

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **203412**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **357370**

(22) Data zgłoszenia: **29.09.2000**

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:
29.09.2000, PCT/GB00/03737

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:
05.04.2001, WO01/23406
PCT Gazette nr 14/01

(51) Int.Cl.

C07J 71/00 (2006.01)

A61K 31/58 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/14 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

Opis patentowy
przedrukowano ze względu
na zauważone błędy

(54)

Zastosowanie pochodnych sapogeniny

(30) Pierwszeństwo:

29.09.1999,GB,9923076.5

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

26.07.2004 BUP 15/04

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.10.2009 WUP 10/09

(73) Uprawniony z patentu:

PHYTOPHARM PLC,Godmanchester,GB

(72) Twórca(y) wynalazku:

Paul Barraclough,Maidstone,GB

Jim Hanson,Steyning,GB

Phil Gunning,Grantchester,GB

Daryl Rees,Sandy,GB

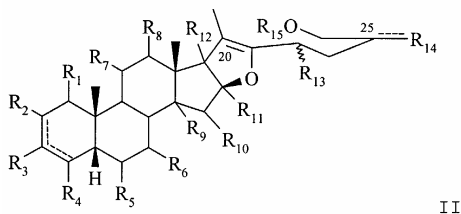
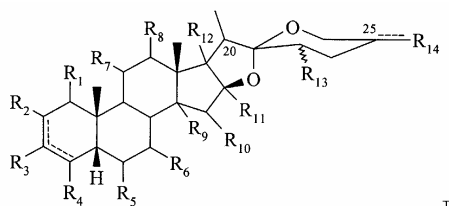
Zongqin Xia,Shanghai,CN

Yaer Hu,Shanghai,CN

(74) Pełnomocnik:

**Wojciech Tykarski, Rzecznik Patentowy,
Sulima Grabowska Sierzputowska,
Biuro Patentów i Znaków Towarowych sp.j.**

Wynalazek ujawnia zastosowanie pochodnych sapogeniny o ogólnym wzorze I lub II



oraz ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli, do wytwarzania leku do wzmacniania funkcji poznawczej lub leczenia dysfunkcji poznawczej.

PL 203412 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy zastosowania pochodnych sapogeniny.

Wynalazek zostanie opisany przede wszystkim w odniesieniu do leczenia choroby Alzheimera (AD) i otępienia starczego typu Alzheimera (SDAT), w przypadku których wykazano zubożenie w szereg typów receptorów. Jednakże należy rozumieć, że wynalazek ogólnie dotyczy leczenia stanów przypisywanych wewnętrznym stanom patologicznym i/lub działaniu niekorzystnych warunków środowiskowych, które to stany charakteryzują się niedoborem liczby lub działania receptorów związanych z błoną lub z niedoborem przekazu w połączeniach między neuronami lub w połączeniach neuronów z komórkami wykonawczymi.

Do stanów wspomnianego powyżej typu należy choroba Parkinsona, choroba rozsianych ciał Lewy'ego, podciśnienie ortostatyczne, autyzm, zespół przewlekłego zmęczenia, miastenia, choroba Lamberta i Eatona, choroby i problemy związane z zespołem Wojny w Zatoce, praca ze związkami fosforoorganicznymi i problemy związane ze starzeniem.

Choroba Alzheimera (AD) i otępienie starcze typu Alzheimera (SDAT) stanowią poważny i nasilający się problem we wszystkich społeczeństwach, w których, z uwagi na wzrost przewidywanej długości życia i zwalczanie zwykłych chorób, profil demograficzny coraz bardziej rozszerza się w kierunku starszej populacji. Pilnie poszukiwane są środki, z użyciem których można leczyć AD/SDAT lub pomagać w postępowaniu z chorymi.

Oslabienie pamięci związane z wiekiem (AAMI) jest charakterystyczne dla starszych pacjentów, którzy, będąc psychologicznie i fizycznie sprawni, cierpią z powodu utraty pamięci. Jest to słabo zdefiniowany zespół, z tym że środki skuteczne w leczeniu AD/SDAT mogą być również przydatne w przypadku tych pacjentów.

