

ÖZET

MULTİPL SKLEROZ TEDAVİSİ

- 5 Multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı kullanılarak yöntemler burada sağlanmaktadır

İSTEMLER

1. Multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı olan bir bileşik.
5
2. Multipl sklerozun kronik gelişen multipl skleroz olduğu, istem 1'e göre kullanıma yönelik bileşik.
- 10 3. Bileşiğin (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin olduğu, istem 1'e göre kullanıma yönelik bileşik.
4. Bileşiğin oral olarak uygulanacağı istemler 1 veya 3'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşik.
15
5. Tedavi edilecek hastanın bir insan olduğu, istemler 1, 3 veya 4'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşik.
6. Bileşiğin (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin olduğu, istem 2'ye göre kullanıma yönelik bileşik.
20
7. Bileşiğin oral olarak uygulanacağı istem 2 veya 6'ya göre kullanıma yönelik bileşik.
8. Tedavi edilecek hastanın bir insan olduğu, istemler 2, 6 veya 7'den herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşik.
25

TARİFNAME

MULTİPL SKLEROZ TEDAVİSİ

5 TEKNİK ALAN

Mevcut buluş genel olarak multipl skleroz tedavisi alanı ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

10

Multipl skleroz (MS), merkezi sinir sisteminin (CNS) bir kronik, immün-aracı demiyelinizan hastalıktır. İmmün sistemi, CNS’de sinirlerin ve bunların sinir liflerinin etrafında miyelin kaplamaya saldırıdadır. MS, CNS’yi etkileyen en yaygın otoimmün bozukluktur ve genç yetişkinlerde güçsüzlüğün önde gelen nedenidir. Hastalar genel olarak 20 ve 50 yaşları arasında başlamaktadır. 2015’te, dünya çapında yaklaşık 2.3 milyon insan etkilenmiştir.

15

MS, birkaç formu, ya izole saldırılarda (nükseden formlar) meydana gelen yeni semptomlar ile ya da tipik nüksetmeler (gelişen formlar) olmadan zamanla yavaş yavaş gelişen hastalar ile oluşmaktadır. Gelişen formlar, birincil gelişen MS ve ikincil gelişen MS’yi kapsamaktadır.

20

Yoğun araştırmadan dolayı hastaların patojenizinin mekanizmaları belirsiz kalmaktadır ve MS için FDA tarafından onaylanan birkaç ilaç bulunurken, hiçbir iyileşme yoktur. Bu ilaçlar arasında, çoğu nükseden-tekrarlayan MS’nin tedavisi için onaylanırken, birincil gelişen MS’in tedavisi için FDA tarafından onaylanan sadece bir ilaç bulunmaktadır. Nükseden-tekrarlayan veya gelişen formlar gibi MS’in tedavi edilmesine yönelik kullanılan mevcut ilaçlar, orta derecede etkili olurken, ciddi yan etkilere de sahip olabilmektedir veya zayıf bir şekilde tolere edilebilmektedir. Buna ek olarak, bu ilaçların çoğu, MS benzeri bir kronik hastalığın bağlamında hastalar için dezavantajlı olan parenteral yol vasıtasıyla uygulanmalıdır.

25

Dolayısıyla, özellikle ayrıca hastalığın gelişen formlarına karşı etkili olabilen ve/veya mevcut tedavilerden daha az yan etki gösteren ve oral yol ile uygulanabilen ilaçlar için MS’nin tedavi edilmesi için yeni ilaçlara yönelik bir ihtiyaç bulunmaktadır. Mevcut buluş, bu ve diğer ihtiyaçları belirtmektedir.

30

35 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

5

Mevcut buluş ayrıca bir hastada (tercihen bir insan) multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik, (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı olan bir bileşik sağlamaktadır söz konusu kullanıma söz konusu bileşiğin teröpatik olarak etkili bir miktarını hastaya uygulanması içermektedir.

10

Mevcut buluş, ayrıca multipl sklerozun tedavisi için bir ilaç olarak kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

15

Bazı yapılandırılmalarda, multipl skleroz, kronik gelişen multipl skleroz, özellikle birincil gelişen multipl skleroz veya ikincil gelişen multipl sklerozdur.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

20

Şekil 1, Örnek 3.1 ve 3.2’de açıklandığı gibi, murin deneysel otoimmün ensefalomyelitte (EAE) 1 ve 3 mg/kg p.o.’da Bileşik 1 ile elde edilen sonuçları göstermektedir. Veriler, ortalama klinik puan olarak ölçülen her gruba yönelik hastalığın ilerlemesini göstermektedir ($\pm$ SEM).

25

Şekil 2, Örnek 3.3’te açıklandığı gibi, EAE modelinde 1, 0.5 ve 0.05 mg/kg p.o.’da Bileşik 1’in etkilerini göstermektedir. Veriler, ortalama klinik puan olarak ölçülen her gruba yönelik hastalığın ilerlemesini göstermektedir ($\pm$ SEM).

30

Şekil 3, Örnek 3.4’te açıklandığı gibi, EAE modelinde 0.06 ve 0.180 mg/kg p.o.’da tasarlanan “ORY-LSD1” (Örnek 1’de ayrıca açıklandığı gibi) LSD1 inhibitörünün etkilerini göstermektedir. Veriler, ortalama klinik puan olarak ölçülen her gruba yönelik hastalığın ilerlemesini göstermektedir ($\pm$ SEM).

Şekil 4, Örnek 4’te açıklandığı gibi EAE tahlilinde 0.5 mg/kg p.o.’da Bileşik 1’in etkilerini göstermektedir. Veriler, ortalama klinik puan olarak ölçülen her gruba yönelik hastalığın ilerlemesini göstermektedir ($\pm$ SEM).

35

Şekil 5, Örnek 4’te açıklandığı gibi EAE tahlilinde 0.5 mg/kg p.o.’da veya vehikülde Bileşik

1 ile tedavi edilen hayvanlardan tedavi sonunda (bağışıklık kazanmadan 26 gün sonra) izole spinal kordların histopatolojik analizinin sonuçları göstermektedir. Gösterilen imgeler Kluver-Barrera ile boyanmış klinik hastalıklı pikiinde seçilen transvers servikal (A) ve lumbar (B) spinal kord bölmelerine karşı gelmektedir. Oklar, demiyelinizasyon ve inflamatuvar hücre filtreleme alanları belirtmektedir. Yatay çubuk, 200 µm ölçeği göstermektedir.

Şekil 6, Örnek 4'te izole spinal korda karşı gelen lumbar ve servikal bölgelerde ortalama sayıda demiyelinizasyon plakları göstermektedir, sırasıyla Bileşik 1 ile tedavi edilen hayvanların servikal ve lumbar spinal kord bölmelerinde olmayan veya büyük oranda azalan demiyelinizasyonu göstermektedir.

Şekil 7, Örnek 4'e göre 0.5 mg/kg p.o. veya vehikülde Bileşik 1 ile tedavi edilen hayvanların dalak ve lenf nodüllerinden izole edilen immün hücrelerin sayılarını göstermektedir, Bileşik 1-tedavi görmüş hayvanların dalak ve lenf nodüllerinde tutulan T hücrelerin sayısında önemli bir artış göstermiştir, immün dokulardan lenfositlerin azalmış bir çikşini göstermektedir.

Şekil 8, Örnek 4'e göre 0.5 mg/kg p.o.'da veya vehikülde Bileşik 1 ile tedavi edilen hayvanlardan bağışıklık kazanmadan 26 gün sonra toplanan spinal kordlarda ELISA ile belirlenen birkaç sitokin ve kemokin seviyelerini göstermektedir. ŞEKİL 8A: IL-4; Şekil 8B: IL-6; Şekil 8C: IL-1beta; Şekil 8D: IP-10; Şekil 8E: MCP-1. Seviyeler doku proteininin ng/100 mg' olarak ifade edilmektedir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, burada aşağıda ayrıntılı açıklanmış ve Örneklerde gösterildiği gibi multipl sklerozun tedavisine yönelik yüksek oranda etkili bir terapötik ajan olarak (-) 5-(((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin bileşiğinin tanımlanması dayanmaktadır.

Bu bileşik, (-) 5-(((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin, Bileşik 1 (veya Karş. 1) olarak Örnekler ve Şekillerde tasarlanmaktadır. "(-) 5-(((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin", "Bileşik 1" veya "Karş. 1" isimleri burada değişimli olarak kullanılmaktadır.

Buna uygun olarak, mevcut buluş, multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-(((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun

farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

Mevcut buluş ayrıca bir hastada (tercihen bir insan) multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik, (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı olan bir bileşik sağlamaktadır, söz konusu kullanımda söz konusu bileşiğin teröpatik olarak etkili bir miktarda hastaya uygulanması içermektedir.

Mevcut buluş, ayrıca multipl sklerozun tedavisi için bir ilaç olarak kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

Bazı yapılarında, multipl skleroz, kronik gelişen multipl sklerozdur (örneğin, birincil gelişen multipl skleroz veya ikincil gelişen multipl skleroz).

Buna uygun olarak, mevcut buluş, ayrıca kronik gelişen multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

Mevcut buluş ayrıca bir hastada (tercihen bir insan) kronik gelişen multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik, (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı olan bir bileşik sağlamaktadır, söz konusu kullanımda söz konusu bileşiğin teröpatik olarak etkili bir miktarda hastaya uygulanması içermektedir.

Mevcut buluş, ayrıca kronik gelişen multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı sağlamaktadır

Tercihen, bileşik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin (veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı) oral olarak uygulanmaktadır. Peroral alımı (veya yutma) vasıtasıyla uygulanabilen örnek formülasyonlar aşağıda daha ayrıntılı olarak açıklanmaktadır

Mevcut buluş, multipl sklerozun tedavisinde kullanılan a yönelik bileşik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin veya söz konusu bileşiğin farmasötik olarak kabul edilebilir bir tuzu ya da solvatı ile sağlamaktadır. Buna uygun olarak, buluş, multipl sklerozun (örneğin, kronik gelişen multipl skleroz) tedavisinde kullanılan a yönelik serbest baz olarak bileşik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin ile ilgilidir ve ayrıca buluş, multipl sklerozun (örneğin, kronik gelişen multipl skleroz) tedavisinde kullanılan a yönelik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-aminin bir farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu veya solvatı ile ilgilidir.

