



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2011129717/15**, **29.12.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.12.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **29.12.2008**(43) Дата публикации заявки: **10.02.2013** Бюл. № 4(45) Опубликовано: **27.07.2013** Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2008061612 A**, **29.05.2008**. **US 6387890 B1**, **14.05.2002**. **US 20050256059 A1**, **17.11.2005**. **RU 2004117211 A**, **27.03.2005**. **WO 2004073623 A2**, **02.09.2004**. **Mohamed Selamnia et. al. "a-Difluoromethylomithine (DFMO) as a Potent Arginase Activity Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells"**, *Biochemical Pharmacology*, v.55, Issue 8, 15 April 1998, p.1241-1245.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **29.07.2011**(86) Заявка РСТ:
EE 2008/000027 (29.12.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/075863 (08.07.2010)

Адрес для переписки:

**197046, Санкт-Петербург,
Каменноостровский пр., 1/3, оф.30, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"**

(72) Автор(ы):

**ВОЛКЕ Валло (EE),
КРАСС Мааря (EE),
ВОЛКЕ Анника (EE),
ВАЗАР Ээро (EE)**

(73) Патентообладатель(и):

Тартуский Университет (EE)**(54) ИНГИБИТОРЫ АРГИНАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕПРЕССИИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и представляет собой применение соединения, которое проявляет ингибирующую активность в отношении аргиназы, в качестве терапевтически активного средства для лечения и/или профилактики

депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Изобретение обеспечивает расширение арсенала средств для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. 5 н. и 4 з.п. ф-лы, 3 пр., 2 ил.

RU 2 488 390 C2

RU 2 488 390 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011129717/15, 29.12.2008**

(24) Effective date for property rights:
29.12.2008

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2008**

(43) Application published: **10.02.2013 Bull. 4**

(45) Date of publication: **27.07.2013 Bull. 21**

(85) Commencement of national phase: **29.07.2011**

(86) PCT application:
EE 2008/000027 (29.12.2008)

(87) PCT publication:
WO 2010/075863 (08.07.2010)

Mail address:

**197046, Sankt-Peterburg, Kamennooostrovskij pr.,
1/3, of.30, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij
i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**VOLKE Vallo (EE),
KRASS Maarja (EE),
VOLKE Annika (EE),
VAZAR Eehro (EE)**

(73) Proprietor(s):

Tartuskij Universitet (EE)

(54) ARGINASE INHIBITORS FOR TREATING DEPRESSION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceutical industry and represents the use of a compound which exhibits inhibitory activity on arginase as a therapeutically active agent for treating and/or

preventing depression and/or depression-associated conditions.

EFFECT: invention provides extending the range of products for treating and/or preventing depression and/or depression-associated conditions.

9 cl, 3 ex, 2 dwg

R U 2 4 8 8 3 9 0 C 2

R U 2 4 8 8 3 9 0 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям, полезным в терапии депрессии и связанных с депрессией состояний. Более конкретно, изобретение относится к соединениям, которые проявляют ингибирующую активность в отношении аргиназы.

Уровень техники

Аргиназа (ЕС Номер 3.5.3.1) - это фермент, активность которого приводит к преобразованию аминокислоты L-аргинина в L-орнитин и мочевины, что является важной частью цикла мочевины. Помимо метаболического преобразования в L-орнитин, L-аргинин является предшественником NO, молекулы-свободного радикала, вовлекаемого в большое число биологических процессов.

Для некоторых соединений, полезных для лечения множества болезней и нарушений, также было показано ингибирование аргиназы. Например, показана возможность применения ингибиторов аргиназы N(омега)-гидрокси-L-аргинина (НОНА), N'-гидрокси-нор-L-аргинина (нор-НОНА), 2(S)-амино-6-бороногексановой кислоты (АВН), S-(+)-амино-6-йодацетамидогексановой кислоты, S-(+)-амино-5-йодацетамидопентановой кислоты, L-норвалина, или L-НОArg для лечения астмы, легочной гипертензии и серповидно-клеточной болезни (WO/2004/073623 Treatment of conditions associated with decreased nitric oxide bioavailability, including elevated arginase conditions).