Badania AD/SDAT prowadzone są tradycyjnymi i zwykłymi metodami badań medycznych, z wykorzystaniem znanych dyscyplin. W konwencjonalnej medycynie istnieje szereg podejść do leczenia AD/SDAT. Wiadomo, że procesy biochemiczne obsługujące pamięć w korze mózgowej są (co najmniej częściowo) pośredniczone cholinergicznie. Fachowcy wiedzą, że mechanizmy „pośredniczone cholinergicznie” można bezpośrednio przypisać acetylocholinie działającej na receptory, i są to działania bezpośrednie. Inne klinicznie przydatne działania mogą być również powodowane przez modulowanie uwalniania acetylocholiny z presynaptycznych zakończeń nerwów lub przez hamowanie enzymów rozkładających acetylocholinę. Te czynniki modulujące mogą działać poprzez neurony, gdy mediator jest niecholinergiczny, co określa się jako działania pośrednie. Pewne próby leczenia skoncentrowano na roli innych mediatorów, takich jak 5-hydroksytryptamina, będąca mediatorem w innych obszarach mózgu, takich jak jądra śródmózgowia. Jednakże z uwagi na to, że włókna z tych obszarów wystają w kierunku kory mózgowej, w której podstawowym przekazywaczem jest acetylocholina, zwrócono uwagę na kierowanie tym mediatorem w poszukiwaniu odpowiednich leków.

Strategie cholinergiczne w leczeniu AD/SDAT skierowano do kilku punktów wzdłuż szlaku powstawania, uwalniania synaptycznego i usuwania uwolnionej acetylocholiny.

Jedno z podejść obejmowało leczenie dużymi dawkami lecytyny i innych prekursorów acetylocholiny. Ma to jednak ograniczone zastosowanie w osiągnięciu przedłużonej poprawy w sprawności poznawczej.

Inne podejście obejmowało stosowanie leków roślinnych, takich jak ekstrakt z korzeni *Polygalae*, który, jak to wykazano, wzmacnia aktywność transferazy cholinowo-acetylocholinowej (CAT) i wydzielanie czynnika wzrostu nerwów (NGF) w mózgu. Doustne podawanie NGF nie wywiera wpływu na neurony ośrodkowego układu nerwowego (OUN), gdyż jest to białko o wysokiej masie cząsteczkowej, które nie może przekroczyć bariery krew-mózg. Jednak do poprawy zachowania związanego z pamięcią zaproponowano środki, które mogą przejść przez barierę krew-mózg i wykazują pobudzające działanie na syntezę NGF w ośrodkowym układzie nerwowym.

Wyniki trzeciego podejścia klinicznego, zgodnie z którym zastosowano inhibitory cholinesterazy, takie jak chlorowodorek takryny, były jedynie minimalnie lepsze niż w podejściach opisanych powyżej. Wykazano, że substancje otrzymane z roślin stosowanych w chińskiej i zachodniej medycynie, np. huperzyna, galantamina i fizostygmina, przynoszą pewną, choć ograniczoną, poprawę w leczeniu AD/SDAT w badaniach klinicznych oraz na modelach laboratoryjnych. Wszystkie te substancje są inhibitorami esterazy acetylocholinowej (AChE). U pacjentów z AD/SDAT może występować zmniejszona synteza acetylocholiny (ACh), zmniejszona skuteczność uwalniania ACh z zapasów presynaptycznych, oraz zmniejszona liczba receptorów postsynaptycznych (M_1) lub ich

działanie. Stwierdzono również zmniejszenie działania presynaptycznych receptorów M_2 . Korzystne działanie inhibitorów AChE przypisuje się zwiększeniu poziomów acetylocholiny w synapsach w mózgu, poprzez spowolnienie rozkładu uwolnionego przekąźnika.

