



(51) МПК

A61K 31/255 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003100076/14, 06.07.2001

(24) Дата начала действия патента: 06.07.2001

(30) Приоритет: 07.07.2000 (пп.1-9) US 60/217,141
20.02.2001 (пп.10-14) US 60/270,022

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2004

(45) Опубликовано: 27.01.2006 Бюл. № 03

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 9944581, 10.09.1999, описание. WO 0061139, 19.10.2000. WO 0076493, 21.12.2000. WO 9800130, 08.01.1998. Клиническая эндокринология. Рук. для врачей под ред. проф. Н.Т.Старковой. - М.: Медицина, 1991, с.193 абзац 2, с.197 абзац 3, с.198 абзац 1-2, с.199 абз.5. БАЛАБОЛКИН М.И. Диабетология. - М.: Медицина, 2000, с.222-223, 234-235, 290-293.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 04.01.2003

(86) Заявка РСТ:
US 01/21404 (06.07.2001)(87) Публикация РСТ:
WO 02/03984 (17.01.2002)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е. Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

ПЛАТА-САЛАМАН Карлос (US),

КРУК Джеффри (US)

(73) Патентообладатель(ли):

ОРТО-МАКНЕЙЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛ, ИНК. (US)

(54) ПРОТИВОСУДОРОЖНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА И СИНДРОМА X

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается использования у млекопитающих противосудорожных производных, таких как топирамат, для профилактики развития сахарного диабета 2-го типа и синдрома X, лечения и профилактики кожных повреждений, связанных с

этимися заболеваниями. Изобретение позволяет предотвратить повышение уровней глюкозы, триглицеридов и инсулина в крови, независимо от массы тела, и тем самым предотвратить развитие вышеуказанных состояний. 3 н. и 11 з.п. ф-лы, 11 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 31/255 (2006.01)

A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2003100076/14, 06.07.2001

(24) Effective date for property rights: 06.07.2001

(30) Priority: 07.07.2000 (cl.1-9) US 60/217,141
20.02.2001 (cl.10-14) US 60/270,022

(43) Application published: 27.04.2004

(45) Date of publication: 27.01.2006 Bull. 03

(85) Commencement of national phase: 04.01.2003

(86) PCT application:
US 01/21404 (06.07.2001)(87) PCT publication:
WO 02/03984 (17.01.2002)Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E. Nazinoj, reg.№ 517

(72) Inventor(s):

PLATA-SALAMAN Karlos (US),
KRUK Dzheffri (US)

(73) Proprietor(s):

ORTO-MAKNEJL FARMAS'JuTIKAL, INK. (US)

(54) ANTICONVULSIVE DERIVATIVES APPLIED FOR PREVENTING THE DEVELOPMENT OF DIABETES MELLITUS AND SYNDROME X

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: one should apply anticonvulsive derivatives in mammals such as topiramate for preventing the development of non-insulin dependent diabetes mellitus and syndrome X, treating and preventing skin diseases associated

with these diseases. The innovation suggested enables to prevent increased blood levels of glucose, triglycerides and insulin despite patient's body weight and, thus, avoid the development of the above-mentioned states.

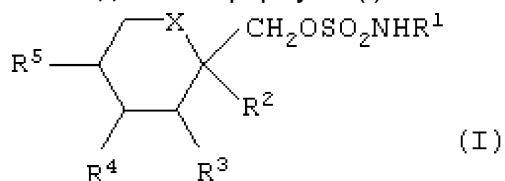
EFFECT: higher efficiency of prophylaxis.

19 cl, 5 ex, 11 tbl

По данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США Сер. №60/217141, заявленной 07 июля 2000 года, и предварительной заявке на патент США Сер. №60/270022, заявленной 20 февраля 2001 года, содержание которых включено в данное описание в виде ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соединения формулы (I)



представляют собой структурно новые противосудорожные соединения, которые в опытах на животных проявили высокую эффективность в качестве противосудорожных средств (MARYANOFF B.E., NORTEY S.O., GARDOCKI J.F., SHANK R.P., DODGSON S.P., J. Med. Chem., 1987, 30, 880-887; MARYANOFF B.E., COSTANZO M.J., SHANK R.P., SCHUPSKY J.J., ORTEGON M.E., VAUGHT J.L., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2653-2656; SHANK R.P., GARDOCKI J.F., VAUGHT J.L., DAVIS C.B., SCHUPSKY J.J., RAFFA R.B., DODGSON S.J., NORTEY S.O., MARYANOFF B.E., Epilepsia, 1994, 35, 450-460; MARYANOFF B.E., COSTANZO M.J., NORTEY S.O., GRECO M.N., SHANK R.P., SCHUPSKY J.J., ORTEGON M.P., VAUGHT J.L., J. Med. Chem., 1988, 41, 1315-1343). Данные соединения защищены тремя патентами США: №4513006, №5242942 и №5384327. Одно из этих соединений - сульфамат 2,3:4,5-бис-О-(1-метилэтилиден)-β-D-фруктопиранозы, известный как топирамат (topiramate), - в клинических испытаниях по действию на эпилепсию человека продемонстрировало высокую эффективность в качестве вспомогательного или основного терапевтического средства в лечении простых и психомоторных эпилептических припадков, а также вторичных генерализированных эпилептических припадков (E.FAUGHT, B.J.WILDER, R.E.RAMSEY, R.A.REIFE, L.D.KRAMER, G.W.PLEDGER, R.M.KARIM et al., Epilepsia, 1995, 36 (S4), 33; S.K.SACHDEO, R.C.SACHDEO, R.A.REIFE, P.LIM, G.PLEDGER, Epilepsia, 1995, 36 (S4), 33; T.A.GLAUSER, Epilepsia, 1999, 40(S5), S 71-80; R.C.SACHDEO, Clin. Pharmacokinet., 1998, 34, 335-346) и в настоящее время продается для лечения приступов у пациентов с простой и психомоторной эпилепсией и у пациентов с первичными или вторичными генерализированными эпилептическими припадками в США, Европе и большинстве других стран всего мира.

Первоначально было установлено, что соединения формулы (I) проявляют противосудорожную активность в стандартном тесте приступа максимального электрошока (maximal electroshock seizure - MES) на мышах (SHANK R.P., GARDOCKI J.F., VAUGHT J.L., DAVIS C.B., SCHUPSKY J.J., RAFFA R.B., DODGSON S.J., NORTEY S.O., MARYANOFF B.E., Epilepsia, 1994, 35, 450-460). Последующие исследования показали, что соединения формулы (I) высокоэффективны и в MES-тесте на крысах. Было также установлено, что топирамат также эффективно блокирует эпилептические припадки в некоторых моделях эпилепсии на грызунах (J.NAKAMURA, S.TAMURA, T.KANDA, A.ISHII, K.ISHIHARA, T.SERIKAWA, J.YAMADA, M.SASA, Eur. J.Pharmacol., 1994, 254, 83-89) и в моделях наследственной (kindled) эпилепсии на животных (A.WAUQUIER, S. ZHOU, Epilepsy Res., 1996, 24, 73-77).

Ранее было также установлено, что соединения формулы (I) эффективны для поддержания сниженной массы тела, как описано в WIPO публикации WO 00/61140, для лечения ожирения, как описано в патенте США №6071537 (WO 9800130), для снижения содержания в крови глюкозы, как описано в WIPO публикации WO 00/61139, и для снижения содержания липидов, как описано в WIPO публикации WO 00/61137. В WIPO публикации WO 99/44581 (Thakur et al.) описывается применение топирамата для лечения диабета.

Сахарный диабет II типа (инсулиннезависимый сахарный диабет - non-insulin-dependent diabetes mellitus - NIDDM) представляет собой нарушение обмена веществ, вызывающее нарушение метаболизма глюкозы и инсулинорезистентность и последующие отдаленные

осложнения, затрагивающие глаза, почки, нервную систему и кровеносные сосуды.