10

Örneklerde gösterildiği gibi, bileşik (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklo-propil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin, multipl sklerozun hayvan modellerinde açık terapötik etkiler sağlamaktadır. Özellikle, Bileşik 1, bir Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) modeli kullanılarak test edildi. EAE insan MS'sine patolojik ve klinik benzerlikler göstermektedir ve potansiyel MS terapötik ajanların test edilmesi için bir model sistemi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, MOG₃₅₋₅₅ ve C57BL/6 fare suşu kullanılarak burada açıklandığı gibi murin EAE modeli, MS'nin kronik gelişen formunun bir geçerli prelinik modeli olarak düşünülmektedir.

15

20

Kronik aktif EAE üzerinde Bileşik 1'in etkileri, bir terapötik rejimde değerlendirildi, yani hastaların semptomlarının başlamasından sonra bileşik uygulandı. Örnek 3 ve Şekiller 1, 2 ve 4'te daha ayrıntılı olarak gösterildiği gibi, Bileşik 1 ile tedavi, EAE'nin gelişimini büyük oranda inhibe etmiştir ve günlük ortalama klinik puan ile ölçülen hastaların insidans ve şiddetini azaltmıştır. Örneğin, Bileşik 1'in 1 veya 3 mg/kg p.o.'da uygulandığı bir EAE tahlilinde, vehikül ile tedavi edilmiş fareler EAE'nin orta ile şiddetli işaretlerini geliştirirken ve Bileşik 1 ile tedavi edilen gruplarda şiddetli paralizden dolayı mortalite gösterirken, farelerin %40 ila 70'i, orta semptomlar göstermiştir ve bunların %30'u hastalığın başlangıcından 40 gün sonra tamamen geri kazandı. Örnek 3.3 ve Şekil 2'de gösterildiği gibi, Bileşik 1, 0.05 mg/kg p.o.kadar düşük dozlarda bu MS modelinde etkili olduğu bulunmuştur. Önemli bir şekilde, Bileşik 1'in koruyucu etkisi, tedavinin durmasından sonra uzun bir süre boyunca korundu.

25

30

Bileşik 1'in hastalığın ilerlemesine karşı eylemin hızlı bir başlangıcı gösterdiği, örneğin Şekil 1'de gösterildiği gibi, tedavinin başlangıcından kısa bir süre sonra günlük klinik puan üzerinde faydalı etkiler gösterdiği dikkate değerdir. Bileşik 1, MS'nin akut saldırılarının erkenden hafifletilmesini veya hızlı bir şekilde multipl sklerozun gelişmesinin sağlanması için faydalı

35

olabilmektedir ve kortikosteroidlere özellikle aşırı hassasiyet veya alerji durumlarında yüksek dozda i.v. kortikosteroidleri ile standart tedaviye bir alternatif sağlayabilmektedir.

Örnek 4 ve Şekiller 5 ve 6'da gösterildiği gibi, Bileşik 1, EAE farelerinde gösterildiği gibi, spinal kordda demiyelinizasyonu azaltmak için spinal kord için immün hücrelerinin filtrelemesini azaltmaya yönelik faydalı Bileşik 1 ile tedavi, Örnek 4 ve Şekil 7'de ayrıntılı olarak açıklandığı gibi dalak ve lenf nodüllerinde tutulan immün hücrelerin sayısında önemli bir artış ile gösterildiği gibi, immün dokulardan lenfositlerin çıkışını azaltmaktadır. Bileşik 1, spinal kordda IL-6 ve IL-1beta gibi proinflamatuvar sitokinleri ve IP-10 ve MCP-1 gibi kemokinleri azaltmaktadır (bkz Şekil 8). Antiinflamatuvar sitokin IL-4, Th2 anti-inflamatuvar yanıtın göstergesi olan Bileşik 1-tedavi edilmiş hayvanların spinal kordlarında büyük oranda artmıştır (Şekil 8A).

Önemli bir şekilde, MS'de Bileşik 1'in terapötik etkilerine, MS ilaçlarında ve/veya gastro-intestinal toksisite işaretleri olmadan hematoloji ve/veya dolaşan lenfosit sayıları, yaygın bir etki üzerine klinik olarak ilgili etkiler üretmeyen dozlarda ulaşabilmektedir. Buna uygun olarak, Bileşik 1, hematoloji üzerinde klinik olarak ilgili etkiler veya dolaşan lenfosit sayıları üretilmeden, gelişen MS'yi kapsayan MS'nin tedavi edilmesi için kullanılabilmektedir. MS'nin tedavisinde Bileşik 1'in terapötik etkileri ayrıca diğer LSD1 inhibitörlerinin etkileri ile karşılaştırıldığında beklenmeyen şekilde üstün olarak bulunmuştur. Bileşik 1 bir siklopropilamino-bazlı tersinmez LSD1 inhibitörüdür. Örnek 3.1'i MS'sinin EAE modeli kullanılarak, Örnek 1'de daha ayrıntılı olarak açıklanan Bileşik 1'in etkileri, diğer siklopropilamino-bazlı tersinmez LSD1 inhibitörü, ORY-LSD1 ile tasarlanmış bileşik ile karşılaştırıldı. Bileşik 1, 90 nM LSD1'e karşı bir IC50 gösterirken, ORY-LSD1, Örnek 2'de daha ayrıntılı olarak açıklandığı gibi 10 nM LSD1'e karşı bir IC50'ye sahiptir. İki bileşik LSD1'e karşı farklı *in vitro* potansiyellere sahip olduğundan dolayı ORY-LSD1, LSD1 inhibisyonu *in vivo*'ya göre Bileşik 1 için kullanılanlara eşdeğer dozlarda Örnek 3'ün EAE modelinde test edildi. ORY-LSD1, gelişme için açık bir eğilim sağlamışken (Şekil 3), Bileşik 1, ORY-LSD1'den önemli oranda daha etkili idi. Bileşik 1 bu yüzden multipl sklerozun tedavisinde kullanıma yönelik özellikle uygun bir LSD1 inhibitörüdür.

Farmasötik Formülasyonlar

Bileşik 1'in bunun gibi doğrudan terapide kullanıma yönelik uygulanabildiği, bunun tipik olarak bir veya daha fazla farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyan veya taşıyıcı ile birlikte

aktif farmasötik karışım oluşturan madde olarak Bileşik 1'i içeren bir farmasötik bileşimi formunda uygulanması mümkündür. Burada Bileşik 1'e herhangi bir referans, serbest baz olarak bileşiği veya bunun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzu veya solvatı kapsamaktadır

5

Bileşik 1, hedeflenen amaca ulaşan herhangi bir araç ile uygulanabilmektedir. Örnekler oral, parenteral, intravenöz, subkütanöz veya topikal yollar ile uygulanmayı kapsamaktadır

10 Oral taşıma için, Bileşik 1, bağlayıcılar (örneğin, jelatin, selüloz, kitre), ekspiyanlar (örneğin, nişasta, laktoz), yağlayıcılar (örneğin, magnezyum stearat, silikon dioksit), ayrıştırıcı ajanlar (örneğin, aljinat, Primogel ve mısır nişastas) ve tatlandırıcı veya lezzetlendirici ajanlar (örneğin, glikoz, sakaroz, sakarin, metil salisilat ve nane) gibi farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcıları kapsayan bir formülasyona dahil edilebilmektedir. Formülasyon, jelatin çevrelenmiş kapsüller ve sıkıştırılmış tabletler formunda oral olarak taşınabilmektedir.

15 Kapsüller ve tabletler herhangi konvansiyonel bir teknikte hazırlanabilmektedir. Kapsüller ve tabletler, kapsüller ve tabletlerin lezzeti, tadı, rengi ve şeklini modifiye etmek için teknikte bilinen çeşitli kaplamalar ile kaplanabilmektedir. Buna ek olarak, sabit yağ gibi sıvı taşıyıcıları kapsüllerde bulunabilmektedir.

20 Uygun oral formülasyonlar, süspansiyon, şurup, çiğneme sakızı, gofret, iksir ve benzeri formlarda olabilmektedir. İstenirse, özel formlarda lezzetlendiriciler, tatlar, renkler ve şekillerin modifiye edilesi için konvansiyonel ajanlar ayrıca dahil edilebilmektedir. Buna ek olarak, yutulamayan hastalarda enteral besleme tüpü ile kolay uygulama için, aktif bileşikler, zeytinyağı, mısır yağı ve aspir yağı gibi bir kabul edilebilir lipofilik bitkisel yağ vehikülünde

25 çözündürülebilmektedir.

Bileşik 1, çözelti veya süspansiyon formunda veya kullanımdan önce bir çözelti veya süspansiyon formuna dönüşebilen liyofilize formda parenteral olarak uygulanabilmektedir. Bu tür formülasyonlarda, steril su ve fizyolojik tuzlu su tamponu gibi seyrelticiler veya farmasötik

30 olarak kabul edilebilir taşıyıcıları kullanılabilmektedir. Diğer konvansiyonel çözücüler, pH tamponları, stabilizörler, antibakteriyel ajanlar, yüzey aktif maddeler ve antioksidanları hepsi dahil edilebilmektedir. Örneğin, faydalı bileşenler, sodyum klorür, asetatlar, sitratlar veya fosfat tamponları, gliserin, dekstroz, sabit yağlar, metil parabenler, polietilen glikol, propilen glikol, sodyum bisülfat, benzil alkol, askorbik asit ve benzerlerini kapsamaktadır

35 Parenteral formülasyonlar, cam şişeler ve ampuller gibi herhangi konvansiyonel bir kapta

depolanabilmektedir.

Topikal uygulama için, Bileşik 1, losyonlar, kremler, merhemler, jeller, tozlar, macunlar, spreyler, süspansiyonlar, damlalar ve aerosollere formüle edilebilmektedir. Dolayısıyla, bir veya daha fazla kılavuşturma ajan, nemlendirici ve stabilize edici ajan, formülasyonlara dahil edilebilmektedir. Bu tür ajanların örnekleri, sadece bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, polietilen glikol, sorbitol, ksantan sakızı, petrolatum, bal mumu veya mineral yağ, lanolin, skualan ve benzerlerini kapsamaktadır. Topikal uygulamanın özel bir formu bir transdermal plaster ile taşınmaktadır. Transdermal plasterlerin hazırlanmasında yönelik yöntemler *örneğin*, Brown, ve ark. (1988) tarafından Ann. Rev. Med. 39:221-229 yayınında açıklanmaktadır.