Wiadomo, że środki, które modulują działanie cholinergiczne, wpływają na pamięć i przypominanie. Przykładowo nikotyna pobudza nikotynowe receptory acetylocholinowe i uważa się, że działanie wzmacniające świeżą pamięć związane z paleniem papierosów jest wywołane działaniem nikotyny. Skopolamina, antagonistka acetylocholiny, będzie powodować amnezję i pogorszenie działania poznawczego, objawiające się w testach psychomotorycznych wydłużeniem czasu prostej reakcji, prawdopodobnie w wyniku pogorszenia uwagi, i jest stosowana w tym celu we wspomagającej terapii przeciwbólowej. Amnetyczne działanie skopolaminy można antagonizować nikotyną.

Istnieją dwie grupy podtypów receptorów nikotynowych (α i β), z których każda składa się z 4 podgrup, które różnią się specyficznością względem ligandów. Rola receptorów nikotynowych w OUN nie jest w pełni zrozumiała na poziomie cząsteczkowym. Być może środki wiążące się z receptorami nikotynowymi mogą modyfikować szybkość obrotu metabolicznego w miejscach receptorów muskarynowych w mózgu. Receptory nikotynowe są bramkowanymi przez ligand kanałami jonowymi i ich uaktywnienie powoduje szybki (w ciągu milisekund) wzrost przepuszczalności komórek w stosunku do Na^+ i Ca^{++} , depolaryzację i pobudzenie.

Inna klasa receptorów cholinergicznych może być pobudzana przez muskarynę. Takie receptory muskarynowe (M) są receptorami sprzężonymi z białkiem G. Odpowiedzi receptorów muskarynowych są wolniejsze; mogą być one pobudzające lub hamujące. Nie muszą być one związane ze zmianami w przepuszczalności jonów. Na drodze klonowania receptora cholinergicznego wykryto 5 typów receptorów muskarynowych, i oznaczono je jako m_1 - m_5 . Działanie farmakologiczne jest związane z czterema sklonowanymi receptorami, które oznaczono jako M_1 - M_4 w oparciu o specyficzność farmakologiczną.

Z użyciem określonych białek receptorowych i monoklonalnych przeciwciał, możliwe było dokładniejsze zlokalizowanie receptorów muskarynowych w mózgu jako m_1 (postsynaptyczne) i m_2 (presynaptyczne). W sercu receptory M_2 są postsynaptyczne. Presynaptyczne receptory muskarynowe uważane są za hamujące, a wiązanie ACh z tymi receptorami spowalnia dalsze uwalnianie ACh, tak że uwalnianie ACh zachodzi według mechanizmu z ujemnym sprzężeniem zwrotnym. W związku z tym selektywne substancje antagonistyczne receptora M_2 , preferencyjnie doprowadzane do mózgu, mogą być przydatne w leczeniu choroby Alzheimera.

Wiadomo, że w stanach chorobowych, takich jak AD/SDAT, następuje ogólny ubytek neuronów i ograniczenie cholinergicznego działania nerwu. Przypuszczano, że miejsca wiązania o wysokim powinowactwie nikotynowym w pozostałych neuronach cholinergicznym mogą zmienić się w miejsca wiązania o niskim powinowactwie podczas leczenia takich chorób, wskutek czego nastąpi opóźnienie uwalniania przekąźnika. Poprzez obniżenie powinowactwa nikotynowych miejsc wiązania, uniknąć można procesu szybkiego zmniejszania czułości.

Uaktywnienie agonistów przy receptorach nikotynowych w mózgu szybko włącza się i wyłącza. Zmniejszone powinowactwo receptorów nikotynowych będzie osłabiać proces zmniejszania czułości. Schwarz R. D. i inni (*J. Neuro Chem* 42, (1984), 1495-8) wykazali, że miejsca wiązania nikotyny są presynaptycznie zlokalizowane na cholinergicznym (a także 5-hydroksytryptaminergicznym i katecholaminergicznym) końcówkach aksonów. Zmiana w miejscach o wysokim powinowactwie w AD/SDAT może również wywoływać zmianę w modulującym działaniu, jakie nikotynowe miejsca wiązania mogą wywierać na inne układy przekąźników.

