенностей, ассоциированных с церебральным амилоидогенным заболеванием. Например, в

случае AD, такие особенности могут включать, кроме прочих, перечень симптомов, таких как глубокая потеря памяти, трудности при выполнении привычных работ, проблемы с речью, нарушение ориентации, сниженная способность к суждениям, нарушение абстрактного мышления, изменения личности, перемены настроения или поведения и/или характерное количество полученных очков в наборе когнитивных тестов. Такие когнитивные тесты включают Wechsler Memory Scale Revised (Шкалу памяти Векслера с внесенными поправками) (WMS-R), Clinical Dementia Rating (Клиническую оценку уровня деменции) (CDR), Mini-Mental State Examination (MMSE) (Мини-диагностику психического состояния) и/или Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale (ADAS) (Шкалу оценки болезни Альцгеймера - когнитивную подшкалу).

В одном или нескольких вариантах осуществления изобретения лечение энантиомерно-обогащенным (-)-нилвадипином может привести к реальному исходу болезни. Одним конечным результатом лечения является измеряемое улучшение одного или нескольких симптомов заболевания у больных, пораженных церебральным амилоидогенным заболеванием. Улучшение может привести к необнаружению у пациента симптомов заболевания или может отражать улучшение дееспособности по сравнению с одним или несколькими симптомами, наблюдавшимися до проведения лечения. Альтернативно, в одном случае окончание лечения может представлять собой поддержание исходного уровня симптоматики. Другими словами, такой конечный результат лечения представляет собой долговременную стабилизацию заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания, или стабилизацию на некоторый период времени. В добавление, один конечный результат лечения может представлять собой снижение скорости прогрессирования заболевания по сравнению с контролем, не подвергавшимся лечению. Более того, лечение может включать предварительное лечение человека, которого считают подверженным риску развития церебрального амилоидогенного заболевания, но до клинического проявления одного или нескольких симптомов. Ссылки на лечение заболевания также охватывают лечение одного или нескольких симптомов, когда лечение не излечивает, а временно смягчает симптомы.

Терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина, которое вводят, необязательно в стандартной лекарственной форме, животным или людям, пораженным церебральным амилоидогенным заболеванием или страдающим травматическим повреждением мозга, а также вводят с целью ограничения риска развития и/или диагностирования церебрального амилоидогенного заболевания у животного или человека, согласно способам по настоящему изобретению может находиться в интервале от приблизительно 0,05 мг до 20 мг в день, предпочтительно от приблизительно 2 мг до 15 мг в день, более предпочтительно от приблизительно 4 мг до 12 мг в день и, наиболее предпочтительно, приблизительно 8 мг в день. Ежедневную дозу можно вводить как однократную дозу или как разделенную на две, три или четыре стандартных дозы в день. В еще одном варианте осуществления изобретения, терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина превышает 16 мг в день вплоть до предела, максимально переносимой дозы. Например, терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина может находиться в интервале от 16 мг до приблизительно 20 мг в день. Альтернативно терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина может составлять приблизительно 20 мг в день, приблизительно 30 мг в

день, приблизительно 40 мг в день, приблизительно 50 мг в день, приблизительно 75 мг в день, приблизительно 100 мг в день, приблизительно 125 мг в день, приблизительно 150 мг в день, приблизительно 175 мг в день, приблизительно 200 мг в день, приблизительно 225 мг в день, приблизительно 250 мг в день,
5 приблизительно 275 мг в день, приблизительно 300 мг в день, приблизительно 325 мг в день, приблизительно 350 мг в день, приблизительно, 375 мг в день, приблизительно 400 мг в день, приблизительно 425 мг в день, приблизительно 450 мг в день, приблизительно 475 мг в день, приблизительно 500 мг в день или вплоть до
10 максимально переносимой дозы в день, и любое количество, целочисленное или нецелочисленное, находящееся между вышеуказанными количествами. Интервалы можно варьировать. Например, интервалы, кроме прочих, включают нижние предельные количества, составляющие 20, 40, 60, 80 или 100 мг в день, и верхние предельные количества, составляющие 50, 100, 150, 200, 250, 300 и 500 мг в день. В
15 качестве предельной точки может служить любое количество, целочисленное или нет, из количеств, перечисленных выше.

Не желая привязываться к теории, полагают, что антигипертензивные эффекты могут ограничивать максимально переносимое количество рацемического
20 нилвадипина. В одном варианте осуществления изобретения после введения энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина, терапевтически эффективное количество энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина снижает кровяное давление на величину, выбираемую из группы, состоящей из значений, меньших, чем
25 приблизительно 30%; меньших, чем приблизительно 20%, меньших, чем приблизительно 10%, меньших, чем приблизительно 5%, меньших, чем приблизительно 1% от величины кровяного давления, получаемого после предварительного лечения. Кровяное давление можно определять множеством
способов. Например, кровяное давление можно измерять как систолическое давление
30 или как диастолическое давление в миллиметрах ртутного столба. Альтернативно кровяное давление можно рассчитать по формуле: $2/3$ от показаний диастолического давления плюс $1/3$ от показаний систолического давления. В одном варианте осуществления изобретения кровяное давление отслеживают непрерывно и интегрируют по времени, чтобы получить однозначную величину площади под
35 кривой (AUC). Изменение кровяного давления можно сравнивать с давлением здоровой популяции или же сравнивать с давлением, полученным после курса предварительного лечения давления у пациента. В одном варианте осуществления изобретения кровяное давление после проведенного курса лечения измеряют после
40 такого периода лечения, когда уже достигают устойчивого состояния при измененном кровяном давлении. Например, кровяное давление после проведенного курса лечения можно измерять после приблизительно 1 недели лечения, приблизительно 4 недель лечения, приблизительно 12 недель лечения, приблизительно 6 месяцев лечения и тому
подобное. В одном варианте осуществления изобретения энантимерно-
45 обогащенный (-)-нилвадипин вводят человеку или животному с нормальным кровяным давлением, или страдающему гипотензией. В одном варианте осуществления изобретения энантимерно-обогащенный (-)-нилвадипин вводят человеку или животному, страдающему гипертензией. Считается, что нормальное
50 кровяное давление человека находится между приблизительно 90/50 мм Hg и приблизительно 135/90 мм Hg. Если кровяное давление человека ниже нормального интервала, то это считается гипотензией.

В еще одном варианте осуществления изобретения терапевтическое средство по

изобретению вводят пациентам, страдающим гипертензией, или пациентам, у которых не принимают во внимание уровни кровяного давления. Пациентов, страдающих гипертензией, можно одновременно лечить антигипертензивными средствами. Если кровяное давление человека выше нормального интервала изменения давления, то такое состояние считают гипертензией.

Нормальные интервалы изменения давления для разных животных можно найти в стандартных ветеринарных справочниках. В одном варианте осуществления изобретения кровяное давление находится в нормальном диапазоне, или в силу естественных причин, или вследствие медицинского вмешательства, такого как введение дополнительного антигипертензивного средства.

В еще одном варианте осуществления изобретения представлен способ предварительной обработки пригодных для трансплантации человеческих или ксеногенных нейрональных стволовых клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина в нейрональные стволовые клетки перед трансплантацией клеток в центральную нервную систему животного или человека, которые могут быть поражены церебральным амилоидогенным заболеванием, таким как AD. Возможно, в самих нейрональных стволовых клетках нет значительного отложения A β . Однако, если нейрональный трансплантат предназначен для окружения, пораженного A β , предварительная обработка нейрональных стволовых клеток должна усилить способность трансплантированных нейронов к выживанию в их новом окружении за счет снижения в этом новом окружении концентрации A β , тем самым A β токсичности. Терапевтически эффективное количество энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина, которое вводят для предварительной обработки нейрональных стволовых клеток, может находиться в диапазоне от приблизительно 1 нМ до 3 мкМ, предпочтительно приблизительно от 10 нМ до 2 мкМ и, наиболее предпочтительно от приблизительно 100 нМ до 1 мкМ. Известно, что стволовые клетки, ориентированные на дифференцировку в специализированные типы клеток, таких как нейрональные клетки, предоставляют возможность возобновляемого источника замещения клеток и тканей для лечения заболеваний и состояний, например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона или травмы спинного мозга. Когда такие клетки трансплантируют/имплантируют пациенту, рекомендуется не только предварительно обработать клетки энантимерно-обогащенным (-)-нилвадипином, но также начать терапевтическое лечение пациента энантимерно-обогащенным (-)-нилвадипином после имплантации.

Полагают, что способы по настоящему изобретению могут быть испытаны на известных AD-моделях трансгенных животных, таких как мышинные PDAPP и TgAPP_{sw} модели, перед тестированием на эффективность лечения, предотвращающего и/или ингибирующего состояния, связанные с отложением амилоида, A β нейротоксичностью и микроглиозом центральной нервной системы человека. Такие AD-модели трансгенных животных конструируют, используя стандартные способы, известные в данной области техники, например, как изложено в патентах США №№ 5487992; 5464764; 5387742; 5360735; 5347075; 5298422; 5288846; 5221778; 5175385; 5175384; 5175383 и 4736866.

Энантимерно-обогащенный (-)-нилвадипин можно вводить пациенту различными путями, включающими парентеральное, оральное или внутривенное введение. Парентеральное введение включает нижеследующие пути введения: внутривенный; внутримышечный; интерстициальный; внутриартериальный; подкожный;

внутриглазной; внутрочерепной; интратекальный; внутрижелудочковый; внутрисуставной; трансэпителиальный, включая трансдермальный, пульмональный через ингаляцию, офтальмический, сублингвальный и буккальный; местный, включающий офтальмический, дермальный, глазной, ректальный или назальную ингаляцию посредством инсуффляции или распыления.

Энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин, который вводят орально, может быть заключен в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, или спрессован в таблетки. Энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин также можно смешивать с наполнителем и использовать в виде глотательных таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, пакетов-саше, леденцов, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель и тому подобного. Кроме того, энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин может находиться в виде порошка или гранулы, раствора или суспензии в водной жидкой среде или неводной жидкой среде, или в эмульсии типа масло-в-воде или типа вода-в-масле.

Таблетки, пастилки, шарики, капсулы и тому подобное могут также содержать, например, связующее вещество, такое как трагакантовая камедь, гуммиарабик, кукурузный крахмал; желатинирующие наполнители, такие как фосфат дикальция; дезинтегрирующее средство, такое как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и тому подобное; смазочное вещество, такое как стеарат магния; подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или корригент. Активный ингредиент может быть сформирован или введен в стандартной лекарственной форме или в нестандартной лекарственной форме. Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать жидкий носитель, в дополнение к описанным выше веществам. Разнообразные дополнительные вещества могут присутствовать в виде покрытий или иным способом модифицировать физическую форму стандартной лекарственной формы. Например, таблетки, шарики или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или и тем, и другим. Сироп или эликсир может содержать нилвадипин, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, краситель и корригент. Дополнительно энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин может быть введен в препараты и составы с пролонгированным высвобождением.

Энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин может быть введен в ЦНС (CNS) парентерально или внутривенно. Растворы нилвадипина как свободное основание или фармацевтически приемлемая соль могут быть получены в воде, смешанной с пригодным поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсионные системы также могут быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты могут содержать консервант и/или антиоксиданты для предотвращения роста микроорганизмов или химической дегенерации.

Требуемый энантиомер (-)-нилвадипина имеет S-конфигурацию у хирального центра. Соединение, предложенное настоящим описанием, может быть энантиомерно чистым или представлять собой стереоизомерную смесь с некоторым количеством (+)(R)-нилвадипина. Понятно, что описание энантиомерно-обогащенного (-) - нилвадипина, приводимое здесь, охватывает любую оптически активную, полиморфную или стереоизомерную форму, или их смеси, которые предпочтительно обладают применимыми свойствами, описанными здесь. В данной области техники хорошо известно, как получить оптически активные формы и как определить

активность, используя стандартные тесты, описанные здесь, или используя другие аналогичные тесты, которые хорошо известны в данной области техники. Термин “энантимерно обогащенный”, используемый здесь, обозначает соединение, которое представляет собой смесь энантимеров, где (-)-энантиомер присутствует в избытке и предпочтительно присутствует в пределах 90% или более, 95% или более и, наиболее предпочтительно, до 98% или более, включая 100%, и вплоть до определяемого предела чистоты. Например, чистоту можно определять, с помощью детектирования методами хиральной ВЭЖХ (HPLC).