L-Норвалин считается сильным ингибитором аргиназы (Rognstad R. Sources of ammonia for urea synthesis in isolated rat liver cells. Biochim Biophys Acta 1977; 496: 249-254; Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. Am J Physiol 1998; 274: H342-H348). Альфа-ДФМО - хорошо известный ингибитор орнитиндекарбоксилазы, но также и сильный ингибитор аргиназы (Selamnia M., Mayeur C, Robert V, Blachier F. Alpha-difluoromethylornithine (DFMO) as a potent arginase activity inhibitor in human colon carcinoma cells. Biochem Pharmacol 1998; 55: 1241-1245.3).

Известно и описано в US6573290 (DFMO and celecoxib in combination for cancer chemoprevention and therapy), US 6258845 (DFMO and sulindac combination in cancer chemoprevention) и US 4925835 (Aziridinyl putrescine containing compositions and their uses in treating prostate cancer), US 6277411 (Pharmaceutical formulation containing DFMO for the treatment of cancer) применение альфа-ДФМО (эфлорнитина, иногда называемого «эльфорнитином») для лечения или профилактики рака индивидуально или в комбинации с другими соединениями.

Норвалин - аналог валина, аминокислоты с разветвленной цепью, и он отсутствует среди 20 общих природных белковых аминокислот. Его использовали в различных комбинациях в исследовательской работе, включая в пептиды и в пищевые композиции, например, по WO/2008/067641 (Composition for improving blood flow in working muscles comprising L-arginine, Crataegus extract and artichoke flavonoids).

Было показано, что повышенная активность аргиназы приводит к снижению образования NO (Que LG, George SE, Gotoh T, Mori M, Huang YC. Effects of arginase isoforms on NO production by nNOS. Nitric Oxide 2002; 6: 1-8). Таким образом, ингибиторы аргиназы могут увеличить выработку NO. Поскольку ингибиторы NO-синтазы обладают свойствами, подобными антидепрессантам и транквилизаторам (Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant - and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. Behavioural Brain Research 2003; 140: 141-147), у ингибиторов аргиназы должен быть противоположный эффект. Неожиданно, как мы показали в нижеследующем изобретении, ингибиторы аргиназы обладают антидепрессантными свойствами.

В настоящем документе раскрыт новый сильный и неожиданный эффект двух структурно различных ингибиторов аргиназы, DFMO и L-норвалина, что ведет к перспективе применения ингибирующих аргиназу соединений для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

5 Краткое описание чертежей

Фиг.1 Влияние имиπραмина (15 мг/кг), L-норвалина и DFMO в тесте принудительного плавания (n=8 на группу). Результаты выражаются как среднее \pm S.E.M. (стандартная погрешность среднего). *-P<0,01, ** - P<0,001, в сравнении с физраствором.

10 Фиг.2 Влияние L-орнитина (500 мг/кг), L-норвалина (500 мг/кг) и их комбинации в тесте принудительного плавания (n=10 на группу). Результаты выражаются как среднее \pm S.E.M. *-P<0,01 в сравнении с группой физраствор+физраствор; # - P<0,001, в сравнении с группой физраствор+L-норвалин.

15 Раскрытие изобретения

Было обнаружено, что ингибиторы аргиназы, например L-норвалин и альфа-DFMO представляют собой терапевтически перспективные антидепрессантные средства.

20 Объектом настоящего изобретения являются соединения, которые ингибируют аргиназу (включая диформетилорнитин (DFMO) и L-норвалин, но не ограничиваясь ими), и которые могут применяться в качестве терапевтически активных средств для лечения и профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

Ингибирующими активностью аргиназы соединениями могут быть диформетилорнитин (DFMO), L-норвалин, но не ограничиваясь ими.