Сахарный диабет II типа обычно развивается в зрелом организме (в среднем возрасте или позднее) и описывается либо как неспособность организма вырабатывать достаточное количество инсулина (патология секреции инсулина), либо как неспособность организма эффективно использовать инсулин (невосприимчивость к действию инсулина целевых органов и тканей). Другими словами, у пациентов, страдающих сахарным диабетом II типа, наблюдается относительная инсулиновая недостаточность. То есть у этих пациентов содержание инсулина в плазме имеет абсолютные показатели от нормальных до достаточно высоких, хотя они ниже, чем показатели, предсказанные для того содержания глюкозы в плазме, которое имеет место.

Сахарный диабет II типа характеризуется следующими клиническими признаками или симптомами: постоянно повышенная концентрация глюкозы в плазме или гипергликемия; полиурия; полидипсия и/или полифагия; хронические капиллярные осложнения, такие как ретинопатия, нефропатия и невропатия; сосудистые осложнения, такие как гиперлипидемия и гипертензия, которые могут приводить к слепоте, почечной недостаточности конечной стадии, ампутации конечностей и инфаркту миокарда.

Синдром X, называемый также синдромом инсулинорезистентности (Insulin Resistance syndrome - IRS), метаболическим синдромом (Metabolic Syndrome) или метаболическим синдромом X (Metabolic Syndrome X), является расстройством, которое предоставляет факторы риска развития сахарного диабета II типа и сердечно-сосудистого заболевания, включая интолерантность к глюкозе, гиперинсулинемию и инсулинорезистентность, гиперлипидемию, гипертензию и ожирение.

Диагностика сахарного диабета II типа включает оценку симптомов и определение содержания глюкозы в моче и крови. Определение содержания глюкозы в крови является обязательным для точного диагноза. Например, применяемым стандартным способом является определение содержания глюкозы в крови на голодный желудок (натощак). Однако считается, что пероральная проба на толерантность к глюкозе (oral glucose tolerance test - OGTT) является более чувствительным тестом, чем определение содержания глюкозы в крови натощак. Сахарный диабет II типа ассоциируется с ослаблением пероральной толерантности к глюкозе. Следовательно, OGTT может способствовать диагностике сахарного диабета II типа, хотя обычно и не является обязательным тестом для диагноза диабета (Emancipator K., Am. J. Clin. Pathol., 1999, Nov; 112 (5): 665-74; Type 2 Diabetes Mellitus, Decision Resources Inc., March 2000). OGTT позволяет оценивать секреторную функцию β -клеток поджелудочной железы и чувствительность инсулина, что помогает диагностировать сахарный диабет II типа и оценить тяжесть или прогрессирование заболевания (например, Caumo A., Bergman R.N., Cobelli C., J. Clin. Endocrinol Metab., 2000, 85 (11): 4396-402). То есть OGTT чрезвычайно полезна при установлении степени гипергликемии у пациентов с множественными граничными содержаниями глюкозы в крови (при определении натощак), которые не были диагностированы как больные диабетом. Кроме того, OGTT полезна при тестировании пациентов с симптомами сахарного диабета II типа, у которых должен быть точно поставлен или подтвержден возможный диагноз патологии углеводного обмена.

Следовательно, ослабленная толерантность к глюкозе диагностируется у пациентов, содержание глюкозы в крови (определение натощак) у которых меньше, чем это необходимо для диагноза сахарного диабета II типа, но ответное содержание глюкозы в плазме в процессе осуществления OGTT, находится в интервале от нормального до диабетического. Ослабление толерантности к глюкозе рассматривается как преддиабетическое состояние, и сниженная толерантность к глюкозе (определенная с помощью OGTT) является серьезным сигналом опасности развития сахарного диабета (Haffner S.M., Diabet. Med. 1997, Aug; 14 Suppl. 3:S 12-8).

Сахарный диабет II типа является прогрессирующим заболеванием, связанным с ослаблением функции поджелудочной железы и/или другими инсулинзависимыми процессами, осложненными повышенным содержанием глюкозы в плазме. Следовательно,

сахарный диабет II типа обычно имеет длительную преддиабетическую фазу, и различные патофизиологические механизмы могут приводить к патологической гипергликемии и сниженной толерантности к глюкозе, например, нарушение утилизации и аномальная эффективность использования глюкозы, аномальное действие инсулина и/или его аномальное продуцирование в преддиабетической стадии (Goldberg R.B., Med. Clin. North. Am., 1998, Jul.; 82 (4): 805-21).

Преддиабетическое состояние, связанное с глюкозной интолерантностью, может также ассоциироваться с предрасположенностью к патологическому ожирению, инсулинорезистентностью, гиперлипидемией и высоким кровяным давлением, то есть синдромом X (Groop L., Forsblom C., Lehtovirta M., Am. J. Hypertens, 1997, Sep.; 10 (9 Pt 2): 172 S - 180 S; Haffner S.M., J. Diabetes Complications, 1997, Mar-Apr.; 11 (2): 69-76; Beck-Nielsen H., Henriksen J.E., Alford F., Hother-Nielson O., Diabet. Med., 1996, Sep.; 13 (9 Suppl. 6): S 78-84).

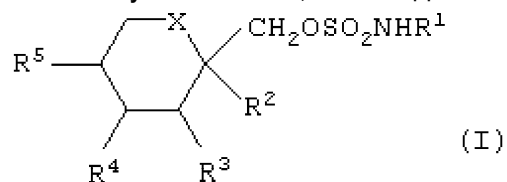
Следовательно, нарушение углеводного обмена является главным событием патогенеза сахарного диабета II типа и ослабленной толерантности к глюкозе (Dinneen S.F., Diabet. Med., 1997, Aug.; 14 Suppl. 3: S 19-24). Фактически развитие сахарного диабета II типа является продолжением развития ослабленной толерантности к глюкозе и сниженного содержания глюкозы в крови (при определении натощак) (Ramlo-Halsted B.A., Edelman S.V., Prim. Care, 1999, Dec.; 26 (4): 771-89).

Воздействие на пациентов при риске развития сахарного диабета II типа на ранней стадии, направленное на снижение патологической гипергликемии или ослабленной толерантности к глюкозе, может предотвратить или замедлить развитие сахарного диабета II типа и связанных с ним осложнений и/или синдрома X. Поэтому эффективным лечением ослабленной пероральной толерантности к глюкозе и/или повышенного содержания глюкозы в крови можно предотвратить или ингибировать развитие сахарного диабета II типа или синдрома X.

Многие противодиабетические лекарственные средства, обычно предписываемые для лечения сахарного диабета II типа и/или синдрома X, например сульфонилмочевины и тиазолидиндионы, обладают нежелательным побочным действием - вызывают повышение массы тела. Повышенная масса тела у пациентов с преддиабетическим состоянием, с диагностированным сахарным диабетом II типа или синдромом X приводит к неблагоприятным последствиям ввиду усиления метаболического и эндокринного дисбаланса, и само по себе ожирение является серьезным фактором риска для развития и прогрессирующего ухудшения сахарного диабета II типа. Следовательно, желательно располагать противодиабетическим средством, которое поддерживает постоянную или снижает массу тела.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

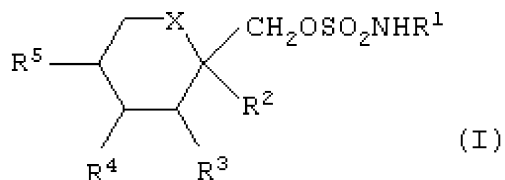
Было установлено, что соединения приведенной ниже формулы (I):



где X представляет собой O или CH₂, и R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ принимают значения, определенные далее, могут использоваться для профилактики развития сахарного диабета II типа и синдрома X.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВОПЛОЩЕНИЙ

Сульфаматы данного изобретения являются соединениями следующей формулы (I):

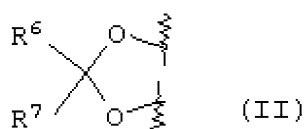


где

X представляет собой CH₂ или кислород;

R¹ представляет собой водород или алкил; и

R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляют собой водород или низший алкил и, когда X представляет собой CH₂, R⁴ и R⁵ могут представлять собой алкеновые группы, соединенные с образованием бензольного кольца, и, когда X представляет собой кислород, попарно R² и R³ и/или R⁴ и R⁵ могут представлять собой метилendiоксигруппу следующей формулы (II):



где

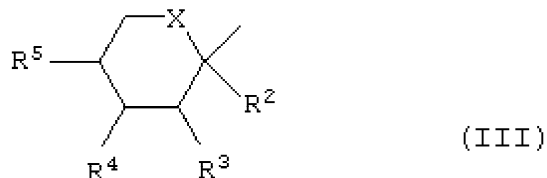
R⁶ и R⁷ являются одинаковыми или разными и представляют собой водород, низший алкил или представляют собой алкил и соединены с образованием цикlopентильного или циклогексильного кольца.