Примеры способов, которые могут быть использованы для получения оптических изомеров соединений, включают нижеследующие:

i) физическое разделение кристаллов - метод, при помощи которого макроскопические кристаллы отдельных энантимеров отделяют ручным способом. Этот метод можно использовать, если существуют кристаллы отдельных энантимеров, то есть вещество представляет собой конгломерат, и кристаллы визуальны отличимы;

ii) одновременная кристаллизация - метод, согласно которому отдельные энантимеры отдельно кристаллизуются из раствора рацемической смеси, что возможно, только если последняя в твердом состоянии представляет собой конгломерат;

iii) ферментативное расщепление - метод, посредством которого происходит частичное или полное разделение рацемической смеси, за счет различия в скоростях реакций энантимеров с ферментом;

iv) ферментативный асимметричный синтез - синтетический метод, при котором, по меньшей мере, на одной стадии синтеза используют ферментативную реакцию, чтобы получить энантимерно чистый или обогащенный синтетический предшественник требуемого энантиомера;

v) химический асимметричный синтез - синтетический метод, посредством которого требуемый энантиомер синтезируют из ахирального предшественника в условиях, в которых получают асимметрию (то есть хиральность) продукта, которая может быть достигнута при использовании хиральных катализаторов или хиральных вспомогательных веществ;

vi) расщепление через диастереомеры - метод, с помощью которого рацемическое соединение, предшественник или полусинтетический интермедиат подвергают взаимодействию с энантимерно чистым реагентом (вспомогательное хиральное вещество), в результате чего отдельные энантимеры преобразуют в диастереомеры. Получающиеся диастереомеры затем разделяют хроматографией или кристаллизацией, вследствие их теперь более отчетливых структурных различий, а хиральное вспомогательное вещество впоследствии удаляют, чтобы получить требуемый энантиомер (см., например, патент США 5508413, право на который переуступлено Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd);

vii) асимметрические преобразования первого и второго порядка - метод, посредством которого диастереомеры рацемической смеси приводят в состояние равновесия так, чтобы преимущество в растворе имел диастереомер требуемого энантиомера, или где преимущественная кристаллизация диастереомера требуемого энантиомера нарушает равновесие таким образом, что в конечном счете, в принципе, все вещество преобразуется в кристаллический диастереомер требуемого энантиомера. Затем требуемый энантиомер получают из диастереомера;

viii) кинетическое расщепление - этот метод относится к достижению частичного

или полного расщепления рацемической смеси (или дополнительного расщепления частично расщепленного соединения), за счет неодинаковых скоростей реакций энантиомеров с хиральным нерацемическим реагентом или катализатором в данных кинетических условиях;

ix) энантиоспецифический синтез из нерацемических предшественников - синтетический метод, с помощью которого требуемый энантиомер получают из ахиральных исходных веществ, и где стереохимическую целостность на протяжении синтеза не подвергают риску или подвергают только минимальному риску;

x) хиральная жидкостная хроматография - метод, с помощью которого энантиомеры рацемической смеси разделяют в жидкой подвижной фазе за счет их различающихся взаимодействий со стационарной фазой. Стационарная фаза может состоять из хирального вещества, или подвижная фаза может содержать дополнительное хиральное вещество, чтобы провоцировать различающиеся взаимодействия;

xi) хиральная газовая хроматография - метод, с помощью которого рацемическую смесь испаряют, и энантиомеры разделяют, благодаря их различающимся взаимодействиям в газовой подвижной фазе с адсорбирующим веществом неподвижной нерацемической хиральной фазой колонки;

xii) экстракция хиральными растворителями - метод, с помощью которого энантиомеры разделяют, благодаря преимущественному растворению одного энантиомера в отдельном хиральном растворителе; и

xiii) транспорт через хиральные мембраны - метод, в котором рацемическую смесь размещают так, что она контактирует с тонкой мембранной перегородкой.

Перегородка обычно разделяет две смешивающиеся текучие среды, одна из которых содержит рацемическую смесь, и такие движущие силы, как разница концентраций или давлений, вызывают предпочтительный транспорт через мембранную перегородку.

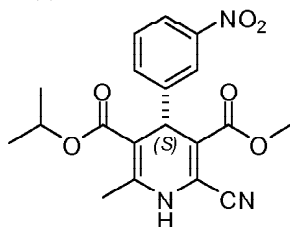
Разделение происходит вследствие нерацемической хиральной природы мембраны, через которую может пройти только один энантиомер из рацемической смеси.

xiv) жидкостная хроматография - метод, с помощью которого энантиомеры разделяют в системе растворителя нормальной фазы вследствие разницы в коэффициентах распределения по отношению к хиральной неподвижной фазе. Этот метод использовали, чтобы получать оптически активные препараты (-)-нилвадипина и (+)-нилвадипина, описанные в настоящем описании (см. фиг. 8).

Энантиомеры нилвадипина разделяли следующим образом:

Нилвадипин 1

(-)-Нилвадипин

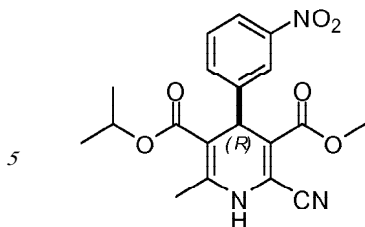


Литература: $[\alpha]_D^{20} -219,6^\circ$ ($c = 1,0$, MeOH)

Наблюдали: $[\alpha]_D^{25} -99,0^\circ$ ($c = 0,057$, MeOH)

Нилвадипин 2

(+)-Нилвадипин



Литература: $[\alpha]_D^{20} +222,4^\circ$ ($c = 1,0$, MeOH)

10 Наблюдали: $[\alpha]_D^{25} +170,1^\circ$ ($c = 0,05$, MeOH)

Литературные данные по величинам оптического вращения для энантиомеров нилвадипина приведены в работе Satoh, Y.; Okumura, K.; Shiokawa, Y. Chem. Pharm. Bull. 42(4) 950-952 (1994). См. на фиг. 5 данные, относящиеся к энантиомерной чистоте разделенных соединений.

15 Термин “приблизительно” обозначает: в пределах $\pm 10\%$ от заявленного количества, или в пределах экспериментальной ошибки измерительного метода. Выражение «композиция, состоящая по существу из» обозначает композицию, в которой активный фармацевтический ингредиент находится в указанном количестве. В одном
20 варианте осуществления изобретения, выражение «состоящий по существу из» исключает не перечисленные активные фармацевтические ингредиенты, но не исключает фармацевтически приемлемые наполнители, носители или разбавители, или способ, в котором активный фармацевтический ингредиент сформирован. В одном
25 варианте осуществления изобретения, например, в способе лечения, выражение «состоящий по существу из» может охватывать введение одного или нескольких активных фармацевтических ингредиентов в виде одиночного терапевтического средства (средств) по некоторому конкретному показанию, хотя и не исключая вводимых терапевтических агентов по другим причинам или показаниям.

30 ПРИМЕРЫ

В нижеследующих неограничивающих примерах будут более подробно описаны способы уменьшения патологических воздействий А β у животных или людей, страдающих заболеваниями, обусловленными амилоидозом, такими как AD, по
35 настоящему изобретению. В примерах 1-5 предложены данные по рацемическому нилвадипину в целях сравнения.

Хроматографическая очистка энантиомеров нилвадипина

Хроматографическую очистку обоих энантиомеров нилвадипина осуществляли посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)(HPLC),
40 используя неподвижную фазу из модифицированной целлюлозы (Chiral Technologies, West Chester, PA). Условия хроматографирования были следующими: внутренний диаметр колонки - 10 мм; длина колонки - 250 мм; подвижная фаза: 95:5 - объемное отношение гексана к этанолу; скорость течения 2,5 мл/мин; температура колонки 7°C. Повторное инъецирование рацемического нилвадипина, при использовании набора
45 сигнальных фракций, давало очищенные энантиомеры для описанных здесь примеров. См. фиг. 8.

ПРИМЕР 1

50 Эффект постоянного введения нилвадипина на отложение А β (поражение амилоидом)

Эффект постоянного введения нилвадипина на отложение А β (поражение амилоидом) на различных участках головного мозга изучали методом 4G8 иммуноокрашивания анти-А β -моноклонального антитела, используя TgAPP_{sw} мышей.

Метод 4G8 иммуноокрашивания выбирали для определения поражения Аβ, вследствие сильного сигнала и оптимальных результатов количественного анализа отложения Аβ. Вкратце, парафиновые срезы подвергали иммуногистохимии, как было описано ранее (Nakagawa, Y. et al., *Exp. Neurol.*, 163:244-252, 2000). Срезы депарафинировали в ксилоле, последовательно гидратировали в этаноле и деионизированной воде, и подвергали стадии извлечения антигена, погружая срезы перед иммуногистохимией на Аβ на 60 мин в 88% муравьиную кислоту. Срезы промывали в воде, и эндогенные пероксидазы подавляли, используя свежеприготовленную смесь метанола (150 мл) и перекиси водорода (33%, 30 мл). Способ с применением авидин-биотинового комплекса использовали согласно инструкциям производителя (Vector Laboratories, Burlingame, Calif). Поражение амилоидом оценивали, определяя долю в процентах участка головного мозга, для которого получали положительное окрашивание на Аβ. Отрицательный контроль включает применение аналогичного иммуногистохимического протокола к срезам, за исключением использования неимунной сыворотки вместо первичного антитела. TgAPP_{sw} мышей разделяли на экспериментальную группу, которая получала эффективное количество нилвадипина (n=7), и контрольную группу, которая получала наполнитель (n=5).

Как показано на фиг. 1, лечение нилвадипином снижало поражение Аβ в зрительной коре головного мозга приблизительно на 62% по сравнению с контролем; в теменной коре головного мозга приблизительно на 65% по сравнению с контролем; в двигательной зоне коры головного мозга приблизительно на 58% по сравнению с контролем; в зоне грушевидных клеток коры головного мозга приблизительно на 58% по сравнению с контролем; в СА1 области гиппокампа приблизительно на 52% по сравнению с контролем; и в СА2-СА3 области гиппокампа приблизительно на 50% по сравнению с контролем.

ПРИМЕР 2

Эффект постоянного введения нилвадипина на активацию микроглии
Эффект постоянного введения нилвадипина на активацию микроглии изучали на трех участках головного мозга TgAPP_{sw} мышей, используя метод CD45 иммуноокрашивания, при котором определяли количество CD45+микроглии.

Вкратце, иммуногистохимию на CD45, специфический маркер микроглии, проводили на замороженных срезах головного мозга. CD45-положительные микроглиальные клетки иммулокализировали посредством инкубирования с мышинным моноклональным антителом к CD45 (Chemicon International) при 4°C на протяжении ночи, с последующим нанесением на 30 минут биотинилированного кроличьего антимышиного вторичного антитела. Детектирование CD45 завершали применением диаминобензидинового хромогенного субстрата, который продуцирует коричневое окрашивание клеточной поверхности CD45-положительных микроглиальных клеток.

Как показано на фиг. 2, лечение нилвадипином, который вводили в количестве, соответствующем эффективной дозировке, снижало активацию микроглии приблизительно на 33% в гиппокампе, приблизительно на 43% в теменной коре головного мозга и приблизительно на 27% в двигательной зоне коры головного мозга по сравнению с контролем.