25 Другими объектами настоящего изобретения являются: применение упомянутых ингибирующих аргиназу соединений в качестве терапевтически активных средств для производства фармацевтических композиций для применения к человеку и в ветеринарии, и фармацевтические композиции, содержащие упомянутые соединения и фармацевтически приемлемый носитель. Примеры таких носителей широко известны в фармацевтической практике в препаратах для человека и в ветеринарии. Примерами таких носителей являются крахмал, альгинаты, стеараты, желатин, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза и т.д. Фармацевтические композиции могут быть в любой форме, подходящей для их применения, например, в форме капсул, порошка, 30 таблеток, раствора, суспензии, лосьона и т.д.

35 Таким образом, диформетилорнитин (DFMO), L-норвалин или другие ингибиторы аргиназы могут применяться в качестве терапевтически активных средств для производства фармацевтических композиций для применения к человеку и в ветеринарии. Фармацевтические композиции, содержащие 40 диформетилорнитин (DFMO), L-норвалин или другие ингибиторы аргиназы, могут применяться для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

45 Кроме того, раскрыт способ выявления соединений, подходящих для применения в качестве терапевтически активных средств для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний и/или тревожности, содержащий этап, на котором определяют, проявляет ли исследуемое соединение ингибирующую 50 активность в отношении аргиназы, и если упомянутое соединение ингибирует аргиназу, то это соединение выбирают в качестве кандидата, подходящего для применения в качестве терапевтически активного средства для лечения и/или профилактики упомянутых болезней и/или состояний.

Также в изобретение включен способ лечения и профилактики депрессии и/или

связанных с депрессией состояний, содержащий этап, на котором вводят
млекопитающему, страдающему от депрессии и/или связанных с депрессией состояний,
или млекопитающему с подозрением на развитие депрессии или связанного с
депрессией состояния терапевтически эффективное количество соединения,
5 проявляющего ингибирующую активность в отношении аргиназы.

Кроме того, раскрыт набор для выбора новых соединений для лечения и/или
профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Набор такого вида
содержит по меньшей мере средство для определения ингибирующей активности в
10 отношении аргиназы способом, известным специалисту в данной области техники.
Если обнаружена ингибирующая активность в отношении аргиназы, соединение
отбирается для дальнейшего скрининга его свойств в качестве кандидата
лекарственного средства для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с
депрессией состояний.

15 Осуществление изобретения

Антидепрессантные свойства ингибирующих аргиназу средств L-норвалина и DFMO
были исследованы посредством ряда поведенческих тестов на животных, обычно
применяемых в фармакологии и считаются в общем прогнозирующими
20 антидепрессантную активность у людей (Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral
despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 1977;
229: 327-336; Crawley J, Goodwin FK).

L-норвалин, DFMO и L-орнитин были проверены в следующих тестах: тест
25 принудительного плавания на мышах, (пример 1, пример 2), тест двигательной
активности (пример 3). Двигательную активность животных измеряли с помощью
автоматизированной системы, описанной ранее (Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E.
Antidepressant - and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-
trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. Behavioural Brain Research 2003; 140: 141-147).

30 Данные анализировали с помощью однофакторного или двухфакторного
дисперсионного анализа (ANOVA), когда это целесообразно. Сравнение по
полученным данным между индивидуальными группами выполнено по тесту
Ньюмена-Кеулса.

Пример 1. Тест принудительного плавания

35 Использовались мыши-самцы C57Bl/6/Bkl (Scanbur BK AB, Швеция) массой тела 20-
25 г. Мыши содержались в клетках по 10 особей (21×37×15 см) в виварии при 20°C с
циклом дня и ночи по 12 ч (свет включали в 7.00 утра). Водопроводная вода и
пищевые гранулы были без ограничений. Животных до введения в эксперимент
40 содержали в питомнике для животных в течение по меньшей мере двух недель.

Измерение двигательной активности и тест принудительного плавания проводили
последовательно через 45 и 55 минут после введения исследуемых соединений,
согласно Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant - and anxiolytic-like effects
of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. Behavioural
45 Brain Research 2003; 140: 141-147. В отдельном эксперименте за 15 минут до введения L-
норвалина вводили продукт активности аргиназы L-орнитин или солевой раствор.