R¹, в частности, представляет собой водород или алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, такой как метил, этил и изопропил. В данном описании термин «алкил» включает прямую и разветвленную алкильную цепь. Алкильные группы, которые представлены R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ и R⁷, содержат от 1 до 3 атомов углерода и включают метил, этил, изопропил и н-пропил. Когда X представляет собой CH₂, R⁴ и R⁵ могут соединяться с образованием бензольного кольца, конденсированного с 6-членным кольцом, содержащим X, то есть R⁴ и R⁵ являются алкатриенильной группой =CH-CH=CH-CN=.

Особую группу соединений формулы (I) составляют соединения, в которых X представляет собой кислород, и попарно R² и R³ и R⁴ и R⁵ представляют собой метилendiоксигруппы формулы (II), где R⁶ и R⁷ представляют собой алкил, такой как метил. Вторую группу соединений составляют соединения, в которых X представляет собой CH₂, и R⁴ и R⁵ соединены с образованием бензольного кольца. Третью группу соединений формулы (I) составляют соединения, в которых R² и R³ представляют собой водород.

Соединения формулы (I) могут быть синтезированы следующими способами:

(а) Взаимодействие спирта формулы RCH₂OH с хлорсульфаматом формулы ClSO₂NH₂ или ClSO₂NHR¹ в присутствии основания, такого как трет-бутоксид калия или гидрид натрия при температуре в интервале примерно от -20 до 25°C в растворителе, таком как толуол, ТГФ или диметилформамид, где R представляет фрагмент приведенной ниже формулы (III):



(b) Взаимодействие спирта формулы RCH₂OH с сульфурилхлоридом формулы SO₂Cl₂ в присутствии основания, такого как триэтиламин или пиридин, при температуре в интервале примерно от -40° до 25°C в растворителе, таком как диэтиловый эфир или метилхлорид, с получением хлорсульфата формулы RCH₂OSO₂Cl.

Хлорсульфат формулы RCH₂OSO₂Cl может затем подвергаться взаимодействию с

амином формулы R^1NH_2 при температуре в интервале примерно от -40° до $25^\circ C$ в растворителе, таком как метиленхлорид или ацетонитрил, с получением соединения формулы (I). Условия взаимодействия для способа (b) описаны также в публикации Т. Tsuchiua et al., *Tetrahedron Lett.*, 1978, 3365.

- 5 (c) Взаимодействие хлорсульфата RCH_2OSO_2Cl с азидом металла, таким как азид натрия, в растворителе, таком как метиленхлорид или ацетонитрил, с получением азидосульфата формулы $RCH_2ISO_2N_3$, как описано в публикации М. Hedayatullah, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 2455. Азидосульфат затем подвергается восстановлению каталитическим гидрированием, например, с благородным металлом и H_2 , или
10 нагреванием с металлической медью, в растворителе, таком как метанол, с получением соединения формулы (I), где R^1 представляет собой водород.

- Исходные вещества формулы RCH_2OH могут быть коммерчески доступными или могут быть получены известными способами. Например, исходные вещества формулы RCH_2OH , где попарно R^2 и R^3 , R^4 и R^5 являются одинаковыми и имеют формулу (II), могут быть
15 получены способом, описанным в публикации R.F.Brady, *Carbohydr. Res.*, 1970, 14, 35, или взаимодействием простого триметилсилиленольного эфира R^6COR^7 кетона или альдегида с фруктозой при температуре примерно $25^\circ C$ в растворителе, таком как хлоруглерод, например, метиленхлорид, в присутствии протонной кислоты, такой как соляная кислота, или кислоты Льюиса, такой как хлорид цинка. Взаимодействие простого
20 триметилсилиленольного эфира описано в публикации G.L.Larson et al., *J. Org. Chem.*, 1973, 38, 3935.

- Кроме того, карбоновые кислоты и альдегиды формул $RCOOH$ и $RCHO$ могут подвергаться восстановлению в соединения формулы RCH_2OH стандартными методами восстановления, например, взаимодействием с алюмогидридом лития, борогидридом
25 натрия или комплексом боран-ТГФ, в инертном растворителе, таком как диглим, ТГФ или толуол, при температуре в интервале примерно от $0^\circ C$ до $100^\circ C$, например, как описано в публикации Н.О. House, «*Modern Synthetic Reactions*», 2nd Ed., pp.45-144 (1972).

- Соединения формулы (I) также могут быть получены способом, описанным в патентах США: №4513006, 5242942 и 5384327, которые включены в описание в виде ссылок.
30

- Соединения формулы (I) включают различные отдельные изомеры, а также их рацематы, например, различные присоединения R^2 , R^3 , R^4 и R^5 в альфа- и бета-положения 6-членного кольца (то есть присоединенные ниже и выше плоскости рисунка). Предпочтительно, кислород метилendioксигруппы (II) присоединен с этой же стороны 6-членного кольца.
35

ПРИМЕР 1

- Известно, что, когда мыши ob/ob получают питание «по желанию», у них развиваются патологически высокие уровни содержания в крови инсулина (гиперинсулинемия), глюкозы (гипергликемия), возникают повреждения кожи, проявляется высокий уровень содержания гликозилированного гемоглобина, и все эти признаки являются типичными симптомами сахарного диабета II типа (R.R.HENRY, *Ann. Intern. Med.*, 1996, 124, 97-103; G.W.EDELSON, *Clin. Pediatr. Med. Surg.*, 1998, 15, 41-48; P.R.JONSON, M.R.GREENWOOD, B.A.HORWITZ, J.S.STERN, *Annu. Rev. Nutr.*, 1991, 11, 325-353). Исходя из этого свойства модели мыши ob/ob, для определения влияния соединений формулы (I) на
45 данные модели проводят два исследования.

- В первом исследовании однородную популяцию мышей делят на три группы; мышам первой контрольной группы в течение всего периода исследования продолжительностью 120 дней топирамат в пищу не добавляют. Второй группе мышей в пищу добавляют топирамат: в течение 84 дней в количестве, обеспечивающем получение суточной дозы 20
50 мг/кг, затем в течение 36 дней в количестве, обеспечивающем получение суточной дозы 180 мг/кг. Третьей группе в течение 120 дней в пищу добавляют суточную дозу 60 мг/кг. По истечении 120-дневного периода мышей умерщвляют и полученную кровь подготавливают для последующих анализов на содержание в плазме глюкозы, инсулина и

триглицеридов.

Статистический анализ результатов показывает, что содержание глюкозы в обеих группах мышей, которым вводился топирамат, значительно ниже по сравнению с контрольной группой (таблица 1). Уровни содержания инсулина у мышей обеих групп, которым вводился топирамат, также значительно ниже, но различие является статистически значимым только в первой группе (таблица 1).

Таблица 1 Влияние топирамата на содержание глюкозы, инсулина и триглицеридов в крови на модели мышей ob/ob				
Группа и вводимое вещество (N)	Доза топирамата (мг/кг/день)	Концентрация в крови указанного маркера		
		Глюкоза (мг/дл±SEM)	Инсулин (нг/мл±SEM)	Триглицериды (мг/дл±SEM)
Контроль (10)	0:120 дней	302±36	10,2±0,5	190±48
Тспирамат 1 (10)	20:84 дня 180:36 дней	183±33 (-39%) P=0,02	6,4±0,7 (-37%) P=0,0004	103±5 (-46%) P=0,075
Тспирамат 2* (10)	60:120 дней	179±11 (-41%) P=0,007	8,0±0,9 (-21%) P=0,058	113±8 (-41%) P=0,099

SEM - среднеквадратичное отклонение.

