

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

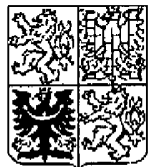
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3699-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLŮVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22. 05. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.05.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/446439**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 06. 99**
(Věstník č. 6/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/07465**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/37199**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K 31/135

(71) Přihlášovatel:

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES,
INC., Jerusalem, IL;
TECHNION RESEARCH AND
DEVELOPMENT FOUNDATION LTD., Haifa,
IL;

(72) Původce:

Youdim Moussa B. H., Tivon, IL;
Finberg John P. M., Tivon, IL;
Levy Ruth, Tel Aviv, IL;
Sterling Jeffrey, Jerusalem, IL;
Lerner David, Jerusalem, IL;
Yellin Haim, Ramat-Gan, IL;
Veinberd Alex, Rehovot, IL;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Použití R-enantiomeru N-propargyl-1-aminoindanu

(57) Anotace:

Předmětem řešení je použití R/+-N-propargyl-1-aminoindanu, jeho farmaceuticky přijatelných solí a rovněž farmaceutických kompozic obsahujících tento R/+- enantiomer. Předmětem vynálezu je rovněž způsob léčení subjektů trpících Parkinsonovou chorobou, poruchou paměti, demencí, depresí, hyperaktivním syndromem, afekčními chorobami, neurodegenerativními chorobami, neurotickými poraněními, mrtvicí, mozkovou ischemií, traumatickým poraněním hlavy, traumatickým poraněním míchy, neurotraumatem, schizofrenií, poruchami pozornosti, sklerozou multiplex nebo abstinenčními příznaky za použití R/+-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli podle

vynálezu. Vynález dále poskytuje způsob prevence nervového poškození subjektu. Vynález rovněž poskytuje způsoby přípravy R/+-N-propargyl-1-aminoindanu, jeho soli a racemického N-propargyl-1-aminoindanu.

CZ 3699-97 A3

Použití R-enantiomeru N-propargyl-1-aminoindanu a jeho solí a kompozic

Oblast techniky

Vynález se týká oblasti selektivních nevratných inhibitorů enzymu, známého jako monoaminoxidáza (dále jen MAO), a konkrétně se týká R(+) enantiomeru N-propargyl-1-aminoindanu (zde rovněž označovaného jako PAI), který je nevratným inhibitorem B-formy monoaminoxidázového enzymu (dále jen MAO-B). Vynález se rovněž týká farmaceutických kompozic obsahujících R(+)PAI, které jsou použitelné zejména při léčení Parkinsonovy choroby, poruch paměti, demence, deprese, hyperaktivního syndromu, afekce, neurodegenerativních chorob, neurotoxických poranění, mrtvice, mozkové ischemie, traumatického poranění hlavy, traumatického poranění míchy, neurotraumatu, schizofrenie, poruchy pozornosti, sklerózy multiplex a abstinenčních příznaků.

Dosavadní stav techniky

Parkinsonova choroba je obecně považována za následek degradace pre-synaptických dopaminergických neuronů v mozku s následným snížením uvolňovaného množství neurotransmiterového dopaminu. Neodpovídající uvolnění dopaminu tedy způsobuje poruchy kontroly svalů ovladatelné vůlí, které jsou příznačné pro Parkinsonovu chorobu.

V současnosti již existuje celá řada způsobů léčení Parkinsonovy choroby jejichž použití je rozšířené, například včetně podávání L-DOPA společně s dekarboxylázovým inhibitorem, například L-carbidopou nebo benserazidem. Dekarboxylázový inhibitor chrání molekulu L-DOPA před periferní dekarboxylací a tak zajišťuje, že L-DOPA je spotřebován zbývajícími dopaminergickými neurony ve striatiu mozku. L-DOPA se konvertuje na dopamin, v důsledku čehož dojde ke zvýšení hladin dopaminu v těchto neuronech. V odezvě na fyziologické impulzy jsou tyto neurony schopny uvolňovat větší množství dopaminu při koncentracích, které odpovídají normálně potřebným hladinám. L-DOPA léčení tedy zmírňuje příznaky nemoci a přispívá ke zlepšení stavu pacienta.

Nicméně L-DOPA léčení má své nedostatky. Hlavním nedostatkem je to, že jeho účinnost je optimální pouze během prvních několika let léčení. Po tomto období se klinická odezva snižuje a je doprovázena nežádoucími vedlejšími účinky, mezi které patří například dyskineze, fluktuace účinnosti v průběhu dne („on-off efekt“) a psychiatrické příznaky, například konfúzní stavy, paranoia a halucinace. Toto snížení účinku L-DOPA léčení je připisováno celé řadě faktorů včetně přirozené progresi nemoci, alterace dopaminových receptorů v důsledku dopaminové produkce nebo zvýšení hladin dopaminových metabolitů, a farmakokinetických problémů s L-DOPA absorpcí (přehled Youdim a kol., Progress in Medicinal Chemistry, 21, 138-167(1984)).

Pro překonání nedostatků L-DOPA léčení byla navržena celá řada léčení, u kterých se L-DOPA kombinuje s MAO inhibitory, které pomáhají redukovat metabolický zlom nově

vytvořeného dopaminu (viz například Chiese, P., patent US 4,826,875, udělený 2. května 1989).

MAO existuje ve dvou formách známých jako MAO-A a MAO-B, které jsou selektivní pro různé substráty a inhibitory. Například MAO-B účinněji metabolizuje substráty, jakým je například 2-fenylethylamin, a je selektivně a nevratně inhibován (-)-deprenylem, který bude popsán níže.

Nicméně je třeba uvést, že léčení kombinující L-DOPA s inhibitorem jak MAO-A tak MAO-B je nežádoucí, protože způsobuje nežádoucí vedlejší účinky, týkající se zvýšené hladiny katecholaminů v průběhu neuraxie. Kromě toho je rovněž nežádoucí kompletní inhibice MAO, protože zesiluje účinek sympatomimetických aminů, například tyraminu, což vede k tak zvanému „sýrovému efektu“ (přehled Youdim a kol., Handbook of Experimental Pharmacology, vyd. Trendelenburg a Weiner, Springer-Verlag, 90, kap. 3 (1988)). Jak se ukázalo, MAO-B představuje převládající formu MAO v mozku. Dá se tedy předpokládat, že selektivní inhibitory pro tuto formu budou představovat možné nástroje pro snižování dopaminového rozkladu na jedné straně a na druhé straně prostředek pro minimalizaci systemických účinků celkové MAO inhibice.

Mnohé inhibitory MAO představují chirální molekuly. I když jeden enantiomer často vykazuje, pokud jde o relativní potenci vůči MAO-A a MAO-B, určitou stereoselektivitu, není daná enantiomerní konfigurace, pokud jde o diskriminaci mezi MAO-A a MAO-B, vždy selektivnější než jeho zrcadlově převrácený isomer.

Tabulka I uvádí IC_{50} (mmol/l) enantiomerních párů propargylaminů při preparaci MAO v mozku krysy. Tyto výsledky ukazují na malé rozdíly v potenci při MAO-B inhibici mezi R a S enantiomery. (B. Hazelhoff a kol., Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol., 330, 50 (1985). Oba enantiomery jsou selektivní pro MAO-B. Ve zprávě, kterou zveřejnil Magyar a kol. (1967), se uvádí, že R-(-)-deprenyl je 500krát účinnější než S-(+) enantiomer, pokud jde o inhibici oxidační deaminace tyraminu homogenátem mozku krysy. (K. Magyar a kol., Act. Physiol. Acad. Sci., Hung., 32, 377 (1967)).

V homogenátu krysích jater je R-deprenyl pouze patnáctkrát účinnější než S enantiomer. Výsledky dalších testů farmakologické aktivity, například testu určujícího inhibici tyraminové spotřeby, ukázaly diferenční stereoselektivitu. S forma je v určitých případech účinnějším epimerem. (J. Knoll a K. Magyar, Advances in Biochemical Psychopharmacology, 5, 393 (1972)).

N-methyl-N-propargyl-1-aminotetralin (2-MPAT) je blízkým strukturním analogem deprenylu. Absolutní stereochemie 2-MPAT doposud nebyla určena. Nicméně (+) isomer je selektivní pro MAO-B a (-) isomer je selektivní pro MAO-A. Rozdíl v účinnosti mezi 2-MPAT enantiomery je menší než pětinašobek. (B. Hazelhoff a kol., tamtéž). Enantiomery N-propargyl-1-aminotetralinu (1-PAT) mají rovněž podobnou aktivitu. Nedostatkem dat v tabulce I je to, že ukazují pouze poměr struktura-aktivita mezi izolovanými (+) nebo (-)-2-MPAT a tato data neumožňují předpovědět jeho absolutní stereochemii.

Na základě extenzivního počítačového modelingu Polymeropoulos nedávno předpověděl, že (R)-N-methyl-N-

propargyl-1-aminoindan (R-1-MPAI) bude jako MAO-B inhibitor účinnější než (S) forma. (E. Polymeropoulos, Inhibitors of Monoamine Oxidase B, I. Szelenyi, vyd. Birkhauser Verlag, str. 110 (1993)). Nicméně popsané experimenty ukázaly, že R-1-MPAI je nejen o něco účinnějším inhibitorem MAO-B než S-1-MPAI, ale že je dokonce účinnějším inhibitorem MAO-A. Jak selektivita mezi MAO-A a -B tak relativní účinnost R a S epimerů jsou nízké. V rozporu s očekáváními, vyplývajícími ze známého stavu techniky, je 1-MPAI použitelný jako farmaceutické činidlo.

Níže uvedené údaje ukazují, že vysokou selektivitu pro MAO jednoho enantiomeru oproti druhému enantiomeru nelze předpovědět. Struktura MAO aktivních míst není natolik známá, aby umožnila předpovědět relativní účinnost nebo selektivitu libovolné dané sloučeniny nebo páru jejích enantiomerů.

Mozková mrtvice zaujímá, pokud jde o počet úmrtí, v zemích s rozvinutou ekonomikou třetí místo. Osoby, které mozkovou mrtvici přežijí, často trpí neurologickou a motorickou nezpůsobilostí. Většina CNS mrtvic je považována za lokalizovanou tkáňovou anemii, k níž dochází v důsledku neprůchodnosti arteriálního krevního řečiště, která je příčinou vzniku deficitu kyslíku a glukózy. Okluze střední cerebrální arterie u krys (MCAO) je běžným experimentálním postupem, kterým se simuluje mrtvice u lidí. Předpokládá se, že neurologická léze, způsobená proximální okluzí této arterie u krysy, odpovídá fokálnímu cerebrálnímu infarktu u lidí (Yamori a kol., 1976). Tato shoda se zakládá na podobnostech mezi kraniálním oběhem těchto dvou druhů. Další zvířecí modely mrtvice popsal Stefanovich (1983).

Histologické změny, popsané Tamurou a kol. (1981), který první zavedl MCAO postup, byly zpravidla patrné v kůře frontální (100%), senzimotorické (75%) a sluchové (75%) oblasti a v menší míře v kůře okcipitálního laloku (25%). Kromě toho bylo poškození pozorováno v laterálním segmentu ocasatého jádra (100%) a pouze v proměnlivé míře v jeho mediální části (38%). U MCAO živočichů byla současně zaznamenána následující onemocnění: neurologické deficity (Menzies a kol., 1992), poruchy vědomí (Yamamoto a kol., 1988), mozkový edém (Young a kol., 1993; Matsui a kol., 1993; Saur a kol., 1993), snížení cerebrálního proudění krve (Teasdale a kol., 1983) a fluktuace katecholaminu (Cechetto a kol., 1989). Kterékoliv z těchto onemocnění by mohlo indikovat závažnost a rozsah poškození mozku, které následuje po MCAO u krys. Na základě výše uvedeného je možné účinnou látku, s potenciálem omezit nebo zcela zlikvidovat dané onemocnění, považovat za kandidáta pro léčení mrtvice u lidí.

Tabulka IA

IC₅₀ (mmol/l) DATA PRO INHIBICI PROPARGYLAMINŮ MAO
V MOZKU KRYSY

SLOUČENINA	EPIMER	INHIBICE		RELATIVNÍ SCHOPNOST		
		A	B	A/B	+/-	
		REF			A	B
2-MPAI	a	+	140	16	8,8	
					3	0,2
		-	46	88	0,5	
R/S						
DEPRENYL	a	S	3600	16	120	
					80	2,6
		R	450	6	75	
1-MPAI	b	S	70	50	1,4	
					23	5
		R	3	10	0,3	
1-PAT	c	S	3800	50	76	
					4	0,5
		R	900	90	10	

a. B. Hazelhoff a kol., Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol., 330, 50 (1985)

b. Evropská patentová přihláška 436,492 A2, publikovaná 10. června 1991

c. autoři vynálezu

Selektivní MAO-B inhibitor, (-)deprenyl, byl podrobněji studován a použit jako MAO-B inhibitor pro posílení L-DOPA léčení. Léčení pomocí (-)-deprenylu je zpravidla příznivé a nezpůsobuje při dávkách, které

způsobují v podstatě úplnou inhibici MAO-B, tak zvaný „sýrový efekt“. (Elsworth a kol., Psychopharmacology, 57, 33 (1978)). Kromě toho přidání (-)-deprenylu do kombinace L-DOPA a dekarboxylázového inhibitoru, podaného pacientům trpícím Parkinsonovou chorobou, vede k určitým zlepšením, pokud jde o akinezi a celkovou funkční kapacitu, a rovněž se tím eliminují fluktuace „on-off“ typu (přehled Birkmayer & Riederer v „Parkinson's Disease“, Springer-Verlag, str. 138-149 (1983)). (-)-Deprenyl tedy (a) zvyšuje a prodlužuje účinek L-DOPA a (b) nezvyšuje nežádoucí účinky L-DOPA léčení.

Nicméně ani samotný (-)-deprenyl není bez vlastních nežádoucích vedlejších účinků. Mezi tyto nežádoucí vedlejší účinky patří například existující žaludeční vředy a případné hypertenzní příhody. Kromě toho je (-)-deprenyl amfetaminovým derivátem a je metabolizován na amfetamin a metamfetaminy, což jsou látky, které mohou způsobovat nežádoucí vedlejší účinky, například zvýšenou srdeční rychlost (Simpson, Biochemical Pharmacology, 27, 1951 (1978); Finberg a kol. v „Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art“, Youdim a Paykel, ed. Willey, str. 31-43 (1981)).

Byly popsány i další sloučeniny, které představují selektivní nevratné inhibitory MAO-B ale které jsou prosté nežádoucích účinků spojovaných s (-)-deprenylem. Jedna taková sloučenina, konkrétně N-propagyl-1-aminoindan.HCl (racemický PAI.HCl), je popsána v GB 1,003,686 a GB 1,037,014 a v patentu US 3,513,244, uděleném 19. května 1970. Racemický PAI.HCl je účinným selektivním nevratným inhibitorem MAO-B, nemetabolizuje se na amfetaminy a nezvyšuje nežádoucí sympatomimetické účinky.

Při srovnávacích testech na zvířatech se ukázalo, že racemický PAI má mnoho výhod oproti (-)-deprenylu. Racemický PAI například nezpůsobuje podstatnější tachykardii, nezvyšuje krevní tlak (účinky, k nimž dochází při dávkách (-)-deprenylu 5 mg/kg) a při dávkách nižších nebo rovných 5 mg/kg nezpůsobuje kontrakci mžurky nebo zvýšení srdeční rychlosti (což jsou vedlejší účinky (-)-deprenylu, podávaného v dávkách vyšších než 0,5 mg/kg). Kromě toho racemický PAI.HCl nezesiluje kardiovaskulární účinky tyraminu (Finberg a kol. v „Enzymes a Neurotransmitters in Mental Disease“, str. 205-219 (1980), Usdin a kol., ed. Wiley, New York; Finberg a kol. (1981) v „Monoamine Oxidase Inhibitors - The State of the Art“, tamtéž; Finberg and Youdim, British Journal Pharmacol., 85, 451 (1985)).

Jedním z cílů vynálezu bylo separovat racemické PAI sloučeniny a získat enantiomer s MAO-B inhibiční aktivitou, která by byla prostá veškerých nežádoucích vedlejších účinků, spojovaných s druhým enantiomerem.

Vzhledem k tomu, že deprenyl má podobnou strukturu jako PAI a vzhledem k tomu, že je známo, že (-)-enantiomer deprenylu, tj. (-)-deprenyl, je farmaceuticky podstatně účinnější než (+)-enantiomer, dalo by se očekávat, že (-)-enantiomer PAI bude účinnějším MAO-B inhibitorem.

Nicméně v rozporu s tímto očekáváním se po rezoluci enantiomerů ukázalo, že (+)-PAI enantiomer je ve skutečnosti aktivním MAO-B inhibitorem, zatímco (-)-enantiomer vykazuje extrémně nízkou MAO-B inhibiční aktivitu. Kromě toho má (+)-PAI enantiomer rovněž překvapivě vyšší stupeň selektivity pro MAO-B inhibici než jeho odpovídající racemická forma a při léčení označených chorob by tedy měl

způsobovat méně nežádoucích vedlejších účinků než racemická směs. K těmto zjištěním se dospělo pomocí in vitro a in vivo experimentů, které budou podrobněji popsány níže.

Následně se ukázalo, že (+)-PAI má R absolutní konfiguraci. Vzhledem k očekávané strukturní podobnosti (+)-PAI analogie mezi deprenylem a amfetaminy bylo toto zjištění rovněž překvapivé.

Za povšimnutí rovněž stojí vysoký stupeň stereoselektivity farmakologické aktivity mezi R(+)-PAI a S(-) enantiomerem, který bude diskutován níže. R(+)-PAI je při MAO-B inhibici téměř o čtyři řády aktivnější než S(-) enantiomer. Tento poměr je podstatně vyšší než poměr pozorovaný mezi dvěma deprenylovými enantiomery (Knoll a Magyar, Adv. Biochem. Psychopharmacol., 5, 393 (1972); Magyar a kol., Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 32, 377 (1967)). Kromě toho při určitých fyziologických testech se zjistilo, že (+)-deprenyl má stejnou nebo vyšší aktivitu než (-) enantiomer (Tekes a kol., Pol. J. Pharmacol. Pharm., 40, 653 (1988)).

MPAI je schopnějším inhibitorem MAO aktivity, ale s nižší selektivitou pro MAO-B než MAO-A (Tipon a kol., Biochem. Pharmacol., 31, 1250 (1982)). To, že při pozorování MPAI byl překvapivě zjištěn nízký stupeň difference v relativních aktivitách dvou rozlišených enantiomerů, ještě dále zvýraznilo chování R(+)-PAI (viz tabulka 1B).

Vynález rovněž poskytuje způsoby použití samotného farmaceuticky účinného PAI-enantiomeru (bez L-DOPA) při léčení Parkinsonovy choroby, poruch paměti, demence, deprese, hyperaktivního syndromu, afekce, neuro-

degenerativních chorob, neurotoxických poranění, mrtvice, mozkové ischemie, traumatického poranění hlavy, traumatického poranění míchy, neurotraumatu, schizofrenie, poruch pozornosti, sklerózy multiplex a abstinenčních příznaků (viz přehled Youdim a kol., Handbook of Experimental Pharmacology, Trendelenburg a Weiner, Springer-Verlag, vyd. 90/I, kap. 3 (1988)).

Vynález dále poskytuje způsob použití samotného farmaceuticky účinného PAI-enantiomeru pro léčení Parkinsonovy choroby. Vynález rovněž poskytuje farmaceutické kompozice obsahující R(+)PAI a synergická činidla, například Levodopu. Použití těchto činidel se studovalo s ohledem na (-)-deprenyl, který, jak se ukázalo, byl účinný, pokud se podával samotný pacientům v raném stadiu Parkinsonovy choroby a měl synergický účinek u pacientů, pokud se podával společně s α -tokoferolem, derivátem vitaminu E (Parkinson's Study Group, New England J. Med., 321(20), 1364-1371 (1989)).

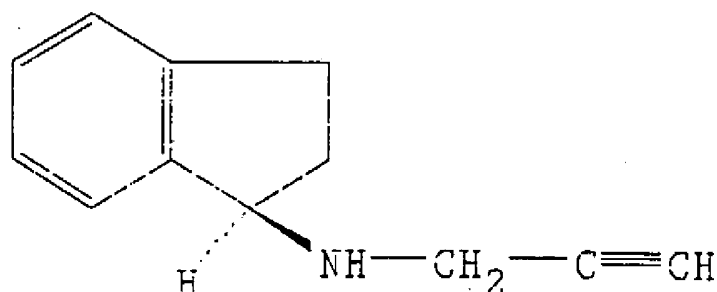
Kromě své využitelnosti při léčení Parkinsonovy choroby se rovněž ukázalo, že (-)-deprenyl je užitečný při léčení pacientů trpících demencí Alzheimerova typu (DAT) (Tariot a kol., Psychopharmacology, 91, 489-495 (1987)) a při léčení deprese (Mendelewicz a Youdim, Brit. J. Psychiat. 142, 508-511 (1983)). Ukázalo se, že R(+)PAI sloučenina podle vynálezu, a zejména její mesylátová sůl, obnovují paměť. R(+)PAI má tedy potenciál pro léčení poruch paměti, demence, zejména Alzheimerova typu, a hyperaktivního syndromu u dětí.

Cílem vynálezu je rovněž poskytnutí vysoce stabilních solí R(+)PAI s vynikajícími farmaceutickými vlastnostmi. Mesylátová sůl je zvláště stabilní, vykazuje neočekávaně

větší selektivitu a vykazuje podstatně méně vedlejších účinků než vykazují odpovídající racemické soli.

Podstata vynálezu

Vynález tady poskytuje R(+)-N-propargyl-1-aminoindan mající strukturu:



Vynález rovněž poskytuje farmaceuticky přijatelnou sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Vynález dále poskytuje farmaceutickou kompozici, která obsahuje terapeuticky účinné množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli a farmaceuticky přijatelný nosič.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu, trpícího Parkinsonovou chorobou, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení Parkinsonovy choroby, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále popisuje způsob léčení subjektu trpícího poruchou paměti, který spočívá v podání množství R(+)-N-

propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení poruchy paměti subjektu, danému subjektu.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího demencí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení demence, subjektu trpícímu touto chorobou. U jednoho provedení se demencí rozumí demence Alzheimerova typu (DAT).

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího depresí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení deprese, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího hyperaktivním syndromem, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení hyperaktivního syndromu, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího afektivní nemocí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení afektivní nemoci, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího neurodegenerativní nemocí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení neurodegenerativní nemoci, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího neurotoxickým poškozením, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení neurotoxického poškození, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího mozkovou ischemií, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení mozkové ischemie, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího traumatickým poškozením hlavy, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení traumatického poškození hlavy, subjektu trpícímu tímto poškozením.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího traumatickým poškozením míchy, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení traumatického poškození míchy, subjektu trpícímu tímto poškozením.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího schizofrenií, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení schizofrenie, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího ochabnutím pozornosti, který zahrnuje podání množství R(+)-

N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení ochabnutí pozornosti, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího sklerózou multiplex, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení sklerózy multiplex, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob prevence nervových poruch u subjektu, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro prevenci nervového poškození, subjektu.

Vynález dále poskytuje způsob léčení drogově závislého subjektu trpícího abstinenci příznaky, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení abstinenci příznaků, subjektu trpícímu těmito příznaky.

Vynález dále poskytuje způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu, který zahrnuje uvedení R(-)-aminoindanu v přítomnosti organické nebo anorganické báze do kontaktu s propargylbromidem nebo propargylchloridem za vzniku R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu a izolaci takto vzniklého R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy racemického N-propargyl-1-aminoindanu, který zahrnuje uvedení racemického 1-aminoindanu v přítomnosti organické nebo anorganické báze do kontaktu s propargylbromidem nebo propargylchloridem za vzniku racemického N-propargyl-1-

aminoindanu a izolaci takto vzniklého racemického N-propargyl-1-aminoindanu.

Cílem vynálezu je konečně způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanové soli, který zahrnuje uvedení racemického N-propargyl-1-aminoindanu do styku s opticky aktivní kyselinou za vzniku dvou diastereomerních N-propargyl-1-aminoindanových solí a izolaci R(+)-N-propargyl-1-aminoindanové soli z takto vzniklých diastereomerních N-propargyl-1-aminoindanových solí.

Stručný popis obrázků

Obr. 1 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 22, který se zaměřuje na stanovení MAO-A inhibiční aktivity in vitro.

Obr. 2 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 22, který se zaměřuje na stanovení MAO-B inhibiční aktivity in vitro.

Obr. 3 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 22, který se zaměřuje na stanovení MAO aktivity v lidské kortikální tkáni.

Obr. 4 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (i.p.) MAO-A v mozku.

Obr. 5 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (i.p.) MAO-B v mozku.

Obr. 6 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (i.p.) MAO-A v játrech.

Obr. 7 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (i.p.) MAO-B v játrech.

Obr. 8 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (per os) MAO-A v mozku.

Obr. 9 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (per os) MAO-B v mozku.

Obr. 10 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (per os) MAO-A v játrech.

Obr. 11 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 23, který analyzuje akutní inhibici (per os) MAO-B v játrech.

Obr. 12 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 24, který analyzuje chronickou inhibici MAO-A v mozku.

Obr. 13 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 24, který analyzuje chronickou inhibici MAO-B v mozku.

Obr. 14 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 24, který analyzuje chronickou inhibici MAO-A v játrech.

Obr. 15 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 24, který analyzuje chronickou inhibici MAO-B v játrech.

Obr. 16 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 25, který analyzuje MAO-B aktivitu v krysím mozku jako časovou funkci po i.p. podání R(+)PAI.

Obr. 17 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 32, které ukazují obnovu normokineze u myší, kterým byl podán haloperidol v dávce 6 mg/kg s.c. Všem myším byly podány testované účinné látky i.p. v naznačených dávkách. O 2 hodiny později jim byl aplikován haloperidol. Kinetické výsledky se odečetly 3 hodiny po podání haloperidolu. Tyto výsledky odpovídají schopnosti pohybovat se horizontálně podél tyče, schopnosti slézt vertikálně tyč obličejem dolů a zkrácení katalepsie. Při absenci haloperidolu bylo maximálně dosaženo výsledku 12, zatímco při použití samotného haloperidolu se dosáhlo výsledku $6,6 \pm 0,03$. Statistická hodnota se vypočetla podle Studentova „t“ testu: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, vztaženo k hodnotám získaným při aplikaci samotného haloperidolu. Výsledky (R)-PAI se značně liší od výsledků dosažených při aplikaci racemického PAI v dávce 5 mg/kg ($p \leq 0,05$), 10 mg/kg ($p \leq 0,01$) a 15 mg/kg ($p \leq 0,05$) ($n=5,6$). Uvedená dávka je počítána pro volnou bázi PAI (a nikoliv pro mesylátovou sůl).

Obr. 18 graficky znázorňuje výsledky testu prováděného v příkladu 32, které ukazují obnovu motorické aktivity u myší ošetřených α -methyl-p-tyrosinem při 100 mg/kg i.p. Krysám se aplikovala testovaná látka i.p. v naznačených dávkách. O dvě hodiny později jim byl aplikován α -Mpt a

bezprostředně po jeho aplikaci se myši umístily do klecí. Celková motorická aktivita se zaznamenávala v průběhu deseti hodin. Kontrolní krysy, ošetřené fyziologickým roztokem, dosahovaly výsledku $15\ 862 \pm 1424$. Při aplikaci samotného α -MpT dosahovaly myši výsledku $8\ 108 \pm 810$. Statistická hodnota se vypočetla podle Studentova „t“ testu: * $p \leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$, vztaženo k hodnotám získaným při aplikaci samotného α -MpT. Výsledky (R)-PAI se značně liší od výsledků dosažených při aplikaci racemického PAI v dávce 2 mg/kg ($p \leq 0,01$) ($n=6$). Uvedená dávka je počítána pro volnou bázi PAI a nikoliv pro mesylátovou sůl.

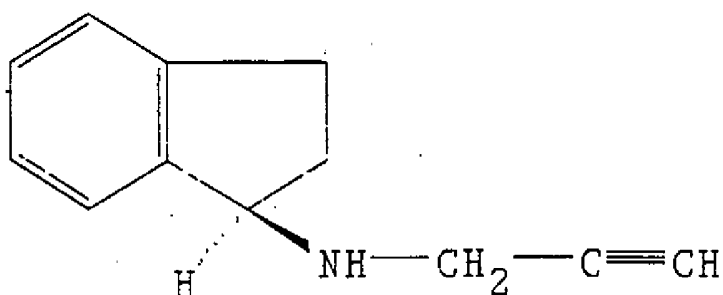
Obr. 19 graficky znázorňuje NADH odezvu na dvouminutovou anoxii, měřenou 30 minut po úrazu a následně v půlhodinových intervalech.