Bileşik 1'in uzatılmış salınımı için subkütanöz implantasyon, uygulamanın uygun bir yolu olabilmektedir. Bu, *örneğin*, ön abdominal duvar altında bir subkütanöz alana herhangi uygun bir formülasyonda bir aktif bileşiğin implantının oluşturulması için cerrahi prosedürlerini gerektirmektedir. Bkz, *örneğin*, Wilson et al. (1984) J. Clin. Psych. 45:242-247. Hidrojeller, aktif bileşiklerin sürdürülmüş salınımı için bir taşıyıcı olarak kullanılabilmektedir. Hidrojeller genel olarak teknikte bilinmektedir. Bunlar tipik olarak malzeme benzeri bir jelin oluşturulması için suda şişen bir ağ içine çapraz bağlayıcı yüksek molekül ağırlığından biyouyumlu polimerler tarafından yapılmaktadır. Tercihen, hidrojeller, biyobozunur veya biyosorbe edildir. Bu amaçlara yönelik, polietilen glikoller, kollajen veya poli(glikolik-ko-L-laktik asit)ten yapılan hidrojeller faydalılabilmektedir. Bkz, *örneğin*, Phillips ve. (1984) J. Pharmaceut. Sci., 73: 1718-1720.

Bileşik 1, bir polimer konjugatının oluşması için bir suda çözünür immünojenik olmayan peptidik olmayan yüksek molekül ağırlığına sahip polimere konjuge edilebilmektedir. *Örneğin*, Bileşik 1, bir konjugatın oluşturulması için polietilen glikole kovalent olarak bağlanabilmektedir. Tipik olarak, bu tür bir konjugat, gelişmiş çözünürlük, stabilite ve azalmış toksisite ve immünojenesite göstermektedir. Dolayısıyla bir hastaya uygulandığında, konjugattaki Bileşik 1, vücutta daha uzun ömre sahip olabilmektedir ve daha iyi etkililik gösterebilmektedir. Bkz genel olarak, Burnham (1994) Am. J. Hosp. Pharm. 15:210-218. PEGile proteinler, protein değiştirme terapilerinde ve diğer terapötik kullanımlar için şu an kullanılmaktadır. *Örneğin*, PEGile interferon (PEG-INTRON A®), Hepatit B'nin tedavi edilmesine yönelik klinik olarak kullanılmaktadır. PEGile adenoazin deaminaz (ADAGEN®), ciddi birleşmiş immünoyetmezlik hastalarının tedavi edilmesi için kullanılmaktadır. PEGile L-asparajinaz (ONCAPSPAR®) akut lenfoblastik löseminin (ALL) tedavi edilmesi için

kullanılmaktadır. Polimer ve aktif bileşik ve/veya polimerin kendisi arasındaki kovalent bağın fizyolojik koşullar altında hidrolitik olarak bozunabildiği tercih edilmektedir. "Önilaçlar" olarak bilinen bu tür konjugatlar vücut içinde aktif bileşiği kolayca salılabilmektedir. Aktif bileşiğin kontrollü salınması ayrı bir teknikte bilinen genel olarak mikrokapsüller, nanokapsüller veya hidrojelere aktif bileşenin dahil edilmesiyle ulaşabilmektedir. Bileşik 1'in diğer farmasötik olarak kabul edilebilir önilaçlar, sadece bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, esterler, karbonatlar, tiokarbonatlar, N-asil türevleri, N-asiloksialkil türevleri, üçüncül aminlerin kuaterner türevleri, N-Mannich bazları, Schiff bazları, amino asit konjugatları, fosfat esterleri, metal tuzları ve sülfonat esterlerini kapsamaktadır.

Lipozomlar aktif bileşik için taşıyıcılar olarak kullanılabilmektedir. Lipozomlar, kolesterol, fosfolipidler, yağ asitleri ve bunların türevleri gibi çeşitli lipidlerden yapılmaktadır. Çeşitli modifiye edilmiş lipidler de kullanılabilmektedir. Lipozomlar, aktif bileşiklerin toksisitesini azaltabilmektedir ve bunların stabilitesini artılabilmektedir. Burada aktif bileşenler barındıran lipozomal süspansiyonların hazırlanmasına yönelik yöntemler, genel olarak teknikte bilinmektedir. Bakınız *örneğin*, U.S. Patent No. 4,522,81 1 ; Prescott, Bask., Methods in Cell Biology, Cilt XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976).

Oral ve parenteral bileşimler benzeri farmasötik bileşimler, dozajın uygulanma kolaylığı ve tekbiçimliliği için birim dozaj formlarında formüle edilebilmektedir. Burada kullanıldığı gibi, "birim dozaj formları" süjelere uygulanması için isteğe bağlı dozajlar olarak uygun fiziksel olarak ayrı birimleri ifade etmektedir, her birim bir veya daha fazla uygun farmasötik taşıyıcı ile ilişki içinde, istenen terapötik etkinin üretilmesi için hesaplanan aktif bileşenin bir daha önceden belirlenmiş miktarı barındırmaktadır.

Terapötik uygulamalarda, farmasötik bileşimler, tıbbi teknikte bir uzman kişi tarafından belirlendiği gibi, tedavi edilecek hastalığa uygun bir şekilde uygulanacaktır. Uygun bir doz ve uygun uygulama süresi ve frekansı bunlar arasında hastanın durumu, hastalığın şiddeti ve türü, aktif bileşenin özel formu, uygulama yolu gibi bu tür faktörler tarafından belirlenecektir.

Genel olarak, uygun bir doz ve uygulama rejimi, daha sıkı tam veya kısmi azalmalar gibi bir gelişmiş klinik sonuç ve/veya daha uzun hastalık olma ve/veya toplam sağkalım ve/veya semptom şiddetinin azalması ve/veya doktor tarafından belirtildiği gibi diğer nesnel olarak saptanabilir gelişme gibi terapötik faydanın sağlanması için yeterli bir miktarda farmasötik bileşim sağlamaktadır. Etkili dozlar genel olarak Örneklerde gösterilenlere benzer in vitro veya hayvan model test sistemlerinden türetilen doz-yanıt eğrileri benzeri deneysel modeller

kullanılarak değerlendirilebilmektedir veya d  değerlenebilmektedir.

Farmasötik bileşimler, uygulama için yönergeler ile birlikte bir kap, ambalaj veya da     ya dahil edilebilmektedir.

5

Bileşik 1, oral olarak aktiftir ve örnekler 3 ve 4'te gösterildiği gibi oral olarak uyguland  ında MS tedavisinde etkilidir. Buna uygun olarak, Bileşik 1'in, MS tedavisi için oral yol ile uygulanması tercih edilmektedir.

10 Tanımlar

Aksi belirtilmediği takdirde, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun ait olduğu teknikte uzman kişi tarafından yaygın bir şekilde anla      gibi ayn  anlama sahiptir.

15 A  a  daki tanımlar, aksi belirtilmediği takdirde, mevcut tarifname ve istemler boyunca uygulanmaktadır

Mevcut buluşun ama  lar  i  in bir "hasta" veya "süje", hem insan hem diğer hayvanlar, özellikle memeliler ve diğer organizmaları kapsamaktadır. Dolay  yla, yöntemler, insan terapi ve veterinerlik uygulamalarına uygulanabilir. Bir tercih edilen yönde süje veya hasta bir memelidir ve en çok tercih edilen yönde süje veya hasta insandır

Terimler "tedavi", "tedavi etmek" ve benzeri, genel olarak bir istenen farmakolojik ve/veya fizyolojik etkinin elde edilmesi anlamına gelmek üzere kullanılmaktadır. Etki bir hastalık ve/veya bunun semptomunun tamamen veya kısmen önlenmesi bakımından profilaktik olabilmektedir ve/veya bir hastal    n tamamen veya kısmen iyileşmesi ve/veya hastalığa atfedilen yan etki bakımından terapötik olabilmektedir. Burada kullanışı gibi "tedavi" terimi, bir hastada bir hastal    n herhangi bir tedavisini kapsamaktadır ve şunları kapsamaktadır (a) hastal    n önceden geliştiren/hastalık riskine sahip olabilen bir hastada bir hastal    n önlenmesi; (b) hastal    n inhibe edilmesi, yani gelişiminin durdurulması veya (c) hastal    n hafifletilmesi, yani hastal    n gerilemesine neden olması. Burada kullanışı gibi, terim "bir hastal    n tedavi edilmesi" veya "bir hastal    n tedavi edilmesi", özellikle hastal    n bir yavaşlaması veya ilerlemesinin geri dönmesini ifade etmektedir. Bir hastal    n tedavisi, hastal    n bir semptomunun tedavi edilmesi ve/veya semptomların azaltılmasını kapsamaktadır

Burada kullanılabildiği gibi, terim "teröpatik olarak etkili miktar", bir süjede bir istenen biyolojik etkinin (örneğin, bir teröpatik etki) üretilmesi için yeterli bir miktarı ifade etmektedir. Buna uygun olarak, bir bileşiğin teröpatik olarak etkili miktarı hastalıktan muzdarip veya hastalığa duyarlı olan bir süjeye uygulandığında, bir hastalığın tedavi edilmesi ve/veya bir hastalığın başlangıcı veya ilerlemesini geciktirmek ve/veya hastalığın bir veya daha fazlasını hafifletmek için yeterli bir miktar olabilmektedir.

Burada kullanılabildiği gibi, bir "farmasötik olarak kabul edilebilir tuz" ile, belirtilen bileşiğin serbest asitleri ve bazları biyolojik etkililiğini koruyan ve biyolojik olarak veya aksi durumda arzu edilmeyen olmayan bir tuz anlamına gelmesi hedeflenmektedir. Bir bileşik, yeterli oranda asidik, yeterli oranda bazik veya her iki fonksiyonel gruba sahiptir ve uygun olarak bir tuz oluşturmak için birçok organik veya inorganik baz ve inorganik ve organik asitlerin herhangi biriyle reaksiyona girebilmektedir. Bu tür tuzların örnekleri sülfatlar, pirosülfatlar, bisülfatlar, sülfidler, bisülfidler, fosfatlar, monohidrojenfosfatlar, dihidrojenfosfatlar, metafosfatlar, pirofosfatlar, klorlar, bromlar, iyotlar, nitratlar, asetatlar, propiyonatlar, dekanatlar, kaprilatlar, akrilatlar, formatlar, izobütiratlar, kaproatlar, heptanoatlar, propiolatlar, oksalatlar, malonatlar, süksinatlar, süberatlar, sebakatlar, fumaratlar, maleatlar, bütün-1,4-dioatlar, heksin-1,6-dioatlar, benzoatlar, klorobenzoatlar, metilbenzoatlar, dinitrobenzoatlar, hidroksibenzoatlar, metoksibenzoatlar, ftalatlar, sülfonatlar, ksilensülfonatlar, fenilasetatlar, fenilpropiyonatlar, fenilbütiratlar, sitratlar, laktatlar, gama-hidroksibütiratlar, glikolatlar, tartratlar, metansülfonatlar, etansülfonatlar, propansülfonatlar, benzensülfonatlar, toluensülfonatlar, triflorometansülfonatlar, naftalen-1-sülfonatlar, naftalen-2-sülfonatlar, mandelatlar, piruvatlar, stearatlar, askorbatlar veya salisilatlar gibi bir mineral veya organik asit ile Bileşik 1'in reaksiyonu ile hazırlanan bu tuzları kapsamaktadır. Bir bileşik bir asidik kısımda taşındığında, bunları uygun farmasötik olarak kabul edilebilir tuzları alkali metal tuzları (örneğin sodyum veya potasyum tuzları) alkali toprak metal tuzları (örneğin kalsiyum veya magnezyum tuzları) ve amonyak, alkilaminler, hidroksilaminler, lizin, arjinin, N-metilglukamin, prokain ve benzerleri gibi uygun organik ligandlar ile oluşturulan tuzları kapsayabilmektedir. Farmasötik olarak kabul edilebilir tuzlar teknikte iyi bilinmektedir.