ПРИМЕР 3

Эффект введения нилвадипина на активацию микроглии
Эффект введения нилвадипина на активацию микроглии изучали на мышинных микроглиальных клетках N9, *in vitro* активированных липополисахаридом (LPS) в

течение 24 часов. Мышинные микроглиальные клетки N9 представляют собой хорошо охарактеризованные поглощающие мышинные микроглиальные клоны, получаемые из головного мозга эмбриональной мыши. Степень микроглиальной активации определяют по продуцированию TNF- α (пг/мл), измеряемому с помощью ELISA. Как показано на фиг. 3, микроглиальные клетки, не активированные LPS, (контрольные клетки) продуцировали приблизительно 40 пг/мл TNF- α . Микроглиальные клетки, в присутствии 50 нМ нилвадипина, продуцировали приблизительно 40 пг/мл TNF- α . Десятикратное увеличение количества введенного нилвадипина (500 нМ) не меняло продуцирования TNF- α . Микроглиальные клетки в присутствии 1 мкг/мл LPS продуцировали приблизительно 820 пг/мл TNF- α , возрастание составляло приблизительно 95% по сравнению с контрольными клетками и клетками с введенным нилвадипином. Микроглиальные клетки, в присутствии как 1 мкг/мл LPS, так и 50 нМ нилвадипина, продуцировали приблизительно 670 пг/мл TNF- α . Введение LPS и 500 нМ нилвадипина снижало продуцирование TNF- α до приблизительно 610 пг/мл. Таким образом, нилвадипин подавлял LPS-индуцируемую активацию микроглии приблизительно на 20-25%.

ПРИМЕР 4

Эффект введения нилвадипина на A β нейротоксичность

Эффект введения нилвадипина (10 нМ и 100 нМ) на A β нейротоксичность изучали, используя человеческие нейрональные клетки-предшественники (HNPC), обработанные в течение трех дней 30 мкМ предварительно агрегированного A β 1-40 (AgA β). При обработке циклическим AMP HNPC клетки легко подвергались дифференцировке в нейроны. Циклический AMP (1 мМ) (Sigma) добавляли к культуральной среде, и HNPC клетки инкубировали при 37°C в отсутствие сыворотки в течение 48 часов или более. В этой среде была возможна дифференцировка клеток-предшественников в клетки нейрональной линии, как было подтверждено с помощью окрашивания большинства клеток антителами к связанному с микротрубочками протеину, MAP-2. Нейротоксичность оценивали, измеряя количество лактатдегидрогеназы (LDH; внутриклеточного фермента, обнаруженного во всех клетках), высвобождаемой из клеток.

Как показано на фиг. 4, обработка клеток AgA β продуцировала приблизительно 44% рост высвобождения LDH по сравнению с обработкой клеток нилвадипином. Изменения в высвобождении LDH не происходило, когда вместе с AgA β добавляли 10 нМ нилвадипина. Однако когда величину дозы нилвадипина увеличили в 10 раз, до 100 нМ, величина высвобождения LDH уменьшалась приблизительно на 44%.

ПРИМЕР 5

Эффект введения нилвадипина на APP процессинг

Эффект введения нилвадипина на APP процессинг изучали, используя человеческие клетки глиобластомы, в которые трансфицировали APP_{SW}. Клетки обрабатывали 50 нМ и 250 нМ нилвадипина в течение 24 и 48 часов, и продуцирование A β 1-40 в культуральной среде измеряли с помощью коммерчески доступного иммуноферментного анализа ELISA на человеческий A β 1-40, (Biosource, CA).

Как показано на фиг. 5A, обработка нилвадипином 50 нМ в течение 24 часов снижала продуцирование A β 1-40 приблизительно на 9%, а 250 нМ нилвадипина снижали продуцирование A β 1-40 приблизительно на 15%. После обработки (фиг. 5B) нилвадипином 50 нМ в течение 48 часов продуцирование A β 1-40 было снижено приблизительно на 18%, а 250 нМ нилвадипина снижали продуцирование A β 1-40

приблизительно на 5%.

ПРИМЕР 6

Эффект варьирования доз рацемических и выделенных энантиомеров нилвадипина на уровне А β

5 Эффект чистых энантиомерных форм нилвадипина, (-)-нилвадипина (нилвадипина 1) и (+)-нилвадипина (нилвадипина 2) (фиг. 8), а также смеси двух энантиомеров (в равном соотношении) на продуцирование А β 1-40 и А β 1-42 изучали, используя клетки яичников китайского хомячка 7W WT APP751 после 24-часовой
10 обработки. Продуцирование А β 1-40 и А β 1-42 в культуральной среде измеряли с помощью коммерчески доступного иммуноферментного анализа ELISA на человеческий А β 1-40 (Biosource, CA) и коммерчески доступного иммуноферментного анализа ELISA на человеческий А β 1-42 (Biosource, CA), соответственно.

15 Как показано на фиг. 6, оба энантиомера, по-видимому, аналогичным образом дозозависимо ингибируют продуцирование А β 1-40. Однако (+)-нилвадипин (нилвадипин 2), также как рацемическая смесь нилвадипина (N1+N2) при низкой дозе незначительно стимулируют А β 1-42, тогда как (-)-нилвадипин (нилвадипин 1) не проявляет такого эффекта (фиг. 7).

20 ПРИМЕР 7

Эффект изолированных энантиомеров нилвадипина на вазоконстрикцию аорт крыс
Изучали эффект чистых энантиомерных форм нилвадипина, (-)-нилвадипина (нилвадипин 1) и (+)-нилвадипина (нилвадипина 2), (фиг. 8) на FPL64176
25 индуцированную вазоконстрикцию аорт крыс. Нормальных самцов крыс Sprague-Dawley (возраст 7-8 месяцев) подвергали гуманной эвтаназии, свежесеченные аорты крыс разделяли на 3-мм кольца и подвешивали в буфере Кребса на крючки в аппарате для промывания сосудов. Эти крючки были соединены с изометрическим датчиком, связанным с системой MacLab. В течение 2 часов, меняя буфер Кребса каждые 30 мин,
30 аортальные кольца приводили в равновесие в системе промывания тканей. К каждому аортальному кольцу прикладывали исходное натяжение в 2 г. Перед добавлением 1 мкМ FPL64176 (метилового эфира 2,5-диметил-4[2-(фенилметил)бензоил]-ИП-пиррол-3-карбоновой кислоты), сильного селективного агониста кальциевых каналов L-типа, аортальные кольца предварительно 2 мин обрабатывали 100 нМ (-)-нилвадипина
35 (нилвадипин 1), 100 нМ (+)-нилвадипина (нилвадипин 2) или оставляли необработанными. Аортальные кольца в течение 30 минут подвергали констрикции, используя FPL64176. Определяли величину контракции по сравнению с исходным уровнем (в г) и вычисляли средние значения и среднеквадратичное отклонение для
40 всех этих величин.

Как показано на фиг. 9, (+)-нилвадипин является полным антагонистом вазоконстрикции, индуцированной FPL64176, тогда как (-)-нилвадипин не производит вазоактивного эффекта агониста кальциевых каналов L-типа, демонстрируя тот факт,
45 что (+)-нилвадипин является блокатором кальциевых каналов L-типа, тогда как (-)-нилвадипин не производит такого эффекта. Представленные здесь данные демонстрируют для (-)-энантиомера исходный уровень аортальной контракции, вызываемой FPL64176, что коррелирует со сниженной вазоактивностью (-)-энантиомера, по сравнению с рацемической смесью или (+)-энантиомером, которые
50 демонстрируют вазоактивность (то есть антагонизм индуцируемой вазоконстрикции).

ПРИМЕР 8

Эффект (-)-нилвадипина на А β уровни головного мозга

Изучали эффект изолированного (-)-нилвадипина на А β 1-40 и А β 1-42 уровни

головного мозга. 93-Недельным трансгенным APP_{sw} самцам мышей (Tg APP_{sw}, линия 2576) ежедневно внутрибрюшинно инъецировали 10 мг/кг массы тела (-)-нилвадипина, растворенного в DMSO (диметилсульфоксид) (n=4) или в таком же объеме (n=4) наполнителя (100 мкл). После 4 дней лечения, через час после последней инъекции животных подвергали гуманной эвтаназии, их мозги собирали и подвергли быстрой заморозке в жидком азоте. Мозги гомогенизировали при 4°C в дистиллированной воде, содержащей 1X смеси ингибиторов протеазы IV, (Calbiochem, CA) и 30 мин центрифугировали при 14000 об./мин при 4°C. Осадок в пробирке повторно суспендировали в равном объеме гуанидина 5M, растворенного в Tris HCl буфере (pH=8), и один час инкубировали при комнатной температуре. С помощью ВСА метода (Biorad, CA) определяли концентрации протеина в образцах, обработанных гуанидином. Уровни Aβ1-40 и Aβ1-42 оценивали с помощью иммуноферментного анализа ELISA (Biosource, CA) и результаты представляли в пг Aβ1-40 или Aβ1-42 на мг протеина.

Как показано на фиг. 10, ежедневное введение (-)-нилвадипина TgAPP_{sw} мышам в дозе 10 мг/кг массы тела в течение четырех дней привело к 26% снижению уровней Aβ1-42 (пг/мл) в головном мозге и 43% снижению уровней Aβ1-40 в головном мозге по сравнению с контрольными животными.

ПРИМЕР 9

Эффект медленного высвобождения (-)-нилвадипина на Aβ уровни головного мозга

Изучали эффект медленного высвобождения (-)-нилвадипина на Aβ1-42 уровни головного мозга. 66-Недельным Tg APP_{sw} мышам (Tg APP_{sw} линия 2576) подкожно имплантировали биоразлагаемую гранулу (-)-нилвадипина, обеспечивающую на протяжении периода в 30 дней медленное непрерывное высвобождение 30 мг (-)-нилвадипина/кг массы тела/день (n=5); биоразлагаемую гранулу (-)-нилвадипина, обеспечивающую выделение 56 мг/кг/день (n=6), или гранулу, высвобождающую плацебо (n=6). Через 26 дней после имплантации гранулы животных подвергали гуманной эвтаназии; их мозги собирали и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте. Мозги гомогенизировали при 4°C в дистиллированной воде, содержащей 1X смеси ингибиторов протеазы IV (Calbiochem, CA), и 30 мин центрифугировали при 14000 об./мин при 4°C. Супернатант повторно суспендировали равным объемом гуанидина 5M, растворенного в Tris HCl буфере (pH=8), и инкубировали при комнатной температуре в течение одного часа. Определяли концентрации протеина в образцах, обработанных гуанидином, с помощью ВСА метода (Biorad, CA). Уровни Aβ1-42 оценивали с помощью иммуноферментного анализа ELISA (Biosource, CA), и результаты представляли в пг Aβ1-42 на мг протеина.

Как показано на фиг. 11, введение (-)-нилвадипина TgAPP_{sw} мышам приводило к 2-кратному снижению Aβ1-42 уровня в головном мозге мышей, получающих дозу 30 мг/кг/день, медленно высвобождаемую из гранулы (-)-нилвадипина; тогда как 2,5-кратное снижение Aβ1-42 уровня наблюдали у животных, обработанных дозой в 56 мг/кг/день, медленно высвобождаемой из гранулы, по сравнению с мышами, которым имплантировали гранулу плацебо.

ПРИМЕР 10

Эффект (-)-нилвадипина на уровни мозгового клиренса Aβ через гематоэнцефалический барьер

Модель In Vitro

Эффект (-)-нилвадипина на уровни мозгового клиренса Aβ через гематоэнцефалический барьер (BBB) изучали, используя как in vitro, так и in vivo

модели. Модель *in vitro* показана на фиг. 12. Эндотелиальную клеточную культуральную среду (ECM, ScienCell Research Laboratories), содержащую 2 мкМ флуоресцеин-β-амилоида (1-42) (3), помещали в базолатеральное (донорное) отделение. Апикальную сторону мембраны (приемник) подвергали воздействию различных дигидропиридиновых (DHP) соединений (1, 5 и 10 мкМ) в ECM (2). В момент времени «0» из донорного отделения брали пробы для установления исходной концентрации флуоресцеин-β-амилоида (1-42) в каждой группе. После контакта вставки и лунки, содержащей флуоресцирующий амилоид, из апикального отделения собирали образцы в разные моменты времени вплоть до точки, соответствующей 90 минутам (1), чтобы оценить движение флуоресцеин-β-амилоида (1-42) через монослой (4) капиллярных эндотелиальных клеток человеческого головного мозга (НВМЕС) (от базолатерального к апикальному). Образцы анализировали ($\lambda_{ex} = 485$ нм и $\lambda_{em} = 516$ нм) на флуоресцеин-β-амилоид (1-42), используя микропланшетный ридер для множественного детектирования BioTek Synergy HT (Winooski, VT). Эффективную магнитную проницаемость (P_{app}) флуоресцеин-β-амилоида (1-42) определяли, используя уравнение $P_{app} = 1/AC_0 * (dQ/dt)$, где A представляет площадь поверхности мембраны, C_0 является исходной концентрацией флуоресцеин-β-амилоида (1-42) в базолатеральном донорном отделении, а dQ/dt представляет количество флуоресцеин-β-амилоида (1-42), появляющееся в апикальном приемном отделении в данный период времени ($poll_i$). P_{app} флуоресцеин-β-амилоида (1-42) в присутствии (-)-нилвадипина сравнивали с контрольными лунками и выражали в виде процентного соотношения.