Р величины вычислены с использованием двустороннего t-теста Стьюдента. Все значения Р получены при сравнении данных групп, получавших топирамат (TPM-группы), с данными контрольной группы*.

Массы тел при начале введения топирамата и в конце исследования (то есть после 120 дней введения топирамата с пищей) были примерно равными в контрольной группе и в TPM-группах: 48,2±1,1 г в -1 день для контрольной группы и 48,4±0,9 в -1 день для TPM - 2-группы; и 62,7±1,4 в 119 день для контрольной группы и 62,2±1,2 в 119 день для TPM - 2-группы. Увеличение массы тела для контрольной и TPM - 2-группы от -1 до 119 дня было аналогичным. Изменения в процентном выражении, приведенные в круглых скобках, вычислены относительно значений контрольной группы.

Во втором исследовании однородную популяцию мышей делят на две группы. Мышам первой контрольной группы на протяжении всего 118-дневного периода исследования топирамат в пищу не добавляют. Мышам второй группы в пищу добавляют топирамат: в течение 6 дней в количестве, обеспечивающем суточную дозу 60 мг/кг, затем в течение 112 дней в количестве, обеспечивающем суточную дозу 180 мг/кг. В течение всего курса дозировки мышей два раза в неделю обследуют на наличие кожных повреждений. Когда кожные повреждения очевидны, их тяжесть оценивают, исходя из количества и размера повреждений, и присваивают им ранг от «слабые» до «тяжелые» (таблица 2). Состояние здоровья четырех контрольных мышей ухудшилось до такой степени, что они погибли или должны были быть умерщвлены. Три мыши из этих четырех имели повреждения (две мыши - тяжелые, одна мышь - слабые). Кроме четырех контрольных мышей, которые не выжили к концу 118-дневного периода, у других мышей развивались кожные повреждения от «слабых» до «тяжелых» в конце исследования (таблица 2). Для сравнения ни у одной из девяти мышей, обработанных топираматом, не развивались кожные повреждения (таблица 2). По истечении 118-дневного периода всех выживших мышей умерщвляют, получают кровь и подготавливают ее для последующего анализа на содержание в плазме глюкозы и инсулина, а также гликозилированного гемоглобина. В этом втором исследовании у мышей, обработанных топираматом, содержание глюкозы в крови значительно ниже, чем у контрольных мышей ($P<0,005$, 276 ± 49 мг/дл - среднее значение $\pm$ SEM, $n=7$ для контрольной группы; и 131 ± 13 мг/дл - среднее значение $\pm$ SEM, $n=9$ для группы, обработанной топираматом - в конце исследования; различие между группами составляет 52%), в то время как содержание инсулина у мышей двух групп не отличаются. Содержание гликозилированного гемоглобина значительно выше у выживших контрольных мышей, чем у мышей, обработанных топираматом ($6,09\pm0,8$ ($n=7$) по сравнению с $3,16\pm0,1$ ($n=9$) - среднее значение $\pm$ SEM, $P<0,01$, 48% снижение при

обработке топираматом). Кроме того, в течение второго 118-дневного исследования средняя масса тела у мышей двух групп не отличалась, то есть массы тел в день -1 составляли $43,6 \pm 0,8$ г ($n=7$) для контрольной группы и $42,8 \pm 1,1$ ($n=9$) для группы, обработанной топираматом; и $55,2 \pm 2,4$ г на 118 день для контрольной группы и $55,1 \pm 1,3$ г на 118 день для группы, обработанной топираматом. Прирост масс тела в процессе исследования в обеих группах был одинаковым. Следовательно, преимущественное действие топирамата на биологические маркеры заболевания не может быть вторичным к потенциальному преимущественному действию, которое может являться результатом потери массы тела. Данные подтверждают, что топирамат изменяет направление метаболических и эндокринных активностей для облегчения диабетического синдрома у мышей ob/ob, активностей, которые являются зависимыми от действия топирамата на массу тела.

Таблица 2 Кожные повреждения у контрольных мышей ob/ob и мышей ob/ob, обработанных топираматом								
КОНТРОЛЬ				ТОПИРАМАТ (180 мг/мг/день)				Дни
Тяжелые	Умеренные	Слабые	Всего	Тяжелые	Умеренные	Слабые	Всего	
			n=7				N=9	
1	1	1	3	0	0	0	0	118
1	1	2	4	0	0	0	0	105
			n=8				N=9	
2	0	3	5	0	0	0	0	97
			n=9				N=9	
2	1	3	6	0	0	0	0	96
0	1	3	4	0	0	0	0	83
			n=10				N=9	
0	1	1	2	0	0	0	0	70
			n=11				N=9	
0	0	2	2	0	0	0	0	61
0	0	2	2	0	0	0	0	53
0	0	0	0	0	0	0	0	41

Для каждой мыши повреждения оценивались следующим образом: не наблюдаются; слабые: одно или два небольших повреждения (менее 5 мм в большем измерении); умеренные: одно или несколько повреждений (свыше 5 мм, но менее 8 мм в большем измерении); тяжелые: множественные повреждения (свыше 8 мм в большем измерении). В графе «дни» указан день в течение 118-дневного периода.

Таким образом, когда мыши ob/ob получают топирамат в смеси с питанием в течение периода продолжительностью четыре месяца, содержание в крови глюкозы и инсулина, а также содержание гликозилированного гемоглобина значительно ниже, чем у контрольных мышей ob/ob, не получавших топирамата. Кроме того, ни у одной из мышей, получавших топирамат в дозе 180 мг/кг, не развиваются повреждения кожи, в то время как у контрольных мышей ob/ob повреждения имеют место. Эти результаты показывают, что топирамат либо снижает, либо предотвращает развитие характерных признаков сахарного диабета II типа на животных моделях с ожирением и диабетом даже в том случае, когда на массу тела воздействие не оказывается. Результаты также подтверждают, что топирамат может снижать клеточную стойкость к инсулину. Это, как известно, является главным фактором в сахарном диабете II типа (R.R.HENRY, Ann. Intern. Med, 1996, 124, 97-103; J.D.McGARRY, Am. J. Clin. Nutr., 1998, 67, 500S - 504S; J.M.OLEFSKY, J.J.NOLAN, Am. J. Clin. Nutr., 1995, 61, 980S - 986S).

Синдром X, называемый также синдромом инсулинорезистентности (Insulin Resistance Syndrom - IRS), метаболическим синдромом или метаболическим синдромом X, является заболеванием, которое предоставляет факторы риска для развития сахарного диабета II типа и сердечно-сосудистого заболевания, включая интолерантность к глюкозе, гиперинсулинемию, инсулинорезистентность и дислипидемию (например, высокое содержание триглицеридов). Когда мыши ob/ob получают топирамат в смеси с пищей в

течение периода продолжительностью четыре месяца, содержание в крови глюкозы, инсулина и триглицеридов значительно ниже, чем у контрольных мышей ob/ob, которые топирамата не получали. Эти результаты показывают, что топирамат может снижать или предотвращать проявление патофизиологических признаков, связанных с синдромом X, и таким образом предотвращать его развитие.

ПРИМЕР 2

Самок мышей вида C57 BLK S/J-m*/⁺Lepr^{db} (db/db) возраста от 6 до 7 недель и их гетерозиготных самцов закупают в лаборатории The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мышей выдерживают в условиях карантина в течение 5 дней и помещают парами в небольшие клетки, содержащие подстилку ALPHA-dri® (Shepherd Speciality Papers, Inc., Kalamazoo, MI). Мышей выдерживают при комнатной температуре от 21 до 23°C с 12-часовым темным и 12-часовым светлым периодом суток и предоставляют доступ к воде и пище «по желанию». Пищевой рацион включает пищевой рацион для крыс и мышей со сниженным содержанием жира, разработанный Национальными институтами здоровья (National Institutes of Health - NIT), (NIH Rat and Mouse/Auto 6F Reduced Fat Diet №5K52 (PMI Nutrition International Inc., Brentwood, MO)).