Burada kullanılabildiği gibi, bir "farmasötik olarak kabul edilebilir solvat", bir çözgen ve su, etanol ve benzeri gibi farmasötik olarak kabul edilebilir çözücü tarafından oluşturulan değişken stokiometride bir kompleksi ifade etmektedir. Su ile bir kompleks bir hidrat olarak

bilinmektedir.

Burada kullanıldığı gibi, bir "farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı" veya "farmasötik olarak kabul edilebilir eksipiyant", formüle edilen farmasötik ürünlerde kullanılan ayrıştıcılar, bağlayıcılar, dolgu maddeleri ve yağlayıcılar gibi bir API-olmayan (API, Aktif Farmasötik Karşıt Oluşturan madde) maddeleri ifade etmektedir. Bunlar genel olarak, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu ve Avrupa Tıp Kurumu tarafından yayınlananları kapsayan oluşturulmuş hükümet standartlarına göre insanlara uygulanmasına yönelik güvenlidir. farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar veya eksipiyantlar teknikte uzman kişi tarafından iyi bilinmektedir.

ÖRNEKLER

Aşağıdaki örnekler, buluşun çeşitli yönlerini göstermektedir. Örnekler tabi ki, buluşun sadece belirli yapılandırmaların açıklayıcı olacak şekilde anlaşılabilir ve buluşun kapsamı üzerine sınırlandırmalar oluşturmamaktadır. Sonuçlar ayrıca şekillerde ve şekil açkama yazılarında sunulmaktadır ve açıklanmaktadır.

Örnek 1: Malzemeler

Bileşik 1, WO2012/013728 sayılı patent dokümanında açıklandığı gibi elde edilebilen (-) 5-((((trans)-2-(4-(benziloksi)fenil)siklopropil)amino)metil)-1,3,4-oksadiazol-2-amin bileşiğidir.

ORY-LSD1, WO2013/057320 sayılı patent dokümanında açıklandığı gibi elde edilebilen N-((1R,2S)-2-(2-florofenil)siklopropil)piperidin-4-amin bileşiğidir.

Örnek 2: İn vitro biyokimyasal tahliller

2.1 LSD1

LSD1'e karşılgili bir bileşiğin inhibe edici aktivitesi, aşağıda açıklanan yöntem kullanılarak test edilebilmektedir: BPS Bioscience Inc'den (katalog referans numarası 50100: insan rekombinant LSD1, GenBank erişim no. NM_015013, N-terminal GST işaretleri ile amino asitler 158-uç MW: 103 kDa) insan rekombinant LSD1 protein kullanılır. Bir test bileşiği ile LSD1 enzimatik aktivite ve/veya bunun inhibisyon oranını izlenmesi için, dimetillenmiş H3-

K4 peptid (Anaspec) bir substrat olarak seçildi. Demetilaz aktivitesi, Amplex® Red hidrojen peroksit/peroksidaz tahlil kiti (Invitrogen) kullanılarak katalitik proses boyunca üretilen H₂O₂'nin salınımının ölçülmesiyle aerobik koşullar altında tahmin edildi.

- 5 Kısaca, sabit bir miktarda LSD1, ilgili inhibitörün (*örneğin*, inhibitör gücüne bağlı olarak 0 ila 75 µM aralığında) en az sekiz 3-kat seri seyreltme olmadan ve/veya bunun varlığında 15 dakika için buz üzerinde inkübe edilmiştir. Tranilkipromin (Biomol International), inhibisyon için bir kontrol olarak kullanıldı. Bu deney ile, her inhibitör konsantrasyonu, iki kere test edildi. İnhibitör ile etkileşime giren enzim(ler) bırakıldıktan sonra, dimetillenmiş H3-K4'ün K_M'si, her reaksiyona eklendi ve reaksiyon karanlıkta 37°C'de 30 dakika boyunca bırakıldı. Enzimatik reaksiyonlar pH 7.4 tamponunda 50 mM sodyum fosfatında ayarlandı. İnkübasyonunda sonunda, Amplex® Red reaktifi ve yabancur peroksidaz (HPR) çözeltisi, tedarikçi (Invitrogen) tarafından sağlanan tavsiyelere göre reaksiyona eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 5 dakika daha inkübe edilmesi için bırakıldı. Bir 1 µM H₂O₂ çözeltisi, kit etkililiğinin bir kontrolü olarak kullanıldı. Tahlilde H₂O₂ varlığından dolayı Amplex® Red reaktifinin resorufine dönüşümü, bir mikroparka okuyucusu (Infinite 200, Tecan) kullanılarak floresan (540 nm'de uyarılma, 590 nm'de emilme) izlendi. İsteğe göre birimler, inhibitör olmadan ve/veya inhibitör varlığında üretilen H₂O₂'nin seviyesini ölçmek için kullanıldı. LSD1'in maksimum demetilaz aktivitesi, inhibitör olmadan elde edildi ve LSD1 olmadan arka plan floresan için düzeltildi. Her inhibitörün IC₅₀ değeri GraphPad Prism Yazılımı ile hesaplandı.

2.2 MONOAMİN OKSİDAZ A (MAO-A) VE B (MAO-B)

- 25 LSD1, yapısal benzerliğin makul bir derecesine ve flavin bağlı amin oksidazlar monoamin oksidaz A (MAO-A) ve B (MAO-B) ile amino asit kimliği/homolojisine sahiptir. LSD1 inhibitörüne karşı MAO-A ve MAO-B'nin seçicilik seviyesinin belirlenmesi için, MAO-A ve MAO-B'ye karşı ilgili bileşiğin inhibe edici aktivitesi, aşağıda açıklanan yöntem kullanılarak test edilebilmektedir:
- 30 İnsan rekombinant monoamin oksidaz proteinler (MAO-A ve MAO-B), Sigma Aldrich'ten satın alındı. MAOlar, birincil, ikincil ve üçüncül aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalizlemektedir. MAO enzimatik aktivitelerin ve/veya inhibitörler tarafından bunların inhibisyon oranının izlenmesi için, bir floresan-bazlı (inhibitör)-görüntüleme tahlil ayarlandı. 3-(2-Aminofenil)-3-oksopropanamin (kinüramin dihidrobromür, Sigma Aldrich), bir floresan olmayan bileşik bir substrat olarak seçildi. Kinüramin, hem MAO-A hem de MAO-B aktiviteleri

için bir spesifik olmayan substrattır. MAO aktiviteleri ile oksidatif deaminasyona girilirken, kinüramin, 4-hidroksikinoline (4-HQ), bir nihai floresan ürününe dönüştürülmektedir.

Monoamin oksidaz aktivitesi, kinüraminin 4-hidroksi-kinoline dönüşümünün ölçülmesiyle tahmin edildi. Tahliller, 100 µL son hacimde berrak tabanlı (Corning) 96-kuyucuklu siyah plakada yürütüldü. Tahlil tamponu 100 mM HEPES, pH 7.5 idi. Her deney, aynı deneyde iki kere gerçekleştirildi.

Kısaca, sabit bir miktarda MAO, ilgili inhibitörün her birinde en az sekiz 3-kat seri seyreltme olmadan ve/veya bunun varlığında reaksiyon tamponunda 15 dakika için buz üzerinde inkübe edilmiştir. Clorgyline ve Deprenyl (Sigma Aldrich) sırasıyla MAO-A ve MAO-B'nin sırasıyla inhibisyonu için bir kontrol olarak kullanıldı.

İnhibitör ile etkileşime giren enzim(ler) bırakıldıktan sonra, kinüraminin K_M 'si, sırasıyla (MAO-A) ve (MAO-B) tahlili için her reaksiyona eklendi ve reaksiyon karanlıkta 37°C'de 1 saat boyunca bırakıldı. Substratın oksidatif deaminasyonu, 50 µL 2N NaOH eklenmesiyle durduruldu. Kinüraminin 4-hidroksikinoline dönüşümü, bir mikrolaka okuyucusu (Infinite 200, Tecan) kullanılarak floresan (320 nm'de uyarılma, 360 nm'de emilme) izlendi. İsteğe göre birimler, inhibitör olmadan ve/veya inhibitör varlığında üretilen H_2O_2 'nin seviyesini ölçmek için kullanıldı.

Oksidatif deaminasyon aktivitesinin maksimumu, inhibitör olmadan kinüramin deaminasyonundan oluşturulan 4-hidroksikinolin miktarının ölçülmesiyle elde edildi ve MAO enzimleri olmadan arka plan floresan için düzeltildi. Her inhibitörün IC_{50} değeri GraphPad Prism Yazılımı ile hesaplandı.

2.3 SONUÇLAR

Bileşik 1 ve ORY-LSD1 için yukarıdaki yöntemler kullanılarak elde edilen LSD1, MAO-A ve MAO-B'ye karşı örnek IC_{50} değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir:

Bileşik	LSD1 IC_{50} (µM)	MAO-B IC_{50} (µM)	MAO-A IC_{50} (µM)
Bileşik 1	0.09	0.06	5.3
ORY-LSD1	0.010	>100	>100

Yukarıdaki verilerden görülebildiği gibi, Bileşik 1, bir potens çift LSD1/MAO-B inhibitörüdür. ORY-LSD1, MAO-A ve MAO-B üzerinden LSD1 için seçiciliğe sahip bir potens LSD1 inhibitörüdür.

5 Örnek 3: Farelerde deneysel otoimmün ensefalomyelit üzerinde Bileşik 1'in etkililiğinin değerlendirilmesi

Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit (EAE) modeli, insan multipl sklerozuna (MS) patolojik ve klinik benzerlikler göstermektedir ve MS için bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, MOG₃₅₋₅₅ ve C57BL/6 fare suşu kullanılarak burada açıklandığı gibi murin EAE modeli, MS'nin kronik gelişen formunun bir geçerli prelinik modeli olarak düşünülmektedir.