Как показано на фиг. 13, (-)-нилвадипин, в соответствии с моделью *in vitro* гематоэнцефалического барьера, дозозависимо стимулирует транспорт Аβ из ткани мозга (В) к периферии (А).

Модель *in vitro* также использовали для изучения *in vitro* эффекта (-)-нилвадипина на мозговой клиренс Аβ через ВВВ, в сопоставлении с рацемической смесью нилвадипина. Протокол, аналогичный описанному выше, использовали в этих экспериментах, с основной разницей в том, что добавляли рацемическую смесь для сравнения. Как показано на фиг. 14, как (-)-нилвадипин, так и рацемическая смесь нилвадипина в модели *in vitro* дозозависимо стимулируют транспорт Аβ через гематоэнцефалический барьер из ткани мозга (В) к периферии (А).

Модель *In Vivo*

Эффект (-)-нилвадипина на уровне мозгового клиренса Аβ через гематоэнцефалический барьер (ВВВ) изучали, используя *in vivo* модель. Самок В6/SJL мышей немутантного типа подвергали анестезии посредством ингаляции, используя смесь 3% изофлуран/кислород. Пока мыши находились под наркозом, им внутрибрюшинно (*i.p.*) впрыскивали наполнитель (DMSO) или (-)-нилвадипин. Через пять минут после *i.p.* инъекции, мышам стереотаксическим способом впрыскивали 3 мкл человеческого β-амилоида (1-42) (1 мМ в DMSO) во внутрижелудочковый участок головного мозга (на 3 мм сзади и на 1,0 мм вбок к темени и на 4 мм ниже поверхности головного мозга). Через десять минут после инъекции человеческого β-амилоида (1-42) мышам подвергали эвтаназии. Образцы плазмы собирали и анализировали на человеческий β-амилоид (1-42), используя сэндвич-анализ ELISA на человеческий β-амилоид (1-42). Уровень β-амилоида (1-42) в образцах плазмы, собираемых от мышей, обработанных (-)-нилвадипином, сравнивали с мышами, получающими только наполнитель. Дополнительно, аналогичные опыты осуществляли, используя животных с подкожно имплантированной биоразлагаемой гранулой (-)-нилвадипина

или плацебо, и получающих внутримозговую инъекцию Аβ1-42 через 13 дней после имплантации гранулы. Все опыты с использованием животных осуществляли согласно протоколам, одобренным «Институциональным Комитетом по Содержанию и

Использованию Животных» («Institutional Animal Care and Use Committee»).

5 Как показано на фиг. 15, и рацемическая смесь нилвадипина, и (-)-нилвадипин увеличивают транспорт Аβ через гематоэнцефалический барьер *in vivo*. (-)-Нилвадипин в дозе 2 мг/кг массы тела увеличивает клиренс Аβ из головного мозга в кровь в 2 раза, а при дозировке 5 мг/кг массы тела - в 4 раза, тогда как рацемическая

10 смесь нилвадипина увеличивает клиренс Аβ в 4 раза при дозировке 2 мг/кг массы тела.

На фиг. 16 представлена столбчатая диаграмма, иллюстрирующая воздействие (-)-нилвадипина на уровни мозгового клиренса Аβ через BBB при использовании животных с подкожно-имплантированной биоразлагаемой гранулой (-)-нилвадипина или плацебо, и получающих внутримозговую инъекцию Аβ1-42 через 13 дней после

15 имплантации гранулы. Как показано на фиг. 16, медленное высвобождение (-)-нилвадипина с дозировкой 30 мг/кг массы тела/день, обеспеченной биоразлагаемой гранулой, увеличивает клиренс внутримозгового Аβ в 3 раза по сравнению с контрольными мышами с имплантированной гранулой, содержащей плацебо.

20 В этих *in vitro* и *in vivo* исследованиях эффекта (-)-нилвадипина на уровни мозгового клиренса Аβ через гематоэнцефалический барьер (BBB) обнаруживают потенциально терапевтически-значимый результат. Данные позволяют предположить, что эффект (-)-нилвадипина на клиренс должен усилить миграцию мозгового Аβ через BBB. Это следует из наблюдаемого возрастания уровней Аβ в сыворотке крови после введения

25 нилвадипина.

Как показано на фигурах 17А и В, (-)-нилвадипин можно вводить в значительно более высоких дозах для модели FPL64176 индуцируемой вазоконстрикции крысиной аорты перед представлением вазоактивных свойств, сравниваемых с (+)-нилвадипином.

30 ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Что касается эффектов различных энантиомеров нилвадипина, то оба энантиомера, по-видимому, аналогичным образом дозозависимо ингибируют продуцирование Аβ1-40, хотя (+)-нилвадипин и рацемический нилвадипин в низких дозах незначительно стимулируют Аβ1-42. Воздействие (-)-нилвадипина на Аβ1-42 меньше и не является

35 статистически значимым. См., например, фигуры 6 и 7. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что (+)-нилвадипин является полным антагонистом вазоконстрикции, индуцированной FPL64176; тогда как (-)-нилвадипин не является антагонистом индуцированной FPL64176 вазоконстрикции агониста кальциевых каналов L-типа.

40 Данные, представленные здесь, демонстрируют для (-)-энантиомера исходный уровень аортальной контракции, вызванной FPL64176, что коррелирует со сниженной вазоактивностью (-)-энантиомера по сравнению с рацемической смесью или (+)-энантиомером, которые демонстрируют вазоактивность (то есть антагонизм по отношению к вызванной вазоконстрикции). Оценка влияния (-)-нилвадипина на

45 мозговые уровни Аβ показывает, что введение (-)-нилвадипина (ежедневно, 10 мг/кг массы тела) продуцирует 26% понижение мозговых Аβ1-42 уровней (пг/мл) и 43% понижение мозговых уровней Аβ1-40 у TgAPP_{sw} мышей только после четырех дней лечения. Как показано на фиг. 11, введение TgAPP_{sw} мышам на протяжении 26 дней (-)-

50 нилвадипина с замедленным высвобождением приводит к 2-кратному понижению мозгового Аβ1-42 уровня у мышей, получающих дозу 30 мг/кг/день, поступающую из гранулы (-)-нилвадипина с замедленным высвобождением; тогда как 2,5-кратное понижение Аβ1-42 уровня наблюдали у животных, получающих 56 мг/кг/день из

гранулы с замедленным высвобождением, по сравнению с мышами с имплантированной гранулой, содержащей плацебо.

Исследование *in vitro* и *in vivo* эффекта (-)-нилвадипина на уровне мозгового клиренса Аβ через гематоэнцефалический барьер (БВВ) также приводит к неожиданным и обнадеживающим результатам. Данные позволяют предположить, что воздействие (-)-нилвадипина на такой клиренс заключается в увеличении миграции мозгового Аβ через БВВ. Это следует из наблюдаемого увеличения уровней Аβ в сыворотке после введения (-)-нилвадипина.

Приведенные выше данные можно экстраполировать таким образом, что введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина животным или людям, пораженным церебральным амилоидогенным заболеванием, таким как AD, может значительно уменьшить величину отложения Аβ в критических областях головного мозга, в которых обычно обнаруживают множество таких патологических отложений; а также уменьшить количество уже отложившегося Аβ в головном мозге, при отсутствии необязательного воздействия на кровяное давление или других возможных побочных эффектов. Дополнительно, введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина может со сниженными побочными эффектами противодействовать нейротоксическим эффектам Аβ, эффектам, которые полагают ответственными за широкораспространенную и разрушительную нейронную деструкцию, наблюдаемую при AD, а также уменьшить активацию микроглии, которая вызывает характерную воспалительную реакцию головного мозга больных AD. В заключение, лечение энантиомерно-обогащенным (-)-нилвадипином может снижать концентрацию Аβ, уже отложившегося в головном мозге животных или людей, пораженных церебральным амилоидогенным заболеванием, таким как AD, при отсутствии нежелательных побочных эффектов.

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что разнообразные модификации и изменения, не нарушающие сущности и объема изобретения, могут быть внесены в способы по настоящему изобретению. Таким образом, подразумевают, что настоящее изобретение включает модификации и изменения, которые не выходят за пределы прилагаемой формулы изобретения и их эквиваленты. Все цитируемые здесь ссылки включены в изобретение посредством ссылки.

Формула изобретения

1. Способ уменьшения отложения Аβ, Аβ-нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, включающий введение животному или человеку терапевтически эффективного количества энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина.

2. Способ снижения риска церебрального амилоидогенного заболевания, являющегося следствием отложения Аβ, Аβ-нейротоксичности и микроглиоза, у животного или человека, страдающего травматическим поражением головного мозга, включающий введение животному или человеку терапевтически эффективного количества энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина, в котором введение энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина начинают после острой черепно-мозговой травмы.

3. Способ снижения риска развития церебрального амилоидогенного заболевания у животного или человека, у которого диагностирован риск развития церебрального амилоидогенного заболевания, включающий введение животному или человеку терапевтически эффективного количества энантиомерно-обогащенного (-)-

нилвадипина.

4. Способ по п.1, в котором церебральное амилоидогенное заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, травматического поражения головного мозга и церебральной амилоидной ангиопатии.

5. Способ по п.1, в котором терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина выбирают из группы, состоящей из приблизительно 0,05-20 мг в день, приблизительно 2-15 мг в день, приблизительно 4-12 мг в день и приблизительно 8 мг в день.

6. Способ по п.1, в котором терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина выбирают из группы, состоящей из величин, находящихся в интервале между 16 мг в день и максимально переносимой дозой, между 16 и 50 мг в день; величин, составляющих приблизительно 16, приблизительно 20, приблизительно 30, приблизительно 40, приблизительно 50, приблизительно 100, приблизительно 300 и приблизительно 500 мг в день.

7. Способ по п.1, в котором терапевтически эффективное количество энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина уменьшает кровяное давление на величину, выбранную из группы, состоящей из величины, меньшей чем приблизительно 20%, меньшей чем приблизительно 10%, меньшей чем приблизительно 5% и меньшей чем приблизительно 1% от величины кровяного давления, установившегося после предварительного лечения, то есть после введения энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина, где кровяное давление вычисляют путем его непрерывного мониторинга и интегрирования по времени площади под кривой, и где величину кровяного давления, установившегося после предварительного лечения, определяют после такого периода лечения, который позволяет добиться стабильного результата.

8. Способ по п.1, в котором энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин вводят человеку или животному с нормальным кровяным давлением или с давлением, которое наблюдают при гипотензии.

9. Способ по п.1, в котором энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин вводят человеку или животному с кровяным давлением, соответствующим гипертензии.

10. Способ по п.1, в котором процент энантиомерного обогащения выбран из группы, состоящей из величин, составляющих более чем приблизительно 95%, более чем приблизительно 98% и приблизительно 100%, вплоть до предельно определяемого значения.

11. Способ по п.1, в котором длительность лечения терапевтически эффективным количеством энантиомерно-обогащенного (-)-нилвадипина выбирают из группы, состоящей из длительности, продолжающейся до конца жизни животного или человека; длительности, продолжающейся между 1 ч и 5 годами; между одним днем и двенадцатью месяцами; между одной неделей и шестью месяцами; между двумя неделями и четырьмя неделями; между двумя неделями и тремя годами и между шестью месяцами и двенадцатью месяцами.

12. Способ по п.1, в котором энантиомерно-обогащенный (-)-нилвадипин вводят в стандартной лекарственной форме, которую выбирают из группы, состоящей из желатиновых капсул с твердой или мягкой оболочкой, таблеток, пастилок, пакетиков-саше, леденцов, эликсиров, суспензий, сиропов, вафель, порошков, гранул, растворов и эмульсий.