Раствор, используемый в качестве контрольного и в качестве растворителя для испытываемых соединений, представляет собой 0,5% раствор метилцеллюлозы в воде. Соединение либо полностью растворяют, либо однородно суспендируют в растворе при введении мышам.

Мышей db/db произвольно делят на пять групп по восемь особей, которые являются гетерозиготными партнерами. Одна из групп является контрольной, каждая из четырех оставшихся групп получает одну из четырех доз топирамата (TPM) (10, 30, 100 или 300 мг/кг, соответственно). Топирамат или контрольный раствор, используемый также в качестве растворителя, вводят перорально с помощью зонда один раз в день в течение 8-го часа светлой части светового графика.

В промежутке между 18 и 24 часами после введения последней дозы мышам проводят наркоз с помощью CO₂/O₂ (70:30), кровь из прокола в ретроглазничной полости собирают в гепаринизированные полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с верхним зажимом и помещают их на лед. Плазму отделяют от клеток крови центрифугированием (15 минут при 1600 g). Образцы плазмы, которые не используют для анализа сразу, переносят в 96-ячеечные микропланшеты и замораживают при -70°C.

Содержание глюкозы и триглицеридов определяют, используя стандартные методики клинических лабораторий анализа крови. В частности, образцы анализируют с помощью автоматического автоанализатора Hitachi 717 (Boehringer Mannheim/Hitachi 717 Autoanalyzer, Boehringer Mannheim Laboratory Systems Division, Indianapolis, IN). Статистический анализ данных, полученных данных для групп, принимавших лекарственное средство, в сравнении с группой, принимавшей контрольный раствор, проводят с использованием однонаправленного дисперсионного анализа (ABOVAS) с тестом множественных сравнений Даннетта.

В соответствии с описанной выше методикой влияние топирамата на содержание в плазме глюкозы и триглицеридов определяют для самок больных диабетом мышей db/db и их парных самцов после 11-дневного перорального введения указанных доз, и результаты представлены в таблице 3 и таблице 4. Массы тел приведены в таблице 5. Аббревиатура N означает количество животных в исследуемой группе.

Таблица 3 Содержание глюкозы в плазме						
Введенное вещество и дозировка	Страдающие диабетом гомозиготные мыши			Не страдающие диабетом гетерозиготные мыши		
	N	Конц. в плазме (мг/дл ±SEM)	Изменение в %	N	Конц. в плазме (мг/дл ±SEM)	Изменение в %
Контрольный раствор	8	525±17	-	8	147±4	-
Топирамат	8	382±146	-27,4	7	145±6	-1,2
10 мг/кг		P<0,05				
Топирамат	7	344±31	-34,6	7	152±6	+3,8

30 мг/кг		P<0,01			
Топирамат	8	333±42	-36,6	8	148±7
100 мг/кг		P<0,01			
Топирамат	7	207±41	-60,5	8	121±7
300 мг/кг		P<0,01			P<0,01

SEM = среднеквадратичное отклонение.

Таблица 4
Содержание триглицеридов в плазме

Введенное вещество и дозировка	Страдающие диабетом гомозиготные мыши			Не страдающие диабетом гетерозиготные мыши		
	N	Конц. в плазме (мг/дл ±SEM)	Изменение в %	N	Конц. в плазме (мг/дл ±SEM)	Изменение в %
Контрольный раствор	8	342±20	-	8	141±10	-
Топирамат 10 мг/кг	8	277±30	-18,9	7	141±13	-0,3
Топирамат 30 мг/кг	7	303±29	-11,2	7	116±6	-17,5
Топирамат	8	227±15	-33,7	8	92±6	-34,8
100 мг/кг		P<0,01			P<0,01	
Топирамат	7	199±16	-41,7	8	138±15	-1,8
300 мг/кг		P<0,01				

Таблица 5 Массы тел				
Введенное вещество и дозировка	Страдающие диабетом гомозиготные мыши		Не страдающие диабетом гетерозиготные мыши	
	N	Изменение массы тела (г ±SEM)	N	Изменение массы тела (г ±SEM)
Контрольный раствор	8	2,4±0,5	8	-0,7±0,4
Топирамат 10 мг/кг	8	1,7±0,9	7	0,5±0,2
Топирамат 30 мг/кг	7	2,6±1,0	7	0/0±0,3
Топирамат 100 мг/кг	8	1,5±0,7	8	0,2±0,2
Топирамат 300 мг/кг	7	0,7±2,4	8	-2,2±0,5
				P<0,05

Результаты показывают, что топирамат снижает содержание глюкозы в крови зависимым от дозы образом на 27% (P<0,05 отн. контроля), 35% (P<0,01 отн. контроля), 37% (P<0,01 отн. контроля) и 61% (P<0,01 отн. контроля) в дозах 10, 30, 100 и 300 мг/кг/день, соответственно. В дозе 100 и 300 мг/кг/день топирамат также значительно (P <0,01) снижает уровни содержания в плазме триглицеридов - на 42% относительно контрольных животных, страдающих диабетом. Результаты показывают, что топирамат значительно облегчает состояние страдающих диабетом гомозиготных мышей и что эта активность топирамата не зависит от снижения массы тела.

ПРИМЕР 3

Страдающих диабетической полнотой самцов крыс вида Zucker (ZDF/Gmi-Fa) закупают в компании Genetic Models, Inc. Indianapolis, Indiana. Крыс размещают в подвесные металлические клетки по 4 животных в каждую при комнатной температуре 68-72°F с 12-часовым темным и 12-часовым светлым периодами суток и предоставляют доступ к воде и пище «по желанию». В качестве нормальных, не страдающих диабетом используют худых контрольных крыс (ZDF/GMI-+/+ или +/fa). Пищевой рацион включает формулу корма LabDiet 5009 (PMI Nutrin Int'l, Brentwood, MO).

Раствор, используемый в качестве контрольного и в качестве растворителя для испытываемых соединений, представляет собой 0,5% раствор метилцеллюлозы в воде. Соединение либо полностью растворяют, либо однородно суспендируют в носителе при введении крысам.

Крыс произвольно делят на четыре группы по восемь особей в каждой. Одна из групп является контрольной, получающей растворитель, каждая из оставшихся трех групп получает одну из трех доз топирамата (TPM) (30, 100 или 300 мг/кг, соответственно). Топирамат или контрольный раствор вводят перорально с помощью зонда один раз в день в течение 14 последующих дней в течение 8-го часа светлого периода суток.

В начале исследования у крыс производят отбор крови из хвостовой вены и определяют

содержание глюкозы и триглицеридов. В интервале между 18 и 24 часами после введения последней дозы снова отбирают образцы крови из хвостового зажима в 1 день (животные, получавшие питание) и в 14 день (животные, получавшие питание). Плазму собирают в гепаринизированные полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с верхним зажимом, которые затем помещают на лед. Плазму отделяют от клеток крови центрифугированием (20 минут при 1800 g). Образцы плазмы, которые сразу не используют для анализа, переносят в 96-ячеечные микропланшеты и замораживают при -70°C.

Массы тел животных определяют в начале исследования и снова после 14 дней пероральной дозировки. Содержание глюкозы и триглицеридов определяют, используя стандартные методики клинических лабораторий исследования крови. В частности, образцы анализируют с помощью автоматического автоанализатора Hitachi 717 (Boehringer Mannheim/Hitachi 717 Autoanalyzer, Boehringer Mannheim Laboratory System Division, Indianapolis, IN). Статистический анализ данных, полученных для групп, принимавших лекарственное средство, в сравнении с группой, принимавшей контрольный раствор, проводят с использованием однонаправленного дисперсионного анализа (ABOVAS) с тестом множественных сравнений Даннетта.