3.1 YÖNTEM

15

Aktif bağışıklık kazanma ile kronik EAE'nin indüklenmesi için, C57BL/6 fareleri, 4 mg/ml *Mikobakterium Tüberküloz* H37 RA barındıran tam Freund adjuvanında (CFA) emülsifiye edilmiş 100 µg miyelin oligodendrosit glikoproteini (MOG₃₅₋₅₅) ile s.c. bağışıklık kazanmıştır. Fareler ayrıca gün 0 ve 2de 200 ng boğmaca toksinin i.p. enjeksiyonları almıştır.

20

Tedavi gün 12 ila gün 16 bağışıklık kazanma ve gün 19 ila gün 23 bağışıklık kazanmadan sonraki beş ardışık gün için günde bir kere hastalığın (gün 12 bağışıklık kazandıktan sonra) başlangıcından itibaren, Bileşik 1'in (1 mg/kg veya 3 mg/kg) oral uygulanmasından oluşmuştur. Kontrol fareleri Bileşik 1 olarak aynı uygulama rejimini takiben vehikül [hacim cinsinden %2 Tween-80 + %98 HPβCD (ağırlık/hacim cinsinden %13)] oral olarak tedavi edildi. n=10 fare/grup, n=9 olduğu 3 mg/kg'da Bileşik 1 ile tedavi edilen grup dır.

25

Fareler, aşağıdaki klinik puanlama sistemine göre EAE'nin işaretleri için günlük olarak puanlandı. 0, klinik işaret yok; 0.5, kuyruk tonu kısmi kaybı; 1, kuyruk tonu tam kaybı; 2, zayıf kuyruk ve anormal yürüyüş; 3, arka bacak paralizi; 4, arka bacak parezisi ile arka bacak paralizi; 5, arka ve ön bacak paralizi; ve 6, ölüm.

30

3.2 SONUÇLAR

35 Tedavi edilmemiş kontrol fareleri, EAE'nin orta (hayvanların %30'u 1.5 ila 3 maksimum klinik

puana ulaştığıla ciddi (hayvanlarđı %70'i 3.5 ila 6 maksimum klinik puana ulaştığı) işaretler geliştirdi ve ciddi paralizden dolayı %40 oranında mortalite gösterdi. Bileşik 1 ile tedavi büyük oranda EAE'nin gelişimini inhibe etti ve şekil 1'de gösterildiği gibi günlük klinik puan ile ölçüldüğü gibi hastalđı insidansında ve şiddetini azalttı. Bileşik 1 ile tedavi edilen grupta, farelerin %40 ila 70'i orta semptomlar göstermiştir ve neredeyse %30'u hastalđı başlangıçından sonra tamamen 40 gün geri kazanıldı. Bileşik 1'in koruyucu etkisi, tedaviden belirli bir zaman periyodu sonra korundu.

Bu tahlilde elde edilen sonuçlara bağlı olarak, Bileşik 1'in, multipl sklerozun kronik gelişen formunu kapsayan multipl skleroz tedavisi için faydalı olduğu beklenmektedir.

3.3 BİLEşİK 1, 0.05 MG/KG OLARAK DÜşÜK DOZLARDA ETKİLİDİR

Yukarıdaki Örnek 3.1'de açđılan aynđ EAE tahlil protokolü kullanılarak, Bileşik 1 gün 12 ila gün 16 bağışık kazanma ve gün 19 ila gün 23 bağışık kazanmadan sonraki beş ardışık gün için günde bir kere gün 12'den bağışık kazanma sonrasında başlayan 1, 0.5 ve 0.05 mg/kg p.o.'da test edildi. Kontrol fareleri aynđ uygulama rejimini takiben vehikül [hacim cinsinden %2 Tween-80 + %98 HPβCD (ađđık/hacim cinsinden %13)] ile oral olarak tedavi edildi. Fareler, Örnek 3.1'de açđılan klinik puanlama sistemine göre EAE'nin işaretleri için günlük olarak puanlandı. n=10 fare/grup. şekil 2'de gösterildiği gibi, Bileşik 1, 0.05 mg/kg p.o.kadar düşük dozlarda klinik puanı azaltarak, EAE üzerinde açđ bir etki göstermiştir.

3.4 BİLEşİK 1'İN ETKİLERİNİN DİĞER LSD1 İNHİBİTÖRÜ İLE KARşILAşTIRILMASI

Örnek 3.1'in EAE modeli kullanılarak, Örnek 1'de daha ayrıntı olarak açđılan diğer siklopropilamino-bazlı tersinmez LSD1 inhibitörü, ORY-LSD1'i test ettik. ORY-LSD1, LSD1'in bir potens ve seçici inhibitörüdür.

ORY-LSD1'e sahip Örnek 3.1'de Bileşik 1 ile elde edilen sonuçları karşılaştışabilmesi için ve iki bileşik LSD1'e (kendi IC50 değerleri için Örnek 2'ye bkz) karşı *in vitro* potansiyeller bakımından farklı olduğundan dolayı, ORY-LSD1, *in vivo* LSD1 inhibisyonuna göre Örnek 3.1'de Bileşik 1 için kullanılabilecek eşdeğer olarak seçilen dozlarda EAE tahlilinde uygulandı. ORY-LSD1, 0.06 ve 0.180 mg/kg p.o'da verildi. ORY-LSD1 veya vehikül (Örnek 3.1'deki ile aynđ) Örnek 3.1'de açđıldığı gibi (n=10 fare/grup), uygulama şemasına takiben uygulandı.

ORY-LSD1 ile elde edilen sonuçlar Şekil 3'te gösterilmektedir. ORY-LSD1, gelişme için açık bir eğilim sağlamışken, ORY-LSD1, Bileşik 1'den önemli oranda daha az etkili idi. Bileşik 1, böylece multipl sklerozun tedavisi için özellikle uygun bir bileşiği simgelemektedir.

5 Örnek 4: Farelerde EAE model üzerinde Bileşik 1'in terapötik etkilerin diğer karakterizasyonu

Örnek 3'ün EAE modelinde Bileşik 1'in terapötik etkilerini ayrıca karakterize etmek için, Bileşik 1 ayrıca 0.5 mg/kg p.o.'da test edildi ve protein ile histopatolojik analiz gerçekleştirildi.

- 10 Bileşik 1 ile tedavi yukarıdaki Örnek 3.1'de açıklandığı gibi aynı şemayı takip etmiştir, yani gün 12 ile gün 16 bağışıklık kazanma ve gün 19 ile gün 23 bağışıklık kazanmadan sonraki beş ardışık gün için günde bir kere gün 12'de bağışıklık kazanma sonrasında başlamaktadır. Kontrol fareleri Bileşik 1 olarak aynı uygulama rejimini takiben vehikül [hacim cinsinden %2 Tween-80 + %98 HPβCD (ağırlık/hacim cinsinden %13)] ile oral olarak tedavi edildi. Fareler,
- 15 Örnek 3.1'de açıklanan puanlar kullanılarak EAE'nin işaretleri için günlük olarak puanlandı. Hayvanlar, gün 26 bağışıklık kazanma sonrasında öldürüldü ve numuneler toplandı ve aşağıda açıklandığı gibi işlendi. n=10 fare/grup.

4.1 YÖNTEMLER

20

Doku toplanması ve hücre izolasyonu. Gün 26 bağışıklık kazanma üzerine, dalak, akciğer lenf nodülleri (DLNler: servikaller, inguinaller ve aksiller) ve spinal kord çöktürüldü. Servikal ve lumbar bölgelerinin spinal segmentleri ayrı ayrı hazırlandı ve protein ekstraksiyonu ve histopatolojik analiz için işlendi. Tek-hücreli süspansiyonlar dalaktan elde edildi veya lenf nodüllerinde birleştirildi, numuneler homojen hale getirildi ve Neubauer haznesi kullanılarak toplam hücre sayımları yapıldı.

25

Histopatolojik analiz için numunelerin işlenmesi. Servikal ve lumbar spinal kord segmentleri, inklüzyon ve parafinde bölmelendirme için bölündü ve işlem gördü. Spinal kord segmentleri 48sa boyunca %10 tamponlanmış formalin ile hemen sabitlendi, dehidre edildi ve standart teknikler kullanılarak parafina dahil edildi. Transversal bölmeler (4-µm kalınlığında) Lüksol hıncı, kresil viyole ve Klüver-Barrera tekniğini takiben hematoksilin ile boyandı ve bir ışık mikroskopu (Leica, DM2000) kullanılarak demiyelinizasyon alanları ve hücre filtrelemesi varlığında analiz edildi.

35

Protein ekstraksiyonu ve sitokin/kemokin analizi. Proteinler liziz tamponunda (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM DTT, ve 10 µg/ml proteinaz inhibitörleri PMSF, pepstatin, ve löpeptin) homojenleşme (50 mg doku/ml) ile spinal kordun servikal ve lumbal segmentlerden ekstrakt edildi. Numuneler santrifüjlendi (20.000 x g, 15 dk, 4°C) ve aşağıdaki antikorlar ve rekombinant proteinler kullanılarak imalatçının tavsiyelerine göre IL-4, IL-6, IL-1beta, IP-10 ve MCP-1 için spesifik sandviç ELISAlar kullanılarak süpernatantlar protein konsantrasyonu (Bradford yöntemi kullanılarak) için ve sitokin/kemokin içerikleri tahlil edildi:

IL-4	Saflaştırılmış Sığır Anti-Fare IL-4. BD Pharmingen. 0.5mg/ml .Ref: 554387. Rekombinant Fare IL-4. BD Pharmingen. 0.2mg/ml. Ref: 550067. Biyotin Sığır Anti-Fare IL-4. BD Pharmingen. 0.5mg/ml. Ref: 554390
IL-6	Saflaştırılmış Sığır Anti-Fare IL-6. BD Pharmingen. 0.5mg/ml. Ref: 554400. Rekombinant Fare IL-6. BD Pharmingen. 0.1mg/ml. Ref: 554582. Biyotin Sığır Anti-Fare IL-6. BD Pharmingen. 0.5mg/ml. Ref: 554402.
IL-1 beta	Saflaştırılmış Hamster Anti-Fare IL-1 Beta. BD Pharmingen. 0.5mg/ml Ref: 550605. Rekombinant Murin IL-1 Beta. Peprotech. 0.1mg/ml. Ref: 211-11B. Biyotinlenmiş Tavşan Anti-Murin IL-1 Beta. Peprotech. 0.4mg/ml .Ref: 500-P51 Bt.
IP-10	Anti-Murin IP-10 Antijen Afinite Saflaştırılmış Poliklonal Antikor. Peprotech. 0.5mg/ml Ref: 500-P129. Rekombinant Murin IP-10 (CXCL10). Peprotech. 0.1mg/ml. Ref : 250-16. Biyotinlenmiş Antijen Afinite Saflaştırılmış Anti-Murin IP-10. Peprotech. Ref: 500-P129Bt. 0.5mg/ml
MCP-1	Anti-Murin JE/MCP-1. Antijen Afinite Saflaştırılmış Poliklonal Antikor. Peprotech. 0.5mg/ml. Ref: 500-P113. Rekombinant Murin JE/MCP-1 (CCL2). Peprotech. 0.1mg/ml. Ref : 250-10. Biyotinlenmiş Anti-Murin JE Antijen Afinite Saflaştırılmış Poliklonal Antikor. Peprotech. 0.5mg/ml. Ref: 500-P113Bt.