13. Способ по п.1, в котором введение лекарственного средства производят путем парентерального, орального или внутрибрюшинного введения, при этом парентеральный путь введения необязательно выбирают из группы, состоящей из

внутривенного; внутримышечного; интерстициального; внутриартериального; подкожного; внутриглазного; внутричерепного; интратекального; внутрижелудочкового; внутрисуставного; трансэпителиального путей введения, включая трансдермальный; пульмональный посредством ингаляции; офтальмический, 5 сублингвальный и буккальный; местного пути введения, включая офтальмический, дермальный, глазной, ректальный, назальную ингаляцию посредством инсуффляции или распыления, необязательно выбираемых из группы, состоящей из аэрозолей, пульверизаторов и распылителей.

10 14. Способ лечения церебрального амилоидогенного заболевания у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, включающий введение животному или человеку композиции, состоящей, по существу, из терапевтически эффективного количества энантимерно-обогащенного (-)-нилвадипина и фармацевтически приемлемого носителя.

15 15. Фармацевтическая композиция для уменьшения отложения A β , A β -нейротоксичности и микроглиоза у животного или человека, пораженного церебральным амилоидогенным заболеванием, содержащая терапевтически эффективное количество оптически активного нилвадипина и фармацевтически приемлемый носитель, при этом фармацевтическая композиция содержит избыток (-)- 20 нилвадипина по сравнению с (+)-нилвадипином.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, содержащая энантимерный избыток (-)нилвадипина, который составляет по меньшей мере 90% по сравнению с (+)-нилвадипином.

25 17. Фармацевтическая композиция по п.15, содержащая энантимерный избыток (-)нилвадипина, который составляет по меньшей мере 95% по сравнению с (+)-нилвадипином.

30 18. Фармацевтическая композиция по п.15, содержащая энантимерный избыток (-)нилвадипина, который составляет по меньшей мере 98% по сравнению с (+)-нилвадипином.

19. Фармацевтическая композиция по п.15, которая не содержит определяемое количество (+)-нилвадипина.

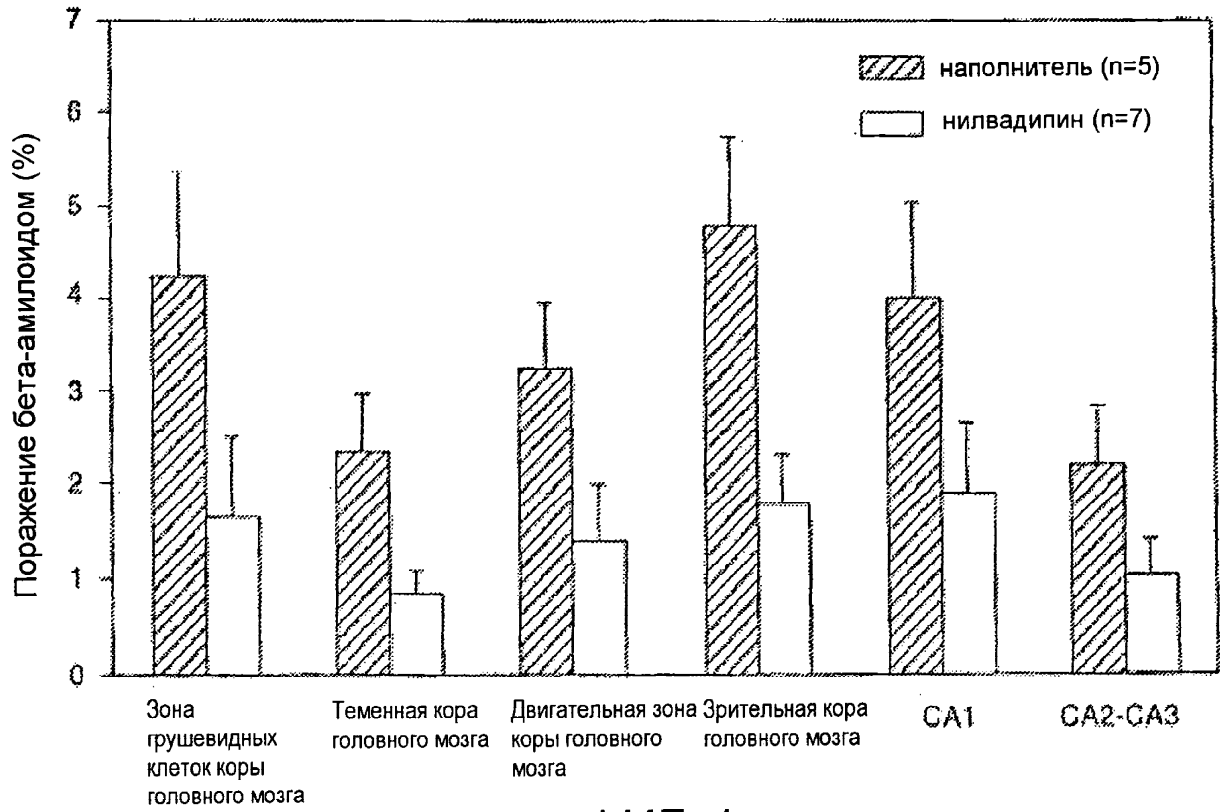
35 20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-19, которая находится в стандартной лекарственной форме.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-19, которая находится в стандартной лекарственной форме, заключенной в желатиновые капсулы с твердой или мягкой оболочкой, или спрессованной в таблетки.

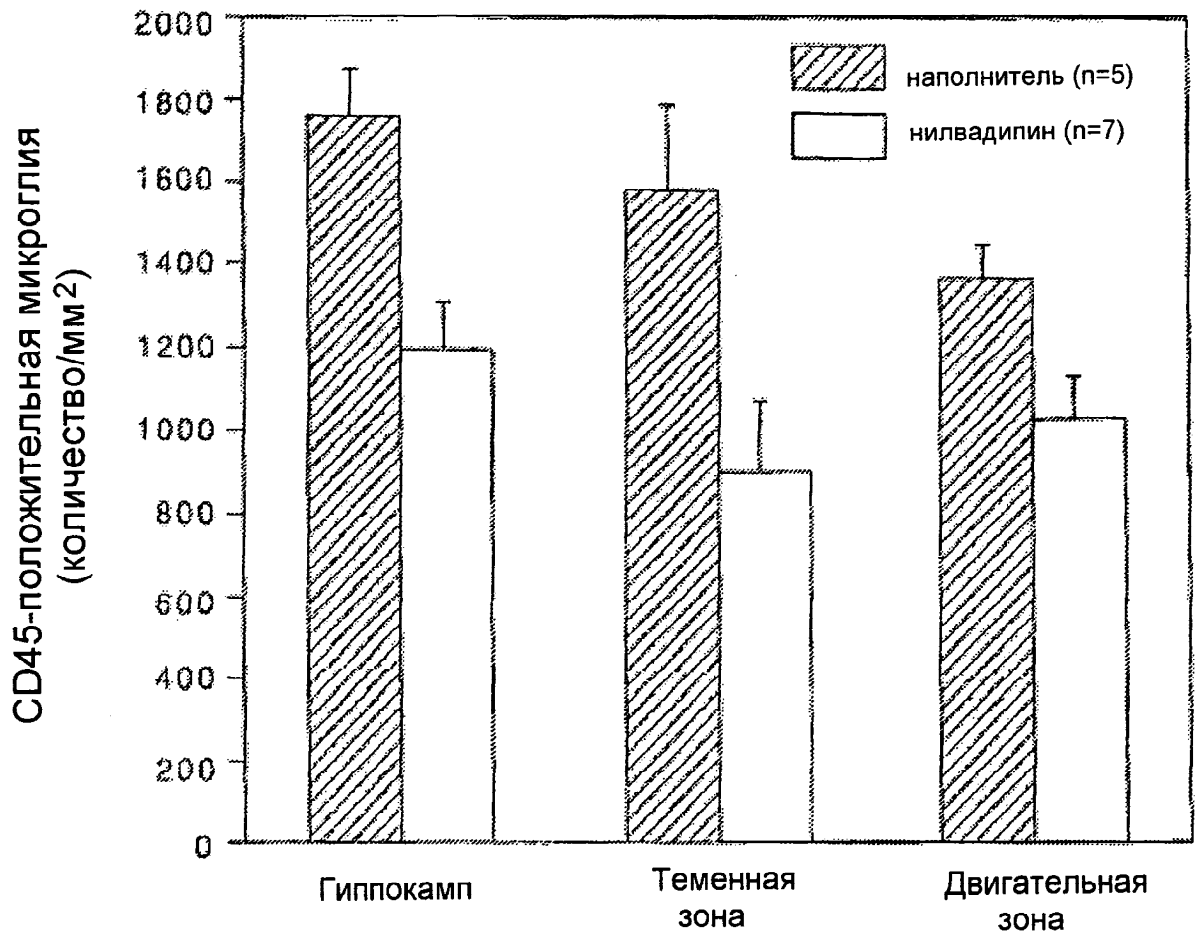
40 22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-19, которая находится в стандартной лекарственной форме, пригодной для парентерального, орального или внутрибрюшинного введения.