В соответствии с описанной выше методикой влияние топирамата на содержание в плазме глюкозы и триглицеридов определяют для самцов крыс Zucker, которым в течение 14 дней он вводится перорально, и результаты представлены в таблицах 6-8.

Аббревиатура N означает количество животных в исследуемой группе.

Таблица 6 Содержание глюкозы в плазме				
Вводимое вещество и дозировка	N	Конц. в плазме (мг/дл) $\pm$ SEM	Изменение относительно диабетического контроля (%)	% от диабетического контроля
Диабетический контроль (контрольный раствор)	8	329,6 $\pm$ 17,7		
Топирамат	8	247,4 $\pm$ 17,8	-24,9	75,1
30 мг/кг		P<0,01		
Топирамат	7	170,3 $\pm$ 14,7	-47,5	52,5
100 мг/кг		P<0,01		
Топирамат	8	166,4 $\pm$ 11,1	-49,5	50,5
300 мг/кг		P<0,01		
SEM = среднеквадратичное отклонение				
Таблица 7 Содержание триглицеридов в плазме				
Вводимое вещество и дозировка	N	Конц. в плазме (мг/дл) $\pm$ SEM	Изменение относительно диабетического контроля (%)	диабетического контроля
Диабетический контроль (контрольный раствор)	7	635,9 $\pm$ 40,1		
Топирамат	7	482,4 $\pm$ 10,5	-20,4	79,6
30 мг/кг		P<0,05		
Топирамат 100 мг/кг	7	498,6 $\pm$ 58,8	-17,7	82,3
Топирамат	8	423,0 $\pm$ 33,6	-30,2	69,8
300 мг/кг		P<0,01		

Таблица 8 Изменение массы тела (в граммах)		
Вводимое вещество, доза	N	Изменение массы тела $\pm$ SEM
Диабетический контроль (контрольный раствор)	8	+103,0 $\pm$ 2,1
Топирамат, 30 мг/кг	8	+95,5 $\pm$ 7,2
Топирамат, 100 мг/кг	7	+75,7 $\pm$ 2,7 (P<0,01)
Топирамат, 300 мг/кг	8	+64,4 $\pm$ 6,0 (P<0,01)

Как показывают данные, представленные в таблицах выше, топирамат снижает содержание глюкозы в крови на 25-50% (P<0,001). Снижение содержания глюкозы в крови при дозе 30 г/кг/день происходит без значительного изменения массы тела. Топирамат в дозах 30 и 300 мг/кг/день также снижает содержание в плазме триглицеридов (20% и 30%;

$P < 0,05$ и $P < 0,01$, соответственно).

В целом, результаты исследований, проведенных на мышах db/db (пример 3) и крысах Zucker (пример 4), показывают, что топирамат является эффективным лекарственным средством для лечения гипергликемии с преимущественным влиянием на содержание триглицеридов, а также его полезность в лечении характерных симптомов сахарного

ПРИМЕР 4

Самок мышей db/db (C57BLK S/J-m*/Lepr^{db} Jackson Labs, Bar Harbor, ME) возраста 7-8 недель размещают в клетки по четыре животных, которые расположены на твердой основе. Поддерживают комнатную температуру 68-72°F и влажность 50-65%. Комнатное освещение осуществляют с 12-часовым светлым и 12-часовым темным периодом суток. Мышей кормят пищевым рационом для крыс и мышей с пониженным содержанием жира, разработанным Национальными институтами здоровья (NIH Rat and Mouse/Auto 6F reduced fat diet #5K52 - PMI Nutrition Int'l Inc.). Пища и вода предоставляются в режиме «по желанию».

Испытываемое соединение и растворитель вводят дозированно перорально в виде суспензий в 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозе (Dow Chemical, Midland, MI). Объем дозы составляет 10 мг/кг массы тела.

Различным группам самок мышей db/db (7-8/группа) перорально ежедневно в течение 11 дней с помощью зонда вводят либо 0,5% метилцеллюлозу в деионизированной воде (контрольный раствор), либо топирамат в дозе 30 или 100 мг/кг/день, либо сульфамат 2,3:4,5-бис-О-(1-метилэтилиден)-β-L-фруктопиразоны (называемый далее соединением V) в дозе 30 или 100 мг/кг/день. На 10 день животных выдерживают без питания в течение 20 часов перед пероральной пробой на толерантность к глюкозе (oral glucose tolerance - OGT). На 11 день через четыре часа после введения последней дозы каждую группу подвергают пероральной пробе на толерантность к глюкозе (OGTT) при пероральном введении глюкозы в дозе 2 г/кг. Кровь у животных отбирают через хвостовой зажим перед введением глюкозы и через 30, 60 и 120 минут после глюкозной стимуляции. Образцы крови собирают в гепаринизованные СВ-микропробирки и затем помещают на лед. Образцы плазмы исследуют на содержание глюкозы с помощью реагента SIGMA DIAGNOSTICS Tringer (Sigma, St. Louis, MO). Статистический анализ выполняют с использованием программного обеспечения (Graphed, Monrovia, CA) и однонаправленного дисперсионного анализа (ABOVAS) с тестом множественных сравнений Даннетта.

В соответствии с описанной выше методикой определяют влияние топирамата и соединения V на пероральную толерантность к глюкозе у самок мышей db/db (7 мышей/группа), результаты представлены в таблице 9. Аббревиатура N показывает количество животных в каждой исследуемой группе.

Таблица 9 Пероральная проба на толерантность к глюкозе (натошак)				
Вводимое вещество и дозировка	Содержание глюкозы в плазме (мг/мл±SEM)			
	0 мин	30 мин	60 мин	120 мин
Контрольный раствор	260,5±24,36	502,7±45,5	448±27	270,3±23,8
Топирамат	188,43±16,7	430,7±68,4	294,8±31,5	124,1±20
30 мг/кг			$P < 0,05$	$P < 0,01$
Топирамат	159,5±12,8	454,3±38,5	270,8±52,6	184,2±32,3
100 мг/кг	$P < 0,01$		$P < 0,05$	
Соединение V	221,33±22,9	440,8±35,7	244,2±21,6	213,2±28,7
30 мг/кг			$P < 0,01$	
Соединение V	152,3±27,3	448,8±42,6	319,4±52,7	153±33,
100 мг/кг	$P < 0,01$			$P < 0,05$

Результаты показывают, что топирамат и соединение V снижают содержание глюкозы (натошак) и подавляют повышенное содержание глюкозы в крови, индуцированное пероральной глюкозной стимуляцией. Это подтверждает, что топирамат и соединение V улучшают толерантность к глюкозе и могут также повышать чувствительность инсулина.

Самок крыс ZDF также произвольно распределяют на контрольную группу и группы, которым дозировано перорально в течение 16 дней вводят топирамат (30 или 100 мг/кг/день), и тестируют на содержание глюкозы в крови и пероральную толерантность к глюкозе глюкозной стимуляцией в дозе 2 г/кг. Влияние топирамата представлено в

5 таблице 10 (N=8 - количество крыс в каждой обрабатываемой группе).

Таблица 10 Содержание глюкозы в плазме (мг/дл±SEM)				
Вводимое вещество и дозировка	Перед глюкозной стимуляцией	Через 60 минут после стимуляции	Через 90 минут после стимуляции	Через 120 минут после стимуляции
Контрольный раствор	177,8±17	474±25	434±25	357±30
Топирамат	121±13	342±32	269±32	206±26
30 мг/кг		P<0,05	P<0,01	P<0,01
Топирамат	129±15	333±32	242±28	173±23
100 мг/кг		P<0,01	P<0,01	P<0,01

15 Полученные результаты показывают, что топирамат улучшает пероральную толерантность к глюкозе через 60, 90 и 120 минут после глюкозной стимуляции в крысах ZDF. Эти результаты также показывают, что пероральное введение топирамата улучшает толерантность к глюкозе и может также повышать чувствительность инсулина.