İstatistiksel Analiz: Lenf nodüllerinde ve dalakta hücre sayı analizi: istatistiksel analizler ANOVA testi kullanılarak ***p<0.001 karşı vehikül olarak gösterilmektedir. Sitokin/kemokin seviyesi analizi: istatistiksel farklar şöyle gösterilmektedir: Mann-Whitney test kullanılarak *p<0.05, **p<0.005; çiftleşmemiş t-testi IP-10 seviyesi analizi için kullanıldı

4.2 SONUÇLAR

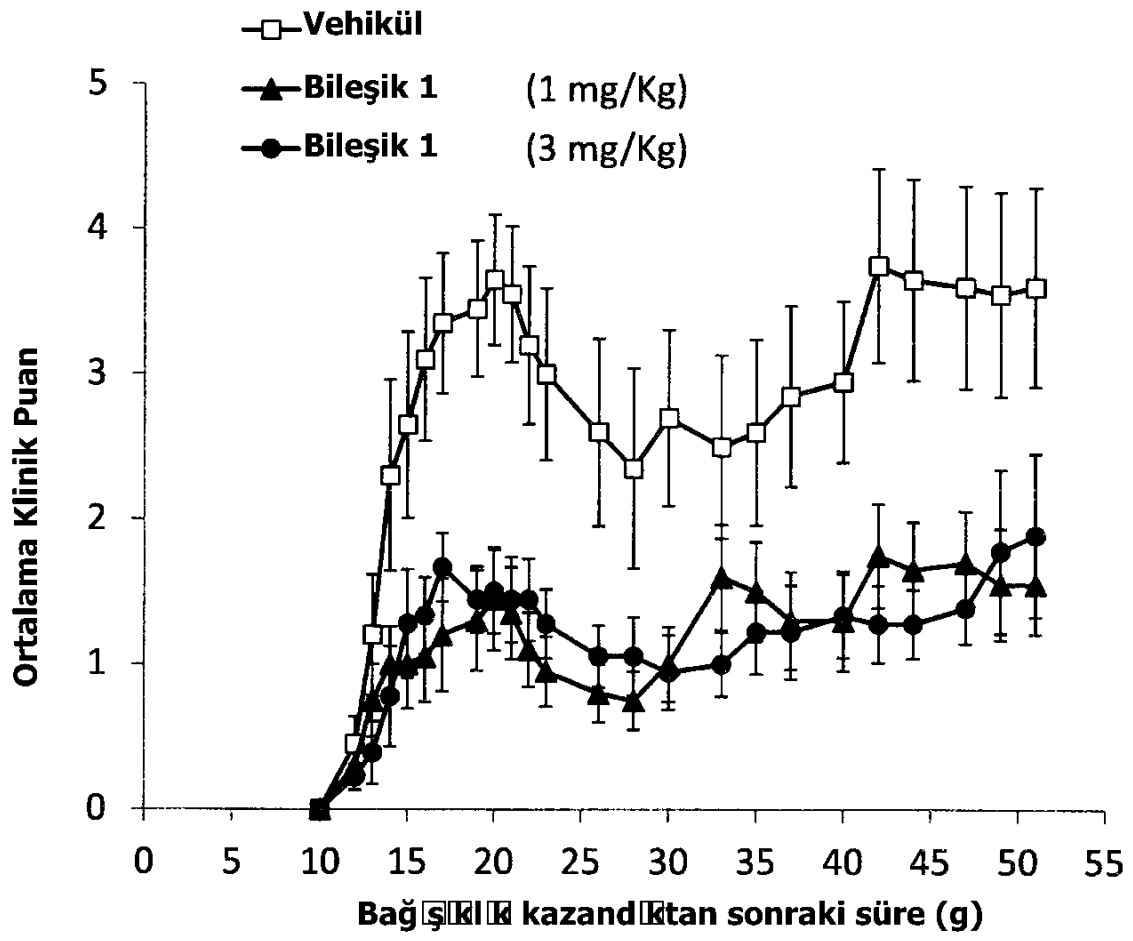
0.5 mg/kg p.o.'da Bileşik 1 ile tedavi, uzun bir tedavi süresi için fareler tarafından iyi tolere edilen bir doz, büyük oranda EAE'nin gelişimini inhibe etti ve Şekil 4'te gösterildiği gibi günlük klinik puan ile ölçüldüğü üzere hastalığın insidansını ve şiddetini azalttı

Bileşik 1, Şekil 5'te gösterildiği gibi, EAE farelerinin spinal kordunda inflamatuvar hücreler ve demiyelinizasyonun filtrelemesini büyük oranda azalttı. Söz konusu şekillerdeki oklar, demiyelinizasyon ve inflamatuvar hücre filtreleme alanlarını göstermektedir. Demiyelinizasyon

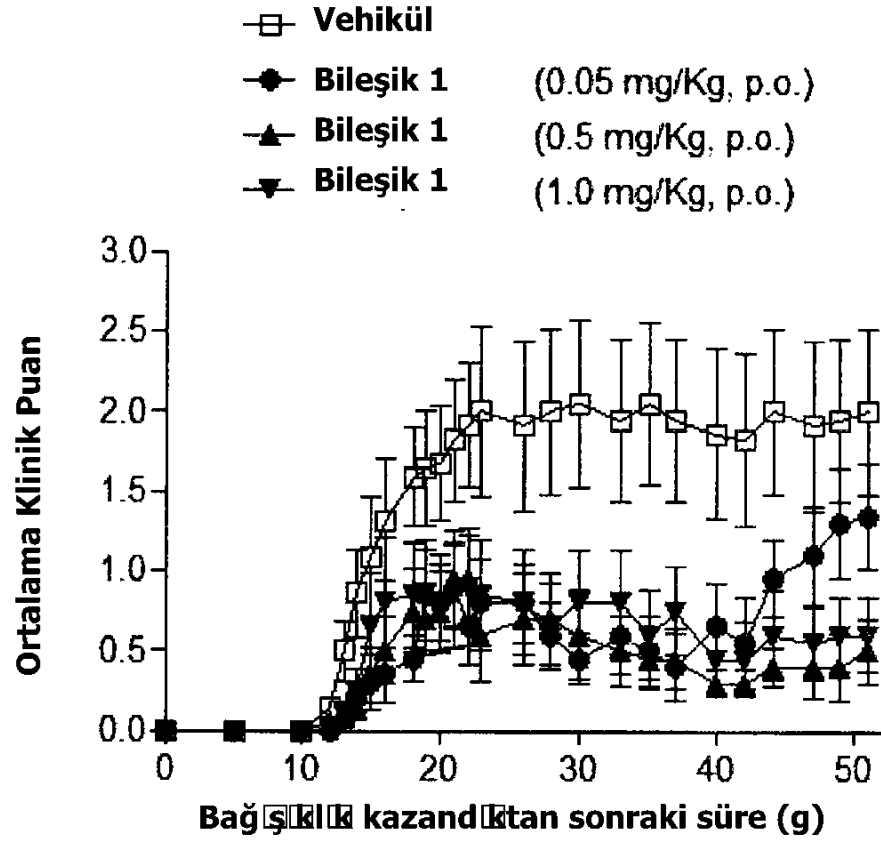
çoklu alanlar ve inflamatuvar hücre filtreleme, hem servikal hem de lumbar numunelerde kontrol (vehikül-tedavili hayvanlar) numunelerinde gözlemlenirken inflamatuvar hücre filtreleme ya da demiyelinizasyon alanları olmaması Bileşik 1 ile işlem görmüş numunelerde gözlemlendi. Şekil 6, Örnek 1 veya vehikülde Bileşik 1 ile tedavi edilen hayvanların lumbar ve servikal bölgelerde ortalama sayıda demiyelinizasyon plakları göstermektedir, şurada Bileşik 1 ile tedavi edilen hayvanların servikal ve lumbar spinal kord bölmelerinde olmayan veya büyük oranda azalan demiyelinizasyonu göstermektedir. Şekiller 5 ve 6'da gösterildiği gibi bu sonuçlar, Bileşik 1'in spinal korda immün filtrelemeyi azalttığını ve multipl sklerozun EAE modelinde demiyelinizasyondan spinal kord koruduğunu göstermektedir.

Şekil 7'de gösterildiği gibi, Bileşik 1, immün dokulardan lenfositlerin bir azalmış kazarlığını göstererek, tedavi görmüş hayvanların dalak ve lenf nodüllerinde tutulan immün hücrelerin sayısında önemli bir artışla sonuçlanmıştır. Buna ek olarak, Bileşik 1 ile tedavi, Şekiller 8A ile 8E'de gösterildiği gibi, inflamatuvar ve oto-immün yanıtı modüle etmektedir. Antiinflamatuvar sitokin IL-4, Th2 anti-inflamatuvar yanıt göstergesi olan Bileşik 1-tedavi edilmiş hayvanların spinal kordlarında büyük oranda artmıştır (Şekil 8A). Spinal kordda pro-inflamatuvar sitokin IL-6 ve IL-1beta seviyeleri, Bileşik 1 tedavisi ile azalmıştır (Şekil 8B ve 8C). Buna ek olarak, spinal korda inflamatuvar ve enseptalitojenik Th1 hücrelerinin iyileştirmeye dahil edilen IP-10 (Şekil 8D) ve MCP-1 (Şekil 8E) içeren hedef organda çeşitli kemokin seviyelerini önemli oranda azaltmıştır. Bu sonuçlar, Bileşik 1'in özellikle multipl sklerozun tedavisi için bir terapötik ajan olarak uygun olduğunu doğrulamaktadır.