Obr. 20 graficky znázorňuje hodnocení ischemické mozkové léze pomocí měřicího přístroje MRI T2-scan 48 hodin po ošetření krys MCA-O a [R](+)PAI mesylátem. Střední cerebrální arterie se chirurgicky uzavřela způsobem popsáným v příkladu 38. [R](+)PAI mesylát se podával následujícím způsobem: $1,0\text{ mg/kg}$ ip bezprostředně po chirurgickém zákroku; $0,5\text{ mg/kg}$ ip dvě hodiny po chirurgickém zákroku; $1,0\text{ mg/kg}$ ip 24 hodin po chirurgickém zákroku. Rozsah infarktu (mm^3) se určil pomocí MRI 48 hodin po zákroku.

Obr. 21 graficky znázorňuje neurologické hodnocení krys Wistar, které se podrobily léčení MCA-O a [R](+)PAI mesylátem. Střední cerebrální arterie se chirurgicky uzavřela a [R](+)PAI mesylát se podával způsobem popsáným v souvislosti s obrázkem 20. 24 hodin po chirurgickém zákroku

se způsobem popsaným v příkladu 38 získaly neurologické výsledky.

Vynález tedy poskytuje R(+)-N-propargyl-1-aminoindan obecného vzorce:



Jak demonstrují níže uvedené experimentální příklady, R(+)-PAI je téměř 7 000krát účinnější v roli inhibitoru MAO-B než S(-)-PAI. Z pohledu známých MAO-B inhibitorů, které vykazují nízkou selektivitu mezi MAO-A a MAO-B a které nevykazují předpokládané trendy, pokud jde o účinnost jako funkci R a S konfigurace, je selektivita R(+)-PAI neočekávaná.

R(+)-PAI lze získat optickou rezolucí racemických směsí R- a S-enantiomerů PAI. Tuto rezoluci lze realizovat libovolnou běžnou rezoluční metodou, která je odborníkům v daném oboru známa, například metodu, kterou popsal J. Jacques, A. Collet a S. Wilen v „Enantiomers, Racemates and Resolutions“, Wiley, New York (1981). Rezoluci lze provádět například preparativní chromatografií na chirální koloně. Dalším příkladem vhodné rezoluční metody je příprava diastereomerních solí s chirální kyselinou, například kyselinou vinnou, kyselinou maleinovou, kyselinou

mandlovou nebo N-acetylovými deriváty aminokyselin, například N-acetylleucinem, a následnou rekrystalizací, jejímž cílem je izolace diastereomerní soli požadovaného R enantiomeru.

Racemickou směs R a S enantiomerů PAI lze připravit například způsobem popsaným v GB 1,003,676 a GB 1,037,014. Racemickou směs PAI lze rovněž připravit uvedením 1-chloroindanu do reakce s propargylaminem. Alternativně lze tento racemát připravit uvedením propargylaminu do reakce s 1-indanonem za vzniku odpovídajícího iminu a následnou redukcí C=N dvojné vazby iminu vhodným činidlem, například borohydridem sodným.

R enantiomer PAI lze podle vynálezu rovněž připravit přímo z opticky aktivního R enantiomeru 1-aminoindanu reakcí s propargylbromidem nebo propargylchloridem v přítomnosti organické nebo anorganické báze a případně v přítomnosti vhodného rozpouštědla.

Vhodnou organickou nebo anorganickou bází pro výše zmíněnou reakci může být například triethylamin, pyridin, uhličitany alkalických kovů a hydrogenuhličitany. Pokud se reakce provádí v přítomnosti rozpouštědla, potom by se toto rozpouštědlo mělo zvolit například z toluenu, methylenu, chloridu a acetonitrilu. Jedním způsobem přípravy R(+)PAI je uvedení R-1-aminoindanu do reakce s propargylchloridem za použití hydrogenuhličitanu draselného jako báze a acetonitrilu jako rozpouštědla.

Výše popsaná reakce 1-aminoindanu zpravidla poskytuje směs nezreagovaného primárního aminu, požadovaného sekundárního aminu a terciálního aminu N,N-bis-propargylamino-produktu. Požadovaný sekundární amin, tj.

N-propargyl-1-aminoindan, lze ze získané směsi separovat běžnou separační metodou, například pomocí chromatografie, destilace a selektivní extrakce.

R-1-aminoindanový výchozí materiál lze připravit v oboru známými způsoby, které zahrnují například způsob popsaný Lawsonem a Raoem, *Biochemistry*, 19, 2133 (1980), způsoby citované v dokumentech, které jsou jmenovány v kapitole „Dosavadní stav techniky“ a způsob popsaný v Evropském patentu č. 234,590.

R-1-aminoindan lze rovněž připravit rezolucí racemické směsi R a S enantiomerů, která zahrnuje například přípravu diastereomerních solí s chirálními kyselinami nebo některou další známou metodou, například metodou, kterou popsal J. Jacques a kol., tamtéž. Alternativně lze R-1-aminoindan připravit uvedením 1-indanonu do reakce s opticky aktivním aminem a následnou redukcí dvojné vazby mezi uhlíkem a dusíkem ve výsledném iminu hydrogenací nad vhodným katalyzátorem, například nad paládiem na uhlíku, oxidem platiny nebo Raneyovým niklem. Vhodné opticky aktivní aminy zahrnují například jeden ze dvou antipodů fenethylaminu nebo ester aminokyseliny, například valinu nebo fenylalaninu. Benzylickou N-C vazbu lze následně rozštěpit hydrogenací za nebouřlivých podmínek.

Dalším způsobem přípravy R-1-aminoindanu je hydrogenace výše popsaných indan-1-onoximetherů, ve kterých alkylová část etheru obsahuje opticky čistý chirální střed. Alternativně lze nechirální deriváty indan-1-onu obsahující dvojnou vazbu mezi uhlíkem a dusíkem, například imin nebo oxim, redukovat chirálním redukčním činidlem, např. komplexem tetrahydridohlinitanu lithného a efedrinu.

Předmětem vynálezu je dále poskytnout farmaceuticky přijatelnou sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Farmaceuticky přijatelná sůl podle vynálezu například zahrnuje mesylát, maleinát, fumarát, vinan, hydrochlorid, hydrobromid, esylát, p-toluensulfonát, benzoát, acetát, fosfát a sulfátové soli.

U jednoho provedení se sůl zvolila ze skupiny tvořené mesylátovou solí R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu, esylátovou solí R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu a sulfátovou sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Jak demonstrují níže uvedené experimentální příklady, mesylátová sůl je vysoce stabilní vůči tepelné degradaci a vykazuje oproti racemické směsi neočekávaně dobrou selektivitu pro MAO-B.

Pro přípravu farmaceuticky přijatelných kyselinových adičních solí sloučeniny R(+)-PAI lze uvést volnou bázi konvenčními metodami do reakce s požadovanými kyselinami v přítomnosti vhodného rozpouštědla. Podobně lze kyselinovou adiční sůl převést známými postupy na volnou bazickou formu.

Výhodný způsob přípravy mesylátové formy (R)-PAI zahrnuje: (a) adici vodného roztoku 15% hydroxidu sodného do roztoku propargylbenzensulfonátu (nebo tosylátu nebo mesylátu) v toluenu; (b) míchání po dobu 5 hodin; (c) přidání dalšího toluenu a vody; (d) separování a promytí organické fáze 10% hydroxidem sodným a následné naředění vodou; (e) nastavení pH hodnoty směsi na 3,2 přidáním 10% vodného roztoku kyseliny sírové; (f) separování vodné fáze a nastavení pH na 7,3 10% vodným roztokem hydroxidu

sodného; (g) trojí extrahování toluenem za udržování konstantní pH hodnoty; (h) zahuštění sloučených organických vrstev ve vakuu za vzniku žlutého oleje; (i) rozpuštění oleje a kyseliny L-vinné v isopropanolu; (j) zahřátí na refluxní teplotu a udržování při této teplotě po dobu jedné hodiny; (k) ochlazení na pokojovou teplotu a izolace sraženiny filtrací; (l) rekrystalizace surového di-propargylaminoindanvinanu ze směsi methanolu a isopropanolu (1:1) za vzniku di(R(+)-N-propargyl-1-aminoindan)vinanu; (m) rozpuštění vinanu a methansulfonové kyseliny v isopropanolu a třicetiminutové ohřívání při refluxní teplotě; a (n) ochlazení na pokojovou teplotu a sebrání vysráženého R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Vynález dále poskytuje farmaceutickou kompozici, která obsahuje terapeuticky účinné množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli a farmaceuticky přijatelný nosič. „Terapeuticky účinné množství“ R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli lze určit běžnými postupy, které jsou odborníkům v daném oboru známy.

Pro uvedené kompozice lze například použít následující soli. Hydrochlorid, fosfát, maleinát, fumarát, vinan, mesylát, esylát a sulfátové soli.

Tyto kompozice lze připravit jako léčiva určená pro orální, parenterální, rektální nebo transdermální podání.

U jednoho provedení je farmaceuticky přijatelným nosičem pevná látka a farmaceutická kompozice má formu tablet. Terapeuticky účinným množstvím může být množství pohybující se přibližně od 0,1 mg do 100 mg. Farmaceuticky

účinným množstvím může být rovněž přibližně 1 mg až 10 mg účinné látky.

Vhodnými formami pro orální podání jsou například tablety, lisované nebo potažené pilulky, dražé, oplatky, tvrdé a měkké želatinové kapsle, podjazykové tablety, sirupy a suspenze.

U alternativního provedení je farmaceuticky přijatelným nosičem kapalina a farmaceutická kompozice má formu injektovatelného roztoku. Terapeuticky účinným množstvím může být množství pohybující se přibližně od 0,1 mg/ml do 100 mg/ml. Terapeuticky účinným množstvím může být rovněž přibližně 1 mg/ml až 10 mg/ml mg účinné látky. U jednoho provedení je podanou dávkou množství pohybující se v rozmezí od 0,5 ml do 1,0 ml.

U dalšího alternativního provedení je nosičem gel a farmaceutická kompozice má formu čípku.

Pro parenterální podání vynález poskytuje ampule nebo lahvičky, které obsahují vodný nebo bezvodý roztok nebo emulzi. Farmaceutická kompozice podle vynálezu, určená pro rektální podání, má formu čípků s hydrofilním nebo hydrofobním vehikulem. Pro topickou aplikaci je určena farmaceutická formulace podle vynálezu, která má formu mastí a transdermální dopravu zajišťují vhodné dopravní systémy, které jsou v daném oboru známy.

U výhodného provedení je farmaceuticky přijatelnou solí mesylátová sůl.

Tyto kompozice lze pro léčení výše jmenovaných chorob použít samotné nebo alternativně, jako v případě

Parkinsonovy choroby, mohou být použity například jako přídatný prostředek při konvenčních L-DOPA terapiích.

Výhodné dávky účinné složky, tj. R-PAI, ve výše zmíněných kompozicích leží v následujících rozmezích. V případě orálních formulací nebo čípků lze denně brát 0,1 do 100 mg účinné látky na dávkovou jednotku a výhodně 1 až 10 mg na dávkovou jednotku denně. V případě injektovatelných formulací 0,1 až 100 mg/ml na dávkovou jednotku denně a výhodně 1 až 10 mg/ml na dávkovou jednotku denně.

U jednoho provedení farmaceutická kompozice dále zahrnuje terapeuticky účinné množství Levodopy. U dalšího provedení farmaceutická kompozice dále zahrnuje účinné množství dekarboxylázového inhibitoru.

Množstvím dekarboxylázového inhibitoru, podaného v kombinaci s (R)-PAI nebo jeho farmaceuticky přijatelnou solí, je množství účinné pro zajištění spotřeby L-DOPA subjektem.

Dekarboxylovým inhibitorem může být L-Carbidopa. U jednoho provedení je terapeuticky účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu přibližně 0,1 mg až 100 mg, terapeuticky účinným množstvím Levodopy přibližně 50 mg až 250 mg a účinné množství L-Carbidopy je přibližně 10 mg až 25 mg.

Dekarboxylázovým inhibitorem může být rovněž benserazid. U jednoho provedení, je terapeuticky účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu přibližně 0,1 mg až 100 mg, terapeuticky účinným množstvím Levodopy je

přibližně 50 mg až 200 mg a účinným množstvím benserazidu je přibližně 12,5 mg až 50 mg.

Předmětem vynálezu je dále způsob léčení subjektu trpícího Parkinsonovou chorobou, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení Parkinsonovy choroby, subjektu trpícímu touto chorobou.

Způsoby léčení Parkinsonovy choroby, jejichž podstatou je kombinace použití (R)-PAI s dalšími účinnými látkami, například dopaminovými agonizujícími činidly, bromokryptinem, pergolidem, lisuridem, a do rozsahu vynálezu spadají rovněž katecholaminoxidázo-methyltransferázové inhibitory.

U výhodného provedení je farmaceuticky přijatelnou solí mesylátová sůl.

Podání může zahrnovat orální podání, rektální podání, transdermální podání nebo parenterální podání.

U jednoho provedení způsob podle vynálezu dále zahrnuje podání terapeuticky účinného množství Levodopy subjektu. U dalšího provedení způsob podle vynálezu dále zahrnuje podání účinného množství dekarboxylázového inhibitoru subjektu.

Dekarboxylázovým inhibitorem může být L-Carbidopa. Alternativně může být dekarboxylázovým inhibitorem benserazid.

Vynález dále popisuje způsob léčení subjektu trpícího poruchou paměti, který spočívá v podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné

solí, účinného pro léčení poruchy paměti subjektu, danému subjektu.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího demencí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení demence, subjektu trpícímu touto chorobou. U jednoho provedení se demencí rozumí demence Alzheimerova typu (DAT).

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího depresí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení deprese, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího hyperaktivním syndromem, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení hyperaktivního syndromu, subjektu trpícímu touto chorobou.

Toto podání může zahrnovat orální podání, rektální podání nebo parenterální podání.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího afektivní nemocí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení afektivní nemoci, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího neurodegenerativní nemocí, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky

přijatelné soli, účinného pro léčení neurodegenerativní nemoci, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího neurotoxickým poškozením, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení neurotoxického poškození, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího mozkovou ischemií, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení mozkové ischemie, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález poskytuje způsob léčení mozkové ischemie nebo mrtvice u subjektu, který zahrnuje podání určitého množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení mozkové ischemie nebo mrtvice, subjektu trpícímu touto chorobou.

U jednoho provedení způsobu léčení mozkové ischemie nebo mrtvice se farmaceuticky přijatelná sůl zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí. Výhodně je farmaceuticky přijatelnou solí mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Účinné množství lze určit za použití technik, které jsou odborníkům v daném oboru známy, například titrace. U jednoho provedení vynálezu se účinné množství pohybuje přibližně v rozmezí od 0,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu do 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu. R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho

farmaceuticky přijatelná sůl se podává za použití technik známých odborníkům v daném oboru. Může být například podáván intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

Subjektem je výhodně savec, například pes, kočka, myš, krysa, králík, prase, kůň, koza, ovce, kráva nebo opice. U výhodného provedení je subjektem člověk.

U jednoho provedení podle vynálezu se účinné množství pohybuje přibližně od 0,01 mg do 50,0 mg na den. U zvláště výhodného provedení se účinné množství pohybuje od 0,1 do 10,0 mg na den.

U jednoho provedení výše popsaného způsobu se rozsah mozkové ischemie redukuje přibližně o 35 %.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího traumatickým poškozením hlavy, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení traumatického poškození hlavy, subjektu trpícímu tímto poškozením.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího ~~traumatickým poškozením míchy, který zahrnuje podání~~ množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení traumatického poškození míchy, subjektu trpícímu tímto poškozením.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího nervovým traumatem, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné

solí, účinného pro léčení nervového traumatu, subjektu trpícímu tímto poškozením.

Při léčení traumatického poškození hlavy, traumatického poškození míchy nebo nervového traumatu se farmaceuticky přijatelná sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí. Výhodně je farmaceuticky přijatelnou solí mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Účinné množství lze určit za použití technik, které jsou odborníkům v daném oboru známy, například titrace. U jednoho provedení vynálezu se účinné množství pohybuje přibližně v rozmezí od 0,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu do 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu. R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl se podává za použití technik známých odborníkům v daném oboru. Může být například podáván intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

Subjektem je výhodně savec, například pes, kočka, myš, krysa, králík, prase, kůň, koza, ovce, kráva nebo opice. U výhodného provedení je subjektem člověk.

U jednoho provedení podle vynálezu se účinné množství pohybuje přibližně od 0,01 mg do 50,0 mg na den. U zvláště výhodného provedení se účinné množství pohybuje od 0,1 do 10,0 mg na den.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího schizofrenií, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné

solí, účinného pro léčení schizofrenie, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího ochabnutím pozornosti, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení ochabnutí pozornosti, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob léčení subjektu trpícího sklerózou multiplex, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení sklerózy multiplex, subjektu trpícímu touto chorobou.

Vynález dále poskytuje způsob prevence nervových poruch u subjektu, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro prevenci nervového poškození, subjektu.

U jednoho provedení je nervovým poškozením poškození struktury nervů. U dalšího provedení je poškozením struktury nervů poškození očních nervů.

Vynález dále poskytuje způsob léčení drogově závislého subjektu na návykové látce trpícího abstinenčními příznaky, který zahrnuje podání množství R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, účinného pro léčení abstinenčních příznaků, subjektu trpících těmito příznaky.

Výraz „abstinenční příznaky“, jak je zde použit, označuje fyzické a/nebo psychické příznaky včetně neodolatelné touhy po droze, deprese, podráždění, anergie,

amotivace, změny chuti, nespavosti, třesu a nepravidelného spánku.

Výraz „návyková látka“, jak je zde použit, zahrnuje například (a) návykové opiáty, například opium, heroin a morfin, (b) psychostimulační látky, například kokain, amfetaminy a metamfetaminy, (c) alkohol, (d) nikotin, (e) barbituráty a (f) narkotika, například fentanyl, kodein, difenoxylát a thebain.

U jednoho provedení je návykovou látkou kokain. U dalšího provedení je návykovou látkou alkohol.

Vynález dále poskytuje způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu, který zahrnuje uvedení R(-)-aminoindanu v přítomnosti organické nebo anorganické báze do kontaktu s propargylbromidem nebo propargylchloridem za vzniku R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu a izolaci takto vzniklého R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy racemického N-propargyl-1-aminoindanu, který zahrnuje uvedení racemického 1-aminoindanu v přítomnosti organické nebo anorganické báze do kontaktu s propargylbromidem nebo propargylchloridem za vzniku racemického N-propargyl-1-aminoindanu a izolaci takto vzniklého racemického N-propargyl-1-aminoindanu.

Cílem vynálezu je konečně způsob přípravy R(+)-N-propargyl-1-aminoindanové soli, který zahrnuje uvedení racemického N-propargyl-1-aminoindanu do styku s opticky aktivní kyselinou za vzniku dvou diastereomerních N-propargyl-1-aminoindanových solí a izolaci R(+)-N-

propargyl-1-aminoindanové soli z takto vzniklých diastereomerních N-propargyl-1-aminoindanových solí.

U jednoho provedení izolace zahrnuje izolaci frakční krystalizací.

Následující příklady provedení vynálezu mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezuji rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Racemický N-propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Do 75 ml acetonitrilu se přidalo 10,0 g racemického 1-aminoindanu a 10,4 g uhličitanu draselného. Výsledná suspenze se ohřála na 60°C a do takto ohřáté suspenze se po kapkách přidalo 4,5 g propargylchloridu.

Směs se míchala při 60°C 16 hodin, načež se většina těkavých podílů odstranila destilací ve vakuu. Zbytek se rozdělil mezi 10% vodný roztok hydroxidu sodného a methylenchlorid.

Organická fáze se vysušila a rozpouštědlo se odstranilo destilací. Zbytek se čistil mžikovou chromatografií na silikagelu, přičemž jako eluční činidlo se použila směs 40% etylacetátu a 60% hexanu. Frakce, obsahující titulní sloučeninu ve formě volné báze, se sloučily a eluční činidlo se nahradilo etherem. Etherický

roztok se ošetřil plynným chlorovodíkem, vzniklá sraženina se izolovala vakuovou filtrací, rekrystalizovala z isopropanolu a poskytla výtěžek 7,3 g titulní sloučeniny, t.t. 182-4°C.

Následující chromatografická a spektroskopická data odpovídala datům uvedeným v patentu US 3,513,244, uděleném 19. května 1970, a autentickému vzorku: NMR δ (CDCl_3): 2,45 (2H, m), 2,60 (1H, t), 2,90 (1H, m), 3,45 (1H, m), 3,70 (2H, d), 4,95 (1H, t), 7,5 (4H, m) ppm.

Příklad 2

S-(-)-N-Propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Titulní sloučenina ve formě volné báze se izolovala štěpením racemické směsi volné báze z příkladu 1 na Chiracel OJ (celulóza tris [p-methylbenzoát]) preparativním HPLC sloupce eluováním pomocí eluční směsi 10% isopropanolu a 90% hexanu a odebráním frakce s prvním výrazným píkem. Výsledný olej se převedl na titulní sloučeninu (hydrochlorid) ošetřením 10% diethyletherového roztoku oleje plynným chlorovodíkem a izolováním vzniklé sraženiny vakuovou filtrací. $[\alpha]_D^{25} -29,2^\circ$ (1% ethanol), t.t. 182-184°C. Další chromatografické a spektroskopické vlastnosti byly identické s vlastnostmi hydrochloridové soli z příkladu 1.

Příklad 3

R-(+)-N-Propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Titulní sloučenina se připravila způsobem popsaným ve výše uvedeném příkladu 2 s tou výjimkou, že se z preparativní HPLC kolony odebrala frakce, vykazující druhý pík: $[\alpha]_D^{+29,1}$ (0,8%, ethanol), t.t. 179-181°C. Další chromatografické a spektroskopické vlastnosti byly identické s vlastnostmi hydrochloridové soli z příkladu 1.

Příklad 4

R-(+)-N-Propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Do 95 ml acetonitrilu se přidalo 12,4 g R-(-)-1-aminoindanu a 12,9 g uhličitanu draselného. Výsledná suspenze se ohřála na 60°C a do takto ohřáté suspenze se po kapkách přidalo 5,6 g propargylchloridu. Směs se 16 hodin míchala při 60°C, načež se většina těkavých podílů odstranila destilací ve vakuu. Zbytek se rozdělil mezi 10% vodný roztok hydroxidu sodného a methylenchlorid.

Organická fáze se vysušila a rozpouštědlo se odstranilo ve vakuu. Zbytek se čistil mžikovou chromatografií na silikagelu, přičemž jako eluční činidlo se použila směs 40% etylacetátu a 60% hexanu. Frakce, obsahující titulní sloučeninu ve formě volné báze, se sloučily a eluční činidlo se nahradilo etherem. Etherický roztok se ošetřil plynným chlorovodíkem, vzniklá sraženina se izolovala vakuovou filtrací, rekrystalizovala z isopropanolu a poskytla výtěžek 6,8 g titulní sloučeniny,

t.t. 183-185°C, $[\alpha]_D^{+30,90}$ (2% ethanol). Spektrální vlastnosti byly identické se spektrálními vlastnostmi zveřejněnými pro sloučeninu z příkladu 1.

Příklad 5

S-(-)-N-Propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Titulní sloučenina se připravila způsobem popsáním ve výše uvedeném příkladu 4 s tou výjimkou, že jako výchozí materiál se použil S-(+)-1-aminoindan. Produkt vykazoval $[\alpha]_D^{-30,3}$ (2%, ethanol), t.t. 183-5°C. Spektrální vlastnosti byly identické s vlastnostmi zveřejněnými pro sloučeninu z příkladu 1.

Příklad 6A

Di(R-(+)-N-propargyl-1-aminoindan) L-vinan

Do roztoku kyseliny vinné (4,4 g) ve 48 ml vroucího methanolu se přidal roztok R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanové volné báze (5,0 g) v methanolu (48 ml). Roztok se ohříval pod zpětným chladičem a v průběhu dvaceti minut se přidalo 284 ml t-butylmethyleheru. Směs se ohřívala dalších 30 minut, ochladila, vzniklá sraženina se izolovala vakuovou filtrací a poskytla výtěžek 6,7 g titulní sloučeniny: t.t. 175-177°C;

$[\alpha]_D (1,5, H_2O) = +34,3;$

analýza vypočtena pro $C_{28}H_{32}O_6N_2$;

C	H	N
68,26	6,56	5,69

nalezeno:	C	H	N
	68,76	6,57	5,61

Příklad 6B

R-(+)-N-Propargyl-1-aminoindan mesylát

a) Do roztoku propargylbenzensulfonátu (78,4 g) a racemického aminoindanu (63,2 g) v toluenu (240 ml) se při 20°C po kapkách přidal vodný roztok 15% hydroxidu sodného (108 ml). Po pěti hodinách následného míchání se za stálého míchání přidal toluen (80 ml) a voda (200 ml). Organická fáze se separovala a promyla 10% vodným roztokem hydroxidu sodného a naředila vodou. Hodnota pH směsi se pomocí 10% vodného roztoku kyseliny sírové nastavila na 3,2. Vodná fáze se separovala, její pH se nastavila na 7,3 pomocí 10% hydroxidu sodného a třikrát se extrahovala toluenem za udržování konstantního pH. Sloučené organické vrstvy se zahustily ve vakuu a poskytly 40,7 g žlutého oleje.

b) Výše uvedený surový racemický propargylaminoindan a kyselina L-vinná (10 g) se rozpustily v isopropanolu (1 l) a ohřívaly pod zpětným chladičem 1 hodinu. Reakční směs se následně, za stálého míchání, ochladila na pokojovou teplotu a sraženina se izolovala filtrací. Surový di(propargylaminoindan)vinan se rekrystalizoval z 1 l 1:1 methanolu a isopropanolu a poskytl di(R-(+)-N-propargyl-1-aminoindan)-L-vinan s fyzikálními a spektrálními vlastnostmi, které byly identické s odpovídajícími vlastnostmi sloučeniny z příkladu 6A.

c) Roztok di-(R-+)-N-propargyl-1-aminoindan)vinanu (15 g) a kyseliny methansulfonové (6 g) v isopropanolu (150 ml) se ohřívala pod zpětným chladičem 30 minut. Reakce se následně ochladila na pokojovou teplotu a výsledná sraženina se izolovala vakuovou filtrací a poskytla titulní sloučeninu (11,1 g), t.t. 157°C a $[\alpha]_D=22^\circ$.

Příklad 7

R-(+)-N-Methyl-N-propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Volná báze tvořená R-(+)-N-propargyl-1-aminoindanem z příkladu 4 (1,2 g), uhličitanem draselným (0,79 g), (0,97 g) a methyl jodidem (1 g) se přidala do 15 ml acetonu a výsledná suspenze se ohřívala 8 hodin při refluxní teplotě pod dusíkovou atmosférou. Potom se za sníženého tlaku odstranily těkavé podíly a zbytek se rozdělil mezi 10% vodný roztok hydroxidu sodného (30 ml) a methylenchlorid (30 ml). Organická fáze se vysušila a rozpouštědlo odstranilo ve vakuu. Zbytek se čistil mžikovou chromatografií na silikagelu, přičemž jako eluční činidlo se použila směs 40% ethylacetátu a 60% hexanu. Frakce, obsahující titulní sloučeninu ve formě volné báze, se sloučily a eluční činidlo se nahradilo diethyletherem. Etherický roztok se ošetřil plynným HCl. Těkavé podíly se odstranily ve vakuu a zbytek, po rekrystalizaci z isopropanolu, poskytl 400 mg titulní sloučeniny ve formě bílé krystalické pevné látky, t.t. 134-136°C, $[\alpha]_D+31,40$ (ethanol). NMR δ (CDCl₃): 2,55 (2H, m), 2,7 (1H, široké s), 2,8 (3H, s), 3,0 (1H, m), 3,4 (1H, m), 3,9 (2H, široké s), 5,05 (1H, m), 7,7 (4H, m) ppm.

Příklad 8

S-(-)-N-Methyl-N-propargyl-1-aminoindan hydrochlorid

Jako výchozí materiál se použil S-(-)-N-propargyl-1-aminoindan (volná báze) z příkladu 5 a titulní sloučenina z výše popsaného příkladu 7. Všechny fyzikální a spektrální vlastnosti titulní sloučeniny byly identické s odpovídajícími vlastnostmi sloučeniny z příkladu 7 s výjimkou $[\alpha]_D -34,9^\circ\text{C}$ (ethanol).