ПРИМЕР 5

20 Самцов мыши (ob/ob) возраста от пяти до семи недель закупают в The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Мышей выдерживают в условиях карантина в течение пяти дней и помещают отдельно в клетки из проволочной сетки с удобствами размером 2 квадратных дюйма. Мышей содержат при температуре окружающей среды от 21 до 23°C с 12-часовым темным и 12-часовым светлым периодами суток и снабжают водой и

25 порошкообразной пищей «по желанию».

Топирамат вводят перорально в виде небольшой добавки к пище (0,143-2,54 мг/г).

Точное количество топирамата тщательно смешивают с известным количеством порошкообразной лабораторной пищи, используя ступку и пестик для растирания лекарственного средства с пищей, после чего содержимое переносят в полиэтиленовую

30 емкость с крышками массой 165 унций и смешивают встряхиванием и вращением емкости. Лабораторная пища (5002M Certified Diet Meal, изготовлена в Brentwood, MO компанией Purina Mills, Inc.) содержит не более 20% белка, 4,5% жира и 64,5% СНО. Количество топирамата, добавленное в пищу, основано на потреблении пищи, определенном в течение предварительного трех-, четырехдневного периода. Порошкообразную пищу помещают в

35 кормушки из нержавеющей стали/алюминия, приспособленные для защиты пищи от просыпания, пролива или загрязнения мышами. Мыши, которые способны просыпать или загрязнять пищу, исключаются из опыта.

Мышей возраста двадцать две недели произвольно делят на три группы: (1) контрольная группа, в которой топирамат не добавляется в пищу, (2) группа, в которой

40 топирамат добавляется в пищу в количестве, обеспечивающем суточную дозу 20 мг/кг в течение 110-дневного периода, и (3) группа, в которой топирамат добавляется в пищу в количестве, обеспечивающем суточную дозу 60 мг/кг в течение всего периода.

В каждой группе контролируется масса тела животных, потребление пищи, содержание в крови глюкозы, HbA1C, инсулина, триглицеридов и наличие физических признаков

45 сахарного диабета II типа или ухудшения здоровья. Масса тела и потребление пищи регистрируется два раза в неделю по графику понедельник/четверг или вторник/пятница в промежутке от 8 до 12-го часа светлого периода суток. Массу тела и потребление пищи регистрируют с использованием шкалы, приспособленной для масс не выше 200 г. Каждый день регистрируют массу тела и обследуют мышей на наличие признаков сахарного

50 диабета II типа (кожные повреждения) и ухудшение общего состояния здоровья (например, сонливость или неприглядный внешний вид). Мышей проверяют на наличие кожных повреждений, и если они наблюдаются, отмечают и регистрируют степень их тяжести. Если общее состояние здоровья мыши ухудшается до крайне тяжелого состояния, мышь

умерщвляют.

За несколько часов до умерщвления мышам предоставляют доступ к пище, содержащей топирамат, и через несколько часов их умерщвляют декапитацией. Кровь собирают из шейной раны в воронку, футерованную двойной пленкой. Затем кровь переносят в мензурки, содержащие гепарин. Плазму отделяют от красных кровяных клеток центрифугированием. Плазму замораживают для последующих анализов. Определяют содержание в плазме глюкозы, инсулина и триглицеридов. Также определяют содержание гликозированного гемоглобина. Для определения содержания гликозированного гемоглобина требуется образец цельной крови объемом 50 мкл, который отбирают из воронки перед центрифугированием. Образцы плазмы затем собирают без замораживания. Все образцы помещают на лед и собранные днем образцы собирают для доставки в течение ночи в AniLytics, Inc. (200 Girard St., Suite 200, Gaithersburg, MD 20877). Образцы, переданные в AniLytics, анализируют в помощью стандартных методик, введенных в практику коммерческими лабораториями исследования крови. Статистический анализ осуществляют для определения достоверности данных (удовлетворяет распределению Гаусса). Установлено, что все группы проходят этот тест и, следовательно, анализируются с использованием метода, подходящего для параметрических данных непарного двустороннего t-теста (Prizm 2.01, Graph Pad Software, Inc.; Saan Diego, CA 92121). Данные для группы, принимавшей топирамат (TPM), сравнивают с данными контрольной группы.

В соответствии с описанной выше методикой определяют влияние топирамата (TPM) на массу тела (BW), содержание гликозидированного гемоглобина (HbA1C), содержание в крови глюкозы (BG), содержание триглицеридов и инсулина у самцов мышей ob/ob, и полученные результаты представлены в таблице 11. Аббревиатура N представляет количество животных в группе.

Таблица 11 Масса тела и содержание глюкозы в плазме			
	Контроль (n=5)	TPM 20 мг/кг (n=6)	TPM 60 мг/кг (n=7)
BW (г)	69,0 $\pm$ 4,9	65,6 $\pm$ 2,8	67,5 $\pm$ 1,6
HbA1c (%)	4,7 $\pm$ 0,4	4,98 $\pm$ 0,6	3,56 $\pm$ 0,4
BG (мг/дл)	243,2 $\pm$ 42,0	229,2 $\pm$ 46,0	144,3 $\pm$ 20,0
			P<0,05
Триглицериды (мг/дл)	111 $\pm$ 7,6	104 $\pm$ 6,4	88 $\pm$ 3,2
Инсулин (нг/мл)	14,8 $\pm$ 8,6	12,2 $\pm$ 1,9	11,4 $\pm$ 2,1

Данные показывают, что животные, принимавшие топирамат (60 мг/кг), имеют в значительной степени более низкое содержание HbA1C и глюкозы в крови (BG) по сравнению с контрольными животными. Эти снижения являются очевидными даже при отсутствии значительных различий в массе тела (BW).

Ввиду того, что мыши в данном исследовании в начале дозированного приема лекарственного средства и контрольного раствора являются старыми животными, имеет место большое количество кожных повреждений. Исходное общее количество случаев наличия кожных повреждений следующее: 47% животных в контрольной группе в начале исследования; 38% животных в группе, принимавшей топирамат в дозе 20 мг/кг, и 47% животных в группе, принимавшей топирамат в дозе 60 мг/кг.

В течение первых 60 дней дозировки общее количество повреждений постепенно увеличивается в контрольной группе и обычно составляет от 57 до 67%. В течение этого периода шесть мышей в контрольной группе погибают или подвергаются умерщвлению. В группе, принимавшей 20 мг/кг топирамата, общее количество случаев кожных повреждений остается почти постоянным в течение первых 60 дней, составляя обычно от 40% до 50%, в течение этого периода четыре мыши в группе, принимавшей 20 мг/кг топирамата, погибли или были умерщвлены. Общее количество случаев повреждения кожи в группе, принимавшей топирамат в дозе 60 мг/кг, постепенно снижается и после первых трех недель дозировки находится в интервале от 15% до 38%. В течение первых 60 дней две

мыши в группе, принимавшей 60 мг/кг топирамата, погибают; обе уже перед началом дозирования имели тяжелые кожные повреждения.

В течение периода дозированного приема между 62 и 110 днями общее количество случаев появления кожных повреждений в группе, принимавшей топирамат в дозе 60 мг/мг/день, было ниже, чем в контрольной группе.

Таким образом, данные показывают, что топирамат улучшает гликемический контроль, снижает содержание триглицеридов и может повышать инсулиновую чувствительность без снижения массы тела. Топирамат также уменьшает количество и распространенность кожных повреждений у животных, которые имели эти повреждения перед началом дозированного приема топирамата.

На основании результатов, представленных в приведенных выше примерах, можно сделать вывод о том, что соединения формулы (I) могут использоваться для профилактики развития сахарного диабета у млекопитающих, включая людей.

Для профилактики развития сахарного диабета II типа или синдрома X соединения формулы (I) могут применяться введением терапевтически эффективного количества соединения формулы (I). В частности, для профилактики развития сахарного диабета II типа или синдрома X соединение формулы (I) может применяться перорально повторным введением в дозе от примерно 10 до 650 мг в день, более предпочтительно, от примерно 16 до 325 мг один или два раза в день.