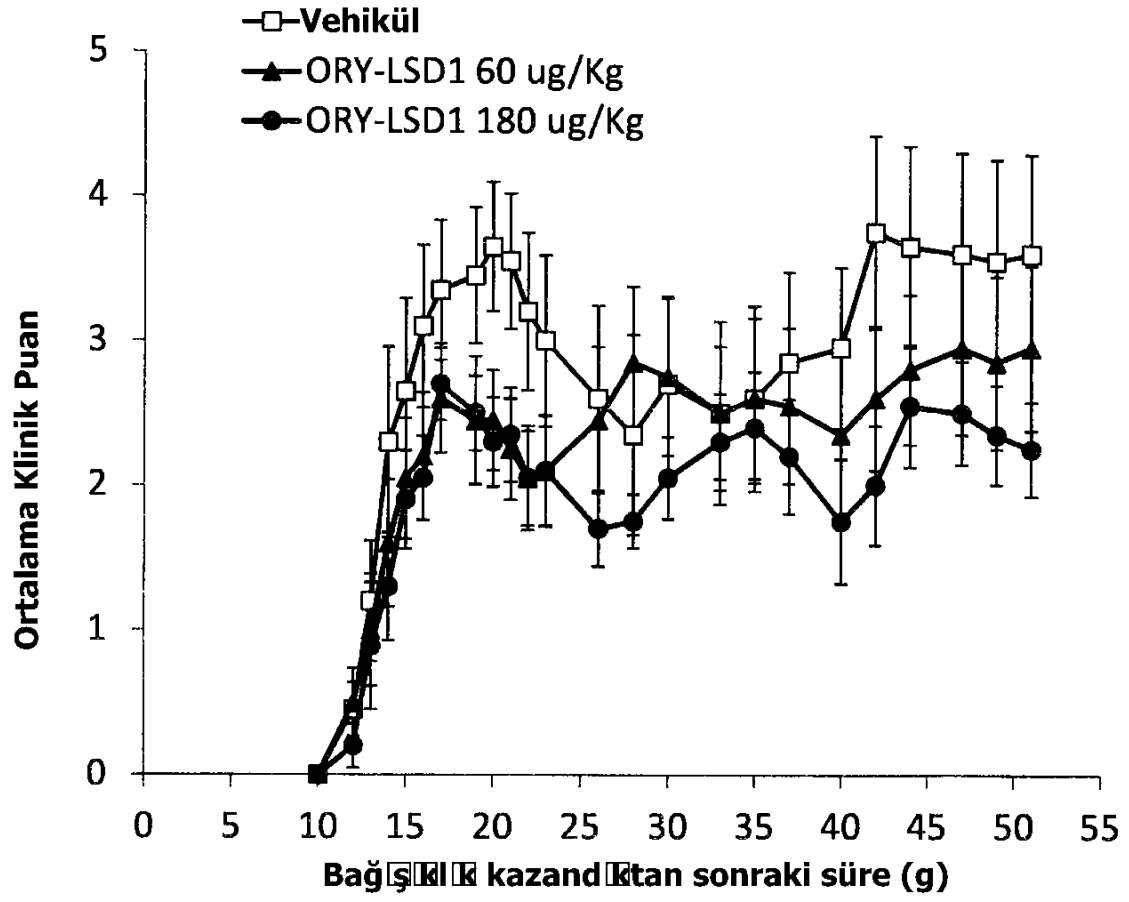
Şekil 1



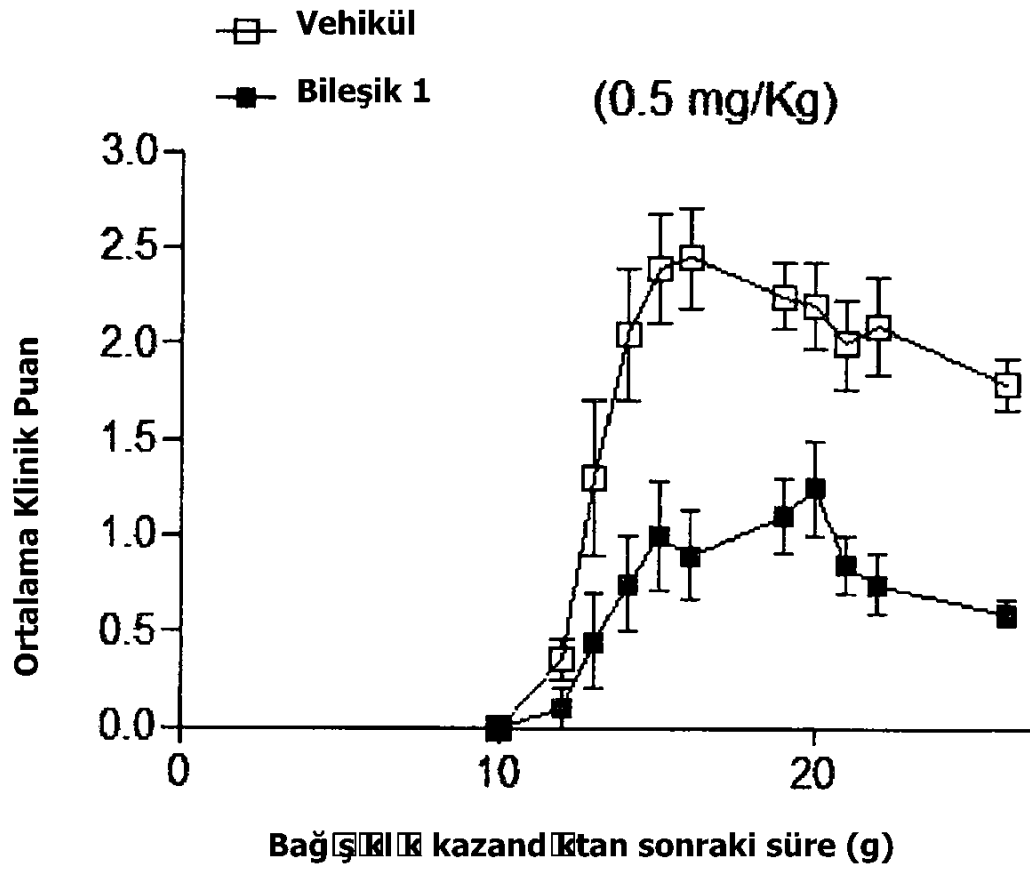
Şekil 2



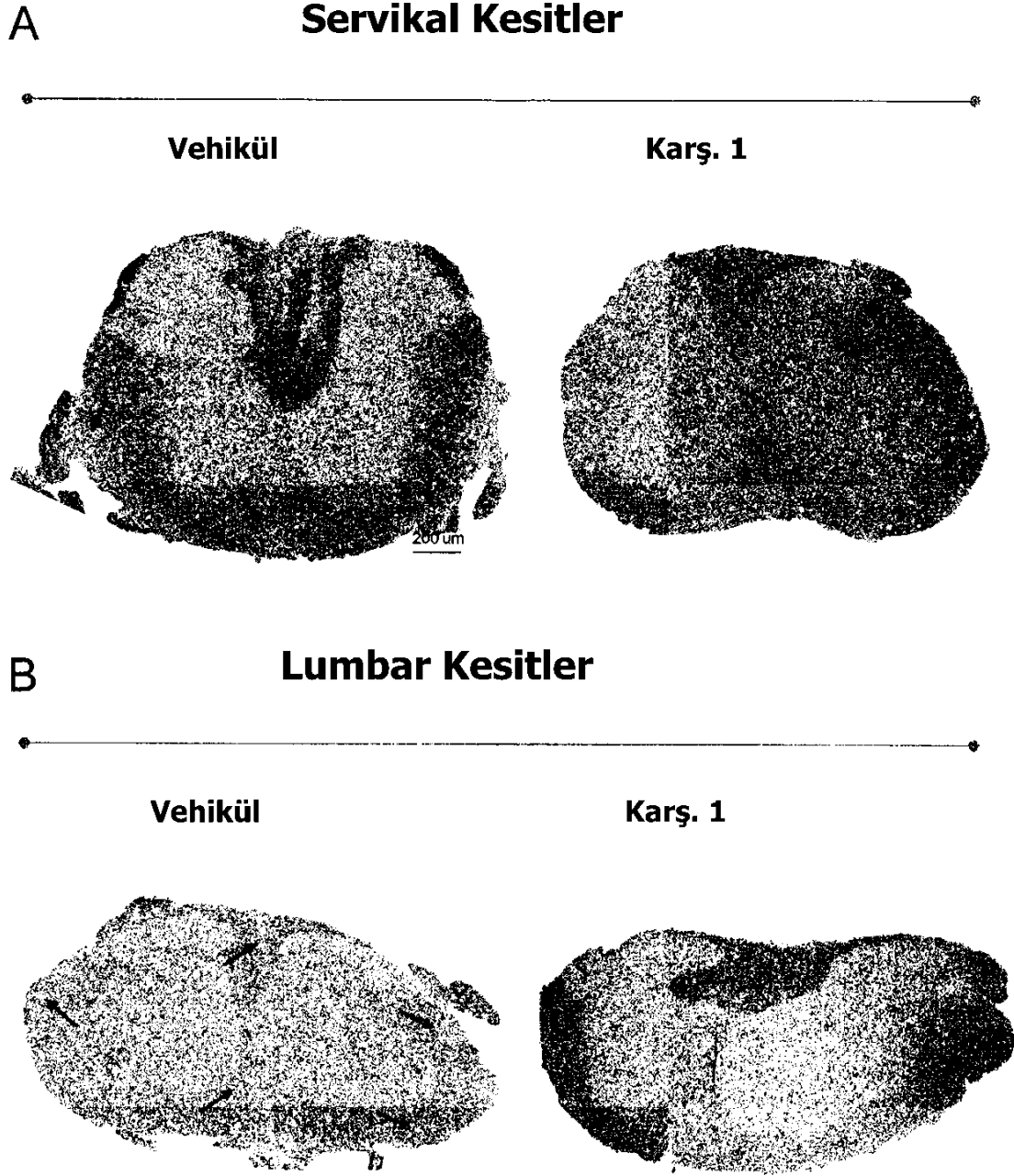
Şekil 3



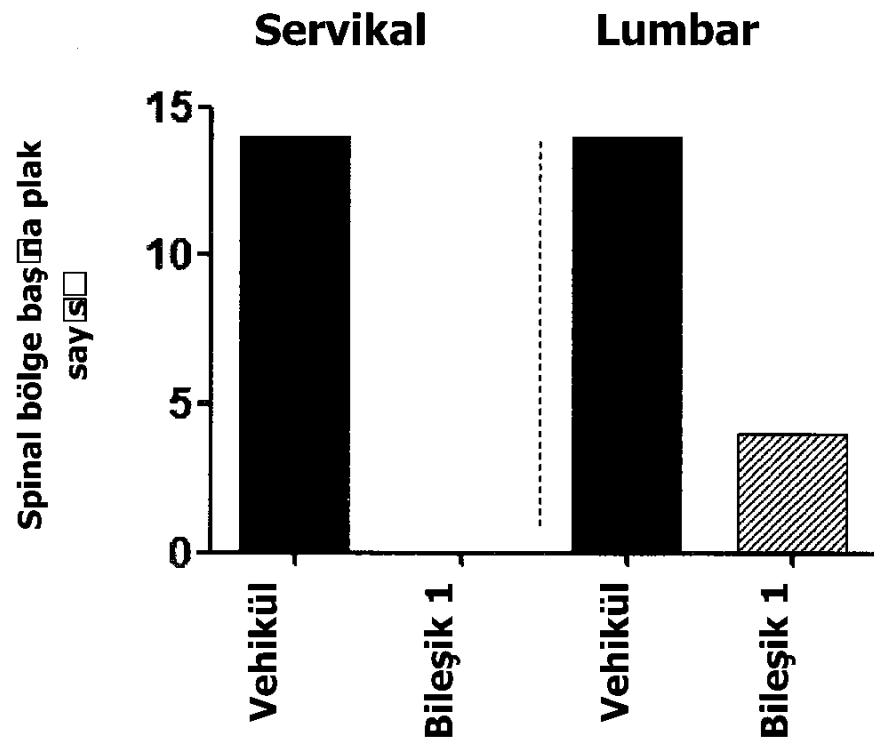
Şekil 4



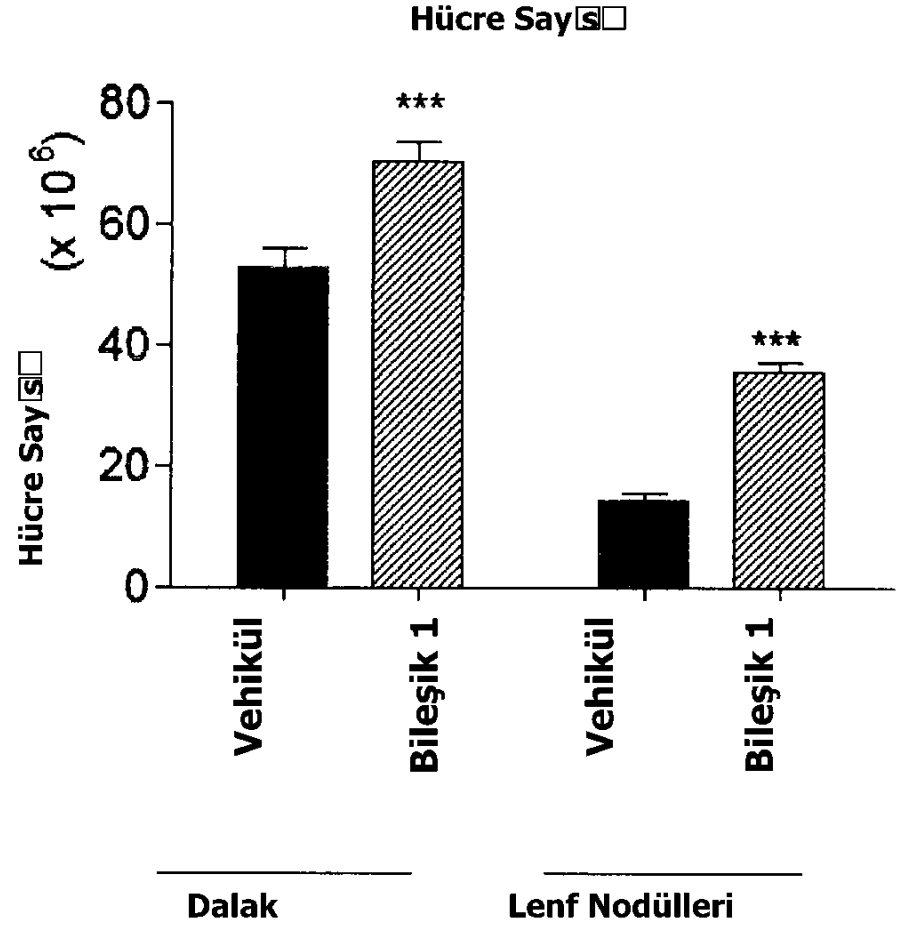