Příklad 9

Tabletová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	7,81 mg*
Předželatinovaný škrob NF	47,0 mg
Vodný roztok laktózy NF	66,0 mg
Mikrokrystalická celulóza NF	20,0 mg
Škrobglykolát sodný NF	2,99 mg
Mastek USP	1,5 mg
Stearát hořečnatý NF	0,7 mg

* Ekvivalentní množství do 5,0 mg N-propargylaminoindanové báze

Příklad 10

Tabletová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	1,56 mg*
Vodný roztok laktózy	50,0 mg
Předželatinovaný škrob	36,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	14,0 mg
Škrobglykolát sodný	2,14 mg
Mastek USP	1,0 mg
Stearát hořečnatý NF	0,5 mg

* Ekvivalent do 1,0 mg N-propargylaminoindanové báze

Příklad 11

Kapslová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	5,0 mg
Předželatinovaný škrob	10,0 mg
Škrob	44,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	25,0 mg
Ethylcelulóza	1,0 mg
Mastek	1,5 mg

Čištěná voda se přidala podle potřeb granulace.

Příklad 12

Injektovatelná kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	5,0 mg
Vodný roztok dextrózy	44,0 mg
HCL, přidávaná do dosažení pH 5	

Kompozice se doplnila do 1 ml čištěnou vodou.

Příklad 13

Injektovatelná kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	1,0 mg
Chlorid sodný	8,9 mg
HCL, přidávaná do dosažení pH 5	

Kompozice se doplnila do 1 ml čištěnou vodou.

Příklad 14

Injektovatelná kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	2,0 mg
Chlorid sodný	8,9 mg
HCL, přidávaná do dosažení pH 5	

Kompozice se doplnila do 1 ml čištěnou vodou.

Příklad 15

Sirupová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	5,0 mg
Sacharóza	2 250,0 mg
Sacharin sodný	5,0 mg
Methylparaben	6,0 mg
Propylparaben	1,0 mg
Ochucovadlo	20,0 mg
Glycerin USP	500 mg
95% Alkohol USP	200 mg

Kompozice se doplnila do 5,0 ml čištěnou vodou.

Příklad 16

Podjazykové tablety

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	2,5 mg
Mikrokrystalická celulóza	20,0 mg
Vodný roztok laktózy	5,0 mg
Předželatinovaný škrob	3,0 mg
Providon	0,3 mg
Bárvicí činidlo	dle potřeby
Ochucovadlo	dle potřeby
Sladidlo	dle potřeby
Mastek	0,3 mg

Směs mastových základů a účinné látky a granulátu s ethanolovým roztokem Providonu. Po vysušení a zvážení se smísila s mastkem a lisovala.

Příklad 17

PAI podjazykové tablety

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	5,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	15,0 mg
Předželatinovaný škrob	12,0 mg
Ethylcelulóza	0,3 mg
Mastek	0,3 mg

Čištěná voda se přidá podle potřeby granulace.

Příklad 18

Tabletová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan hydrochlorid	5,0 mg
Levodopa	100,0 mg
Carbidopa	25,0 mg
Předželatinovaný škrob	24,0 mg
Škrob	40,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	49,5 mg
Barvivo Col. D & C žlut' No. 10	0,5 mg
Barvivo Col. D & C žlut' No. 6	0,02 mg

Alkohol USP se přidal podle potřeby granulace.

Příklad 19

Tabletová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan mesylát	7,81 mg*
Předželatinovaný škrob NF	47,0 mg
Vodný roztok laktózy NF	66,0 mg
Mikrokrystalická celulóza NF	20,0 mg
Škrobglykolát sodný NF	2,99 mg
Mastek USP	1,5 mg
Stearát hořečnatý NF	0,7 mg

* Ekvivalent do 5,0 mg N-propargylaminoindanové báze

Příklad 20

Tabletová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan mesylát	1,56 mg*
Vodný roztok laktózy	50,0 mg
Předželatinovaný škrob	36,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	14,0 mg
Škrobglykolát sodný	2,14 mg
Mastek USP	1,0 mg
Stearát hořečnatý NF	0,5 mg

* Ekvivalent do 1,0 mg N-propargylaminoindanové báze

Příklad 21

Kapslová kompozice

N-Propargyl-1-(R)-aminoindan mesylát	5,0 mg
Předželatinovaný škrob	10,0 mg
Škrob	44,0 mg
Mikrokrystalická celulóza	25,0 mg
Ethylcelulóza	1,0 mg
Mastek	1,5 mg

Čištěná voda se přidala podle potřeb granulace.

Následující příklady, doprovodné tabulky a obrázky se týkají biologických experimentů, prováděných podle vynálezu.

Příklad 22Inhibice MAO aktivity in vitro

Experimentální protokol

Zdrojem MAO enzymu byl homogenát krysího mozku v 0,3M sacharózy, který se odstřeďoval při 600 g po dobu 15 minut. Supernatant se naředil na přibližně 0,05M fosfátového pufru a pre-inkuboval postupnými zředěními sloučenin: R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemické PAI; 20 minut při 37°C. Potom se přidaly ¹⁴C-značené substráty (2-fenylethylamin, dále jen PEA; 5-hydroxytryptamin, dále jen 5-HT) a v inkubaci se pokračovalo dalších 20 minut (PEA) nebo 30 až 45 minut (5-HT). Použité koncentráty substrátů tvořily 50 μM (PEA) a 1 mM (5-HT). V případě PEA se koncentrace enzymu zvolila

tak, aby se během reakce nespotřebovalo více než 10 % substrátu. Reakce se potom zastavila přidáním tranylcyprominu (do konečné koncentrace 1 mM) a inkubát se odfiltroval přes malou kolonu Amberlite CG-50, pufrovanou na pH 6,3. Kolona se promyla 1,5 ml vody, eluáty se odebraly a radioaktivní obsah se určil kapalinovou scintilační spektrometrií. Vzhledem k tomu, že aminové substráty zůstaly v plném rozsahu zachyceny v koloně, radioaktivita v eluátu stanovila produkci neutrálních a kyselinových metabolitů vzniklých v důsledku MAO aktivity. Aktivita MAO ve vzorku se vyjádřila jako procento kontrolní aktivity za nepřítomnosti inhibitorů, po odečtení příslušných kontrolních hodnot. Aktivita, stanovená za použití PEA jako substrátu, se označila jako MAO-B a aktivita, stanovená za použití 5-HT jako substrátu, se označila jako MAO-A.

Výsledky

Inhibiční aktivita R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemického PAI se stanovila odděleně in vitro a výsledky typických experimentálních běhů jsou znázorněny na obrázku 1 a 2. Celý experiment se zopakoval třikrát. Koncentrace inhibitoru, produkující 50% inhibici metabolismu substrátu (IC-50), které se vypočetly z inhibičních křivek, jsou uvedeny v tabulce 1B. Z těchto výsledků je patrné, že:

- a) R(+)-PAI je dvakrát aktivnější než racemát v případě inhibice MAO-B;
- b) aktivita R(+)-PAI pro MAO-B představuje pouze 1/6 800 aktivity pro MAO-A;

- c) aktivita S(-)-PAI představuje pouze 1/6 800 aktivity R(+)-PAI v případě inhibice MAO-B, přičemž S(-)-PAI vykazuje malou nebo žádnou selektivitu mezi MAO-B a MAO-A.

Tabulka 1A

IC-50 (nM) HODNOTY PRO INHIBICI MAO-A A MAO-B RACEMICKÝM PAI A JEHO R(+) A S(-) ENANTIOMERY V HOMOGENÁTU KRYSÍHO MOZKU IN VITRO

IC-50 (nM)

MAO-A			MAO-B		
S(-) PAI	R(+) PAI	Rac	S(-) PAI	R(+) PAI	Rac
26000	73	140	17000	2,5	5

Výsledky stejných experimentů, při kterých se však použil R(+) a S(-)MPAI (N-methyl-N-propargyl-1-aminoindan) jsou zaznamenány v tabulce 1B. Každý z enantiomerů MPAI je méně selektivní pokud jde o MAO-A a MAO-B inhibici než R(+)-PAI. Kromě toho je R(+)-MPAI, na rozdíl od R(+)-PAI, pouze pětkrát aktivnější než S(-)MPAI při MAO-B inhibici. R(+)-MPAI je v tomto testu přibližně 7 000krát aktivnější než S(-)-PAI.

Tabulka 1B

IC-50 (nM) HODNOTY PRO INHIBICI MAO-A A MAO-B RACEMICKÝM
PAI A JEHO R(+) A S(-) ENANTIOMERY V HOMOGENÁTU KRYSIHO
MOZKU IN VITRO

IC-50 (nM)

Sloučenina:	<u>MAO-A</u>		<u>MAO-B</u>	
	S(-)MPAI	R(+)MPAI	S(-)MPAI	R(+)MPAI
	70	3	50	10

Některé experimenty se rovněž prováděly za použití humánních cerebrálních kortikálních tkání, získaných 6 hodin po smrti a zpracovaných výše popsáním způsobem. Výsledky tohoto experimentu jsou znázorněny na obrázku 3, kde R(+)-PAI, S(-)-PAI a racemický PAI jsou definovány výše.

Příklad 23

Inhibice MAO aktivity in vivo: akutní ošetření

Experimentální protokol

Krasy (samečci odvození od Sprague Dawley) o hmotnosti 250±20 g se ošetřily jedním z enantiomerů nebo racemickou formou PAI intraperitoneální injekcí (ip) nebo orálně pomocí žaludeční sondy (po) a o hodinu, resp. o dvě hodiny, později se dekapitovaly. Skupiny tří krys se použily pro

každou dávkovou hladinu inhibitoru a MAO aktivita se zjišťovala v mozku a v játrech za použití výše popsané techniky. Množství proteinu v každé inkubaci se určilo pomocí Folin-Lowryho metody a enzymatická aktivita se vypočetla jako nmol metabolizovaného substrátu za hodinu inkubace pro každý mg proteinu. Aktivita MAO ve tkáních zvířat ošetřených inhibitory se vyjádřila jako procento enzymatické aktivity ve skupině kontrolních zvířat, kterým bylo podáváno vehikulum (voda v případě orálního podání a 0,9% fyziologický roztok v případě ip injekce) a která byla utracena výše popsaným způsobem.

Výsledky

Žádná z dávkových hladin, použitých společně s inhibitorem účinných látek, neprodukovala znatelnou změnu chování. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 4 až 11. Po i.p. podání způsobila sloučenina R(+)PAI, podaná v dávce 0,5 mg/kg, 90% inhibici mozkové MAO-B aktivity. Stejná dávka způsobila pouze 20% inhibici MAO-A aktivity. Při orálním podání způsobila stejná dávka R(+)PAI 80% inhibici MAO-B a nebyla detekována žádná inhibice MAO-A. V podstatě shodné výsledky byly zjištěny v případě inhibice hepatické MAO, například mozkové MAO. Dávky, způsobující 50% inhibici MAO-A a MAO-B (IC-50), se vypočetly z inhibičních křivek a jsou uvedeny v tabulce 2. Tato data ukazují: (a) že MAO inhibiční aktivita R(+)PAI in vivo v těle krys zůstává zachována; (b) že selektivita pro inhibici MAO-B, na rozdíl od MAO-A, je udržována R(+)PAI in vivo; (c) že je zachována mnohem větší aktivita (+)-enantiomeru, na rozdíl od (-)-enantiomeru, in vivo; (d) že sloučeniny jsou po orálním

podání účinně absorbovány; a (e) že sloučeniny účinně procházejí hematoencefalickou bariérou a účinně inhibují mozkovou MAO. Skutečnost, že R(+)-PAI byl přibližně dvakrát účinnější než racemická sloučenina v případě inhibice MAO-B, je odrazem extrémně nízké aktivity S(-)-PAI v případě inhibice MAO-B.

Tabulka 2

IC-50 HODNOTY (mg/kg) PRO INHIBICI MAO-A a MAO-B R(+)-PAI, S(-)-PAI NEBO RACEMICKÝM-PAI V TĚLE KRYSY PO INTRAPERITONEÁLNÍ INJEKCI (I.P.) NEBO ORÁLNÍM PODÁNÍ (P.O.)

IC-50 (mg/kg)

MAO-A

MAO-B

Sloučenina:	S(-)PAI	R(+)-PAI	Rac	S(-)PAI	R(+)-PAI	Rac
I.P. mozek	>10	1,2	2,5	>10	0,07	0,22
I.P. játra	>10	5	5	>10	0,06	0,11
P.O. mozek	>10	>5	>5	>10	0,17	0,29
P.O. játra	>10	>5	>5	>10	0,05	0,09

(Rac = racemický PAI)

Příklad 24

Inhibice MAO aktivity in vivo: dlouhodobé léčení

Experimentální protokol

Krasy (specifikované v příkladu 23, 4 zvířata pro každou dávkovou hladinu) se ošetřily R(+)-PAI nebo racemickou směsí, které jim byly podávány orálně jednou

denně po dobu 21 dní ve třech dávkových hladinách (0,05, 0,1 a 0,5 mg/kg) a dvě hodiny po poslední dávce se zvířata dekapitovala. Aktivita MAO typu A a B v mozku a v játrech se určily způsobem popsaným v příkladu 23.

Výsledky

Denní dávka 0,1 mg/kg sloučeniny R(+)PAI produkovala příznivý stupeň selektivní inhibice, přičemž inhibice mozkové MAO-B je vyšší než 80 % a inhibice mozkové MAO-A je 20% a nižší. Při vyšší dávce, tj. při dávce 0,5 mg/kg denně, byla MAO-A stále inhibována méně než z 50 % (obr. 12 a 13). Hepatická MAO vykazuje podobný stupeň selektivní inhibice (obr. 14 a 15). Sloučenina R(+)PAI byla opět účinnější než racemická směs, a to přibližně dvakrát. V případě mozkové MAO měl R(+)PAI vyšší stupeň selektivity pro inhibici MAO-B než racemická směs.

Tyto výsledky ukazují, že selektivita MAO-B inhibice může zůstat zachována i v případě déle trvajícího léčení těmito sloučeninami. Pokud jde o další nevratné inhibitory, stupeň inhibice enzymu je v případě dlouhodobého léčení vyšší, než v případě podání jediné dávky účinné látky. Sloučenina R(+)PAI vykazuje lepší stupeň selektivity pro inhibici MAO-B než racemická směs.

Příklad 25

Nevratná povaha MAO inhibice

Experimentální protokol

Skupinám, které vždy tvořily čtyři krysy, byla podána i.p. injekcí jediná dávka sloučenina R(+)PAI (1 mg/kg) a zvířata se o 2, 6, 18, 24, 48 a 72 hodin později usmrtila. Aktivita MAO-B se určila výše popsáním způsobem v celých mozkových tkáních.

Výsledky

Výsledky jsou znázorněny na obr. 16. Maximální inhibice MAO-B se dosáhlo 6 hodin po injekci. 72 hodin po injekci se MAO aktivita vrátila pouze na 30 % kontrolní aktivity. Tento experiment ukazuje na nevratnou povahu MAO inhibice způsobené R(+)PAI.

Příklad 26

Zesílení účinku tyraminového presoru u krys, které jsou při vědomí

Experimentální protokol

Krysy se anestetikovaly směsí pentobarbitalu (30 mg/kg) a chloralhydrátu (120 mg/kg) intraperitoneální injekcí. Levá krční tepna a jugulární žíla se kanylovaly tenkou polytenovou trubicí (arterie) nebo tenkou silikonokaučukovou trubicí, spojenou s polyethylenovou trubicí

(žíla), jejíž vzdálený konec se zavedl pod kůži v upínacím místě za krkem. Trubice se naplnila heparinizovaným fyziologickým roztokem a ucpala tenkou ocelovou tyčkou. Zvířata se ošetřila 20 mg chloramfenikolu intramuskulární injekcí a přes noc nechala zotavit po operaci. Následující den se krysy umístily do vysokostěnných beden, které jim umožnily volný pohyb. Arteriální katétr se připojil pomocí 100 cm dlouhé, fyziologickým roztokem naplněné, polyethylenové hadičky s malým průsvitem k tlakovému převodníku a venózní katétr se spojil s 1ml injekční jehlou pomocí podobně dlouhé hadičky, která stejně jako injekční jehla obsahovala roztok tyraminhydrochloridu ve fyziologickém roztoku (1 mg/ml). Potom následovala vyrovnávací 30 až 40minutová perioda, aplikace tyraminových injekcí (50 nebo 100 µg) a zaznamenal se krevní tlak. Mezi jednotlivými injekcemi se zachoval alespoň patnáctiminutový interval, po kterém se krevní tlak vrátil na kontrolní hodnoty. Stanovily se odezvy kontrolního presoru, načež se intraperitoneálně injektovala jedna z účinných látek a následující 4 hodiny se zaznamenával průběh tyraminových odezev. Určila se plocha pod získanou křivkou a poměr této plochy po ošetření ku ploše před ošetřením a ku ploše získané 1 až 3 hodiny po injekci se vypočetl za použití průměru 3 až 4 hodnot, získaných během kontrolní periody.

Výsledky

Výsledky jsou znázorněny v tabulce 3. Sloučenina R(+)PAI při dávce 1 mg/kg (která způsobuje úplnou inhibici MAO-B v mozku a játrech a 40 až 50% inhibici MAO-A v těchto tkáních) nezpůsobila žádné významnější zesílení tyraminové

odezvy. Při vyšší dávce, tj. 5 mg/kg R(+)PAI (která způsobila extenzívnější inhibici MAO-A v mozku a periférii), došlo k významnému zesílení tyraminové presorové odezvy, která měla podobný rozsah jako v případě použití stejné dávky deprenylu a menší rozsah než v případě použití clorgylinu (při dávce, která inhibuje hepatickou MAO-A aktivitu více než z 85%).

Tabulka 3

POSÍLENÍ TYRAMINOVÉHO PRESOROVÉHO ÚČINKU U KRYŠ PŘI
VĚDOMÍ, DOSAŽENÉ POMOCÍ MAO INHIBITORŮ

Inhibitor	Dávka (mg/kg)	Počet krys (n)	Poměr plochy pod křivkou presorové odezvy po ošetření/před ošetřením	SEM*
Fyziologický roztok		12	1,25	0,28
Clorgylin	2	6	10,39	2,13
(-)Deprenyl	1	2	1,15	
(+)Deprenyl	5	3	2,36	0,16
R(+)PAI	1	3	1,38	0,7
R(-)PAI	5	3	3,49	0,98

*SEM = standardní odchylka

Z tohoto experimentu lze usuzovat, že sloučenina R(+)PAI nezpůsobuje žádné zesílení tyraminového presorového účinku při dávce, která účinně inhibuje MAO-B.

Příklad 27

Potlačení MPTP-indukované dopaminergické toxicity pomocí R(+) PAI

1-methylfenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) je neurotoxin, který u několika savčích druhů včetně myši poškozuje nigrostriatální dopaminergické neurony a u lidí a primátů způsobuje Parkinsonův syndrom. Důležitým krokem mechanismu jeho neurotoxicity je konverze MPTP na toxický metabolit, 1-methyl-4-fenylpyridiniový iont (MPP+). Tato reakce se katalyzuje enzymem MAO-B a pravděpodobně probíhá vně dopaminových neuronů, zejména v glii. Je známo, že MPTP představuje jak substrát, tak nevratný inhibitor MAO-B. Předšetření pokusných zvířat MAO-B inhibitory, například deprenylem nebo pargylinem je chrání před MPTP indukovaným poškozením nigrostriatálních neuronů, protože dochází ke blokaci oxidační konverze MPTP na MPP+. Progresivní nigrostriatální degenerace u Parkinsonovy choroby může být způsobena vystavením působení exogenních MPTP podobných neurotoxinů, odvozeným z okolního prostředí. V těchto případech je další silnou indikací iniciace dlouhodobějšího léčení MAO-B inhibitory již ve velmi ranných stadií Parkinsonovy choroby v přesvědčení, že toto léčení bude neutralizovat škodlivé účinky těchto ještě domnělých MPTP toxinů a tak zastaví nebo zpomalí vývoj choroby. Za úspěšný MAO-B inhibitor účinné látky je v současné době považován inhibitor, který má schopnost blokovat MPTP-indukované poškození nigrostriatálních dopaminergických neuronů in vivo. (-) a (+) enantiomery PAI se tedy testovaly z hlediska jejich schopnosti bránit nebo tlumit MPTP-indukované striatál-dopaminové deplece u myši.

Expresní protokol

Samečci černé myši C57 (o hmotnosti 20 až 25 g) se (a) injektovali MPTP.HCl (30 mg/kg rozpuštěný v destilované vodě, s.c.) nebo samotným vehikulem, nebo se jednu hodinu po předošetření injektovali (-) nebo (+) isomerem PAI (2,5 mg/kg, i.p.) nebo deprenylem (5 mg/kg i.p.) a (b) dekapituluji o pět dní později. Mozky se odstranily a corpora striata se rozřezala na ledem chlazené skleněné desce a zmrazila na suchém ledu. Striatální tkáň se homogenizovala v 0,1 M kyselině perchlorové a deproteinizované alikvotní podíly, obsahující dihydroxybenzylamin jako vnitřní standard, se použily pro analýzu dopaminu a jeho hlavního metabolitu, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (DOPAC), za použití HPLC s elektrochemickou detekcí.

Výsledky

Tabulka 4 ukazuje výsledky tohoto experimentu. Při ošetření samotným MPTP došlo k produkci značných striatál-dopaminových (DA) a DOPAC deplecí. Ošetření (-) a (+) enantiomery PAI nebo (-) deprenylem neovlivnilo DA koncentrace ve striatu. Předošetření (-) isomerem PAI neovlivnilo MPTP-indukovanou DA a DOPAC hladinu produkovanou toxinem. Při dávce 2,5 mg/kg odpovídala účinnost (+)PAI účinnosti (-) deprenylu (5 mg/kg), pokud jde o jeho ochranný účinek.

Tabulka 4

VLIV PŘEDOŠETŘENÍ (-) A (+) ENANTIOMERY MAO-B INHIBITORU
PAI NA STRIATÁLNÍ DA A DOPAC DEPLECE, INDUKOVANÉ MPTP U
MYŠÍ IN VIVO

	<u>DA</u>	<u>DOPAC</u>
	(nm/mg proteinu)	
Kontrolní	162,8 ± 7,2	8,4 ± 0,5
MPTP	53,1 ± 6,2	3,2 ± 0,3
(-)PAI	174,0 ± 4,8	7,5 ± 0,2
(-)PAI + MPTP	53,4 ± 6,9	7,0 ± 0,6
(+)PAI	185,0 ± 6,9	3,3 ± 0,3
(+)PAI + MPTP	177 ± 14,4	6,0 ± 0,3
(-)Deprenyl	170,6 ± 7,1	5,6 ± 0,3
(-)Deprenyl + MPTP	197,0 ± 8,0	6,4 ± 0,5

Výše uvedené hodnoty pro DA a DOPAC jsou vyjádřeny jako průměr ± standardní odchylka a počet krys n = 7 až 11 v každé skupině.

Tyto výsledky naznačují, že R(+)PAI je vynikajícím MAO-B inhibitorem in vivo a má zvláště velký potenciál pro léčení Parkinsonovy choroby.

Je třeba poznamenat, že i když byl vynález popsán s odkazem na výše zmíněné příklady, doprovodné tabulky a obrázky, neomezuje se pouze na tyto příklady. Rovněž jsou možné různé modifikace a aplikace vynálezu. (R)-PAI lze při

léčení Parkinsonovy choroby například zkombinovat synergickým způsobem s α -tokoferolem (derivát vitamínu E).

Příklad 28

Vliv PAI enantiomerů na amfetaminem indukované stereotypní chování u stárnoucích krys

Je známo, že amfetamin indukuje stereotypní chování (Sulser F. a Sanders-Bush E., Ann. Rev. Pharmacol., 11, 209-230 (1971)) mobilizací endogenního dopaminu. Amfetamin není metabolizován MAO-B. Inhibice MAO-B účinným inhibítorem a podání amfetaminu způsobí uvolnění dopaminu, který nepodlehne degradaci inhibovanou MAO-B. Takže po podání amfetaminu a účinného MAO-B inhibitoru se očekává, že dojde ke zvýšení synaptického dopaminu, které povede ke zvýšení stereotypního chování a tedy k posílení amfetaminového účinku. Rozsah tohoto chování se hodnotí na základě počtu laterálních pohybů hlavy během jedominutové časové periody.

Experimentální protokol

Testovaná sloučenina se podávala v dávce 0,5 mg/kg/den v pitné vodě 24 hodin před tím, než došlo k hypoxii (92 % dusíku + 8 % kyslíku po dobu 6 hodin). Potom se injektoval s.c. amfetamin v dávce 0,5 mg/kg. O 45 minut později se počítaly laterální pohyby hlavy.

Výsledky

Výsledky tohoto experimentu jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5

VLIV PAI ISOMERŮ NA AMFETAMINEM-INDUKOVANÉ STEREOTYPNÍ
CHOVÁNÍ U STÁRNOUCÍCH KRYŠ (KONTROLNÍCH A POŠKOZENÝCH
HYPOXIÍ)

<u>Skupina</u>		<u>Hodnocení léčení stereotypního chování</u>
Kontrolní (6)	-	87 $\pm$ 10
Kontrolní (5)	(+) PAI	126 $\pm$ 16*
Kontrolní (4)	(-) PAI	94 $\pm$ 18
Hypoxií poškozená (5)	-	93 $\pm$ 12
Hypoxií poškozená (6)	(+) PAI	143 $\pm$ 6*

Číslo v závorkách označuje počet testovaných zvířat

* $p < 0,001$, vztaženo k neošetřené, hypoxií postižené,
skupině nebo neošetřené kontrolní skupině

Výsledky v tabulce 5 naznačují, že (+)PAI způsobil podstatné zvýšení amfetaminem indukovaného stereotypního chování jak u kryš poškozených hypoxií, tak u kontrolních kryš. (-)PAI byl v tomto ohledu zcela inaktivní. Tyto in vivo výsledky potvrzují předchozí biochemická zjištění, že (+)PAI je aktivním inhibítozem MAO-B v mozku, zatímco (-)PAI je v tomto ohledu inaktivní.

Příklad 29

Vliv R(+)-PAI na zlepšení nebo obnovu paměti

Čerstvě narozená mláďata krys se podrobila krátké epizodě anoxie a potom se opět nechala normálně růst, čímž se u nich vyvinulo dlouhotrvající poškození paměti (Speiser a kol., Behav. Brain Res., 30 89-94 (1988)). Toto poškození paměti je vyjádřeno jako horší výkon v testu vyčkávání před vstupem do černé komory.

Účinek R(+)-PAI a S(-)-PAI na zlepšení nebo obnovu paměti se stanovil v testu vyčkávání před vstupem do černé komory. Pokud je účinná látka opravdu účinná, potom prodlouží latenci odezvy na vstup do tmavé komory, ve které utrpěly testované krysy před prováděním experimentu elektrošok. Latence maximální odezvy je 300 sekund.

Experimentální protokol

Mladé krysy se podrobily, způsobem popsaným v příkladu 27, postnatální anoxii. R(+)-PAI nebo S(-)-PAI se podával podle jednoho z následujících protokolů.

Protokol A

Kojícím matkám se podávala dávka jednoho z izomerů 1 až 1,5 mg/kg/den v pitné vodě, dokud nepřestaly kojit, tj. 21 dní. Potom se odstavení potomci přímo ošetřovali, po dobu následujících 20 dní, stejnou dávkou účinné látky. Ošetření se ukončilo po čtyřiceti dnech a test se prováděl

šedesátý den, tj. 20 dní po podání poslední dávky účinné látky.

Protokol B

Dávka, která se zredukovala na 0,5 mg/kg/den, se podávala kojícím matkám dokud nepřestaly kojit, tj. 21 dní a následně přímo mladým krysám a to až do šedesátého dne, kdy se provedl test.

Test vyčkávání před vstupem do černé komory

Pro tento test se použilo zařízení tvořené osvětlenou komorou, která je spojena s tmavou komorou a posuvnými dveřmi, oddělujícími tyto dvě komory. Při výcviku se krysa umístila na 30 sekund do osvětlené komory a potom se otevřely dveře oddělující obě komory. Krysa se pohybovala do tmavé komory s latencí, která se zaznamenala. Po vstupu krysy do černé komory se dveře zavřely a krysa prodělala třísekundový elektrošok 0,3 mA, vedený do nohou.

Retence (paměť) se stanovila opakováním testu po 48 hodinách a zaznamenáním latence, která předcházela pohybu ze světla do tmy, přičemž za maximální latenci se považovalo 300 sekund.