Термин «композиция», применяемый в данном изобретении, означает продукт, включающий указанные ингредиенты в указанных количествах, а также любой продукт, который является результатом, прямо или опосредовано, сочетания указанных ингредиентов в указанных количествах.

Если не указано другого значения, термин «терапевтически эффективное количество», используемый в данном описании, означает количество активного соединения или фармацевтического средства, вызывающее биологический или медицинский ответ в тканевой системе, животном или человеке, который желает получить исследователь, ветеринар, медицинский доктор или клиницист, и который указывает на облегчение симптомов болезни или расстройства, которая(ое) подлежит лечению.

Оптимальные дозы, которые следует вводить, могут легко определяться квалифицированным специалистом и будут изменяться в зависимости от способа введения, эффективности препарата и развития болезни. Кроме того, такие факторы, связанные с конкретным пациентом, подлежащим лечению, как пол, возраст, масса тела, пищевой рацион, физическая активность, время введения и сопутствующие заболевания и применяемые лекарственные средства, могут приводить к необходимости корректирования дозирования.

При фармацевтическом введении одно или несколько соединений формулы (I) могут вводиться любым подходящим способом, которые будут очевидны для квалифицированного в данной области специалиста. В частности, соединение(я) формулы (I) могут вводиться любым парентеральным способом, включая, но без ограничения указанным перечнем, пероральный, легочный, интраперитонеальный (ip), внутривенный (iv), внутримышечный (im), подкожный (sc), чрескожный, трансбуккальный, назальный, подъязычный, глазной, ректальный и вагинальный. Для квалифицированного специалиста понятно, что любая доза или частота введения, которая обеспечивает терапевтический эффект, описанный в данном изобретении, подходит для применения в данном изобретении.

Для приготовления фармацевтических композиций данного изобретения одно или несколько сульфаматных производных соединений формулы (I) тщательно смешиваются с фармацевтическим носителем в соответствии с традиционными методами получения фармацевтических препаратов, указанный носитель может быть самого разного вида в зависимости от желаемой формы препарата и желаемого способа введения, например, стерильные препараты для iv введения будут приготавливаться с использованием подходящих солибилизирующих агентов. Стандартная лекарственная доза будет

содержать от примерно 10 до 200 мг активного ингредиента. Топирамат в настоящее время доступен для перорального введения в таблетках округлой формы, содержащих 25 мг, 100 мг или 200 мг активного ингредиента. Таблетки содержат некоторые или все перечисленные далее неактивные ингредиенты: лактоза водная, предварительно

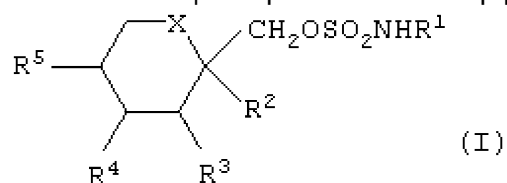
5 желатинированный крахмал, микрокристаллическая целлюлоза, натрий крахмал гликолят, стеарат магния, очищенная вода, карнаубский воск, гидроксипропилметилцеллюлоза, диоксид титана, полиэтиленгликоль, синтетический оксид железа и полисорбат 80.

Хотя приведенное выше описание раскрывает принципы данного изобретения с приведенными с целью иллюстрации примерами, следует представлять, что практическое

10 применение данного изобретения включает все обычные изменения, приспособления и/или модификации, которые составляют объем приведенной далее формулы изобретения, и их эквиваленты.

Формула изобретения

15 1. Способ профилактики развития сахарного диабета II типа у нуждающихся в этом млекопитающих терапевтически эффективным количеством соединения формулы (I):



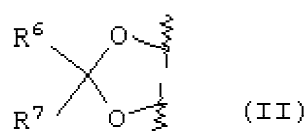
где

X представляет собой CH₂ или кислород;

R¹ представляет собой водород или алкил;

25 R², R³, R⁴ и R⁵ независимо представляют собой водород или низший алкил, и, когда X представляет собой CH₂, R⁴ и R⁵ могут представлять собой алкеновые группы, соединенные с образованием бензольного кольца, и, когда X представляет собой

30 кислород, R² и R³ и/или R⁴ и R⁵ вместе могут представлять собой метилendioксигруппу следующей формулы (II):



где

R⁶ и R⁷ являются одинаковыми или разными и представляют собой водород, низший алкил, или представляют собой алкил и соединены с образованием цикlopентильного или циклогексильного кольца.

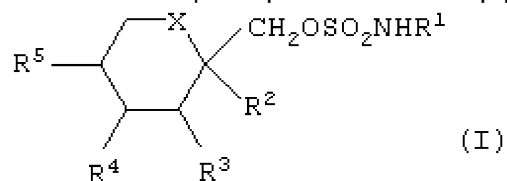
2. Способ по п.1, где соединение формулы (I) представляет собой топирамат.

40 3. Способ по п.1, где терапевтически эффективное количество составляет от 10 до 650 мг в день.

4. Способ по п.1, где указанное количество составляет от 16 до 325 мг один или два раза в день.

5. Способ профилактики развития синдрома X (синдрома инсулинорезистентности, метаболического синдрома или метаболического синдрома X) у нуждающихся в этом

45 млекопитающих терапевтически эффективным количеством соединения формулы (I):

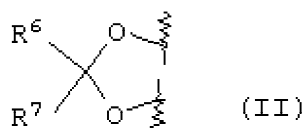


где

X представляет собой CH₂ или кислород;

R^1 представляет собой водород или алкил;

R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо представляют собой водород или низший алкил, и, когда X представляет собой CH_2 , R^4 и R^5 могут представлять собой алкеновые группы, соединенные с образованием бензольного кольца, и, когда X представляет собой кислород, R^2 и R^3 и/или R^4 и R^5 вместе могут представлять собой метилendioксигруппу следующей формулы (II):



где

R^6 и R^7 являются одинаковыми или разными и представляют собой водород, низший алкил, или представляют собой алкил и соединены с образованием цикlopентильного или циклогексильного кольца.

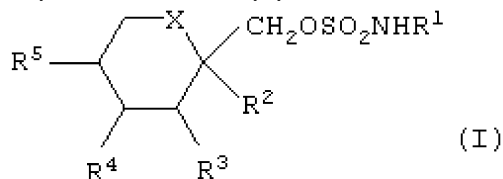
6. Способ по п.5, где соединение формулы (I) представляет собой топирамат.

7. Способ по п.5, где терапевтически эффективное количество составляет от 10 до 1000 мг в день.

8. Способ по п.5, где терапевтически эффективное количество составляет от 10 до 650 мг в день.

9. Способ по п.5, где указанное количество составляет от 16 до 325 мг один или два раза в день.

10. Способ лечения или профилактики развития кожных повреждений, связанных с сахарным диабетом II типа или синдромом X, у нуждающихся в этом млекопитающих терапевтически эффективным количеством соединения формулы (I):

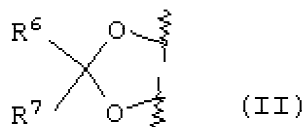


где

X представляет собой CH_2 или кислород;

R^1 представляет собой водород или алкил;

R^2 , R^3 , R^4 и R^5 независимо представляют собой водород или низший алкил, и, когда X представляет собой CH_2 , R^4 и R^5 могут представлять собой алкеновые группы, соединенные с образованием бензольного кольца, и, когда X представляет собой кислород, R^2 и R^3 и/или R^4 и R^5 вместе могут представлять собой метилendioксигруппу следующей формулы (II):



где

R^6 и R^7 являются одинаковыми или разными и представляют собой водород, низший алкил, или представляют собой алкил и соединены с образованием цикlopентильного или циклогексильного кольца.

11. Способ по п.10, где соединение формулы (I) представляет собой топирамат.

12. Способ по п.10, где терапевтически эффективное количество составляет от 10 до 1000 мг в день.

13. Способ по п.10, где терапевтически эффективное количество составляет от 10 до 650 мг в день.

14. Способ по п.10, где указанное количество составляет от 16 до 325 мг один или

два раза в день.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50