Şekil 5



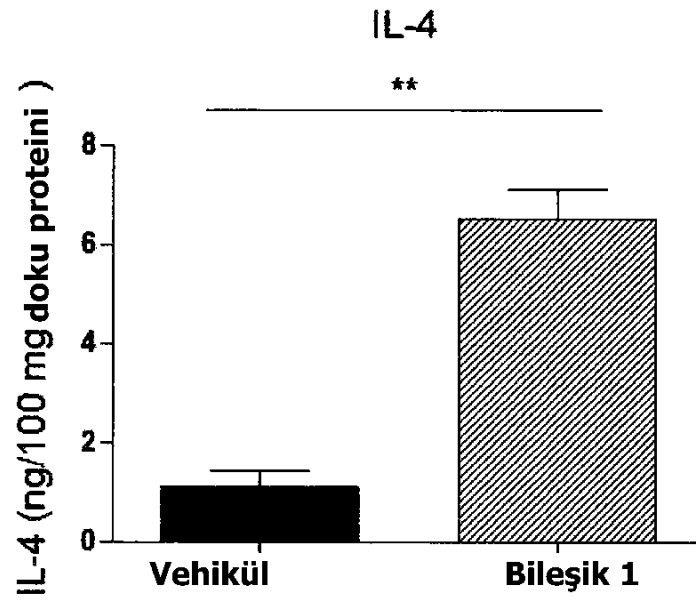
Şekil 6



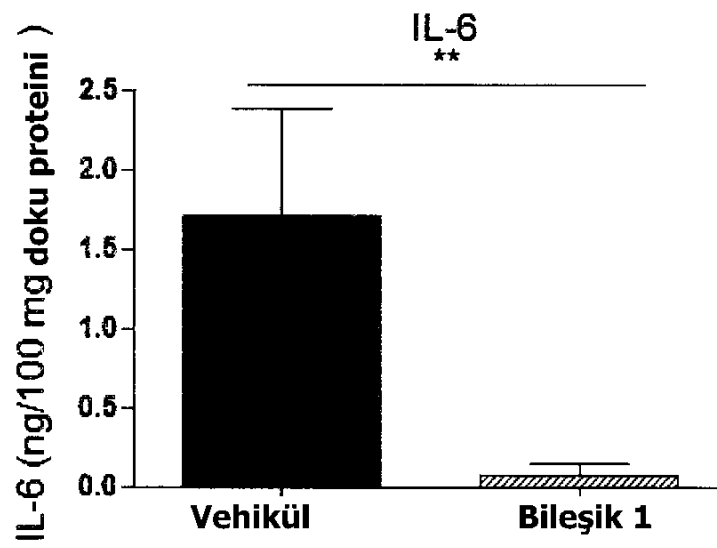
Şekil 7



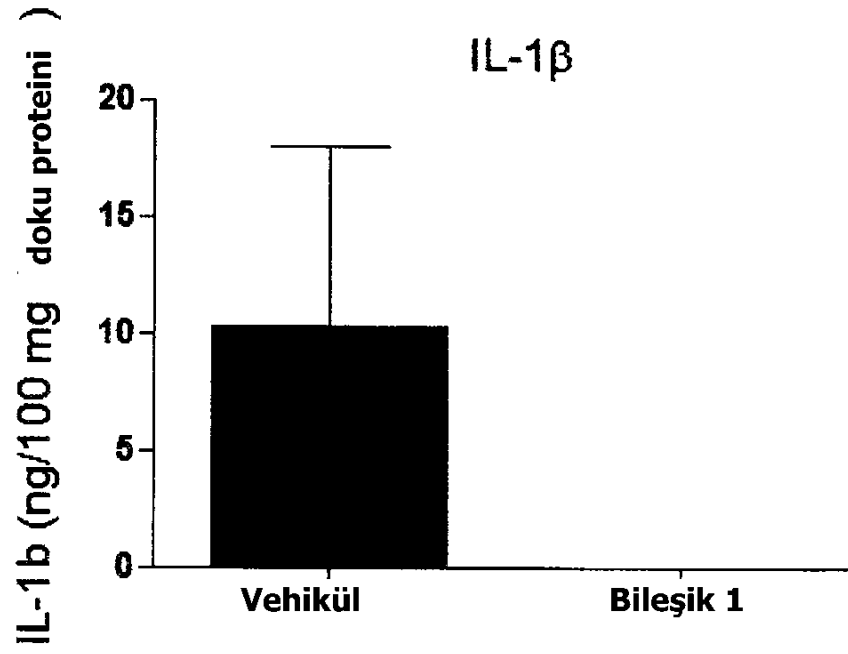
Şekil 8A



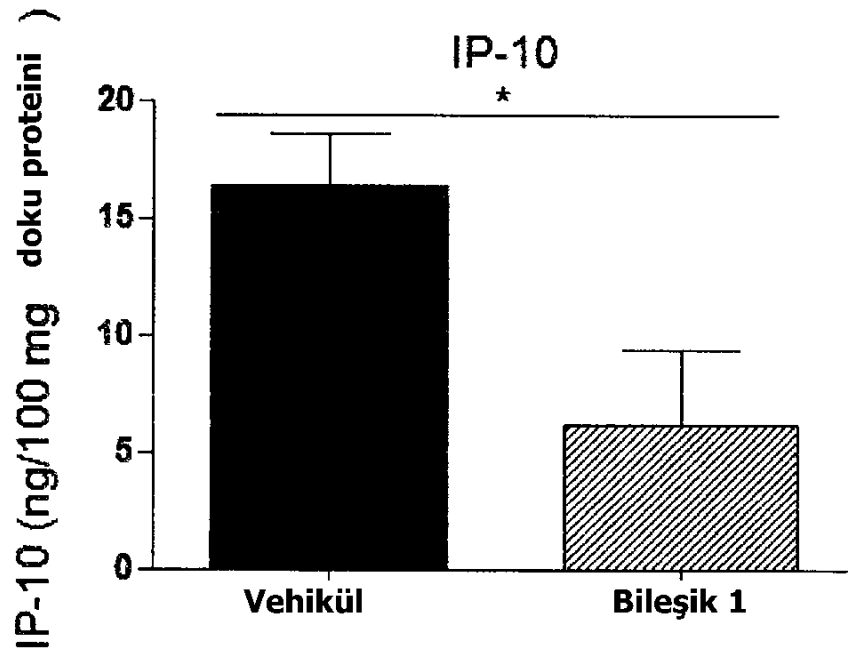
Şekil 8B



Şekil 8C



Şekil 8D



Şekil 8E