45

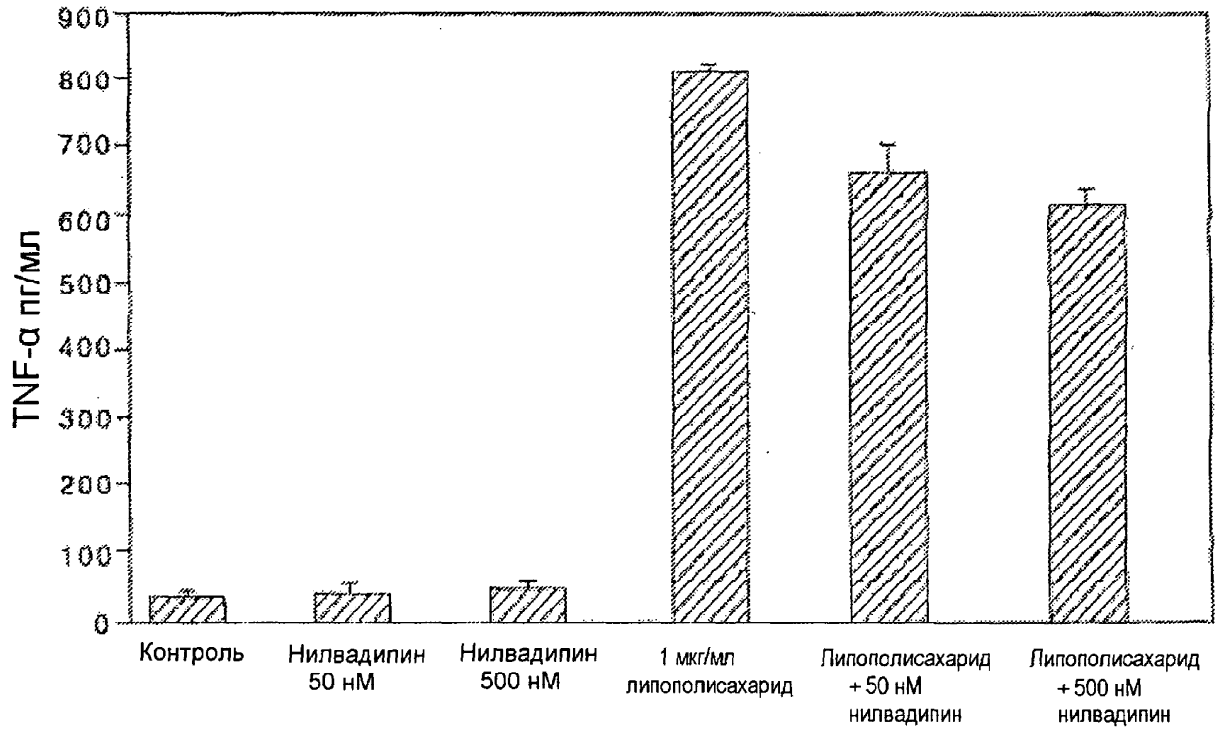
50



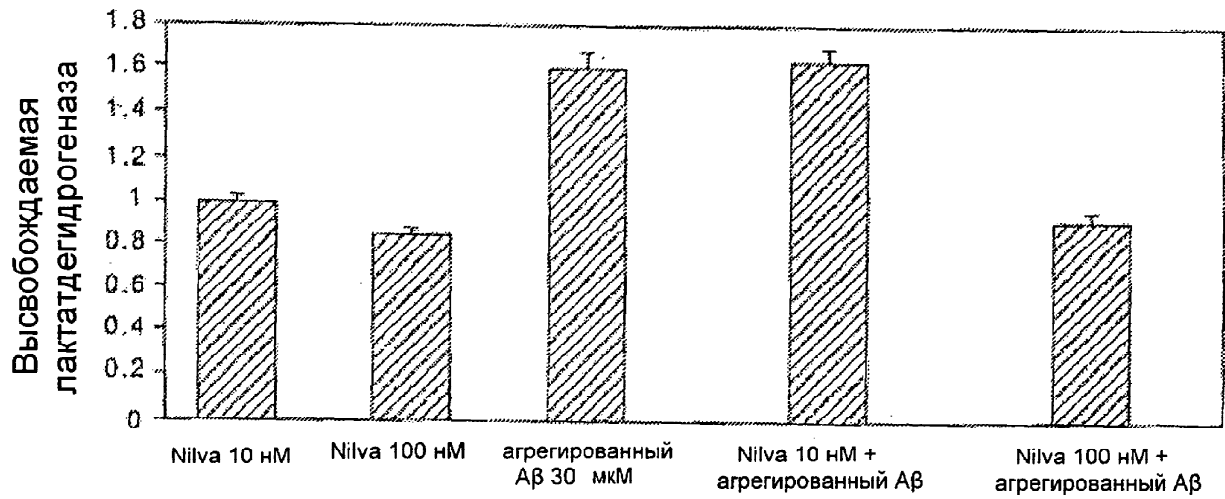
ФИГ. 1



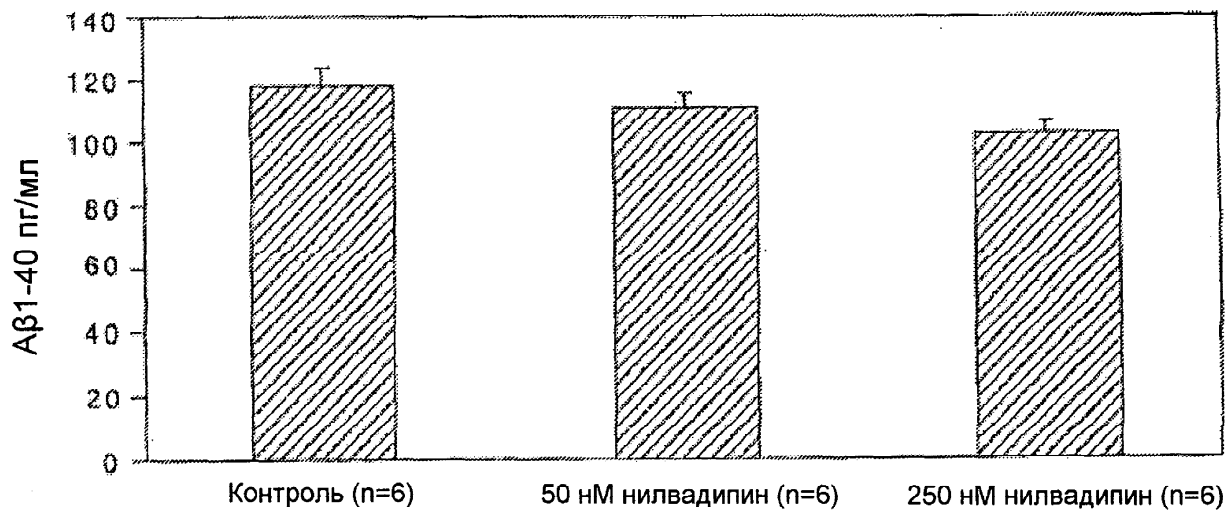
ФИГ. 2



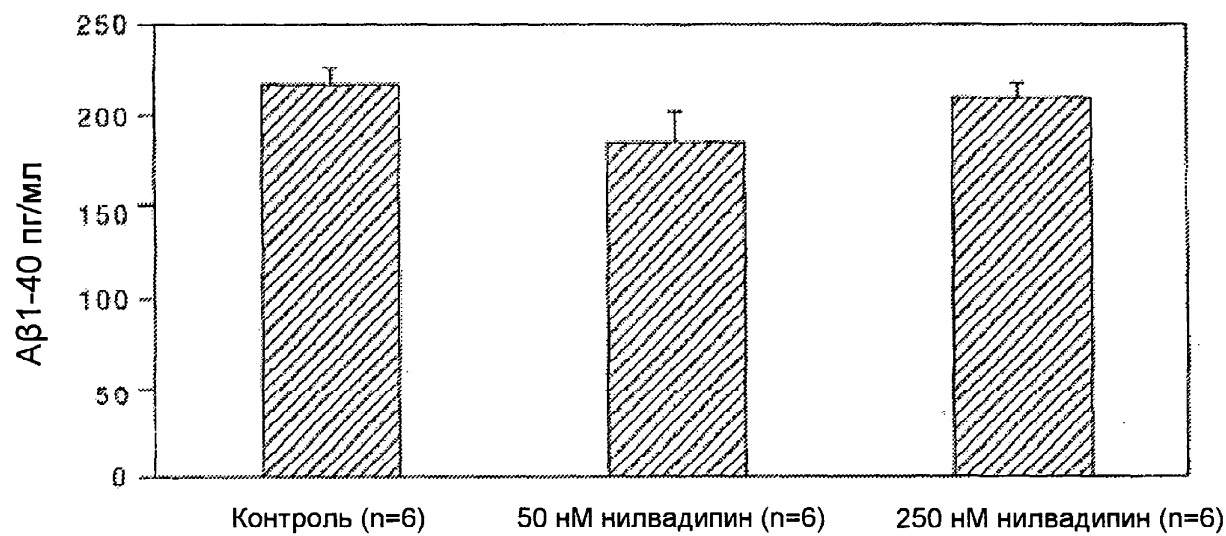
ФИГ. 3



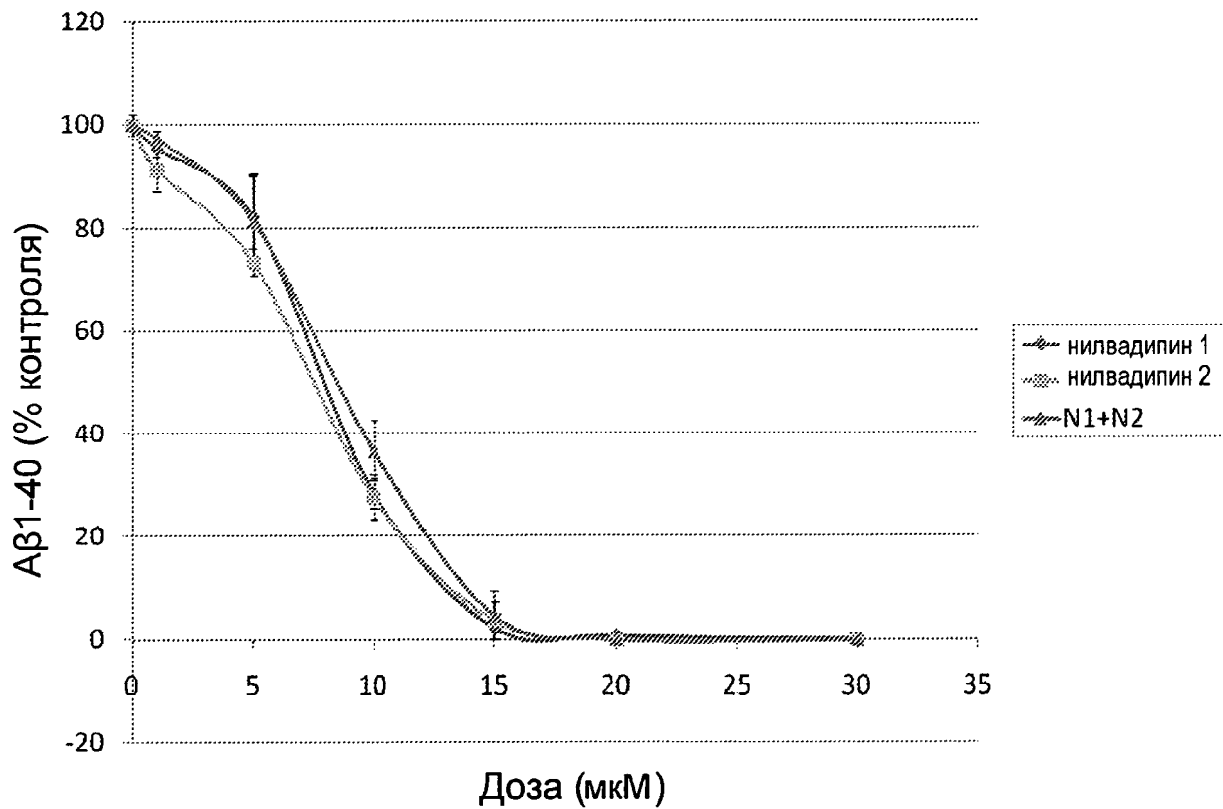
ФИГ. 4



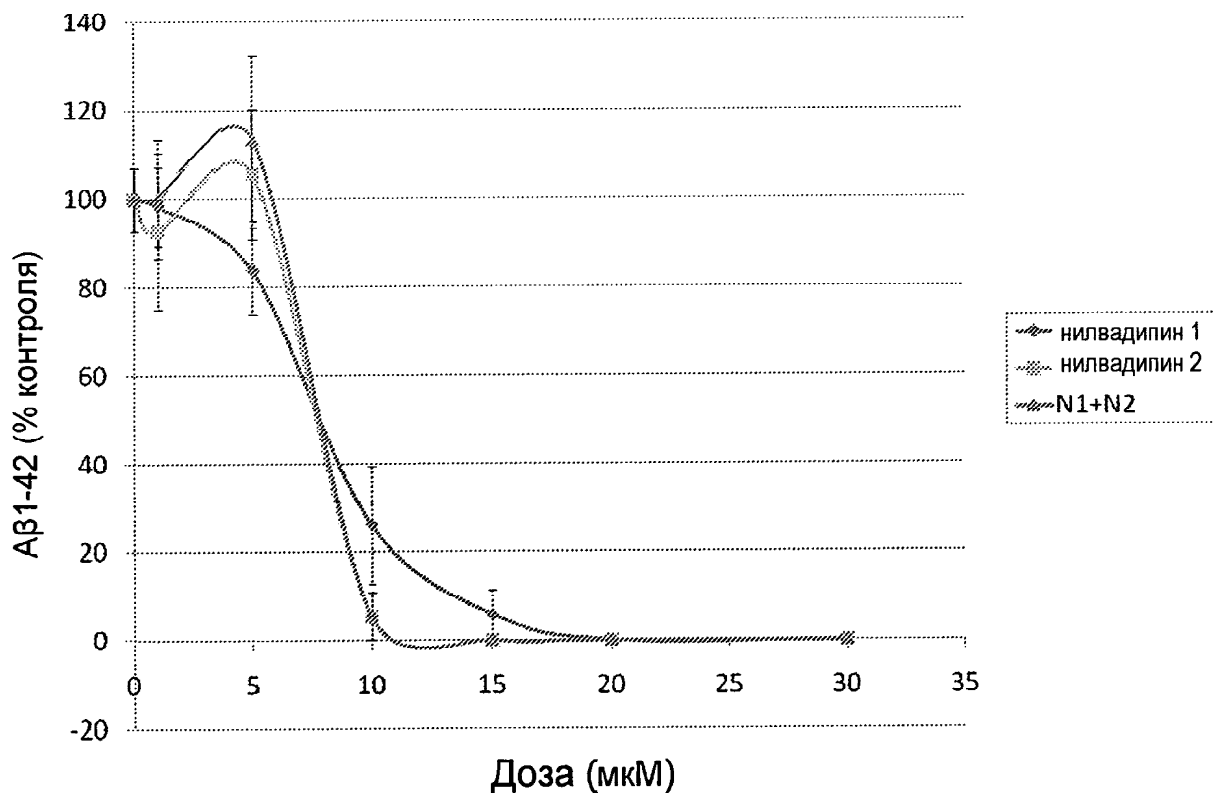