Тест принудительного плавания проводили согласно Porsolt et al., Porsolt RD,
Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants.
50 Arch Int Pharmacodyn Ther 1977; 229: 327-336.

Стекланный цилиндр диаметром 12 см заполнен водой на 8 см при 25°C. Животное
помещали в воду и регистрировали его поведение на видео в течение 6 мин.
Наблюдатель, не владеющий информацией о протоколе введения вещества,

регистрировал время неподвижности в течение последних 4 минут из 6 минут теста.

Результаты:

Время неподвижности составило 220 секунд в контрольной группе животных. При введении L-норвалина внутривенно (в/в) в дозах 20, 100 и 500 мг/кг время неподвижности снизилось до 146, 107 и 96 секунд, соответственно (фиг.1).

В отдельном эксперименте DFMO (400 мг/кг, в/в) снизил время неподвижности с 219 секунд до 191 секунды. Более низкие дозы DFMO (10-100 мг/кг, в/в) были неэффективны.

И L-норвалин, и DFMO уменьшают время неподвижности, тем самым проявляя антидепрессант-подобный эффект.

Пример 2. Эффект L-орнитина, L-норвалина, и их комбинации в тесте принудительного плавания

В отдельном эксперименте L-орнитин (500 мг/кг) не влиял на время неподвижности (физраствор 199 секунд, L-орнитин 214 секунд. Фиг.2). Однако предварительное введение L-орнитина снизило влияние L-норвалина на время неподвижности (L-норвалин 127 секунд, L-орнитин+L-норвалин 215 секунд; $p < 0,001$ против группа L-норвалина).

Таким образом, два структурно различных ингибитора аргиназы вызвали антидепрессант-подобный эффект, что указывает на то, что обе молекулы, равно как и ингибиторы аргиназы вообще, представляют интерес как терапевтически активные средства для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Кроме того, продукт активности аргиназы L-орнитин был способен блокировать эффект L-норвалина, что дополнительно свидетельствует в пользу того, что антидепрессантный эффект исследуемых соединений зависит от ингибирования аргиназы.

Пример 3. Влияние L-орнитина, L-норвалина, и их комбинации на двигательную активность

Двигательную активность измеряли с помощью автоматизированной системы с шестью камерами (45×45×45 см) из прозрачного акрила (MOTI, Technical & Scientific Equipment GMBH, Германия; Volke V, Wegener G, Bourin M, Vasar E. Antidepressant - and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. 20 Behavioural Brain Research 2003; 140: 141-147). В камеру помещали интактных в отношении аппарата мышей и регистрировали активность в вертикальном и горизонтальном направлении в течение 10 мин.

Результаты:

Исследуемые соединения самостоятельно или в комбинации не изменяли способность животных передвигаться, что исключает возможность того, что эффекты лекарственных средств в тесте принудительного плавания были неспецифического происхождения.

Описанные выше результаты приводят к заключению, что соединения, проявляющие ингибирующую активность в отношении аргиназы, могут применяться как фармакологические средства для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Дифторметилорнитин (DFMO) проявил себя как кандидат для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. L-норвалин проявил себя как кандидат для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

Соответственно, L-норвалин, DFMO и другие ингибирующие аргиназу соединения можно рассматривать в качестве кандидатов на производство лекарств для людей для

лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Соответственно, L-норвалин, DFMO и другие ингибирующие аргиназу соединения можно рассматривать в качестве кандидатов на производство ветеринарных лекарственных средств для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

В настоящем документе раскрыт способ лечения или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний путем введения млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей соединение, проявляющее ингибирующее активность в отношении аргиназы.

Специалисту в данной области техники очевидно, что другие ингибирующие аргиназу соединения также могут быть полезными для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний. Таким образом, способ выявления соединения, подходящего для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний, содержит этап, на котором определяют, проявляет ли исследуемое соединение ингибирующую активность в отношении аргиназы, и, если упомянутое соединение ингибирует аргиназу, тогда это соединение выбирают как кандидат, подходящий для применения в качестве терапевтически активного средства для лечения и/или профилактики упомянутых болезней и/или состояний.