Výsledky

Výsledky těchto experimentů jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6

ÚČINEK PAI ISOMERŮ NA DOBU VYČKÁVÁNÍ PŘED VSTUPEM DO ČERNÉ
KOMORY U MLADÝCH KRYŠ (60DENNÍ KRYSY)

Protokol A

<u>Skupina</u>	<u>Ošetření</u>	<u>Před</u> <u>elektrošokem</u>	<u>Po elektrošoku</u>
Kontrolní	-	49 ± 13	201 ± 111
Kontrolní	(+) PAI	49 ± 19	220 ± 100 (+9%)*
Kontrolní	(-) PAI	48 ± 13	192 ± 116
Poškozená anoxií	-	45 ± 11	183 ± 109
Poškozená anoxií	(+) PAI	49 ± 10	239 ± 99 (19%)*
Poškozená anoxií	(-) PAI	55 ± 27	179 ± 123

Protokol B

<u>Skupina</u>	<u>Ošetření</u>	<u>Před</u> <u>elektrošokem</u>	<u>Po elektrošoku</u>
Kontrolní	-	53 ± 20	104 ± 101
Kontrolní	(+) PAI	48 ± 11	128 ± 119 (+23%)*
Poškozená anoxií	-	45 ± 8	119 ± 105
Poškozená anoxií	(+) PAI	52 ± 12	137 ± 126 (+15%)*
Poškozená anoxií	(-) PAI	48 ± 19	112 ± 112

Obrázky reprezentují latenci pro vstup do tmavé komory (v sekundách), ve které krysy poprvé utrpěly elektrošok

* Naznačená procentická zvýšení jsou vztažena k hodnotám odpovídající anoxické nebo kontrolní skupiny

Výsledky experimentů naznačují, že (+)PAI je na rozdíl od (-)PAI účinný, pokud jde o zlepšení paměti anoxií poškozených krys a kontrolních krys. Látky, účinné v tomto testu, jsou považovány za látky, které mohou být účinně použity při léčení různých poškození paměti, demence a zejména při léčení senilní demence Alzheimerova typu.

Příklad 30

Účinek R(+)PAI na anoxií indukovaný hyperaktivní syndrom u juvenilních krys

Krysy, které se podrobily postnatální anoxii a následně nechaly růst za normálních podmínek, vykazovaly ve věku 10 až 42 dní zvýšenou motorickou aktivitu na otevřeném poli (Hertshkowitz a kol., Dev. Brain Res., 7, 145-155 (1983)).

Úkolem tohoto testu bylo stanovit vliv R(+)PAI a S(-)PAI na tento hyperaktivní syndrom.

Experimentální protokol

Anoxie se provedla na mláďatech krys první postnatální den. Tyto krysy se umístily do skleněné komory a na 25 minut se vystavily 100% dusíku. Potom se resuscitovaly přerušovanou masáží, lehce aplikovanou na hrudník, a následně vrátily ke svým matkám. Kontrolním krysám bylo poskytováno stejné ošetření s tou výjimkou, že se namísto dusíku použil kyslík.

R(+)-PAI nebo S(-)-PAI (0,5 mg/kg/den) se podávaly kojícím matkám v pitné vodě, takže se přenesly na potomky prostřednictvím mléka.

Pohyb se měřil v šesti klecích, zcela sledovaných počítačem (28 x 28 cm), zaznamenáním počtu přeběhů v průběhu dané časové periody. Přeběhy mřížky infračervených paprsků ve 4cm intervalech iniciovaly elektrické impulzy, které přijímal počítač. Záznamy pohybové aktivity se provedly ve věku 15 a 20 dní, a to při patnáctiminutové sledované periodě.

Výsledky

Výsledky experimentů jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7

VLIV JEDNOTLIVÝCH ENANTIOMERŮ NA ANOXIÍ-INDUKOVANÝ
HYPERAKTIVNÍ SYNDROM

<u>Skupina</u>	<u>Ošetření</u>	<u>15denní krysy</u>	<u>20denní krysy</u>
Kontrolní	-	414 ± 192 (11)	808 ± 212 (12)
Kontrolní	(+)PAI	254 ± 149 (11)c	719 ± 110 (13)
Poškozená anoxií	-	482 ± 119 (7)	858 ± 96 (9)
Poškozená anoxií	(+)PAI	276 ± 186 (15)a	737 ± 150 (16)c
Poškozená anoxií	(-)PAI	334 ± 196 (5)	778 ± 232 (6)

Čísla v závorkách znamenají počet testovaných zvířat

- Hodnoty znamenají počty přeběhů mřížky infračervených paprsků v kleci během 15 minut

a $p < 0,001$ vztaženo k anoxii podrobené skupině

b $p < 0,05$ vztaženo k anoxii podrobené skupině

c $p < 0,05$ vztaženo ke kontrolní skupině

Tyto výsledky naznačují, že dlouhodobější orální léčení R(+)-PAI při dávce 0,5 mg/kg, podávané kojícím matkám a při kojení prostřednictvím mléka potomkům, podstatně zlepšuje hyperaktivní syndrom. Z těchto zjištění vyplývá, že R(+)-PAI může být účinně použit jako účinná látka při léčení dětí trpících hyperaktivním syndromem.

Příklad 31

Stabilita je důležitým faktorem při volbě optimální soli jako terapeutické účinné látky. Různé soli mohou ovlivňovat fyzikálně-chemické a biologické charakteristiky účinné látky a mohou mít značný vliv na její celkové vlastnosti (Berge S.M. a kol., J. Pharm. Sci. 66, 1 (1977); Gould P.L., Int. J. Pharmaceutics, 33, 201 (1986)).

Experiment

Syntéza PAI solí

Roztok příslušné kyseliny (1 mol-ekv.) ve 2-propanolu se přidal za stálého míchání do roztoku PAI (1 mol-ekv.) ve 2-propanolu (Ar, BHT). Vzniklá sůl se přefiltrovala, promyla 2-propanolem a etherem a vysušila za sníženého tlaku. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 70 až 90 %. Výjimka byla učiněna při přípravě PAI acetátu, kdy se jako rozpouštědlo použil ether.

Analytické metody

Chromatografické separace se prováděly za použití B 5 μ 125x4 mm kolony Lichrosphere 60 RP (Merck), HPLC (Jasco BIP-1) vybavené L-4200 UV-Vis detektorem (Merck-Hitachi) nastaveným na 210 nm a D-2500 chromatointegrátorem (Merck-Hitachi). Eluční činidlo a ředidlo byly tvořeny z 80% destilovanou vodou a z 20% acetonitrilem (HPLC kvality) a 0,07 M kyselinou perchlorovou, nastavenou na pH 2,5 vodným roztokem amoniaku. Rychlost průtoku kolonou

dosahovala 1 ml/min, roztok příslušné PAI soli měl koncentraci 250 µg/ml a do chromatografického systému se injektovalo 20 µl roztoku.

Rozmezí tavné teploty se měřilo pomocí automatického zařízení (Mettler FP 80) a termo-gravimetrická analýza se prováděla na přístroji Mettler TA 3000 při rychlosti 10°C/min v aplikovatelném rozmezí. Rozpustnost se určila příslušným naředěním supernatantu z vodného roztoku nasycené PAI soli a měřila na UV-Vis spektrofotometru UVIKON 941 (Kontron). Která solná forma (mono- nebo di-sůl) vznikla se zjistilo elementární analýzou za použití standardního vybavení pro stanovení C, H, N a S. Hodnota pH se měřila v 1% vodném roztoku PAI solí.

Výsledky

Vlastnosti různých solí jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8

FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI PAI SOLÍ

PAI-sůl mol. hm.	pH	Rozpustnost mg/ml	Tavné rozmezí (°C)	%Hm. ztráta	Solná forma
vinan 492	5,5	33	176,2-177,3	LT 0,1	di
mesylát 267	4,3	635	156,8-157,6	0,1	mono
maleinát 287	4,0	NLT 1000	87,2-87,8	0,1	mono
sulfát 440	3,9	485	159,4-161,1	3,2	di
chlorid 207	4,2	238	177,0-180,0	LT 0,5	mono
tosylát 343	4,4	60-70	129,3-129,9	LT 0,1	mono
fumarát 287	3,5	95	125,4-126,2	0,2	mono
fosfát n.a.	7,0	NTL 720	109,5-110,4	n.a.	n.a..
esylát 279	2,4	NTL 300	n.a.	n.a.	mono
octan 231	6,1	NTL 720	69,2-69,7	0,4	mono

n.a. = není dostupná

Studie, porovnávající stabilitu solí, se prováděly za urychlujících podmínek: I) ohříváním na 80°C po dobu 72, 96 nebo 144 hodin; a II) ohříváním na refluxní teplotu v isopropanolu po dobu 30 hodin. Vyvinuté degradační produkty se měřily HPLC a potvrdily pomocí TLC. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9, přičemž relativní retenční doba (vztažená k PAI píku; RRT) je vyjádřena jako procento plochy, vztažené k celkové integrované píkové ploše.

Tabulka 9

DEGRADAČNÍ PRODUKTY VYVINUTÉ V PAI SOLÍCH ZA ZRYCHLENÝCH
PODMÍNEK

Sůl	80°C/72 hod		80°C/144 hod		Reflux v iPrOH/30 hod	
	RRT ^a	% ^b	RRT	%	RRT	%
sulfát	ND ^c	ND	ND	ND	0,47	0,22
					0,60	0,72
fosfát	0,60	0,22	0,60	0,57	0,60	2,62
					0,74	0,21
					1,84	0,20
					1,98	0,73
chlorid	ND	ND	ND	ND	2,23	0,71
mesylát	ND	ND	ND	ND	0,60	0,08
maleinát	0,60	0,41	n.a.		0,60	2,17
	1,27	0,50			0,65	1,35
	1,48	0,33			1,29	0,59
	1,81	0,10			1,42	1,30
	3,07	1,44			150	0,16
	4,16	0,10			1,83	0,18
	4,84	7,76			1,98	0,23
					4,09	0,65
octan	0,44	0,10	n.a.		0,60	6,74
	0,60	2,56			0,74	0,35
	0,73	0,13			1,76	0,33
	1,29	0,71			1,84	0,16
	1,55	1,06			1,99	4,17
	1,75	21,85			3,60	0,27
	1,96	3,33				
	2,15	0,08				
	2,32	0,15				
	2,83	0,15				
	3,54	1,82				
esylát ^d	ND	ND	0,85	0,26	ND	ND
			1,96	0,31		

omezení kvantifikace = 0,08%

n.a. = není dostupné

^a Relativní retenční čas (vztaženo k PAI píku)

^b Plošné procento vztažené k celkové integrované píkové ploše

^c Množství detekovaných nečistot

^d Ethylsulfátová sůl

Soli se předložily vizuální kontrole barvy a formy. Zjištění jsou shrnuta v tabulce 10.

Tabulka 10

VZHLED PAI SOLÍ ZA DESTRUKČNÍCH PODMÍNEK

Sůl	80°C/72 hod	80°C/96 hod	80°C/144 hod	Reflux v iPrOH/30 hod
sulfát	Ne zcela bílý prášek	n.a.	Ne zcela bílý prášek	Hnědý prášek
fosfát	Hnědavý prášek	n.a.	Hnědý prášek	Hnědý prášek
chlorid	Bílý prášek	n.a.	Bílý prášek	Ne zcela bílý prášek
mesylát	Bílý prášek	n.a.	Bílý prášek	Bílý prášek
maleinát	Hnědá tavenina	Hnědá	n.a.	Hnědá tavenina
esylát	Hnědavá tavenina	n.a.	Tmavě hnědá tavenina	Tmavě hnědá tavenina

n.a. = nedostupný

Tyto studie ukazují, že síran, esylát a mesylát vykazují oproti ostatním solím, díky své dobré rozpustnosti a chemické stabilitě, značné výhody. Z těchto tří solí je díky své vynikající stabilitě, a to i za destrukčních podmínek, nejvýhodnější solí mesylát.

Příklad 32

Zvrat haloperidolem-indukované katalepsie u myši

Samečci ICR myši, o hmotnosti 25 až 30 g, se předošetřili některou z následujících účinných látek: fyziologickým roztokem, (R)-PAI mesylátem nebo recemickým PAI mesylátem. Všechny účinné látky se podávaly i.p., v objemu 0,2 ml. O dvě hodiny později se v dávce 6 mg/kg v objemu 0,1 až 0,2 ml injektoval s.c. haloperidol. Testy pohybové koordinace se prováděly 3 hodiny po podání haloperidolu, tj. 5 hodin po podání předpokládaných ochranných účinných látek.

Testy pohybové koordinace a rigidity se kvantifikovaly podle tří různých parametrů: (a) podle schopnosti přejít po délce horizontální tyč 80 cm dlouhou; (b) podle schopnosti sešplhat obličejem směrem dolů vertikální tyč 80 cm dlouhou; (c) podle setrvání bez pohybu v nepřírozeném sedu, při kterém je břicho myši tlačeno proti „zdi“. Úplný výkon, jako v případě haloperidolem neošetřených myši, je dán čtyřmi body v každém testu, nebo dvanácti body ve všech testech. Za slabý výkon jsou považovány jeden až tři body. Klíč k hodnocení je uveden v tabulce 9A. Vlivy různých činidel při antagonizaci haloperidolem-indukované katalepsie jsou uvedeny v tabulce 11. Tři hodiny po podání

haloperidolu dosáhla (R)-PAI mesylátem udělená ochrana proti haloperidolu, podanému v dávce 5 až 15 mg/kg, vrcholu při 7,5 až 10 mg/kg (hodnocení aktivity = 94 % kontrolního fyziologického roztoku). Racemický PAI mesylát uděloval příslušnou ochranu, pokud se podal v dávce 7,5 až 15 mg/kg a nebyl aktivní při dávce 5 mg/kg. Z obrázku 17 je patrné, že profil dávka-účinek (R)-PAI mesylátu nebo racemického PAI je takový, že při zvýšení nad hodnotu 10 mg/kg dojde ke snížení účinku, a že racemická směs má obecně nižší účinnost. To znamená, že racemický PAI mesylát v dávce dvakrát vyšší než (R)-PAI mesylát bude vždy méně účinný než uvedený (R) enantiomer.

Zvrat α -MpT-indukované hypokinese u krys

Předpokládá se, že účinná látka α -MpT inhibuje tvorbu L-DOPA z tyrosinu a tedy tvorbu samotného dopaminu. Nedostatek CNS dopaminu je vyjádřen jako hypoaktivita. Šestiměsíční samečci krys Wistar (Harlan Olkac, UK) se předošetřili solným roztokem, (R)-PAI mesylátem nebo Rac PAI mesylátem, které se podávaly v naznačených dávkách. O dvě hodiny později jim byl podán i.p. α -MpT v dávce 100 mg/kg v 0,3 až 0,5 ml. Kontrolním krysám byl podán fyziologický roztok. Potom se po dobu deseti hodin zaznamenávala motorická aktivita v počítačem sledované kleci. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 12 a znázorněny na obrázku 18. Při dávce 2 mg/kg (R)PAI mesylát obnovuje přibližně z 90 % hladinu aktivity, vztaženo k aktivitě krys ošetřených fyziologickým roztokem. Rac PAI mesylát nebyl v tomto ohledu aktivní. V druhém případě měl profil křivky, vyjadřující závislost účinku na dávce, zvoncovitý tvar, z

čehož vyplývá snížení účinku při zvýšení dávky nad 2 až 5 mg/kg. Při 5 mg/kg Rac PAI mesylát nemohl dosáhnout hladiny účinnosti srovnatelné s účinností (R)-PAI mesylátu podaného v dávce 2 mg/kg.

Z těchto měření vyplývá, že (R)-PAI mesylát a Rac PAI mesylát nesdílí podobný vzor aktivity při obnově normokineze u myši ošetřených haloperidolem a u krys ošetřených α -MPT. V případě všech analyzovaných dávek byl (R)-PAI mesylát vždy účinnější než Rac PAI mesylát, podaný v odpovídající dávce. Rovněž maximální účinnost Rac PAI mesylátu byla vždy nižší než maximální účinnost (R)-PAI mesylátu. Takže Rac PAI mesylát je při dané dávce vždy méně účinnější než (R)-PAI mesylát při poloviční dávce. Zdvojením dávky Rac PAI mesylátu vzhledem k (R)-PAI mesylátu se nedosáhne účinku, který odpovídá účinku (R)-PAI mesylátu.

Farmakologicky nelze Rac PAI mesylát považovat za směs tvořenou z 50 % účinnou složkou, kterou je (R)-PAI mesylát, a z 50 % inertním materiálem, jakým je ředidlo. Přítomnost (S)-PAI v Rac PAI mesylátu má nežádoucí vliv na účinnost (R)-PAI, což vede k více jak dvojnásobnému snížení účinnosti. Snížení může být přímo důsledkem nežádoucího vlivu (S)-PAI na behaviorální parametry.

Tabulka 11

ZVRAT HALOPERIDOLEM-INDUKOVANÉ KATALEPSIE U MYŠÍ, DOSAŽENÝ
PŘI APLIKACI (R)-PAI MESYLÁTU A RACEMICKÉHO MESYLÁTU

Myším se podaly jednotlivé testované účinné látky i.p. v naznačených dávkách. O dvě hodiny později byl myším, způsobem popsaným v textu, podán haloperidol. Uvedené dávky jsou zamýšleny pro volnou bázi.

Dávka mg/kg	(R)-PAI mesylát			Rac PAI mesylát		
	Hodnocení + SEM	n	% kontroly	Hodnocení + SEM	n	% kontroly
1,8	7,2±1	6	60	7,0±0,6	6	59
3,0	6,4±0,5	6	60	5,9±0,7	6	49
5,0	8,7±0,9*	6	73	6,4±0,4	6	53
7,5	11,0±0,4***	5	92	9,4±0,8++	6	78
10	11,3±0,3***	6	94	9,2±0,6***	6	77
15	10,8±0,5***	5	90	8,8±0,8***	6	73
Kontrolní fyziologický roztok	12±0	12	100			
Samotný haloperidol	6,6±0,3	16	59			

Statistická hodnota vzhledem k samotnému haloperidolu:

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ se určila pomocí Studentova „t“ testu.

Hodnocení pro (R)-PAI se značně liší od hodnocení pro racemický PAI při dávce 5 mg/kg $p \leq 0,05$; při dávce 10 mg/kg $p \leq 0,01$; a při dávce 15 mg/kg $p \leq 0,05$.

Tabulka 11A

KLÍČ PRO HODNOCENÍ HALOPERIDOLEM-INDUKOVANÉ KATALEPSIE
U MYŠÍ A JEJÍHO ZVRATU DOSAŽENÉHO RŮZNÝMI ČINIDLY

Vertikální tyč:

Není schopna uchopit tyč nohama	1
Je schopna uchopit tyč, ale sklouzne z tyče	2
Je schopna uchopit tyč, částečně klouže, částečně slézá dolů	3
Je schopna uchopit tyč, slézá dolů za použití všech čtyř nohou	4

Horizontální tyč:

Není schopna uchopit tyč, padá dolů	1
Je schopna uchopit tyč, ale není schopna udělat na tyči více než dva kroky	2
Je schopna uchopit tyč a přejít půlku tyče	3
Je schopna uchopit tyč a přejít celou tyč	4

Výdrž v klidu, v sedě proti stěně:

Nehybnost delší než 5 minut	1
Nehybnost 3 až 5 minut	2
Nehybnost 1 až 3 minuty	3
Nehybnost 0,1 minuty	4

V případě, že se chování pohybovalo někde na rozhraní dvou kategorií, například na rozhraní kategorie 2 a 3, se kryse udělilo hodnocení 2,5.

Tabulka 12

OBNOVA POHYBOVÉ AKTIVITY U KRYŠ, OŠETŘENÝCH
 α -METHYL-p-TYROSINEM (α -MpT) PŘI DÁVCE 100 mg/kg i.p.

Krysám se podaly testované účinné látky i.p. v naznačených dávkách. Po dvou hodinách jim byl podán α -MpT a bezprostředně potom se umístily do klecí, ve kterých se určovala jejich celková pohybová aktivita, která se automaticky zaznamenávala po dobu deseti hodin, způsobem popsáním v textu.

Dávka mg/kg	(R)-PAI mesylát			Rac PAI mesylát		
	Hodnocení + SEM	n	% kontroly	Hodnocení + SEM	n	% kontroly
2	14 132** $\pm$ 1457	7	89	9,035 $\pm$ 829	6	57
5	12 893* $\pm$ 1 869	7	81	10 926* $\pm$ 820	8	69
7,5	6 679 $\pm$ 414	4	42	9 698 $\pm$ 557	4	61
Kontrol- ní fyzi- ologický roztok	15 862 $\pm$ 1 424	5	100			
Samotný α -MpT	8 108*** $\pm$ 810	6	51			

Statistická hodnota podle Studentova „t“ testu: * $p \leq 0,01$;

*** $p \leq 0,001$ pro testované účinné látky + α -MpT vs. α -MpT
samotný α -MpT samotný vs. kontrolní fyziologický roztok

Hodnocení pro (R)-PAI se značně liší od hodnocení pro racemický PAI při dávce 2 mg/kg $p \leq 0,01$.

Příklad 33

Účinky (R)-PAI mesylátu na krysy při vnitřním úrazu hlavy

Metody

1. Indukce úrazu

Úraz hlavy se u sameček krys indukoval za etherové anestézie dobře kalibrovaným závažovým zařízením, které dopadlo na exponovanou část lebky, která pokrývá levou mozkovou hemisféru ležící 1 až 2 mm bočně od středové linie ve střední koronální rovině.

2. Hodnocení motorické funkce

Jednu hodinu po způsobení úrazu se krysy testovaly podle celé řady kritérií, která hodnotila jejich neurologické výsledky (kritéria popsal Shohami a kol. v J. Neurotrauma, 10, 113 (1993)). Tato kritéria, označovaná jako Neurological Severity Score (Skóre neurologické závažnosti (NSS)), sestávají z řady reflexů a motorických funkcí. Body jsou udělovány na základě nedostatků, pokud jde o tato kritéria, a hodnocení se opět provedla po dvaceti čtyřech hodinách.

3. Hodnocení mozkového edému

Po druhém hodnocení motorické funkce (24 hod) se mozky odstranily. Vzorek tkáně (~20 mg) se zvažil za účelem získání mokré hmotnosti tkáně (wet weight (WW)). Po 24hodinovém sušení v eksikační peci při 95°C se vzorek

opět zvažil a získala se tak suchá hmotnost (dry weight (DW)). K výpočtu procenta vody ve tkáni se použil vzorec $(WW-DW) \times 100/WW$.

4. Ošetření účinnou látkou

(R)-PAI mesylát se rozpustil ve vodě. Krysám se intraperitoneálně 0, 4, 8 a 12 hodin po indukci úrazu hlavy aplikovala účinná látka v dávce 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti. Kontrolní krysy se ošetřily ve stejných časových okamžicích vodou.

Výsledky

NSS, které bylo mírou „klinického“ stavu krys, bylo většinou u ošetřených a neošetřených skupin jednu hodinu po poškození hlavy identické, ale při druhém hodnocení, tj. o dvacet čtyři hodin později, bylo u krys ošetřených (R)-PAI mesylátem podstatně nižší (tabulka 13). Tyto výsledky naznačují, že PAI mesylát je účinný při zlepšování obnovy motorických funkcí u krys, u kterých došlo k vnitřnímu poranění hlavy.

Dvacet čtyři hodin po úrazu byl nalezen v hemisféře hlavní edém (85,4 % vody v mozku kontrolních krys vs. 78,5 % v nepoškozené mozkové tkáni). PAI mesylát byl účinný při redukci edému, jak vyplývá z jeho vlivu na procento vody ve tkáni.

Na základě shrnutí získaných výsledků lze tvrdit, že (R)-PAI mesylát má v případě modelu simulujícího humánní

nervové poškození a při indukci vnitřního úrazu hlavy neuroprotekční vlastností.

Tabulka 13

	NSS		Δ NSS (1 hod - 24 hod)	% H ₂ O v mozku
	1 hod	24 hod		
Kontrolní (n = 6)	15,6	12,3	$4,3 \pm 0,5$	$85,4 \pm 0,4$
(R)-PAI Mesylát (n = 6)	16,7	10,2	$6,5 \pm 0,7^*$	$82,1 \pm 0,6^{**}$

* $P < 0,05$ (Mann Whitney U-test)

** $P < 0,005$ (t-test)

Příklad 34

Účinky PAI mesylátu na prevenci NMDA indukovanou buněčnou smrt buněčných kultur malého mozku

Výsledky in vitro testů

Postupy

Kultury mechanicky disociovaného malého mozku neonatální krysy

Malý mozek šestidenních nebo sedmidenních kryších mláďat se asepticky rozpitval a umístil do 15ml sterilní plastické kónické zkumavky obsahující 3 ml obohaceného média (média tvořeného Dulbecem modifikovaným Eagleovým médiem (DMEM) s vysokou koncentrací glukózy (1 g/l), 2 mM (obj./obj.) L-glutaminu, antibiotickou antimitotickou směsí a obohaceným 15 % (obj./obj.) tepelně inaktivovaným fetálním telecím sérem). Po dvaceti až dvaceti pěti průchodech sterilní, 10 cm dlouhou, nerezovou ocelovou jehlou 13, nasazenou na 5ml injekční stříkačku, ve které bylo vloženo nylonové síto s velikostí pórů 45 μm se malý mozek disocioval. Disociované buňky se 5 minut odstředily při 200 g a po odstranění supernatantu se buňky resuspendovaly v obohaceném médiu. Přežívání buněk se určilo vylučovacím testem trypanové modři. Buňky se následně naočkovaly při hustotě 200/mm² na povrchy potažené poly-L-lysinem (poly-L-lysinem potažená skleněná podložní sklička se připravila alespoň jednu hodinu před očkováním, ponořením sklíček do sterilního roztoku destilované vody obsahujícího 15 $\mu\text{g/ml}$ poly-L-lysinu a bezprostředně před použitím se opláchla sterilní vodou a vysušila), překryly obohaceným médiem a inkubovaly se při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO₂ ve vzduchu a při 100% vlhkosti. Po čtyřech dnech v kultuře se médium nahradilo médiem obsahujícím požadované testované sloučeniny. Experimenty se prováděly duplicitně a opakovaly dvakrát nebo třikrát. Po zjištění závislosti odezvy na toxické dávce testované sloučeniny se porovnávaly čtyři skupiny: (I) kontrolní (samotné obohacené médium); (II) testovaná sloučenina (jedna podskupina pro každou koncentraci (testované byly dvě koncentrace)); (III) N-methyl-D-aspartát (NMDA, expozice koncentrací 1 mM po dobu 3 hodin), jako

cytotoxická výzva; (IV) testovaná sloučenina plus NMDA (jedna podskupina pro každou ze dvou koncentrací testovaných sloučenin); (V) kontrolní skupina pro testování vlivu rozpouštědla (ve kterém je testovaná sloučenina rozpouštěna); a (VI) další „pozitivní kontrolní“ skupina sperminu ($0,01 \mu\text{M}$ rozpouštěných v kulturním médiu) plus NMDA. Přežití nervových buněk se hodnotilo fázovou kontrastní mikroskopií a barvením tripanovou modří po 24 hodinách.

Výsledky

Zjistilo se, že kyselina glutamová (Glu) vykazuje neurotoxické vlastnosti, které se exprimují ve vážných neurologických onemocněních zahrnujících epilepsii a mrtvici, a nejpravděpodobněji rovněž v mozkových neurodegenerativních nemocech, například v Parkinsonově chorobě, Alzheimerově chorobě a traumatickém poškození mozku. Neurotoxické účinky Glu jsou mediovány membránu vážícími Glu receptory, například N-methyl-D-asparátovými (NMDA) receptory.

Získané výsledky shrnuté v tabulce 14 ukazují, že $10 \mu\text{M}$ (R)-PAI mesylát zvyšuje počet buněk malého mozku, které přežívají po expozici $1 \mu\text{M}$ NMDA o 27 procent. Tyto in vitro výsledky podporují in vivo účinky (R)-PAI mesylátu prezentované v příkladech 33 a 35, z čehož vyplývá, že tato účinná látka má neuroprotektční vlastnosti v případě neurotoxické koncentrace NMDA.

Tabulka 14

NEUROPROTEKČNÍ VLIV (R)-PAI MESYLÁTU NA PREVENCI
NMDA-INDUKOVANÉ BUNĚČNÉ SMRTI BUNĚK MALÉHO MOZKU

Pokusná skupina	Přežívající buňky	Procentická ochrana
<u>Cerebrální kultury</u>		
(Toxicita TD_{25} = 30 μ M; TD_{50} = 85 μ M; TD_{100} = 320 μ M)		
Kontrolní	100	
Rozpouštědlo	97	
NMDA	10	
Rozpouštědlo + NMDA	10	0
Sloučenina + NMDA:		
1) 0,01 μ M + NMDA	12	2
2) 1,00 μ M + NMDA	22	12
3) 10,00 μ M + NMDA	37	27
Spermin + NMDA	75	65

Hodnoty, které jsou vyjádřeny jako procento neošetřených kontrolních vzorků, reprezentují průměr dvou duplicitních běhů experimentů kultury a průměr $\pm$ SEM čtyř zvířat pro ischemii. Hodnota procentické ochrany vyjadřuje účinek testované sloučeniny po odečtení vlivu rozpouštědla.