ФИГ. 5А



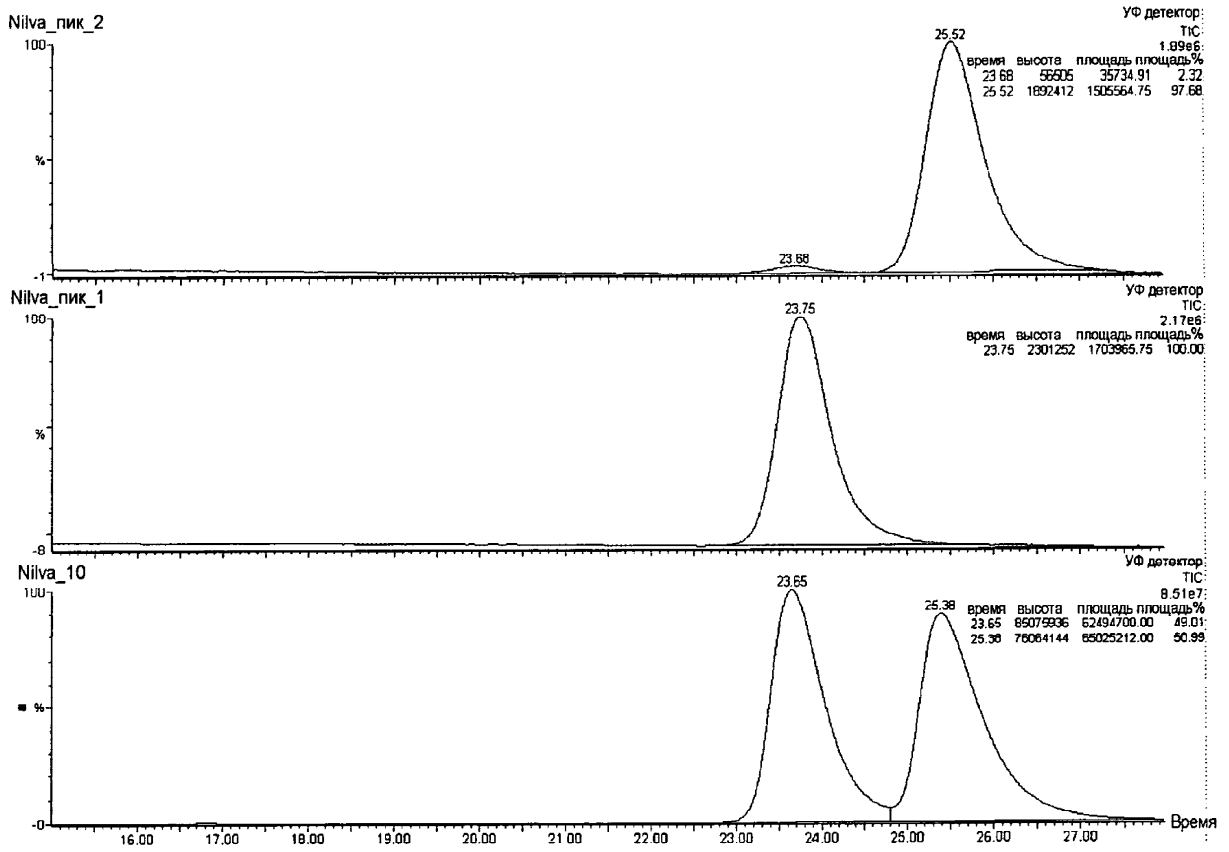
ФИГ. 5В



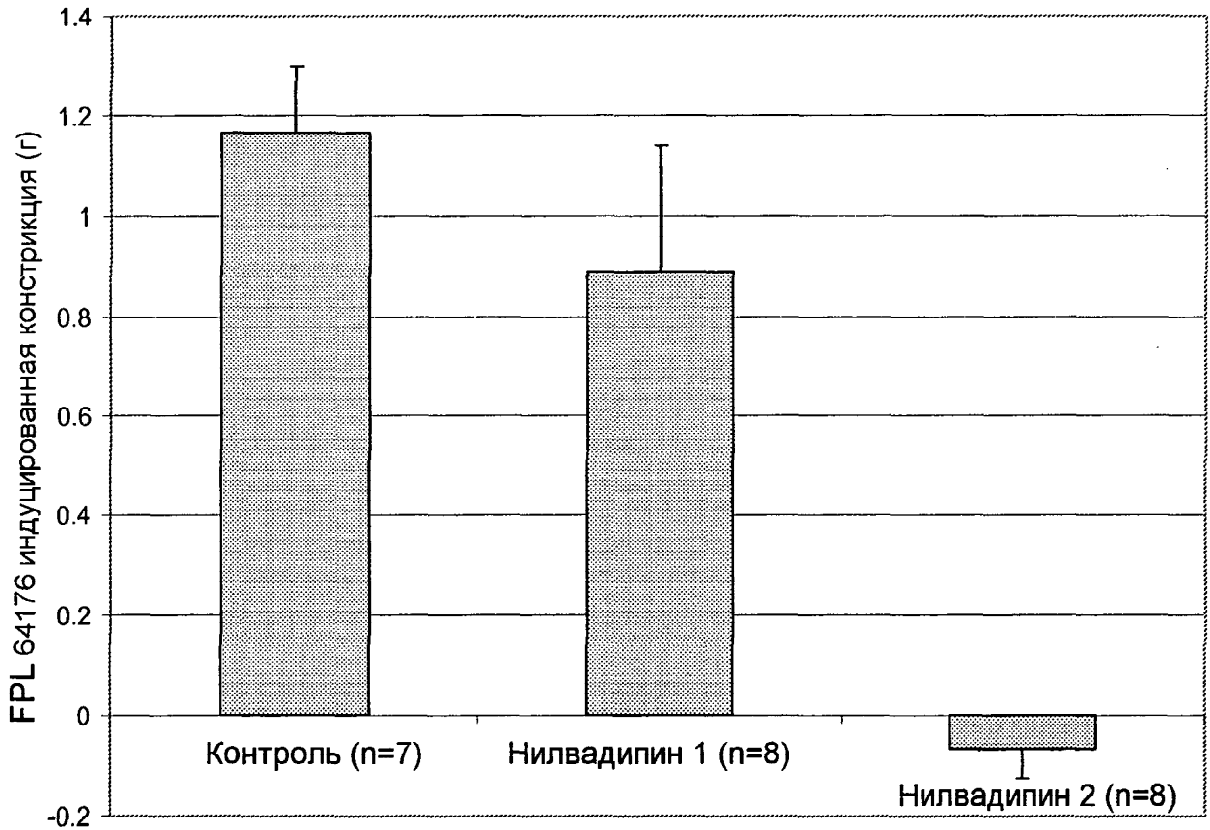
ФИГ. 6



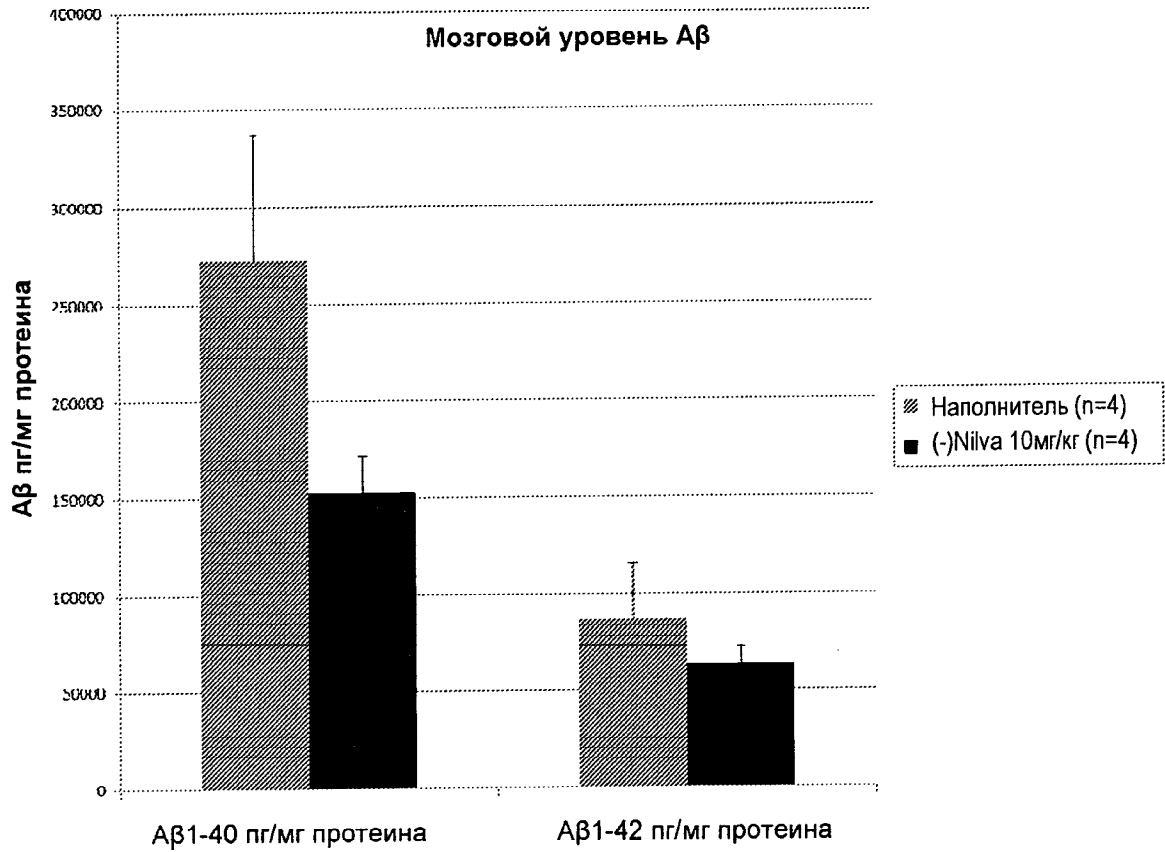
ФИГ. 7



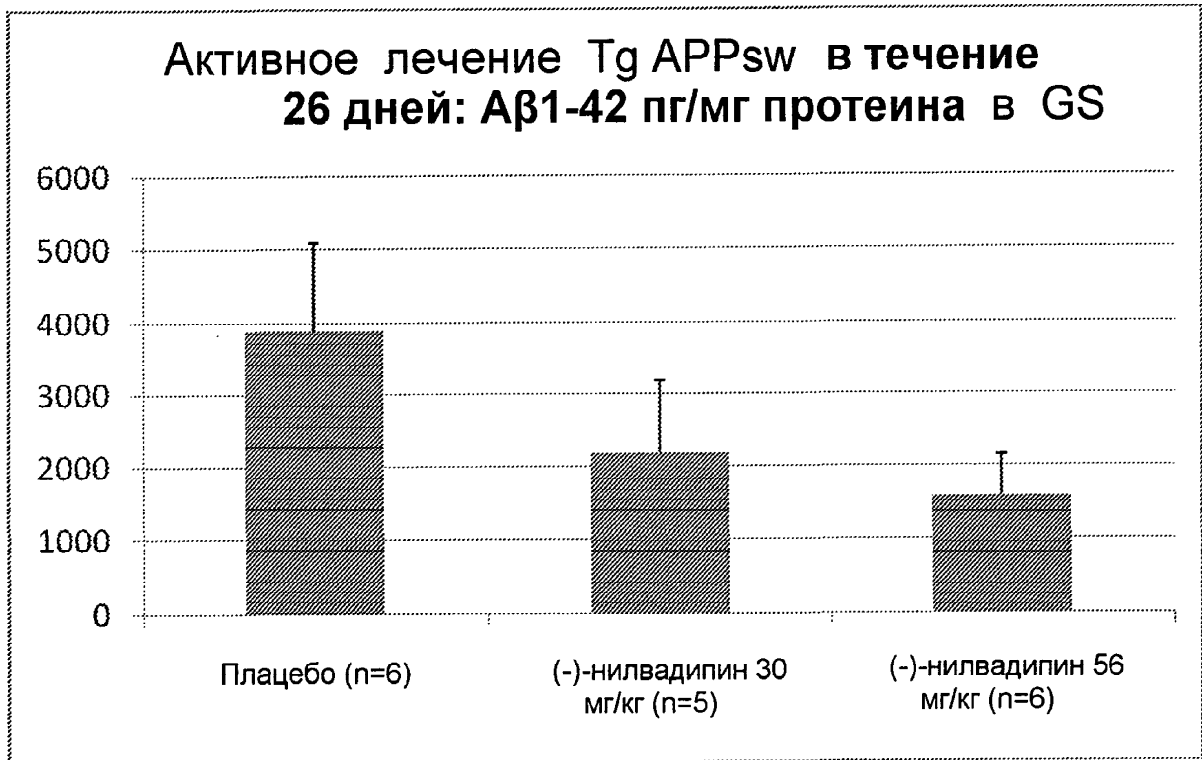
ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