Специалист в данной области техники также может заключить, что набор для выбора новых соединений для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний содержит по меньшей мере средство для определения ингибирующей активности соединения в отношении аргиназы способом, известным специалисту в этой области техники. Это средство включает биохимический анализ, в котором измеряется выработка L-орнитина или мочевины, не ограничиваясь этим. Анализ выполняется *in vitro* с очищенным ферментом аргиназой в клеточной культуре или в другой модельной системе. Если обнаруживается ингибирующая активность в отношении аргиназы, то соединение отбирается для дальнейшего скрининга его свойств как кандидат лекарственного средства для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

Формула изобретения

1. Применение соединения, которое проявляет ингибирующую активность в отношении аргиназы, в качестве терапевтически активного средства для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний.

2. Применение по п.1, причем соединение является дифторметилорнитинном (DFMO).

3. Применение по п.1, причем соединение является L-норвалином.

4. Применение по любому из предыдущих пп.1-3, причем упомянутое соединение применяется в качестве терапевтически активного средства для производства фармацевтической композиции для применения к человеку.

5. Применение по любому из предыдущих пп.1-3, причем упомянутое соединение применяется в качестве терапевтически активного средства для производства фармацевтической композиции для применения в ветеринарии.

6. Фармацевтическая композиция для лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией состояний, содержащая терапевтически активное средство и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что терапевтически активное средство является соединением, которое проявляет ингибирующую активность в отношении аргиназы.

7. Способ лечения и/или профилактики депрессии и/или связанных с депрессией

состояний у млекопитающих, нуждающихся в таком лечении и/или профилактике, причем упомянутый способ содержит этап, на котором вводят упомянутому млекопитающему терапевтически эффективное количество соединения, проявляющего ингибирующую активность в отношении аргиназы.

5

8. Способ по п.7, в котором упомянутое соединение является дифформетилорнитинном (DFMO).

9. Способ по п.7, в котором упомянутое соединение является L-норвалином.

10

15

20

25

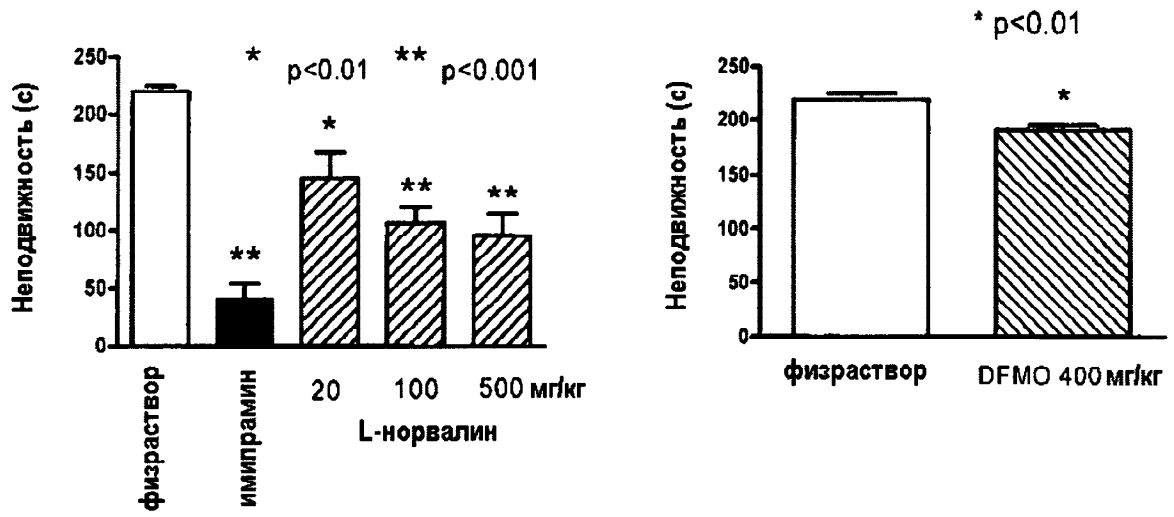
30

35

40

45

50



ФИГ. 1



ФИГ. 2