Příklad 35

Vliv (R)-PAI mesylátu po rozdrčení krysího zrakového nervu

Neuroprotekční účinky (R)-PAI mesylátu se určily bezprostředně po rozmačkání zrakového nervu u dospělé krysy. Krátkodobé účinky se měřily metabolicky a dlouhodobé účinky se stanovily elektrofyzilogicky.

Metody

1. Metabolická měření

a) Obecně

Použil se způsob, který popsal Yoles a kol. v Investigative Ophthalmology & Visual Science, 33, 3586-91 (1992). Při metabolických měřeních krátkodobých účinků se monitoroval poměr mitochondriální NADH/NAD, který závisí na aktivitě elektronového transportního systému a tak indikuje úroveň energetické produkce. Změny schopnosti nervu produkovat energii v důsledku poškození se určily porovnáním NADH úrovní v odezvě na umělý přechodný anoxický inzult před a po poškození.

b) Povrchová fluorometrie - reflektometrie

Monitorování intramitochondriálního NADH redoxního stavu se zakládá na skutečnosti, že NADH, na rozdíl od zoxidované formy NAD⁺, fluoreskuje, pokud je osvětleno světlem o vlnové délce 450 nm. Pro přenos světla ke zrakovému nervu a od něj se použil pružný

svazek optických vláken ve tvaru Y (světelný vodič). Světlo, které emitovalo od nervu, se měřilo při vlnových délkách: 366 nm (odražené světlo) a 450 nm (fluorescenční světlo). Změny v intenzitě odraženého světla korelovaly se změnami tkáňové absorpce, které byly způsobeny hemodynamickými efekty a s pohyby zrakového nervu, sekundárně pak se změnami arteriálního krevního tlaku a objemem nervu. Zjistilo se, že fluorescenční měření jsou adekvátně upravena pro měření NADH redoxního stavu odečtem odraženého světla (366 nm) od fluorescenčního světla (poměr 1:1), čímž se získá správný fluorescenční signál.

c) Příprava zvířat

Použití zvířat bylo v souladu s „Rezolucí ARVO o používání zvířat pro výzkumné účely“. Samci krys Sprague-Dawley (SPD) o hmotnosti 300 až 400 g se anestetikovaly pentobarbitonem sodným (50 mg/kg intraperitoneálně). Při držení hlavy zvířete na místě, pomocí držáku hlavy, se provedla pod binokulárním operačním mikroskopem laterální katotomie a ve spojivce, bočně od rohovky, se provedl řez. Po separaci retraktorových bulbálních svalů se identifikoval zrakový nerv a jeho úsek, dlouhý 3 až 3,5 mm, se v blízkosti oční bulvy odkryl tupým rozpítváním. Tvrdá plena se ponechala celistvá a dbalo se na to, aby nedošlo k porušení nervu. Okolo zrakového nervu se implantoval držák světelného vodiče takovým způsobem, aby držel světelný vodič na povrchu zrakového nervu, v místě 1 mm vzdáleném od místa poškození. Zvířata, stále ještě

anestetikovaná, se nechala 30 minut zotavit z chirurgického zákroku a následně vystavila anoxickým podmínkám. Anoxického stavu se dosáhlo tak, že se krysy nechaly dýchat dvě minuty v atmosféře 100% dusíku, načež se opět vrátily ke kyslíku. Za účelem vyhodnocení metabolické aktivity zrakového nervu se relativní změny intenzity odraženého a fluorescenčního světla, v odezvě na anoxii, změřily před a po poškození způsobeném drcením.

d) Experimentální protokol pro poranění způsobené drcením a metabolická měření

Pomocí lékařských kleští s kalibrovaným průřezem se na nervu mezi okem a držákem světelného vodiče drcením, při třicetisekundovém tlaku odpovídajícím 120g, způsobilo poranění nervu. Bezprostředně po poranění se zvířatům podala intraperitoneální injekcí voda s (R)-PAI mesylátem (2 mg/kg) a samotná voda. Pro stanovení aktivity energetického produkčního systému se měřila NADH odezva na dvouminutovou anoxii u všech zvířat před poškozením, 30 minut po poškození a dále v hodinových intervalech, přičemž poslední měření se provedlo 4 hodiny po poškození (viz obrázek 19).

2. Elektrofyzilogická měření

Tento způsob popsal Assia a kol. v Brain Res., 476, 205-212 (1989). Při těchto měřeních byla preferována stejná příprava zvířete a poškození zrakového nervu jako v případě metabolických studií.

Bezprostředně po poškození přijala zvířata jednu injekci vody s (R)-PAI mesylátem (0,5 mg/kg) a jednu bez (R)-PAI mesylátu. Čtrnáct dní po poškození a ošetření se zrakové nervy vyjmuly a elektrofyziologicky měřily. Před odstraněním zrakových nervů pro účely elektrofyziologických měření se krysy hloubkově anestetikovaly 70 mg/kg pentobarbitonu. Z lebky se odstranila kůže a zrakové nervy se oddělily od očních bulv. Provedla se subtotální dekapitace a lebka se otevřela pomocí štípacích kleští. Malý mozek se vyjmul bočně, čímž se odkryla intrakraniální část zrakového nervu. Provedla se pitva na úrovni nervu, který se následně přemístil do lahvíček obsahujících čerstvý solný roztok obsahující NaCl (126 mM), KCl (3 mM), NaH_2PO_4 (1,25 mM), NaHCO_3 (26 mM), MgSO_4 (2mM), CaCl_2 (2 mM) a D-glukózu (10 mM), který byl při pokojové teplotě zavzdušněn 95 % O_2 a 5 % CO_2 . Nervy se uchovávaly v tomto roztoku, ve kterém zůstane elektrická aktivita stabilní alespoň po dobu 3 až 4 hodin. Po půl hodině regenerace při pokojové teplotě se získaly z konce zrakového vlákna, vzdáleného od rozdrčené léze, elektrofyziologické záznamy. Konce nervu se následně připojily ke dvěma odsávacím Ag-AgCl elektrodám, ponořeným ve smáčecím roztoku, při 37°C. Stimulační pulz se aplikoval přes elektrodu na vzdáleném konci a akční potenciál se zaznamenával pomocí vzdálené elektrody. Pro supramaximální elektrickou stimulaci (0,5 pps) se použil stimulátor Grass SD9. Naměřený signál se přenesl do předzesilovače Medelec PA36 a následně do elektromyografu (Medelec MS7, AA7T zesilovače). Roztok, stimulátor a zesilovač měly společný podklad. Zaznamenala se a maximální amplituda osmi průměrných

akčních potenciálů sloučeniny (CAP), která se rovněž vyfotila pomocí polaroidu. Jako referenční hodnoty sloužily hodnoty CAP, naměřené u kontralaterálních nepoškozených nervů.

Výsledky

Výsledky ukazují, že (R)-PAI mesylát, aplikovaný bezprostředně po poškození zrakového nervu, blokoval poškozením indukovanou redukci energetické produkce. (R)-PAI mesylát má rovněž dlouhodobé účinky, jak zjistilo elektrofyzilogické monitorování.

CAP (akční potenciály sloučeniny) amplituda přímo korelovala s počtem vodivých vláken v testovaném segmentu nervu.

(R)-PAI mesylát podstatně tlumí poškozením indukovanou ztrátu aktivity distálního segmentu poškozeného nervu, z čehož vyplývá, že (R)-PAI mesylát je neuroprotektčním činidlem nebo alespoň činidlem zpomalujícím degeneraci.

Tabulka 15

ELEKTROFYZIOLOGICKÁ MĚŘENÍ

Skupina	CAP amplituda (μV) (Průměr + standardní odchylka)
Vehikulum N = 13	441 $\pm$ 95
(R)-PAI mesylát N = 7	2104 $\pm$ 313*

Příklad 36

Srovnání antikonvulzivních vlastností R-PAI a S-PAI soli

Jak (R)-PAI tak (S)-PAI HCl soli mají značné antikonvulzivní účinky. U myši (při i. p. podání), použitých v maximálním elektrošokovém testu (MES testu), má (S)-PAI HCl vyšší antikonvulzivní účinnost ($ED_{50}=57$ mg/kg) než (R)-PAI HCl ($ED_{50}=79$ mg/kg). Analogické výsledky se získaly u krys (p.o. podání). Čtyři krysy ze čtyř byly chráněny před záchvaty v MES testu, pokud jim bylo podáno 50 mg/kg (S)-PAI HCl, zatímco po stejné dávce (R)-PAI HCl byly chráněny tři ze čtyř myši. Pokud jde o účinnost v případě Parkinsonovy choroby, je zvyšování antikonvulzivní účinnosti škodlivým vedlejším účinkem. Stejný trend se objevuje v případě mesylátových solí. (S)-PAI mesylát má v MES testu vyšší antikonvulzivní účinnost než (R)-PAI mesylát. Při dávkách 100 mg/kg (S)-PAI mesylát chránil tři myši ze tří, zatímco (R)-PAI mesylát chránil při identické dávce pouze jednu myš ze tří. MES test je klasickým modelem pro indikaci účinnosti pro parciální a generalizované záchvaty u lidí. Mechanismus účinnosti tohoto činidla spočívá v jeho schopnosti bránit šíření záchvatů. Nicméně některé látky, které brání šíření záchvatu, mají vedlejší účinek, který spočívá ve snižování křečového prahu. Tato činidla mají tedy jak prokonvulzivní, tak antikonvulzivní vedlejší účinky.

Získané výsledky tedy ukazují, že (S)-PAI mesylát má prokonvulzivní účinnost. Při testu měřené intravenózní infuze Metrazolu redukuje 141 mg/kg (S)-PAI mesylátu dobu infuze a tedy množství Metrazolu, potřebného pro vyvolání jak prvního místního záchvatu tak pro počátek škubavé

křeče. Další činidla, která se zpravidla používají při parciálních a generalizovaných záchvatech, například fenytoin a karbamazepin, tento efekt nevykazují. (H.J. Kupferberg, *Epilepsia*, 30, s51-s56 (1989)). Stejně tak (S)-PAI mesylát vykazuje podstatně vyšší akutní neurotoxicitu než (R)-PAI mesylát. Při 300 mg/kg (R)-PAI mesylát nevykazuje u myši, při testu zjišťujícím poruchu koordinace na rotující tyči, žádnou neurotoxicitu. Při použití (S)-PAI mesylátu vykazují čtyři myši ze čtyř neurotoxicitu a křečovitost.

Metody

TD₅₀ (střední toxická dávka)

Tento test měří neurologické nedostatky pomocí testu poruchy koordinace na rotující tyči. Myš se umístí na tyč s boulovitým povrchem, která se otáčí rychlostí 6 ot./min. Potom se v každém ze tří pokusů zjišťuje, zdali má myš schopnost udržet rovnováhu a udržet se na tyči po dobu jedné minuty.

Test měřené intravenózní infuze Metrazolu

Tento test měří u každého zvířete minimální křečový práh. Metrazol se aplikuje formou infuze, která se podává rychlostí 0,185 mg/ml do ocasní žíly myši. Potom se zaznamená čas (v sekundách), který uplyne od počátku infuze do okamžiku, kdy se objeví první záškub (první fokální záchvat) a počátek škubavé křeče (škubavý záchvat). Prokonvulzivní činidla potřebují pro vyvolání těchto

příznaků méně Metrazolu a vykazují tedy konečné body v kratší časové periodě.

Příklad 37

Periferní účinky (R)-PAI a (S)-PAI na stažitelnost preparátů intestinálního hladkého svalu

Periferní účinky hydrochloridových solí enantiomerů PAI se určily v izolovaném tenkém střevě králíka nebo morčete. Tato pozorování poskytují užitečné informace o příslušných periferních vedlejších účincích u lidí. Prvním bodem kontaktu subjektu s orálně podanou účinnou látkou je gastrointestinální trakt, ve kterém jsou koncentrace účinné látky mnohem vyšší než po absorpci a distribuci. V případě PAI hydrochloridu (MH = 208) by 10mg orální dávka, obsažená přibližně ve 100ml objemu kapaliny, odpovídala přibližně koncentraci 0,5 mM. Terapeutická koncentrace (R)-PAI hydrochloridu v plazmě se naopak pohybuje v nanomolárním rozsahu.

Zjištění účinků enantiomerů PAI v izolovaném králičím lačnicku a kyčelníku morčete mělo zjistit, zda bude společný příjem (S)-PAI a (R)-PAI (jak se nacházejí v racemickém PAI) produkovat vedlejší účinky, které nebyly v případě podání samotného (R)-PAI zjištěny. (R)-PAI je díky své účinnosti a vysoké selektivitě k této formě enzymu výhodným enantiomerem pro inhibici MAO-B v mozku. (S)-PAI je v tomto ohledu méně účinný než (R)-PAI a není rovněž selektivní k MAO-B. V zásadě by bylo možné jeho přítomnost v PAI racemátu tolerovat nebo přehlédnout za předpokladu, že by byl (S)-PAI při doporučených dávkách (R)-PAI inertní.

Výsledky shrnuté v tabulkách 16 až 19 ukazují, že (S)-PAI není inertní látkou. V kyčelníku morčete se (S) enantiomer neprojevil jako účinnější relaxační látka než (R)-PAI. Díky jeho periferním účinkům ho nelze považovat za zanedbatelný. Tyto údaje ukazují, že při podání racemického PAI obsahujícího ekvivalentní dávku (R)-PAI by se mohlo vyskytovat více periferních vedlejších účinků než při podání čistého (R)-PAI.

Tabulka 16

TYRAMINOVÁ POTENCIACE KAŽDÝM ZE DVOU ENANTIOMERŮ PAI HCl
PŘI RYCHLOSTI PREPARACE LAČNÍKU

Napínání králičího lačníku, přichyceného v orgánové komoře, vykazuje rytmické kontrakce, které jsou inhibovány noradrenalinem, ale nikoliv tyraminem. Nicméně pokud se lačník předošetrí inhibitorem monoaminoxidázy, například PAI, potom tyramin způsobí uvolnění spontánních kontrakcí. Rozsah uvolnění může korelovat s relativní účinností inhibitoru.

<u>Účinná látka a koncentrace (μM)</u>		<u>Procentické uvolnění</u>
Samotný tyramin	40	0
Noradrenalin	0,002	100
Samotný (R) PAI	0,2-4,0	0
Samotný (S) PAI	0,2-4,0	0
Tyramin	40	
po (R) PAI	0,2	67

pokračování

<u>Účinná látka a koncentrace (μM)</u>	<u>Procentické uvolnění</u>
2	88
40	85-90
po (S)-PAI	0
2	35
40	33-50

Výsledky

(S)-PAI je jako inhibitor mozkové MAO-B mnohem méně účinný než (R)-PAI. Takže (S)-PAI není použitelným činidlem v případě prevence mozkové dopaminové degradace, ale může potenciovat tyraminem-evokované uvolnění noradrenalinu v tenkém střevě. Jeho účinnost v tenkém střevě je nežádoucím vedlejším účinkem, protože se dá očekávat, že bude zvyšovat absorpci a působení nežádoucího tyraminu. Takže (S)-PAI, pokud se použije společně s (R)-PAI ve formě racemického PAI, není inertní látkou.

Tabulka 17

ANTAGONISMUS BETHANECHOLEM-INDUKOVANÝCH KONTRAKCÍ KYČELNÍKU
MORČETE V PŘÍTOMNOSTI 400 μM KAŽDÉHO ZE DVOU ENANTIOMERŮ
PAI HCl

Napínání kyčelníku morčete, přichyceného ve fyziologickém roztoku v orgánové komoře, způsobí dávkově závislé kontrakce, pokud se ošetří bethanecholem, který je

enzymaticky stabilním analogem přirozeného gastrointestinálního přenašeče neuronů, jakým je acetylcholin. Tyto kontrakce se v přítomnosti PAI zeslabilly. Údaje jsou vyjádřeny v gram-napětí.

	<u>Bathenechol (μM)</u>		<u>Gram-napětí</u>	
	<u>Kontrolní</u>	<u>(R) PAI</u>	<u>Kontrolní</u>	<u>(S) PAI</u>
0,8	0,5	0,2	0,6	0
2	1,5	0,3	2,0	0
4	2,2	0,7	3,0	0
8	4,0	1,0	3,8	0,6
20	5,6	2,0	3,8	1,2
40	6,2	2,8	3,8	1,7
80	6,2	3,1	3,8	2,6
200	6,2	4,3	3,8	2,6

Výsledky

(S)-PAI je většinou jako MAO-B inhibitor inaktivní, pokud jde o (R)-PAI, a není tedy účinný při prevenci degradace mozkového dopaminu. Nicméně při prevenci bethanecholem-indukované kontrakce tenkého střeva je účinnější než R(PAI). (S)-PAI, pokud se použije spolu s R(PAI) ve formě racemického PAI, tedy není inertní látkou.

Tabulka 18

ANTAGONISMUS HISTAMINEM-INDUKOVANÝCH KONTRAKCÍ KYČELNÍKU
MORČETE KAŽDÝM ZE DVOU ENANTIOMERŮ PAI HCl

Pevně stanovená dávka histaminu (40 nM) způsobuje vytrvalou kontrakci napnutého kyčelníku morčete, uchyceného ve fyziologickém roztoku v orgánové komoře. Přírůstkové přidávání každého ze dvou enantiomerů PAI HCl způsobuje dávkově dependentní uvolnění svalu. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentické uvolnění, přičemž za 100% uvolnění je považován stav před přidáním histaminu.

Koncentrace PAI	Procentické uvolnění	
<u>μM</u>	<u>(R) PAI</u>	<u>(S) PAI</u>
2	0	11
4	0	15
10	0	30
20		20
30	31	33
40	37	36
100	81	71
200		90
300	92	
400	100	98
700	100	
1000		100

Výsledky

(S)-PAI je jako MAO-B inhibitor v mozku, v porovnání s (R)-PAI, inaktivní a tedy nepoužitelný při prevenci degradace mozkového dopaminu; ale pokud jde o uvolnění střevního hladkého svalu, potom je aktivnější než (R) isomer. Takže (S)-PAI není inertní látkou, pokud je podán společně s (R) isomerem ve formě racemického PAI.

Tabulka 19

ANTAGONISMUS BETHANECHOLEM-INDUKOVANÝCH KONTRAKCÍ KYČELNÍKU
MORČETE KAŽDÝM ZE DVOU ENANTIOMERŮ PAI HCl

Pevně stanovená dávka bethanecholu ($0,8 \mu\text{M}$) způsobuje vytrvalou kontrakci napnutého kyčelníku morčete, uchyceného ve fyziologickém roztoku v orgánové komoře. Přírůstkové přidávání každého ze dvou enantiomerů PAI HCl způsobuje dávkově dependentní uvolnění svalu. Výsledky jsou vyjádřeny jako procentické uvolnění, přičemž za 100% uvolnění je považován stav před přidáním histaminu.

Koncentrace PAI	Procentické uvolnění	
<u>μM</u>	<u>(R) PAI</u>	<u>(S) PAI</u>
20	25	40-50
60	25-50	60-70
100	50-70	100
300	100	100

Výsledky

(S)-PAI je jako MAO-B inhibitor v mozku, v porovnání s (R)-PAI, inaktivní a tedy nepoužitelný při prevenci degradace mozkového dopaminu; ale pokud jde o uvolnění střevního hladkého svalů, potom je aktivnější než (R) isomer. Takže (S)-PAI není inertní látkou, pokud je podán společně s (R) isomerem ve formě racemického PAI.

Příklad 38

Určité účinky [R](+)PAI mesylátu na okluzi střední cerebrální arterie u krysy, jako na model mrtvice

Metody

1.1 Okluze střední cerebrální arterie (MCAO) u krysy

Použila se modifikace postupu, který popsal Tamura a kol. (1981). Samečci krysy Wistar (Olac England-Jerusalem) o hmotnosti 300 až 400 g se neestetizovali roztokem equitesinu, podaného i.p. při dávce 3 ml/kg. Equitesin sestává z 13,5 ml roztoku pentothalu sodného (60 mg/ml), 3,5 g chloralhydrátu, 1,75 g MgSO₄, 33 ml propylenglykolu, 8,3 ml bezvodého alkoholu, které byly doplněny do 83 ml destilovanou vodou. Chirurgický zákrok se provedl za použití operačního mikroskopu s vysokým rozlišením, model SMZ-2B, typ 102 (Nikon, Japan). Za účelem odkrytí levé střední cerebrální arterie se ve spánkovém svalů provedl řez. Špička koronoidního výběžku mandibuly se vyřízla a odstranila pomocí malých lékařských kleští.

Na spoji mezi střední příčkou a stropem inferotemporální jamky se provedla kraniektomie s vrtáním zubů. Tvrdá plena se opatrně otevřela za použití jehly 27. MCA se trvale ucpala mikrobipolární koagulací při nastavení nízké energie, se začátkem 2 až 3 mm od čichového traktu, mezi její kortikální větví k nosní kůře a laterálními arteriemi striata.

Po koagulaci se MCA oddělila mikronůžkami a rozdělila tak, aby zajistila kompletní okluzi. Potom se sešil spánkový sval a položil přes místo kraniektomie. Kůže se uzavřela pomocí hedvábné sutury 3 až 0. Paralelní skupina myši se podrobila kraniektomické operaci bez kauterizace MCA. Během celé chirurgické operace (20 až 25 minut) se u obou skupin pomocí regulátoru tělesné teploty (Kyoristsu, Japan), sestávajícího ze samoregulačního topného polštářku, který je připojen k rektálnímu termistoru, udržovala tělesná teplota 37 až 38°C. Dvacet čtyři hodin po chirurgickém zákroku se stanovilo neurologické skóre, aby se stanovila závažnost poškození u krys ošetřených účinnou látkou v porovnání s neošetřenými kontrolními subjekty. Po 48 hodinách se zvířata anestetikovala equitesinem a závažnost poškození se vizualizovala pomocí MRI postupu. Dále se určil objem mozkové tkáně, poškozené v důsledku ischemie.

1.2. Podání účinné látky

[R](+)PAI mesylát se podával i.p. injekcí v 0,3 až 0,4 ml destilované vody podle následujícího rozvrhu: 1 mg/kg bezprostředně po chirurgickém zákroku;

0,5 mg/kg 2 hodiny po chirurgickém zákroku;

1 mg/kg 20 až 24 hodin po chirurgickém zákroku.

1.3. MRI-SCAN ischemické mozkové léze

Všechny experimenty se prováděly za použití systému 4,7T BIOSPEC (BRUKER) (viz T. Back a kol., „Diffusion Nuclear Magnetic Resonance Imaging in Experimental Stroke: Correlation with Cerebral Metabolites“, Stroke (únor 1994) 25: 494-500). Čtyřicet osm hodin po MCAO nebo kraniektomii bez kauterizace se každé zvíře podrobilo rychlému víceřezému T1 vyváženému zobrazení (TR/TE), (500/25), čímž se určila přesná poloha. Potom se získaly obrazy T2-vyvážené množiny řezů (300/80) (5 po sobě jdoucích řezů o tloušťce 3 mm).

Ke stanovení velikosti a závažnosti rozsahu infarktu se použila hyperintenzita, pozorovaná v T2 vyváženém MRI 48 hodin po okluzi nebo po kvazi zákroku u kontrolních zvířat. U každé skupiny krys se určovaly následující MRI parametry:

- c. Ischemická plocha (v mm^2);
- d. Plocha ischemické hemisféry (v mm^2);
- e. Plocha neovlivněné hemisféry (v mm^2).

Použití přilehlých řezů umožnilo převést plošné jednotky na objemové jednotky jednoduchým vynásobením plochy šířkou řezu.

1.4. Neurologické skóre

Neurologické skóre sestává ze součtu celé řady hodnocení pro posuzování specifických motorických aktivit u dané krysy. Stupnice hodnocení začíná od 0 (úplně normální krysy) a končí u 13 (zcela neschopné krysy). U většiny parametrů se při hodnocení používají pouze hodnoty 0 (normální) nebo 1 (neschopná); u dalších parametrů se používá postupné hodnocení. V rámci studie se použily následující testy:

Obecné pozorovací testy

hypoaktivita, zklidnění, piloerekce

Motorický reflex

Krysy se zavěsily za ocas přibližně 15 cm nad podlahu. Normální krysy zaujaly polohu, při které se obě jejich přední končetiny natáhly směrem k podlaze a zadní nohy visely po straně trapézovým způsobem. MCAO způsobilo konzistentní flexi protilehlých končetin.

Motorická schopnost

Motorická schopnost se hodnotila na základě schopnosti krys udržet se na tyči o průměru 1 cm pomocí protilehlých končetin po dobu 5 až 15 sekund, pokud je krysa zavěšena na tyči za ramenní jamky.

Motorická koordinace

Normální krysy jsou schopny vyběhnout a seběhnout 5 cm široký trám, umístěný na mírném svahu. Chyba při přecházení trámu v některém směru znamená určitou motorickou nekoordinaci, nedostatek rovnováhy a slabost končetin.

Chůze

Schopnost krysy opět zaujmout normální polohu obou zadních protilehlých končetin, pokud jsou úmyslně vysunuty ze své přirozené polohy při stojí na tenkém trámu.

Rovnováha

Schopnost krysy zachytit se a udržet rovnováhu na úzkém trámu, širokém 2 cm.

Pohybová aktivita

Celkový pohyb během patnácti minut v automatizované aktivní kleci.

Hodnocení pro každý z výše uvedených parametrů je naznačeno v tabulce 20.

Tabulka 20NEUROLOGICKÉ SKÓRE NAVRŽENÉ PRO KAŽDÝ Z DESETI
PARAMETRŮ POSTOJE A POHYBU

<u>Parametr</u>	<u>Skóre</u>
a. Aktivita v domácí kleci	normální=0 hypoaktivní=1
b. Zklidnění	žádné=0 zaznamenané=1
c. Piloerekce	žádná=0 zaznamenaná=1
d. Extenze protilehlých předních končetin krys směrem k podlaze, pokud jsou zavěšeny za ocas	dobrá=0 ohnuté končetiny=1
e. Roztažení zadních protilehlých končetin krys, pokud jsou zavěšeny za ocas (trapezoidní držení těla)	dobré=0 ohnuté končetiny=1

pokračování

<u>Parametr</u>	<u>Skóre</u>	
f. Uchopení tyče proti-lehlými končetinami na dobu 5 až 15 sekund, pokud jsou krysy zavěšeny za ramenní jamku	dobré=0	slabé=1
g. Chůze po trámu širokém 5 cm	dobrá=0	špatná=1
h. Zaujmutí původní polohy protilehlých zadních nebo předních končetin krys, pokud jsou z této pozice záměrně vychýleny	dobré=0 špatné =1 (jedna končetina) =2 (dvě končetiny)	
i. Uchopení trámu a udržení rovnováhy na trámu širokém 2 cm	dobré=0	špatné=1
j. Motorická aktivita krys v porovnání s kontrolními subjekty (15 minut v automatizované aktivní kleci)	<25 % kontrolní 26-50 % kontrolní 51-75 % kontrolní 76-100 % kontrolní	3 2 1 0

Výsledky

2.1. Rozsah infarktu

Výsledky MRI studií jsou shrnuty v tabulce 21 a znázorněny na obrázku 20. Rozsah infarktu byl podstatně menší u kryš ošetřených [R](+)PAI mesylátem (n=9), než u neošetřených kryš (n=10). V prvním případě představovala velikost infarktu přibližně 60 % velikosti infarktu u neošetřených kryš.

Tabulka 21

HODNOCENÍ ISCHEMICKÉ MOZKOVÉ LÉZE MRI T2-SCANEM 48 HODIN
PO MCA-OKLUZI A OŠETŘENÍ KRYŠ WISTAR [R](+)PAI MESYLÁTEM

MCA-O		MCA-O + [R](+)PAI mesylát*	
Zvíře č.	Rozsah infarktu (mm ³)	Zvíře č.	Rozsah infarktu (mm ³)
1	252	1	94,4
2	272	2	139
3	314	3	240
4	273	4	137
5	201	5	137
6	221	6	174
7	358	7	164
8	265	8	171
9	341	9	215
10	236		
průměr ± SEM	273,3 ± 50,9	průměr ± SEM	163,5 ± 43,9

$$t = 5,0475$$

$$f = 17$$

$$p < 0,001$$

[R](+)PAI mesylát redukuje velikost infarktu o 40 %.