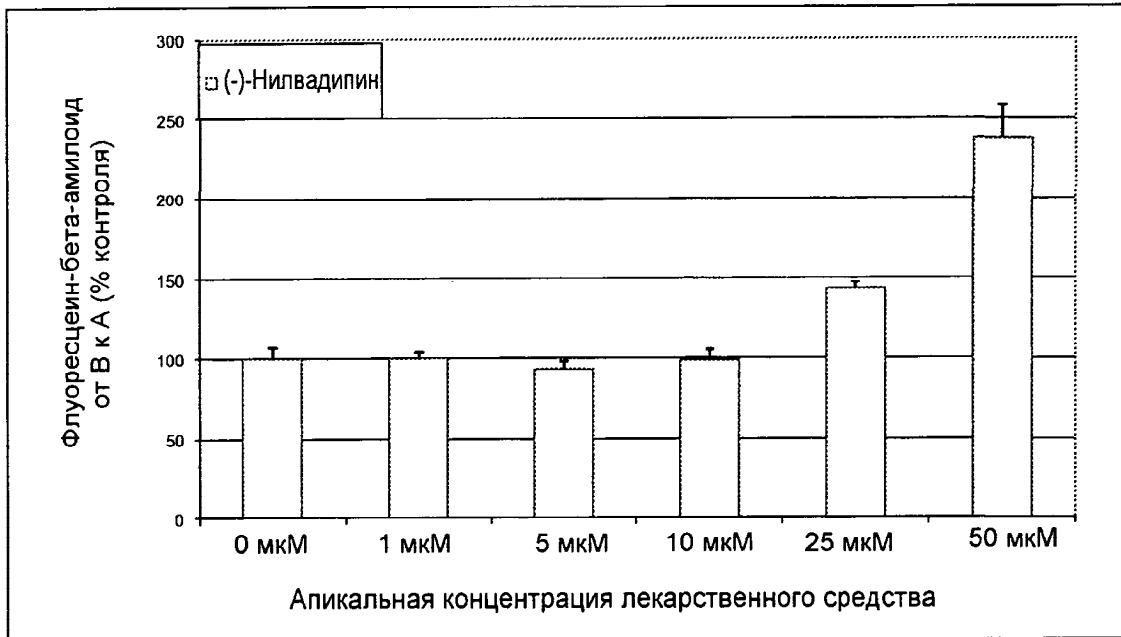


ФИГ. 11

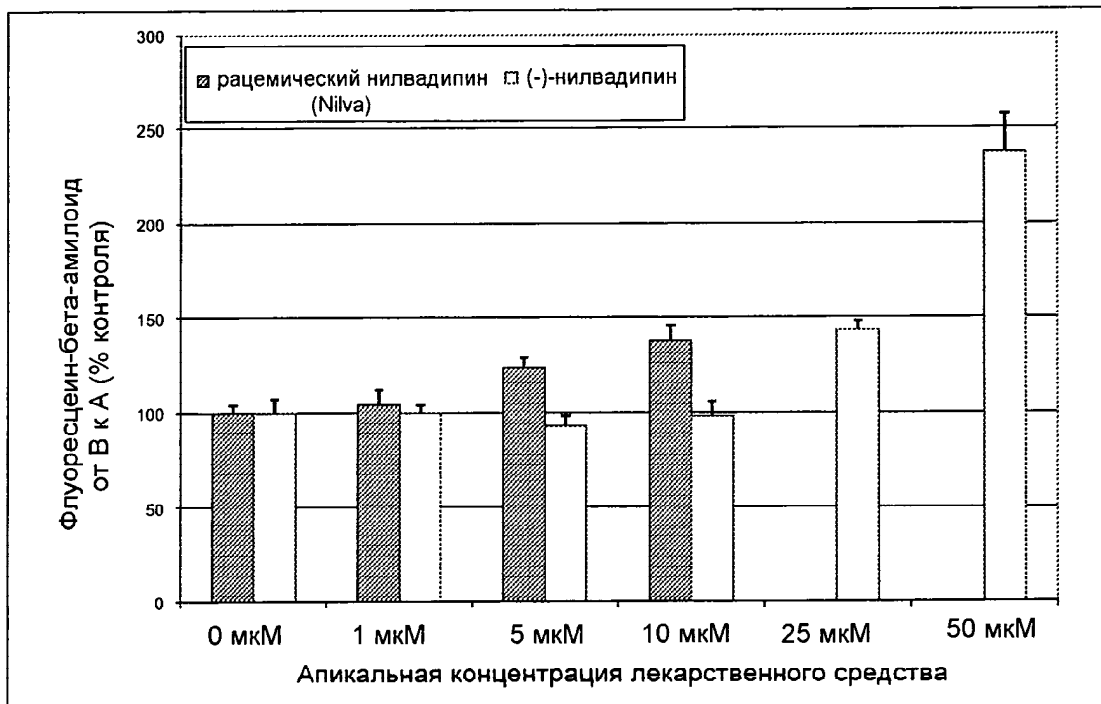


Базолатеральное (головной мозг)

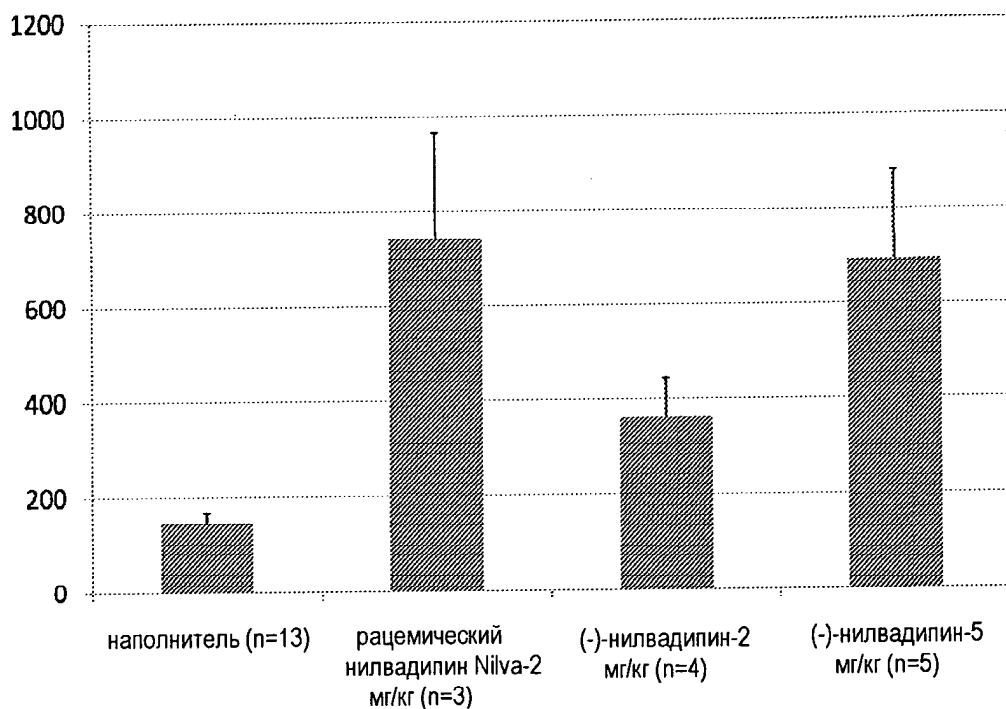
ФИГ. 12



ФИГ. 13

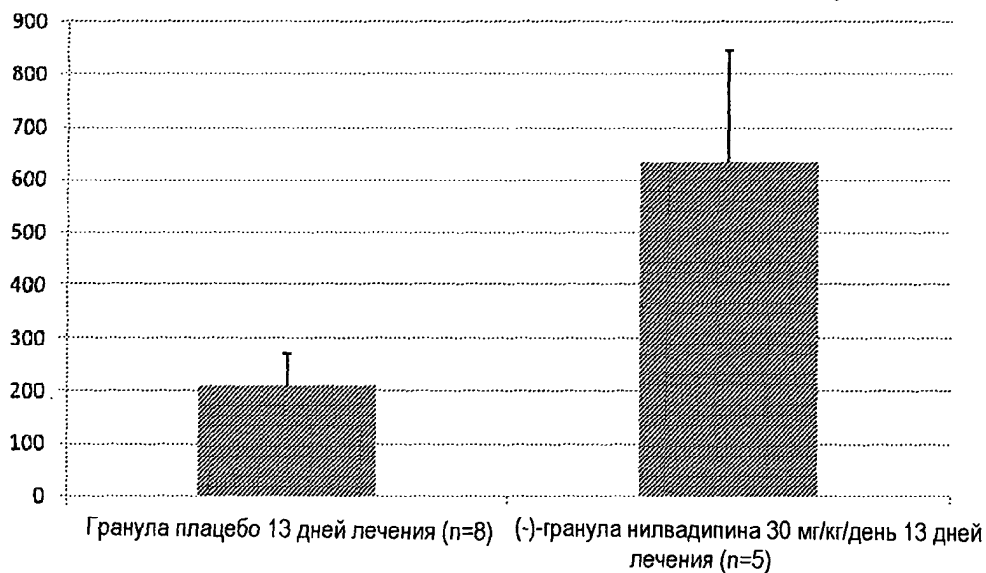


ФИГ. 14
Плазма Аβ1-42 пг/мл



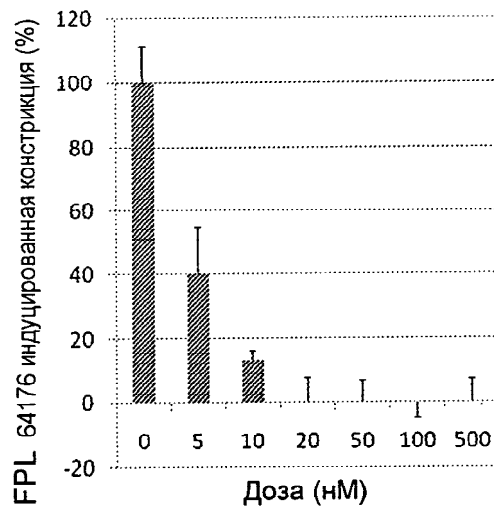
ФИГ. 15

Плазма Аβ1-42 (пг/мл) после мозговой инъекции Аβ1-42

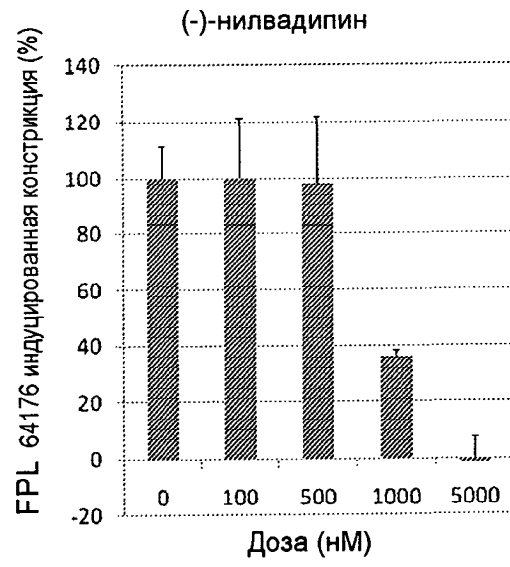


ФИГ. 16

(+)-нифвадипин



ФИГ. 17А



ФИГ. 17В