* [R](+)PAI mesylát se podával:

Čas po okluzi MCA:

0 -1,0 mg/kg ip;

2 hodiny -0,5 mg/kg ip;

24 hodin -1,0 mg/kg ip.

2.2. Neurologické skóre

Neurologické skóre bylo u pěti krys ošetřených [R](+)PAI mesylátem a šesti neošetřených krys určeno náhodně zvoleným pozorovatelem. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 22, ve které se porovnávají rozsahy infarktu u každého zvířete, zjištěné pomocí MRI testu, a rovněž jsou znázorněny na obrázku 21. Z výsledků vyplývá, že zvířata s minimálním neurologickým skóre jsou zvířata, která byla ošetřena [R](+)PAI mesylátem. Neurologické skóre se u MCAO zvířat, která byla ošetřena [R](+)PAI mesylátem v porovnání s neošetřenými zvířaty, snížilo o 54 % a rozsah infarktu o 36 %.

Tabulka 22

NEUROLOGICKÉ SKÓRE KRYŠ, KTERÉ PODSTOUPILY MCA OKLUZI
A OŠETŘENÍ [R] (+) PAI MESYLÁTEM, VE VZTAHU K ROZSAHU
ISCHEMICKÉHO INFARKTU, KTERÝ U NICH BYL ZJIŠTĚN

MCA-O			MCA-O + [R] (+) PAI mesylát***		
Zvíře č.	Neurolo- gické * skóre	Rozsah infarktu ** (mm ³)	Zvíře č.	Neurolo- gické * skóre	Rozsah infarktu ** (mm ³)
1	5,0	201	1	1,0	137
2	5,0	221	2	2,0	174
3	6,0	358	3	4,0	164
4	6,0	265	4	4,0	171
5	8,25	341	5	2,88	215
6	5,75	236			
Průměr ± SEM	6,0±1,19	270±65	Průměr ± SEM	2,78±1,3	172±28

Neurologické skóre

Rozsah infarktu

t = 4,25

t = 3,34

f = 9

f = 9

p < 0,01

p < 0,01

[R] (+) PAI mesylát redukuje neurologické skóre o 53,7 % a
rozsah infarktu o 36,3 %.

* Zjištěno 24 hodin po MCA-okluzi

** Vyhodnoceno MRI T2-SCANnem 48 hodin po MCA-okluzi

*** [R](+)PAI mesylát byl podán:

Čas po MCA-okluzi:

0 -1,0 mg/kg ip;

2 hodiny -0,5 mg/kg ip;

24 hodin -1,0 mg/kg ip.

Reference k příkladu 38

Cechetto DF, Wilson JX, Smith KE, Wolski D, Silver MD, Hachinski VC (1989). Autonomic and myocardial changes in middle cerebral artery occlusion: stroke models in the rat. Brain Res 502:296-305.

Kolb B, Sutherland RJ, Whishaw IQ (1983). A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localizations in the rat. Behav. Neurosci. 97:13-27.

Menzies SA, Hoff JT, Betz AL (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: A neurological and pathological evaluation of a reproducible model. Neurosurgery 31:100-106.

Sauer D, Allegrini PR, Conseti A, Pataki A, Amaceker H, Fagg GE (1993). Characterization of the cerebroprotective efficacy of the competitive NMDA receptor antagonist CGP40116 in a rat model of focal cerebral ischemia: An in vivo magnetic resonance imaging study. J. Cerebr. Blood Flow and Metabol. 13:595-602.

Stephanovich C, Editor, Stroke: Animal Models, Pergamon Press, 1983.

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GH (1981). Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following MCA occlusion. J. Cereb. Blood Flow and Metab. 1:53-60.

Teasdale G, Tyson G, Tamura A, Graham DI, McCulloch J. Focal cerebral ischaemia in the rat: Neuropathology, local cerebral blood flow and cerebrovascular permeability. In Stroke: Animal Models, Stephanovic C, Editor, Pergamon Press 1983, str. 83-97.

Yamamoto M, Tamura A, Kirino T, Shimitzu M, Sano K, (1988). Behavioral changes after focal cerebral ischemia by left middle cerebral artery occlusion in rats. Brain Re. 452:323-328.

Yamori Y a kol. (1976). Pathogenic similarity of strokes in stroke prone spontaneously hypertensive rats and humans. Stroke 7:46-53.

Young W, DeCrescito V, Flamm ES, Hadani M, Rappaport H, Cornu P (1986). Tissue Na, K, and Ca changes in regional cerebral ischemia: Their measurement and interpretation. Central Nervous System Trauma, 3:215-234.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice určené pro léčení mozkové ischemie nebo mrtvice u subjektu.

2. Použití podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m , že se farmaceuticky přijatelná sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí.

3. Použití podle nároku 2, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelnou solí je mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

4. Použití podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, které má být podáno, je přibližně 0,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu až 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu.

5. Použití podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

6. Použití podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m , že subjektem je člověk a účinným množstvím je přibližně 0,01 mg až 50,0 mg na den.

7. Použití podle nároku 6, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím je 0,1 až 10,0 mg na den.

8. Použití podle nároku 6, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně.

9. Použití podle nároku 1, v y z n a č e n é t í m , že při léčení mozkové ischemie nebo mrtvice se plocha mozkové ischemie redukuje přibližně o 35 procent.

10. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice určené pro léčení traumatického poškození hlavy.

11. Použití podle nároku 10, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelná sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu se zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí.

12. Použití podle nároku 11, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelnou solí je mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

13. Použití podle nároku 10, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, které má být podáno, je přibližně 0,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu až 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu.

14. Použití podle nároku 10, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

15. Použití podle nároku 10, v y z n a č e n é t í m , že subjektem je člověk a účinným množstvím je přibližně 0,01 mg až 50,0 mg na den.

16. Použití podle nároku 15, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím je 0,1 až 10,0 mg na den.

17. Použití podle nároku 15, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně.

18. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice určené pro léčení traumatického poškození míchy.

19. Použití podle nároku 18, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelná sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu se zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí.

20. Použití podle nároku 19, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelnou solí je mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

21. Použití podle nároku 18, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, které má být podáno, je přibližně 0,5 miligramů na kilogram

tělesné hmotnosti subjektu až 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu.

22. Použití podle nároku 18, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

23. Použití podle nároku 18, v y z n a č e n é t í m , že subjektem je člověk a účinným množstvím je přibližně 0,01 mg až 50,0 mg na den.

24. Použití podle nároku 23, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím je 0,1 až 10,0 mg na den.

25. Použití podle nároku 23, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně.

26. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice určené pro léčení neurotraumatu.

27. Použití podle nároku 26, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelná sůl R(+)-N-propargyl-

1-aminoindanu se zvolí ze skupiny tvořené: mesylátovou solí; ethylsulfonátovou solí; sulfátovou solí; a hydrochloridovou solí.

28. Použití podle nároku 27, v y z n a č e n é t í m , že farmaceuticky přijatelnou solí je mesylátová sůl R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu.

29. Použití podle nároku 26, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli, které má být podáno, je přibližně 0,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu až 2,5 miligramů na kilogram tělesné hmotnosti subjektu.

30. Použití podle nároku 26, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně, orálně, rektálně, transdermálně nebo parenterálně.

31. Použití podle nároku 26, v y z n a č e n é t í m , že subjektem je člověk a účinným množstvím je přibližně 0,01 mg až 50,0 mg na den.

32. Použití podle nároku 31, v y z n a č e n é t í m , že účinným množstvím je 0,1 až 10,0 mg na den.

33. Použití podle nároku 31, v y z n a č e n é t í m , že se R(+)-N-propargyl-1-aminoindan nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl podává intravenózně.

34. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro léčení neurodegenerativní choroby.

35. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro léčení neurotoxického poškození.

36. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro léčení mozkové ischemie.

37. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro léčení traumatického poškození hlavy.

38. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro léčení traumatického poškození míchy.

39. Použití R(+)-N-propargyl-1-aminoindanu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu farmaceutické kompozice účinné pro zabránění nervovému poškození.

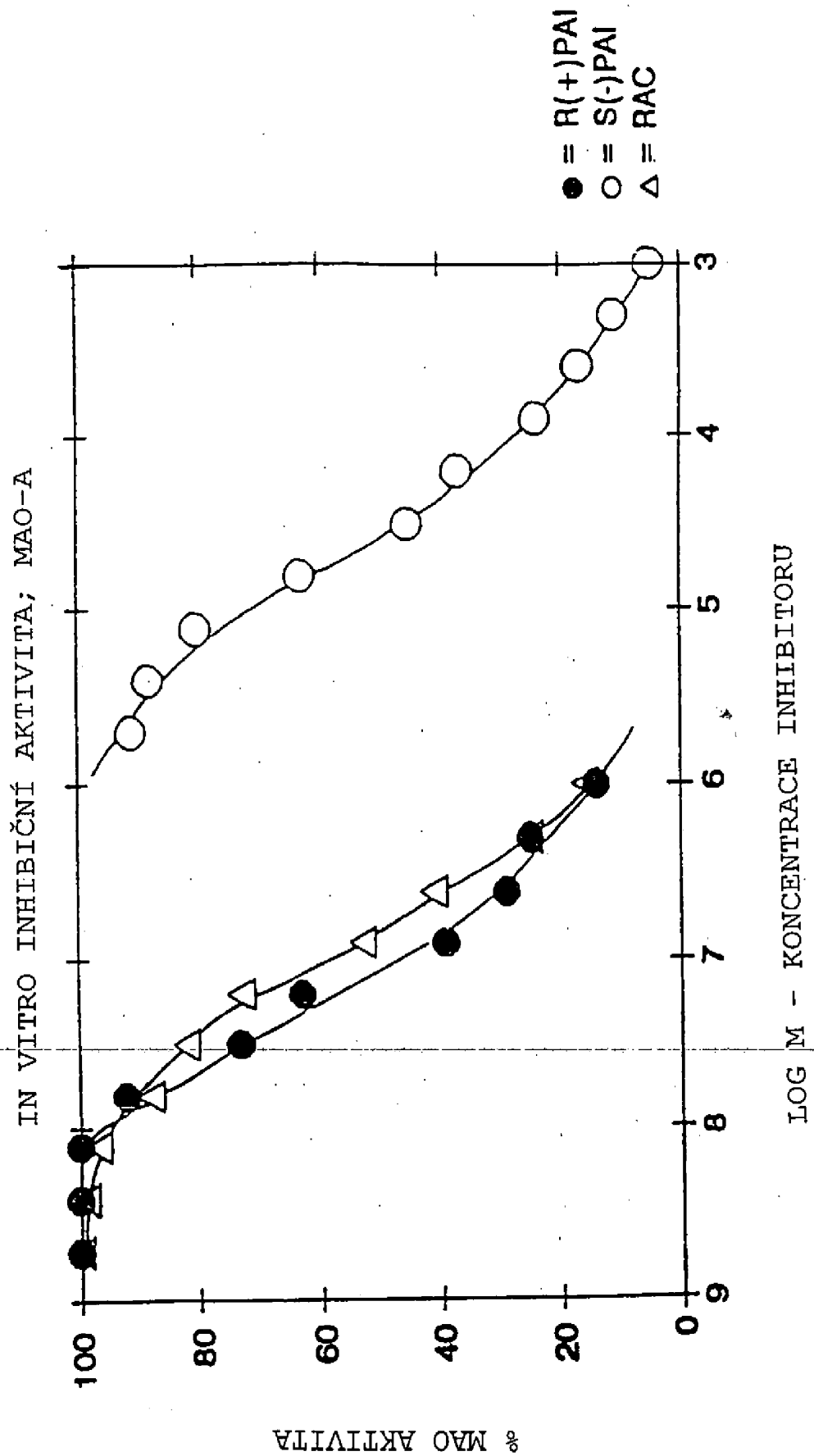
40. Použití podle nároku 39, v y z n a č e n é t í m , že nervovým poškozením je poškození struktury zrakového nervu.

41. Použití podle nároku 39, v y z n a č e n é t í m , že poškozením struktury nervu je poškození zrakového nervu.

Zastupuje:

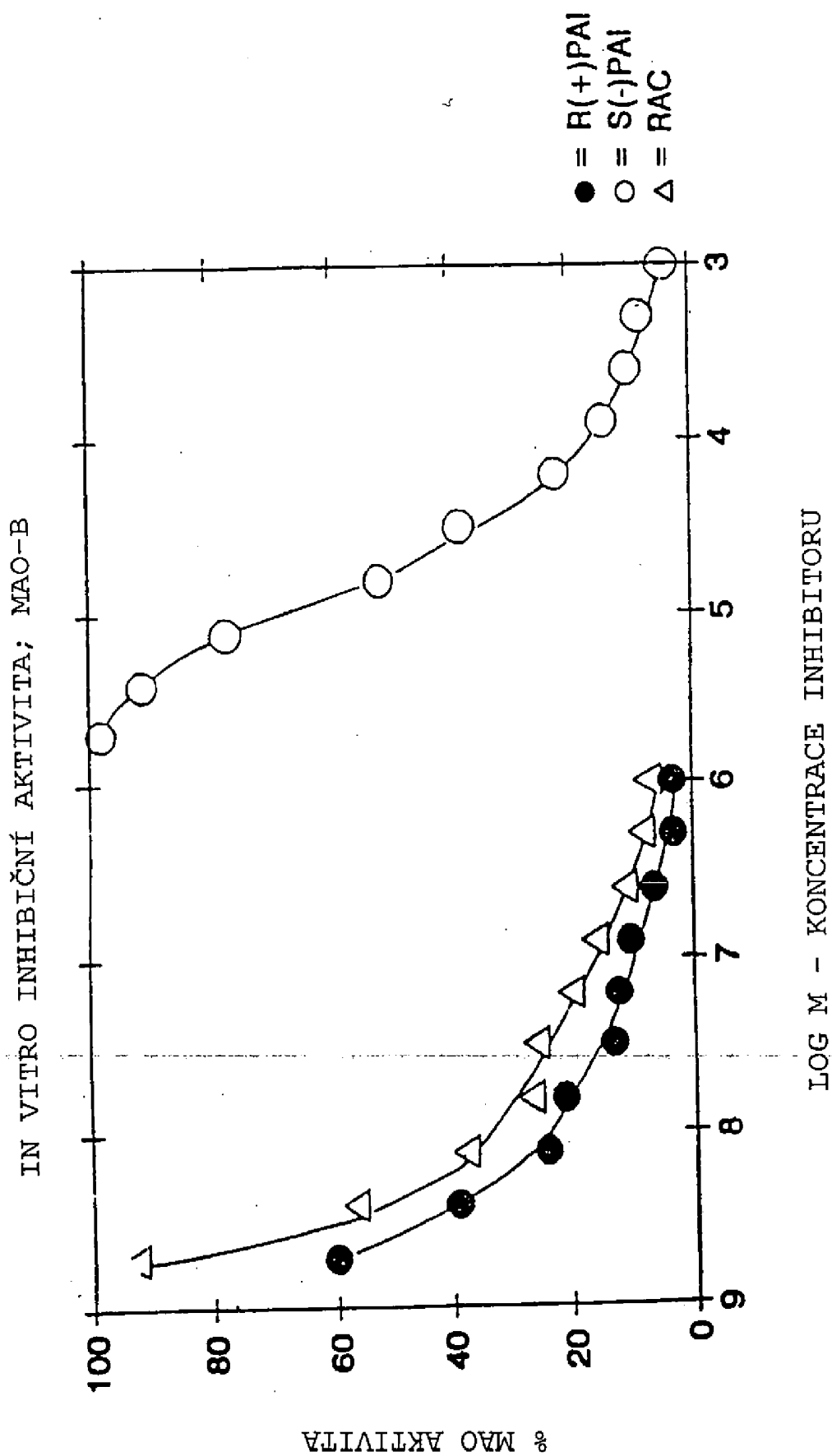
1/22

Obr. 1



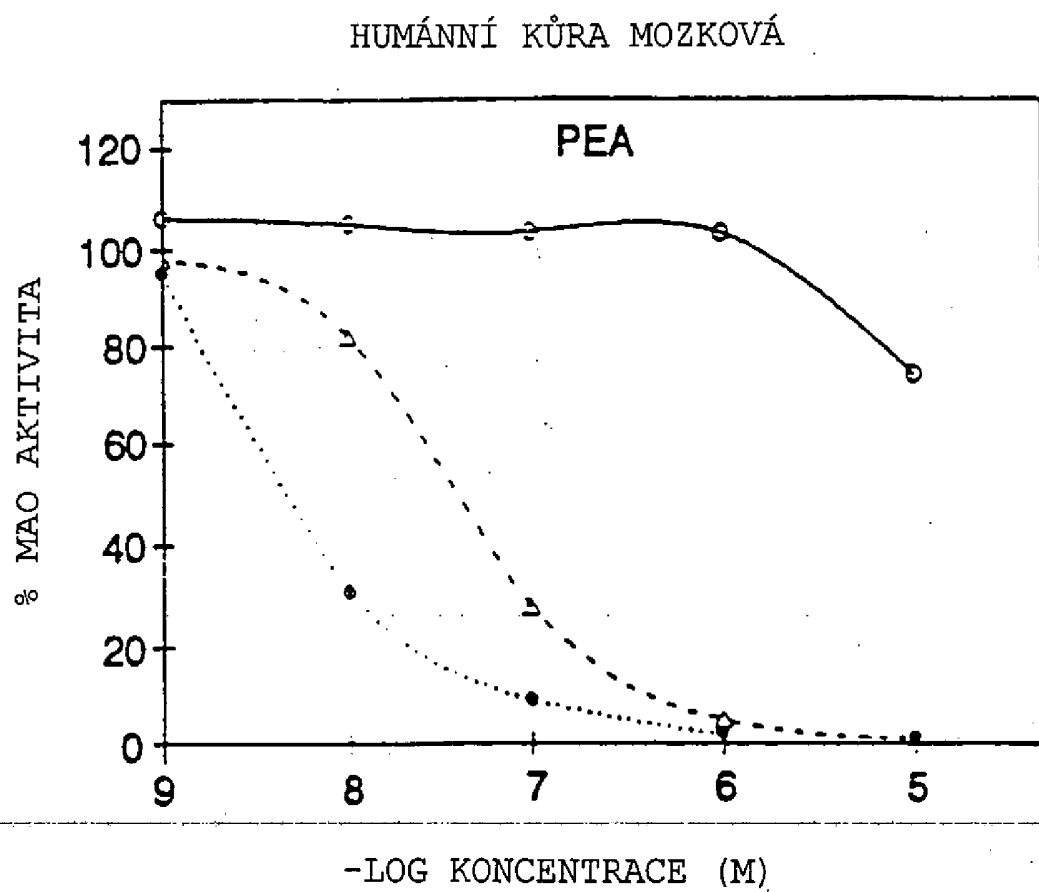
2/22

Obr. 2



3/22

Ohr. 3A

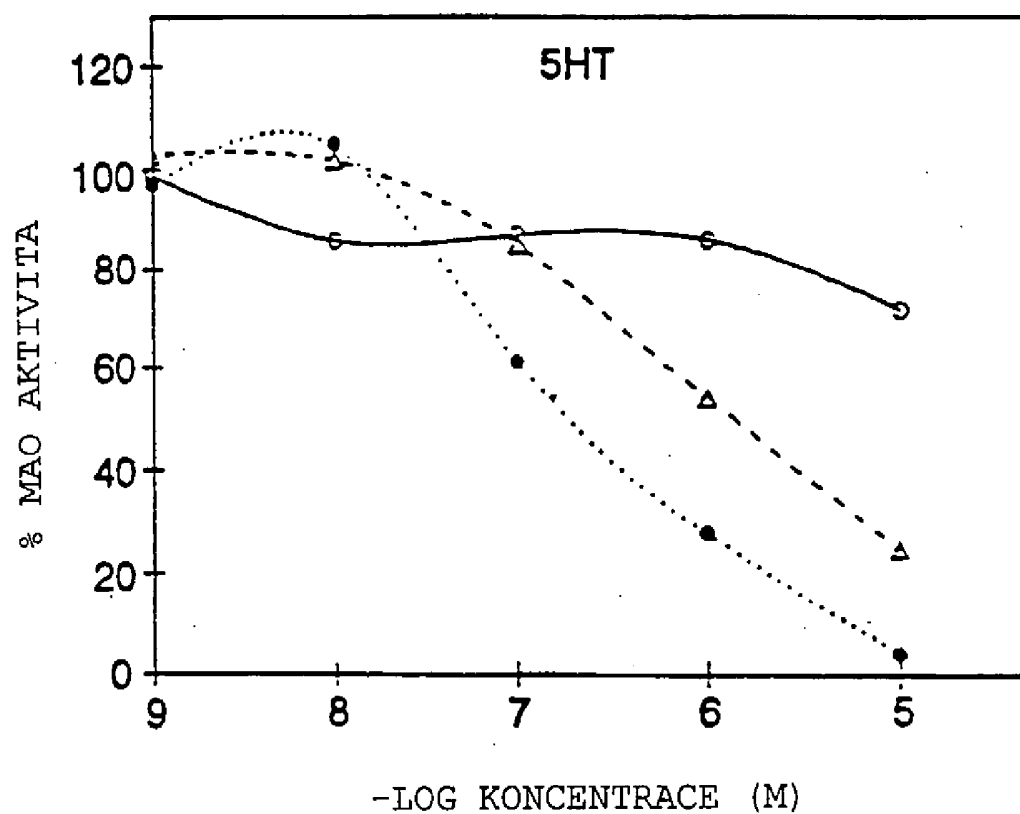


○—○ S(-)-PAI
●.....● R(+)-PAI
△---△ RAC

4/22

Obr. 3B

HUMÁNNÍ KŮRA MOZKOVÁ

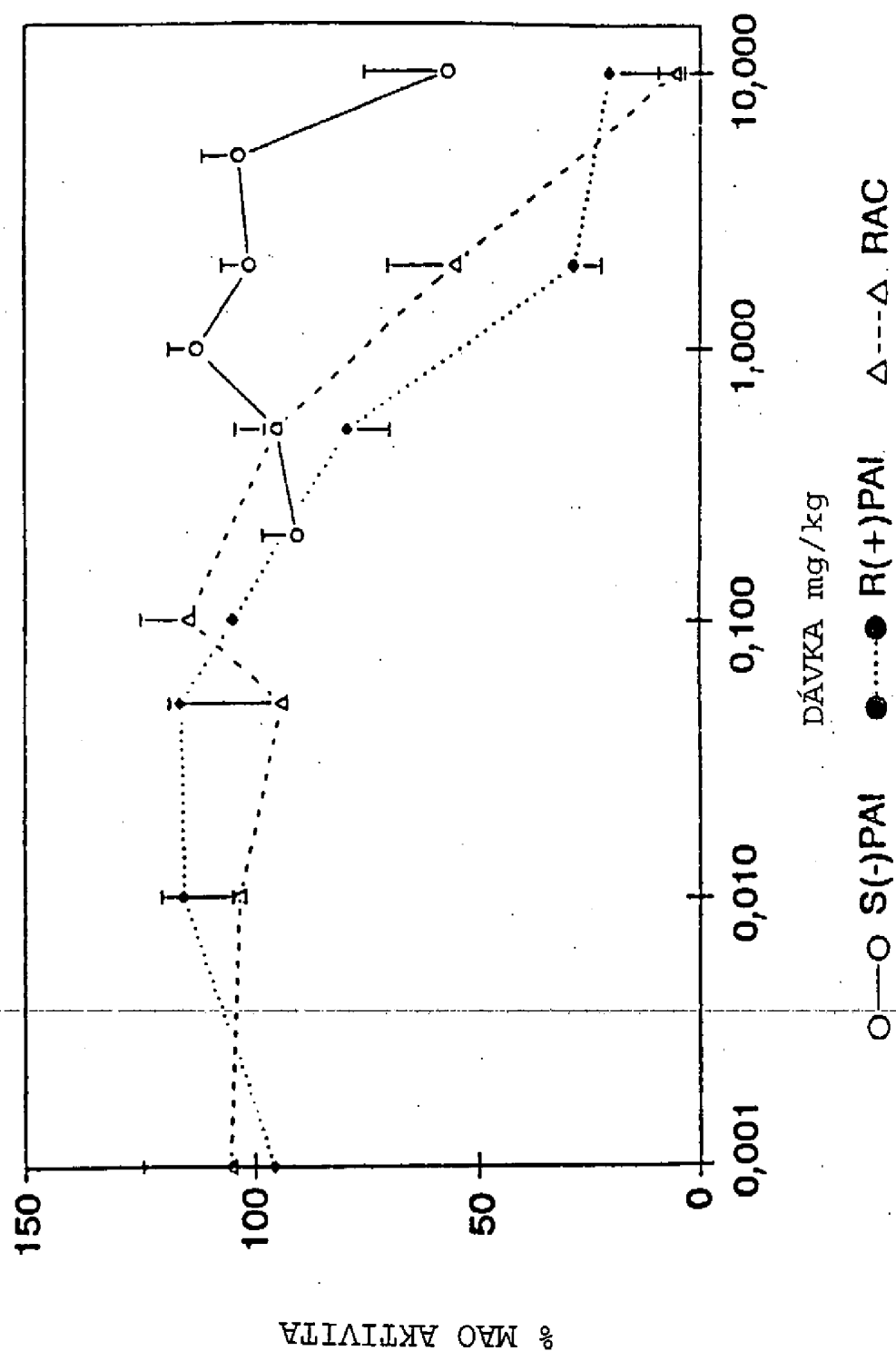


○—○ S(-)-PAI
●·····● R(+)-PAI
△---△ RAC

5/22

Obr. 4

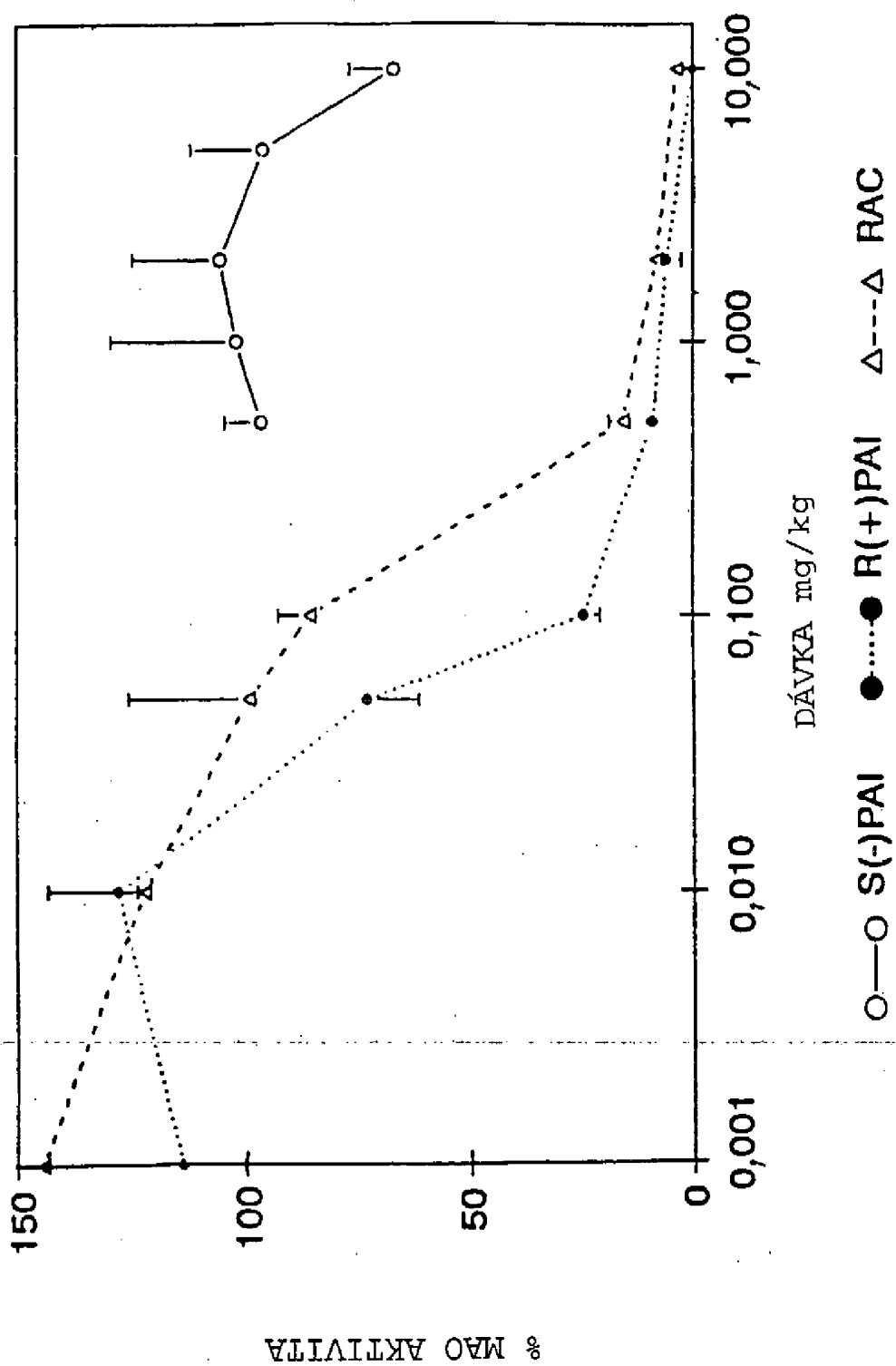
AKUTNÍ IN VIVO MAO-A INHIBICE; IP/MOZEK



6/22

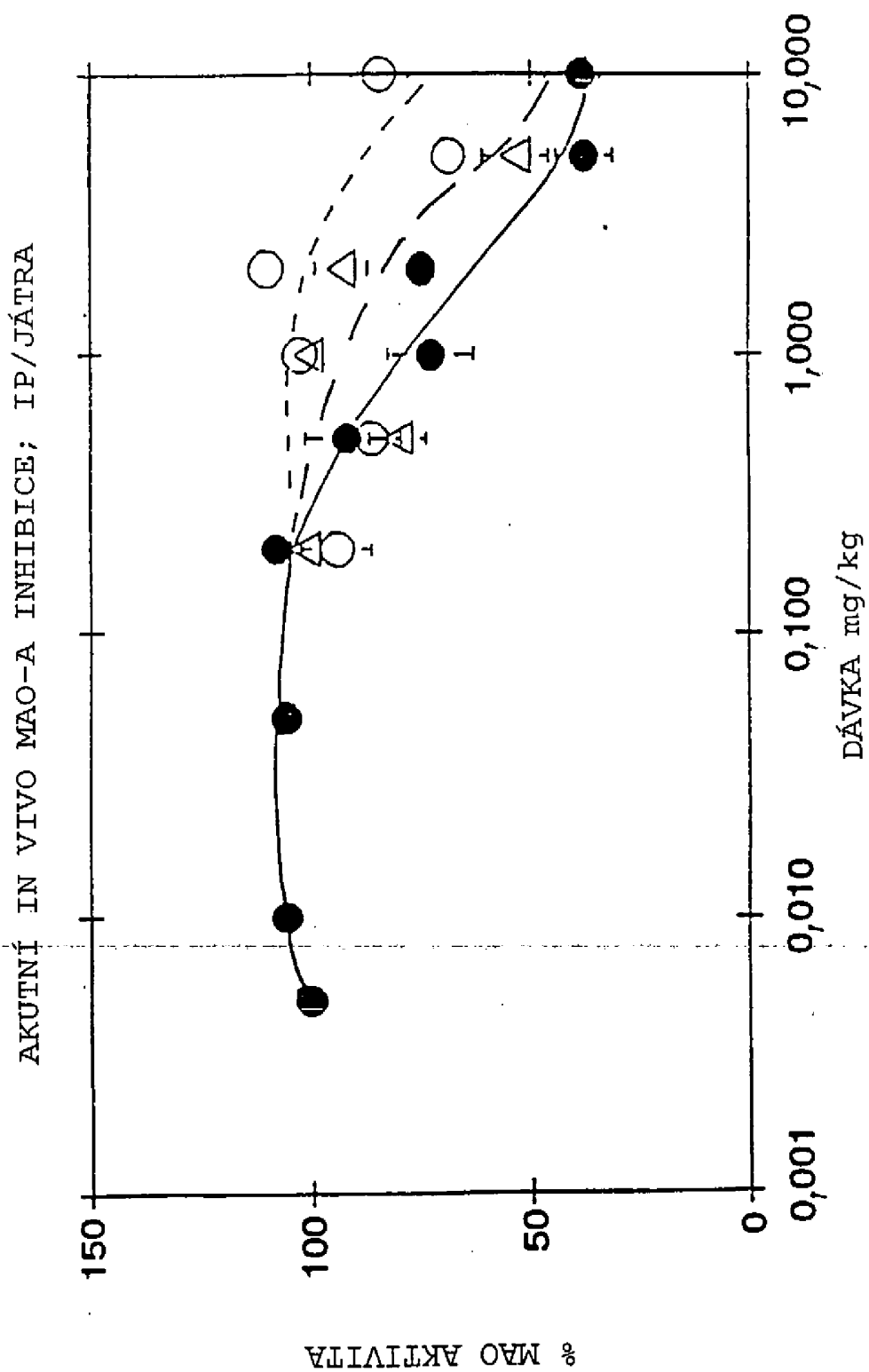
Obr. 5

AKUTNÍ IN VIVO MAO-B INHIBICE; IP/MOZEK



7/22

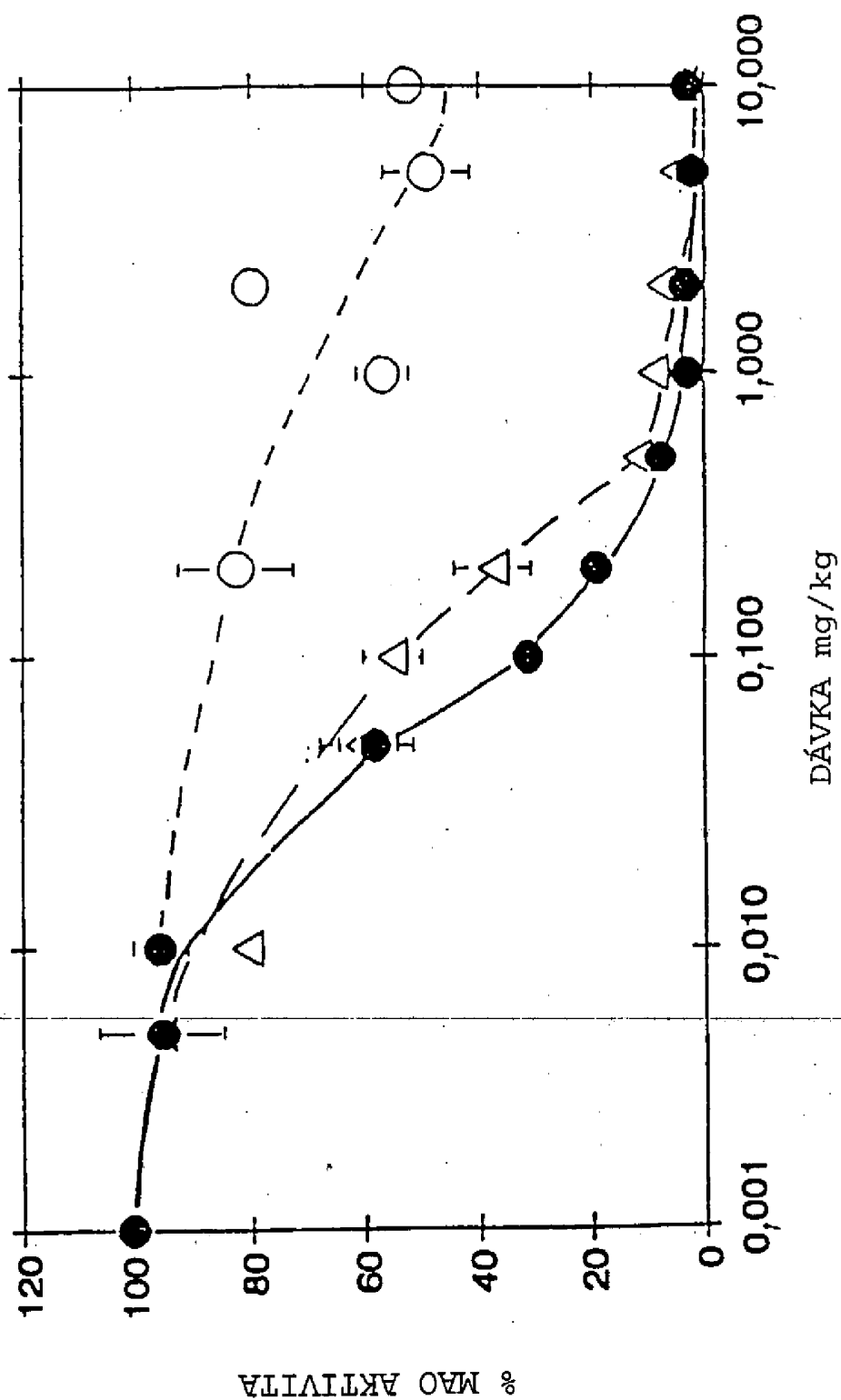
Obr. 6



8/22

Obr. 7

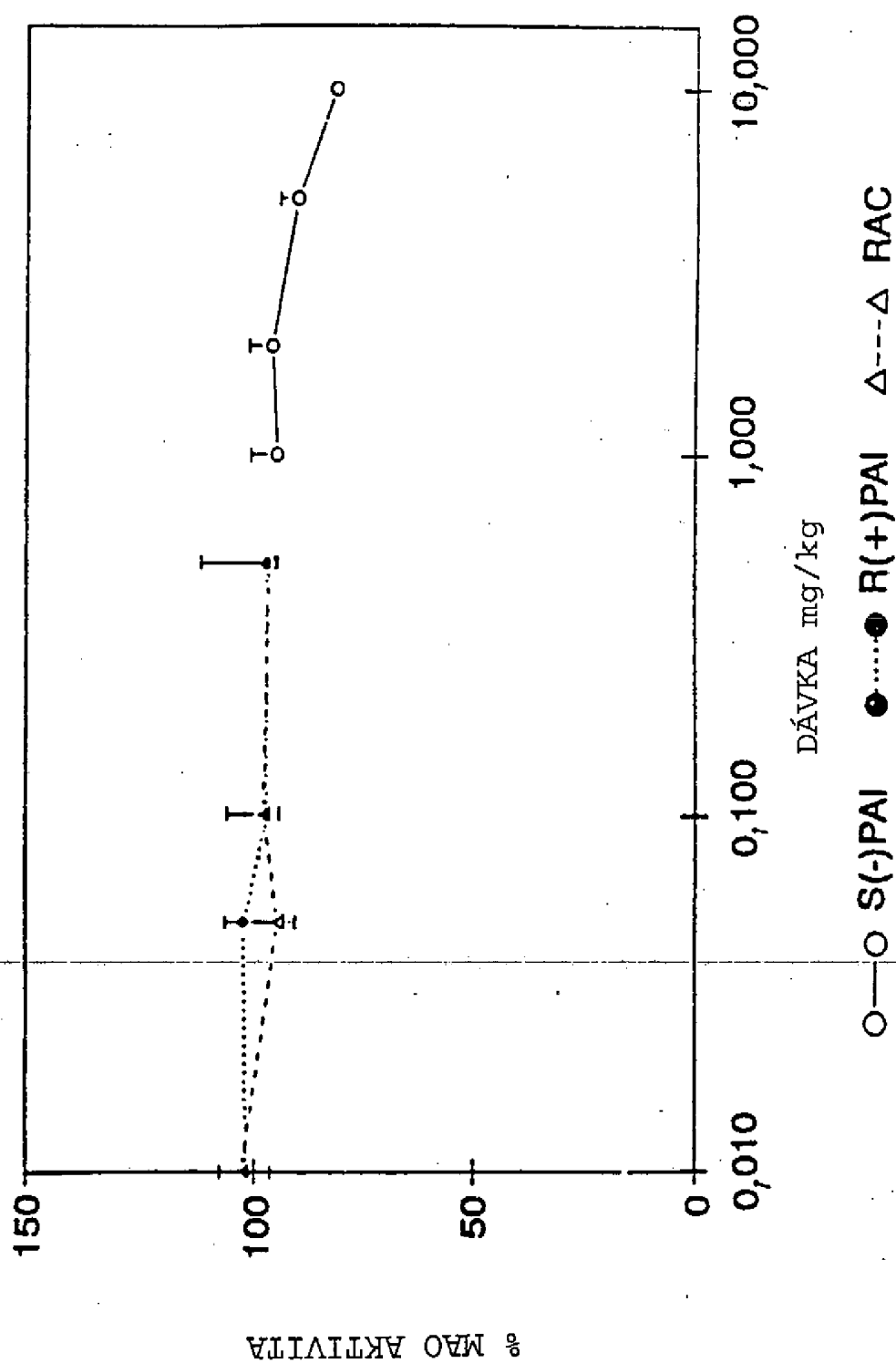
AKUTNÍ IN VIVO MAO-B INHIBICE; IP/JÁTRA



9/22

Obr. 8

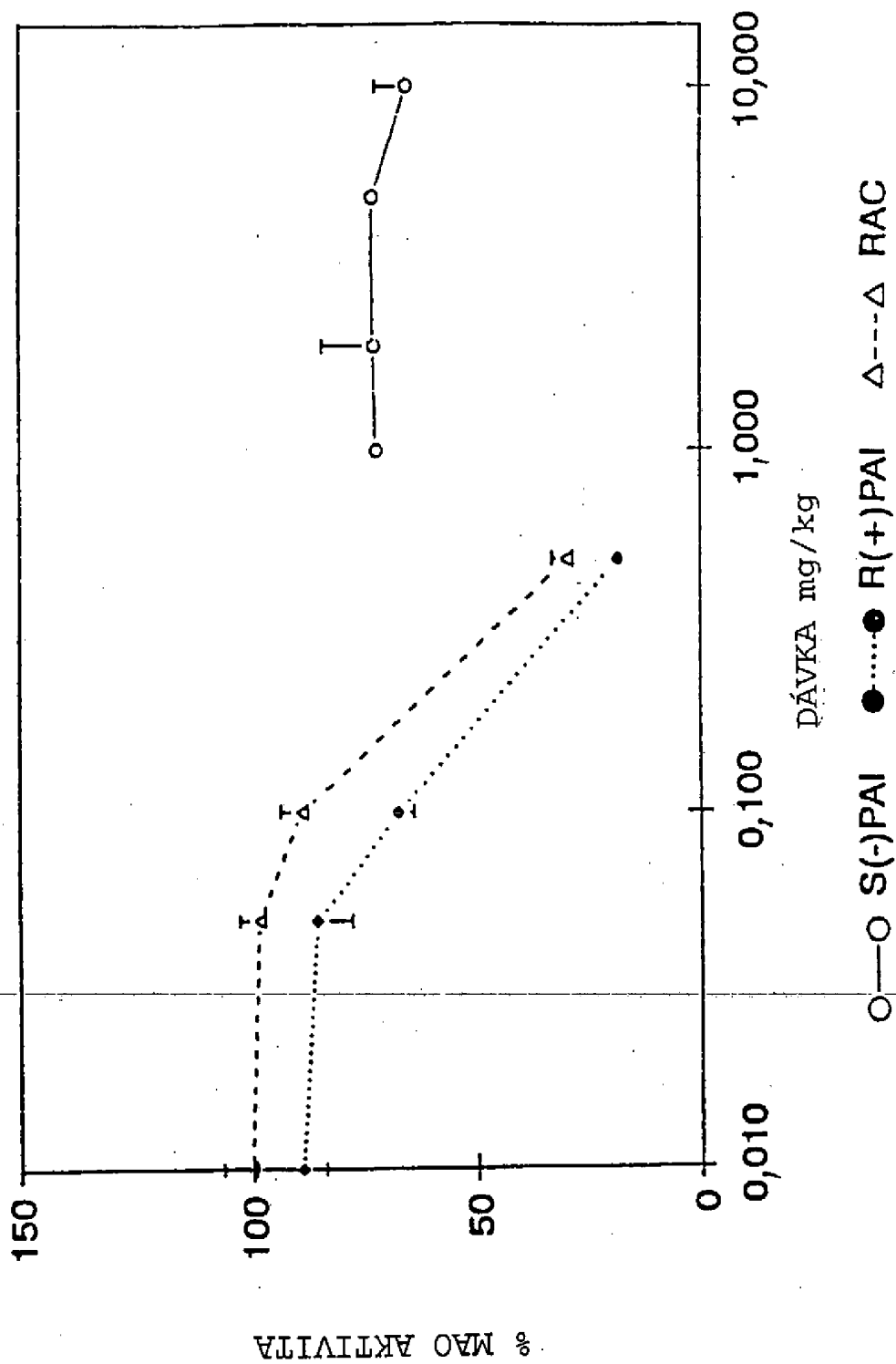
AKUTNÍ IN VIVO MAO-A INHIBICE; PER OS/MOZEK



10/22

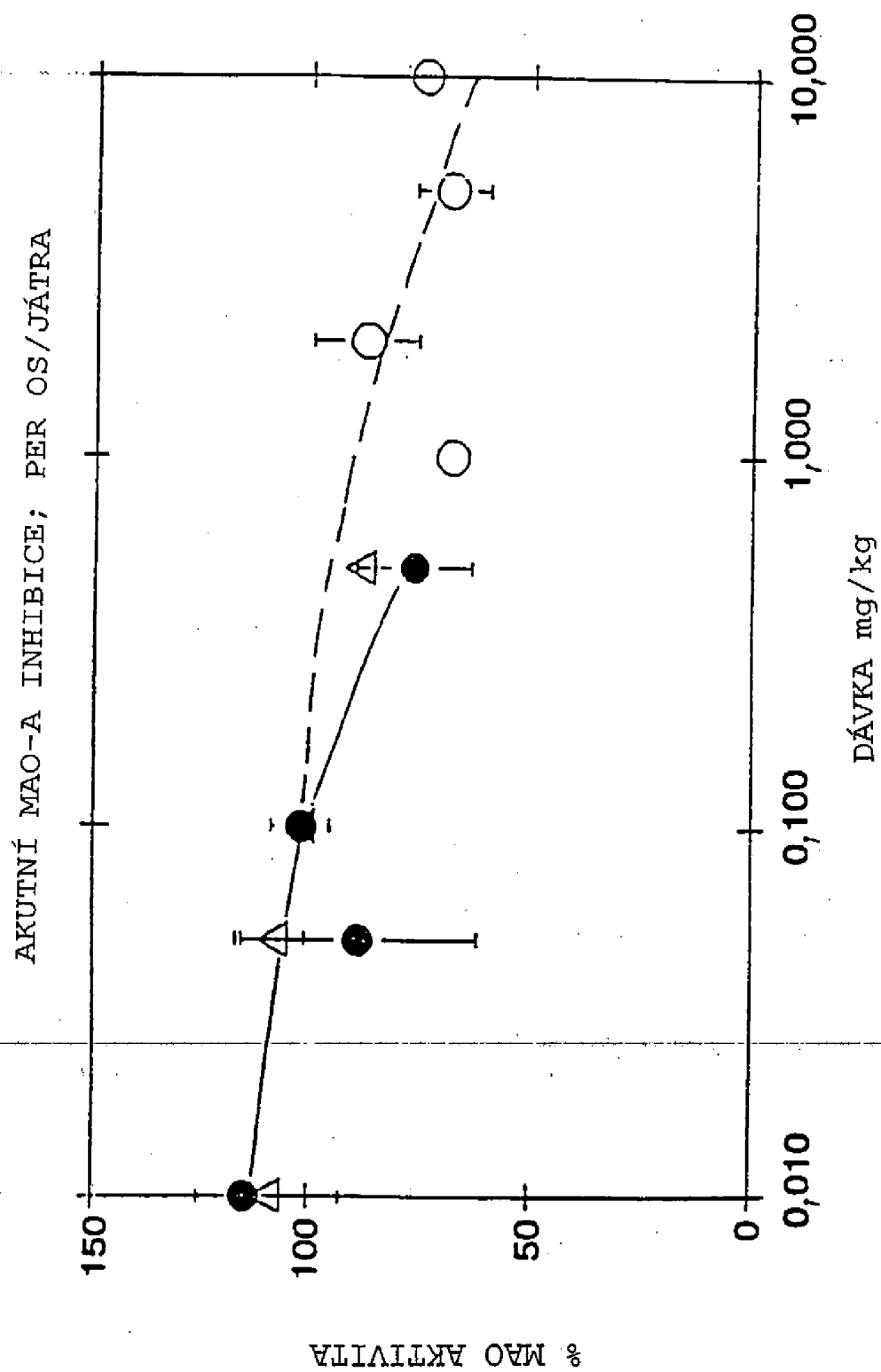
Obr. 9

AKUTNÍ IN VIVO MAO-B INHIBICE; PER OS/MOZEK



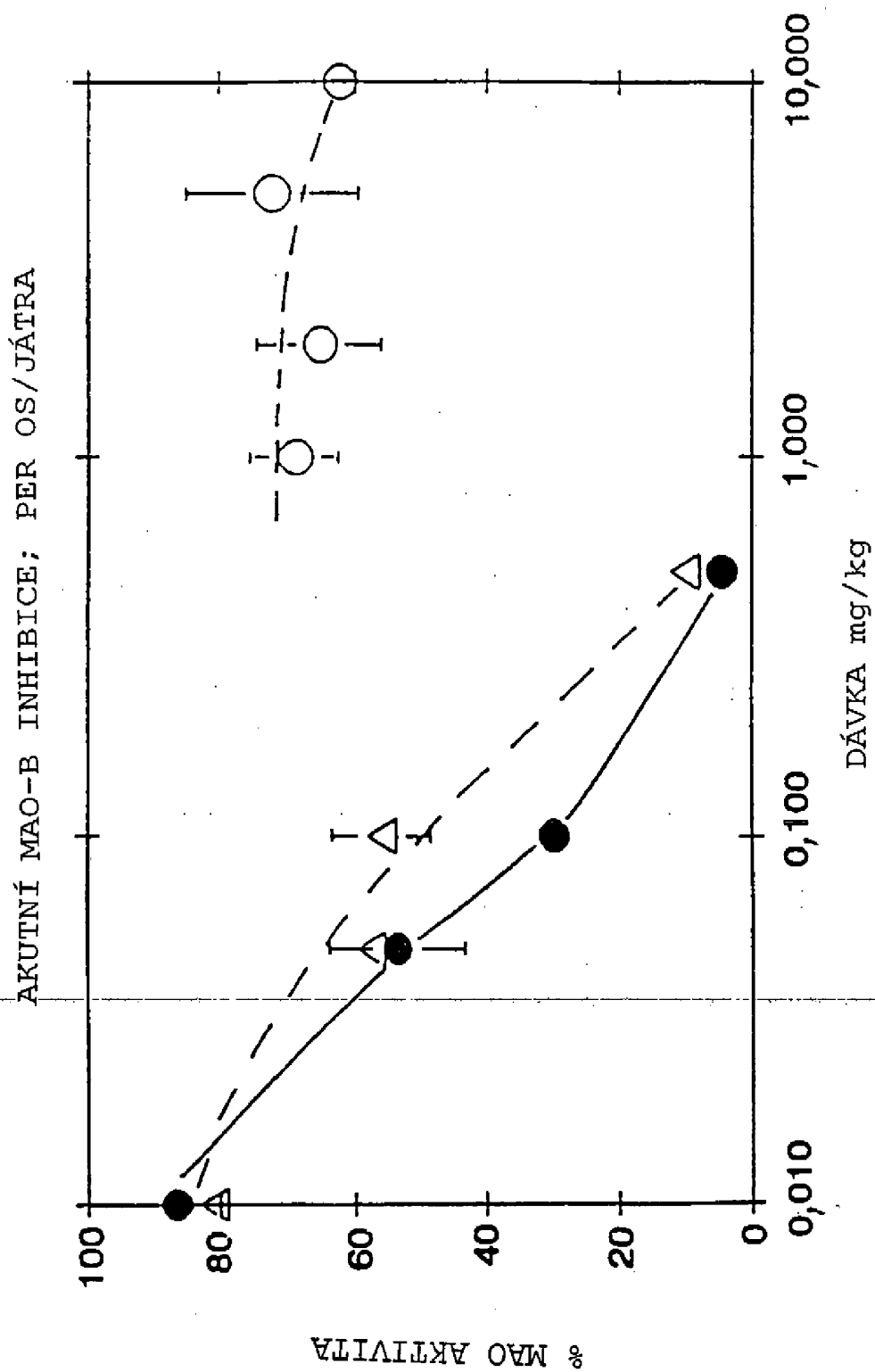
11/22

Obr. 10



12/22

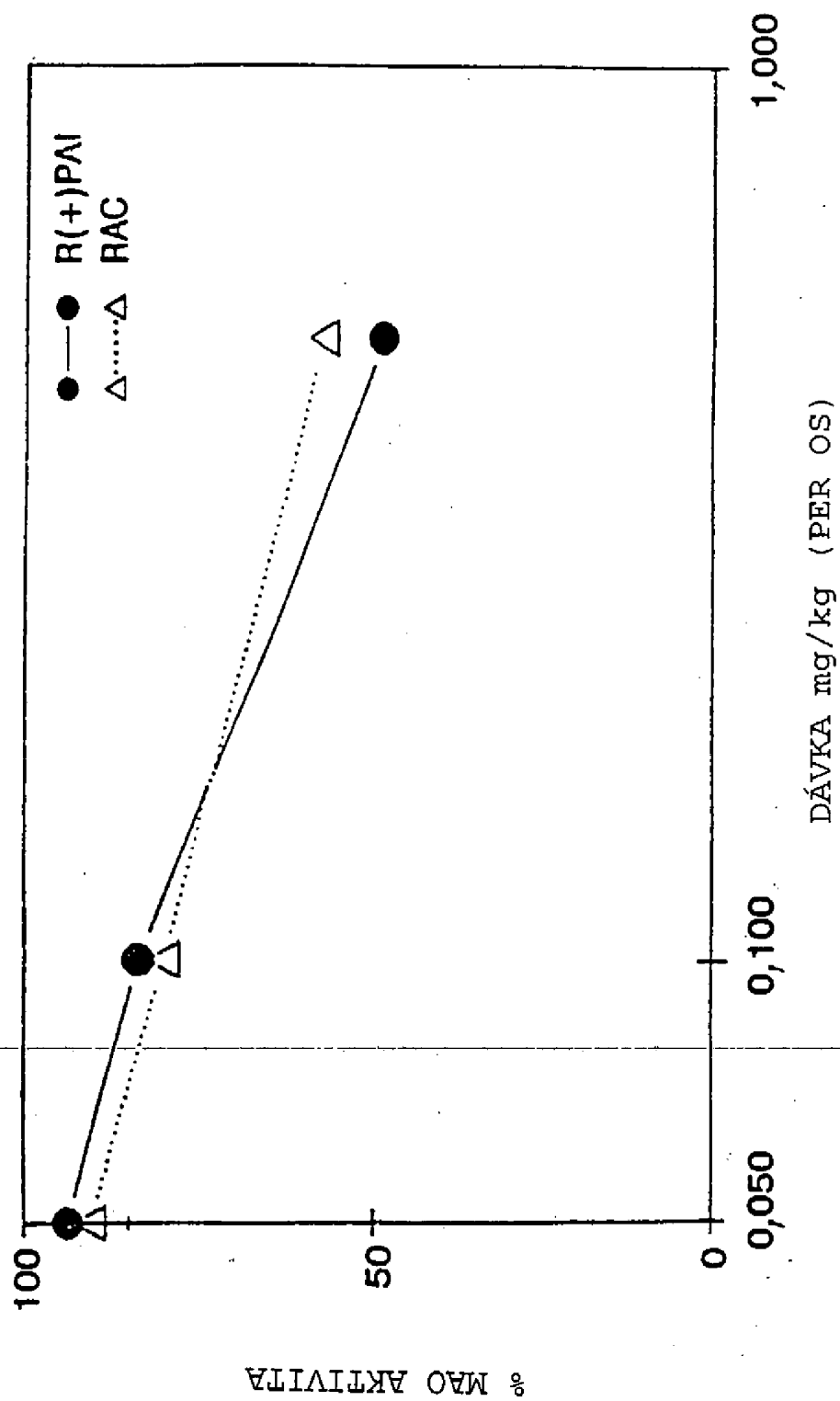
Obr. 11



13/22

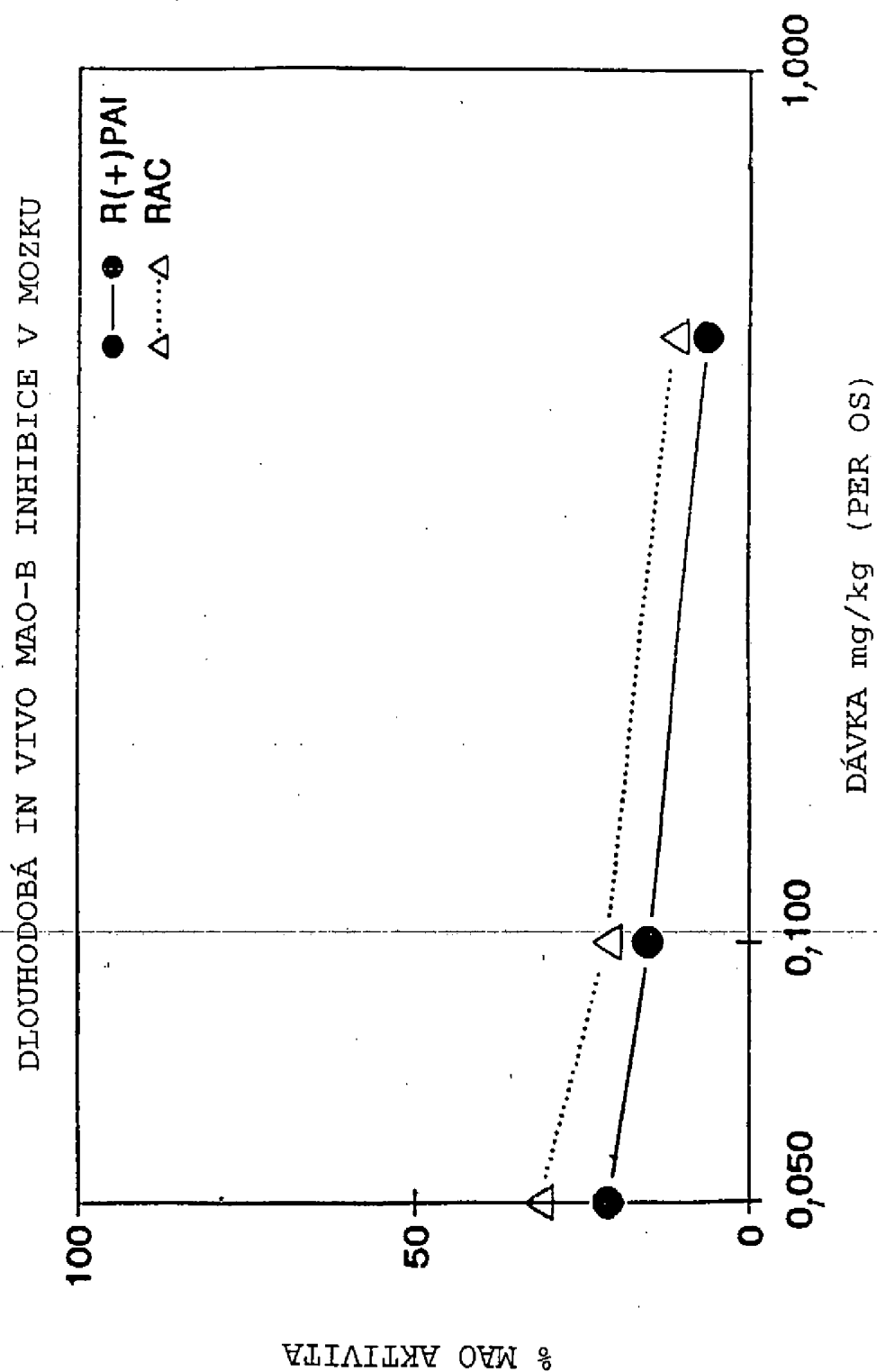
Obr. 12

DLOUHODOBÁ IN VIVO MAO-A INHIBICE V MOZKU



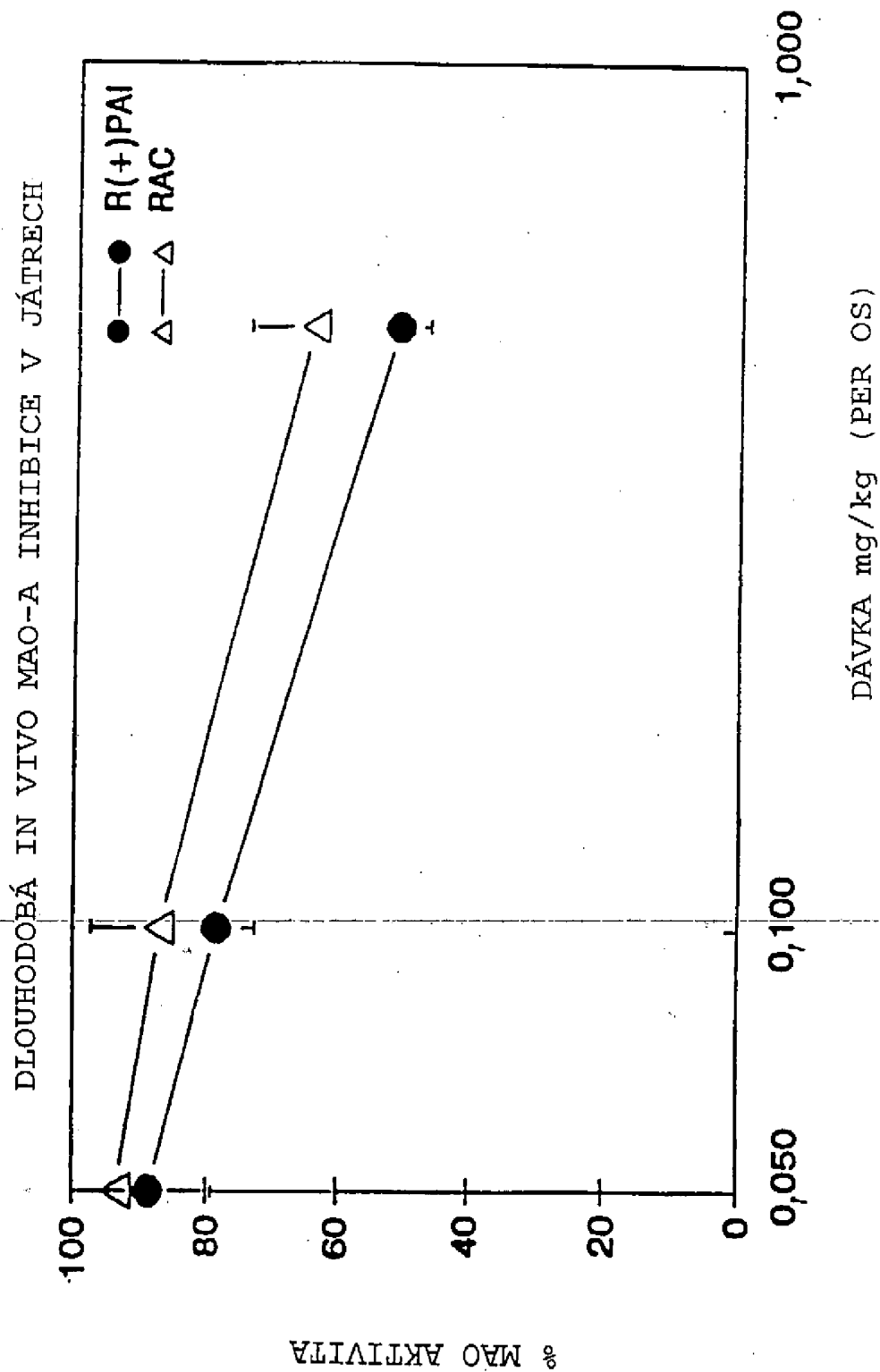
14/22

Obr. 13



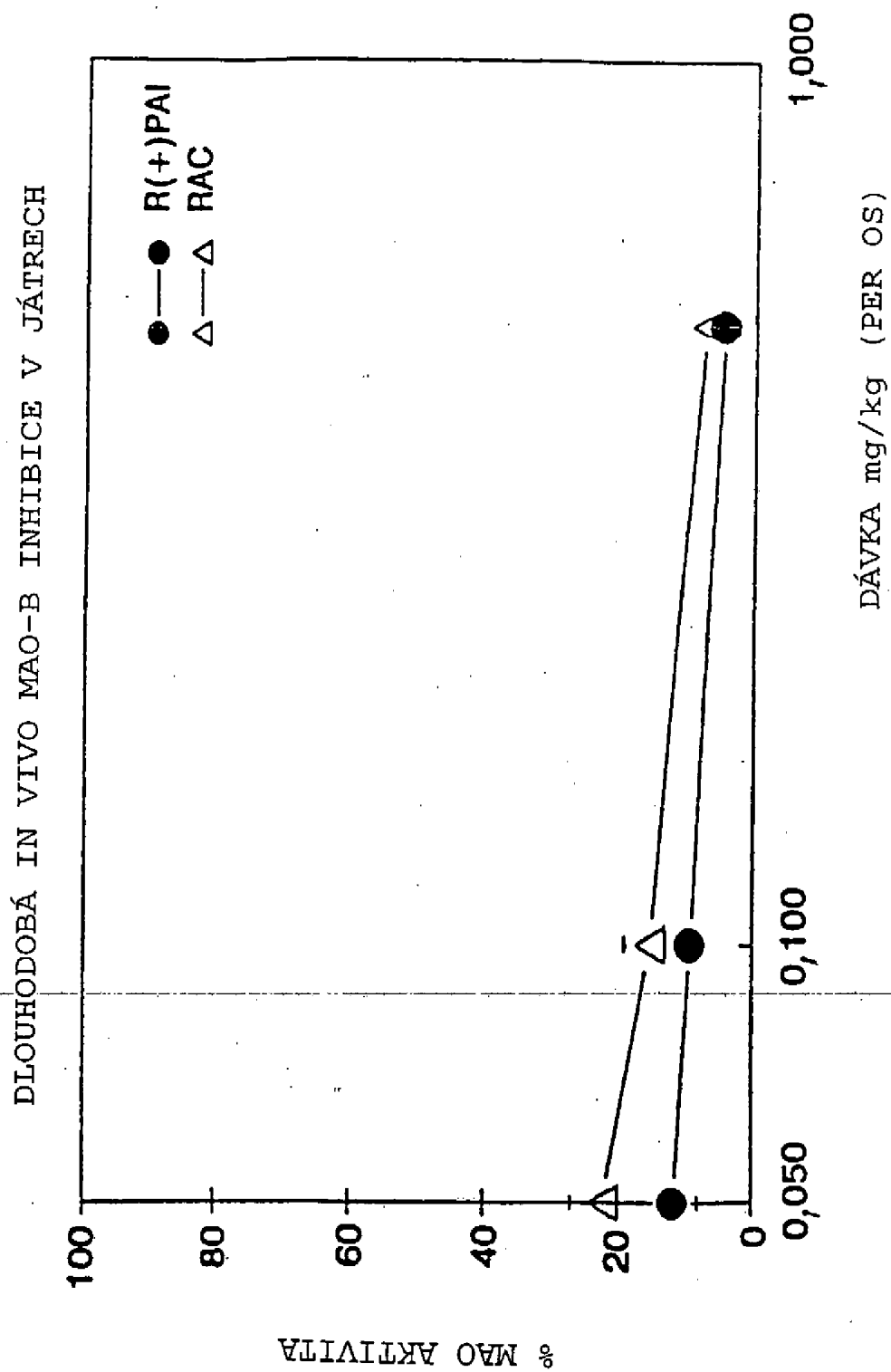
15/22

Obr. 14



16/22

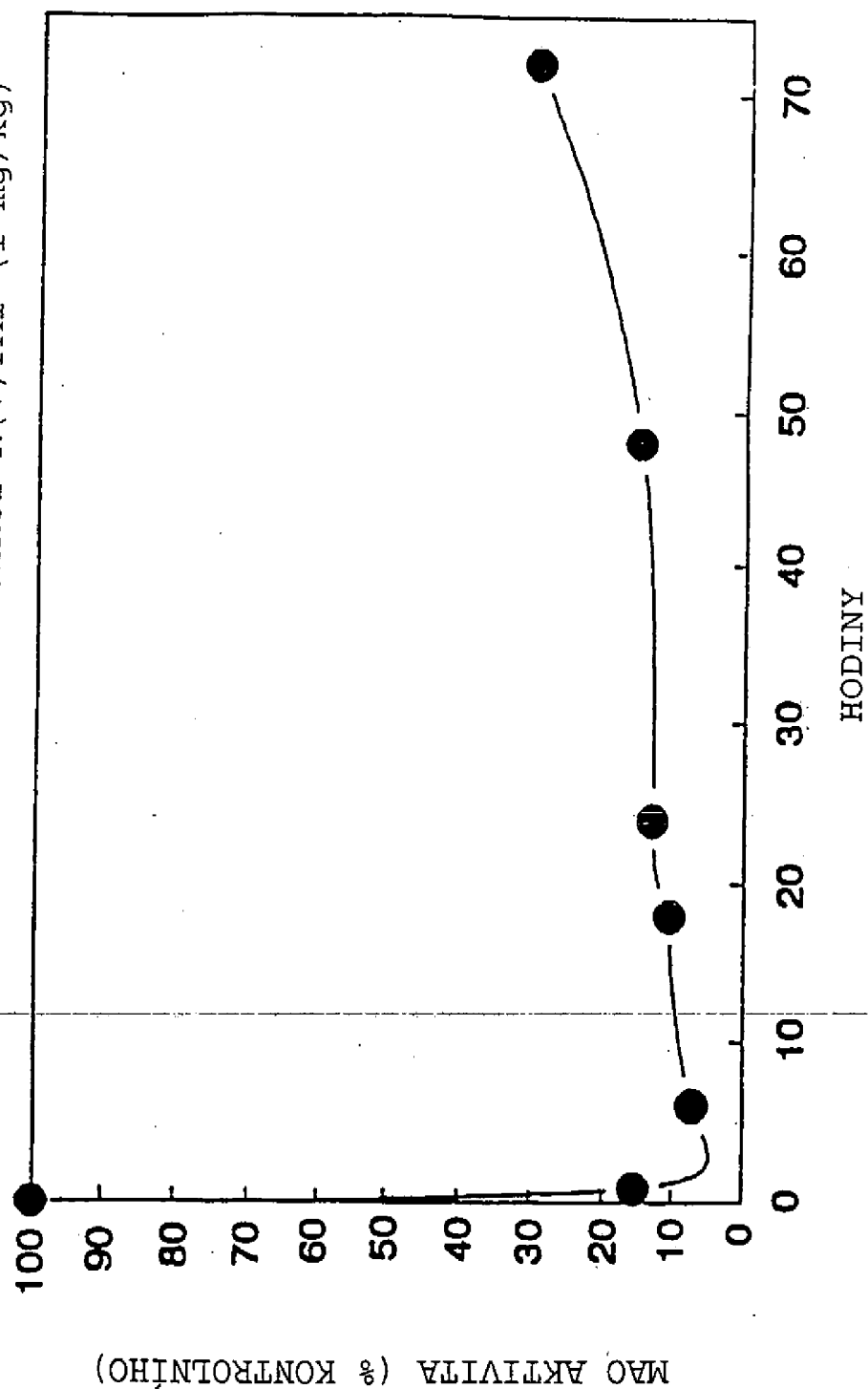
Obr. 15



17/22

Obr. 16

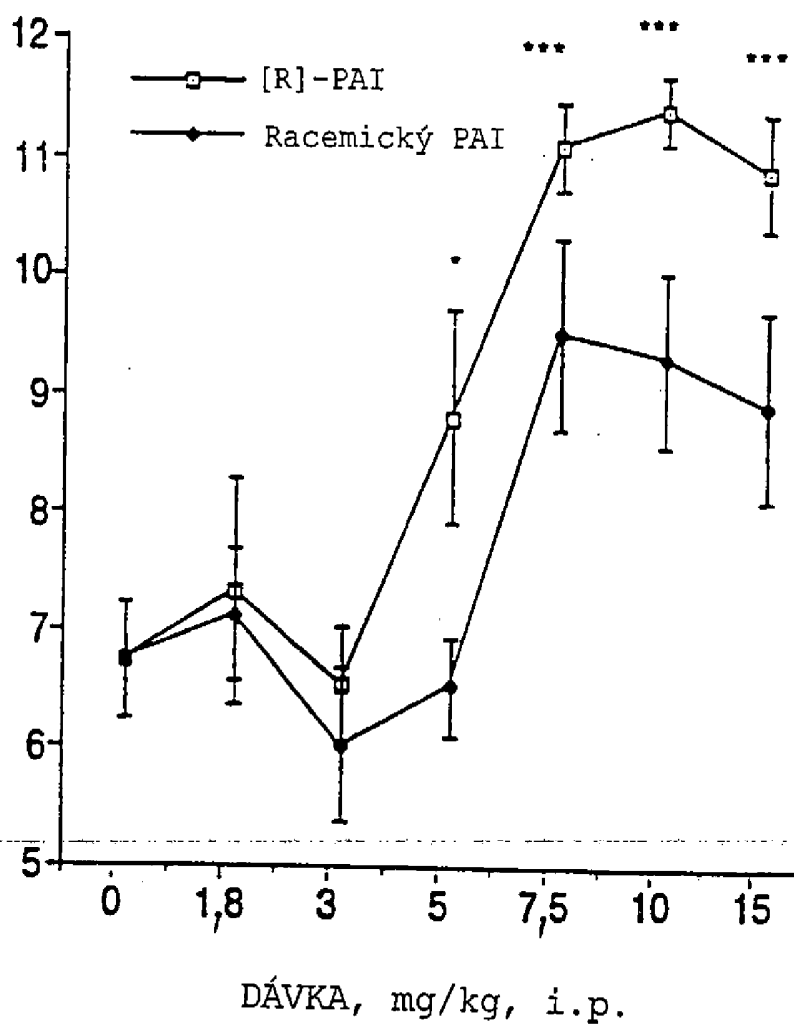
MAO-B AKTIVITA V MOZKU KRYSY V RÚZNÝCH ČASOVÝCH
OKAMŽÍKÁCH PO I.P. INJEKCI R(+)PAI (1 mg/kg)



18/22

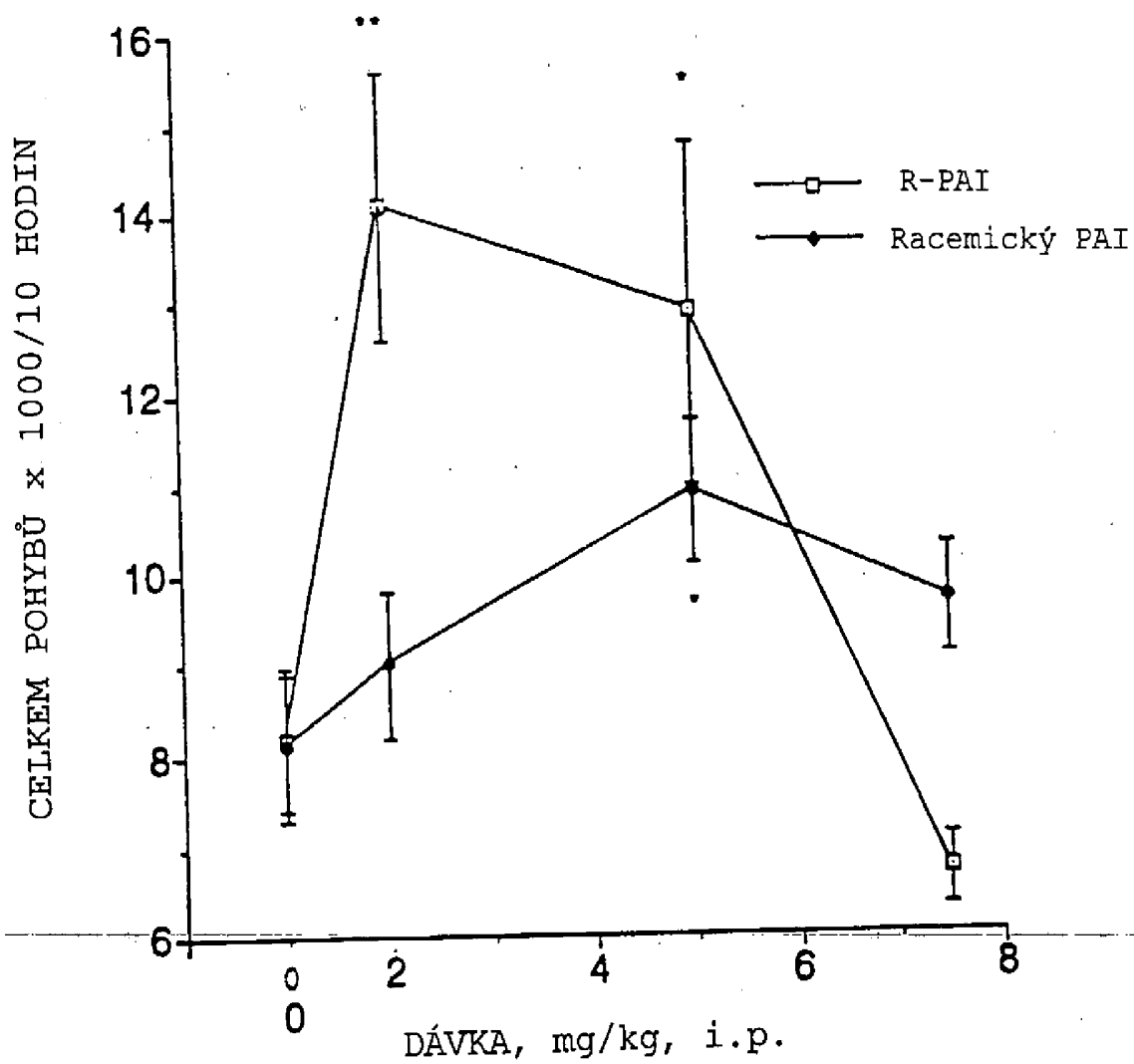
Obr. 17

ZVRAT HALOPERIDOLEM-INDUKOVANÉ KATALEPSIE



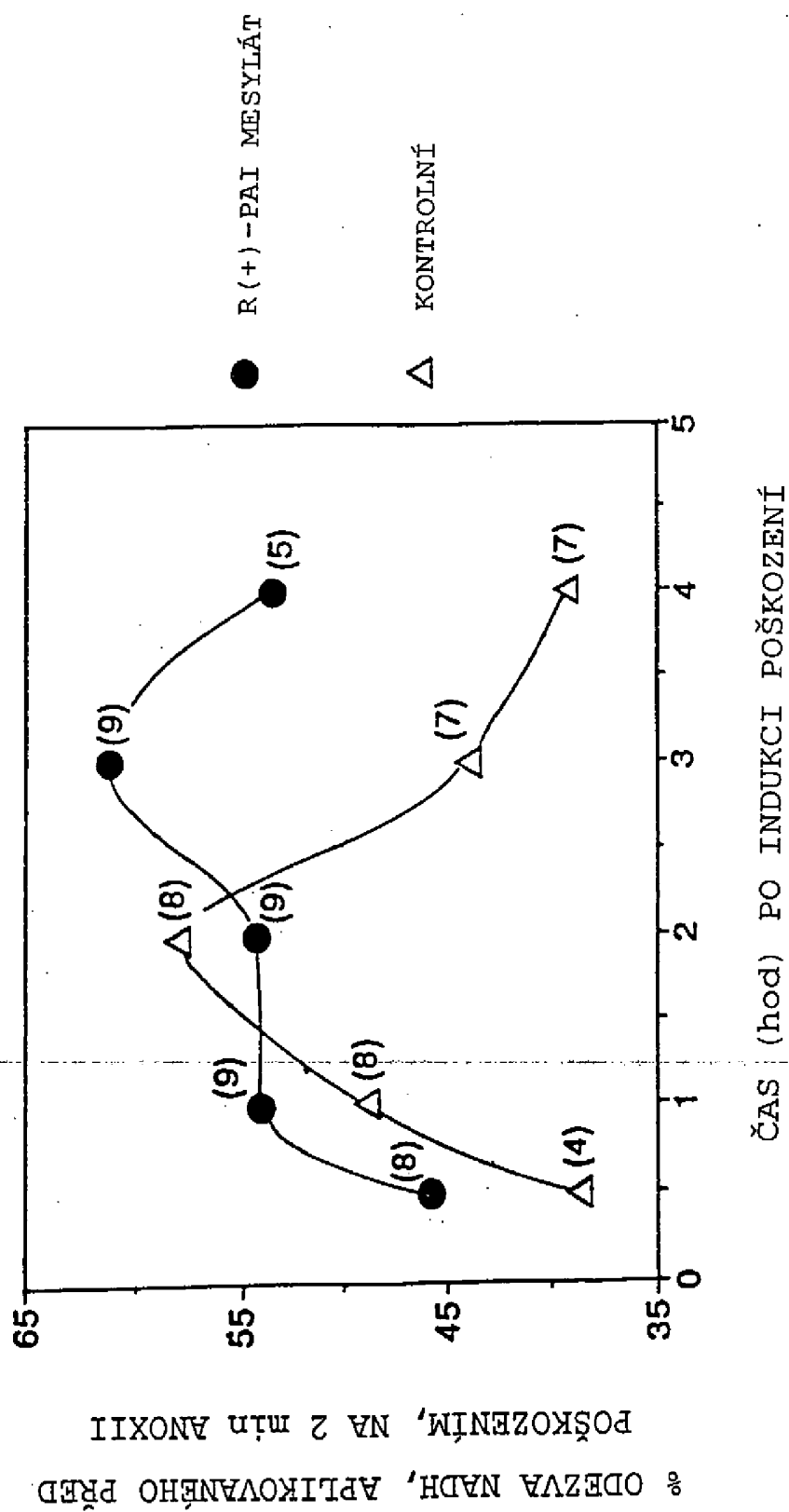
19/22

Obr. 18

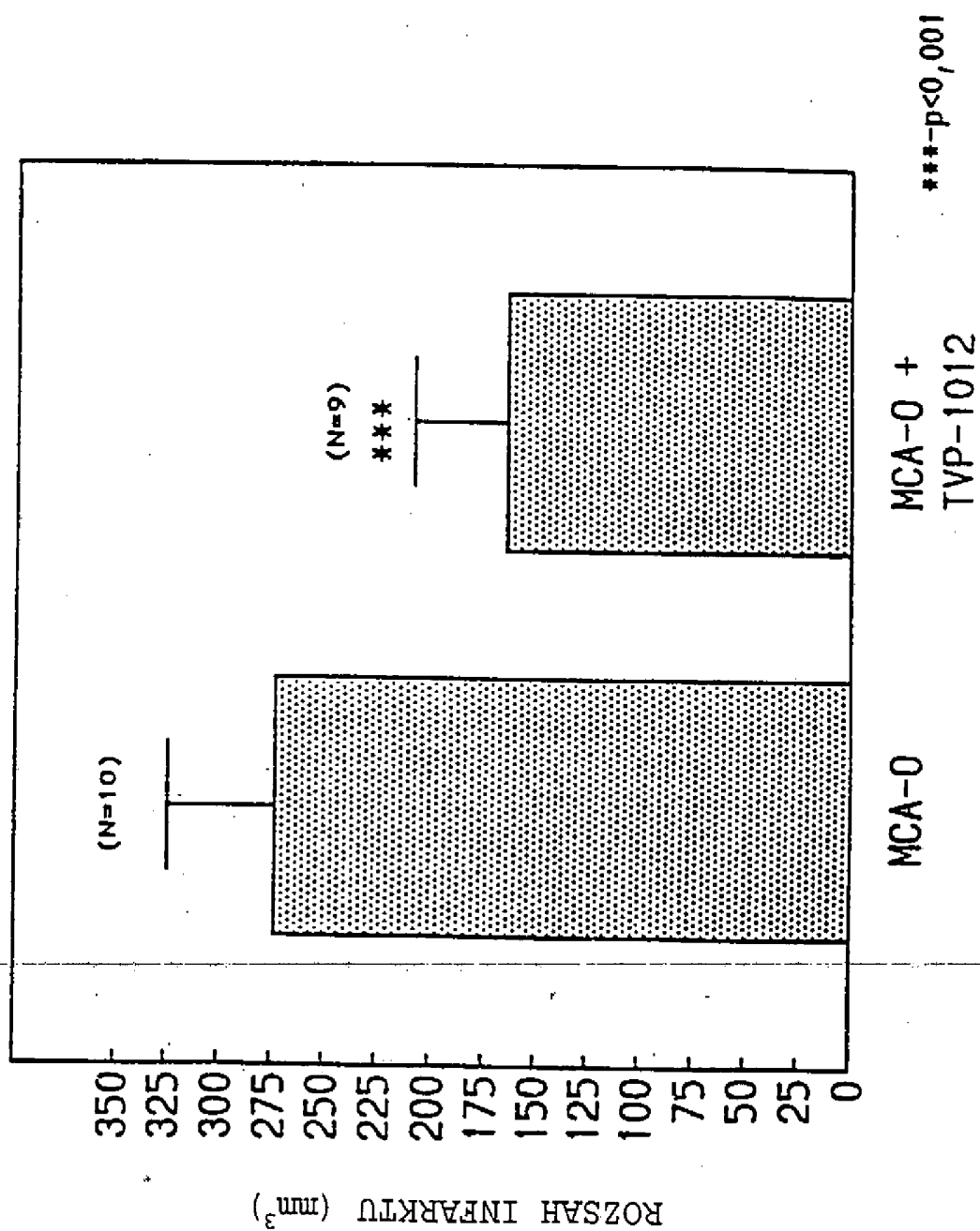


20/22

Obr. 19



Obr. 20



Obr. 21