Presynaptyczne mechanizmy cholinergiczne są również pod hamującą kontrolą neuronów GABAergicznym i sądzi się, że to hamowanie nasila się w AD/SDAT. Wyeliminowanie lub osłabienie tego hamowania zwiększa presynaptyczną korową aktywność cholinergiczną i wzmacnia procesy pamięciowe.

Oddziaływania włókien międzyneuralnych uaktywniane do przesyłania impulsów przez nikotynę (zmniejszającą powinowactwo wiązania) oraz znoszenie hamowania włókien GABAergicznym mają lokalizację presynaptyczną.

Jest to uproszczony model przekazu ośrodkowego, z tym że dostarcza on podstawy do zrozumienia wysiłków podjętych w celu skutecznego zwiększenia stężenia acetylocholiny w synapsach ośrodkowych. Jeszcze dobitniej ilustruje to koncepcję bezpośredniego i pośredniego działania. Istnieją wady trzech wspomnianych powyżej znanych terapeutycznych podejść do leczenia AD/SDAT: uzupełniającego podawania prekursora ACh, zastępowania agonisty i hamowania esterazy acetylocholinowej.

Takie sposoby leczenia mogą doprowadzić do krótkotrwałego zwiększenia dostępności ACh, co może uaktywnić mechanizmy ze sprzężeniem zwrotnym powodujące zmniejszenie czułości receptorów postsynaptycznych. W oparciu o podstawy teoretyczne nie można przewidywać długotrwałych korzyści, a po przerwaniu terapii korzyści związane z kontrolowaniem AD/SDAT i AAMI zanikają i stan może nawet ulec pogorszeniu.

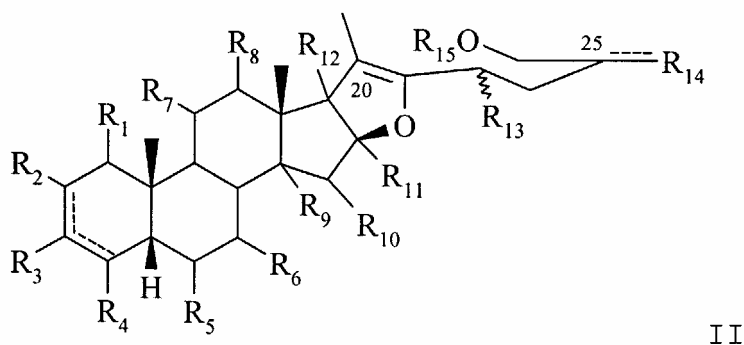
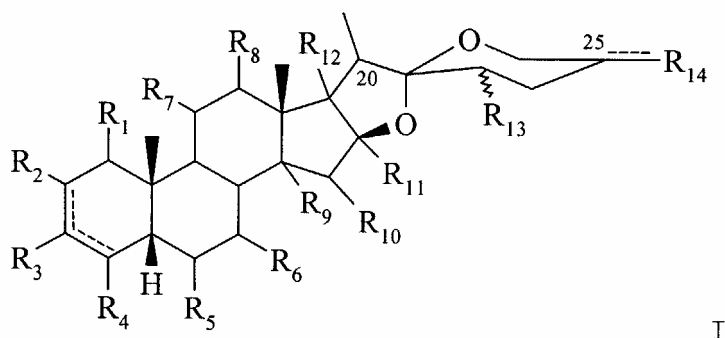
Wykazano, że związek o działaniu agonisty M_1 i antagonisty M_2/M_3 poprawia sprawność pamięciową pacjentów z SDAT (Sramak i inni, *Life Sciences* tom 2, nr 3, 195-202, 1997). Jednakże związek ten wywołuje niedopuszczalne cholinergiczne skutki uboczne, takie jak zmęczenie, biegunka i mdłości.

W bardziej radykalnym podejściu do AD/SDAT i AAMI celem jest zwiększenie liczby receptorów postsynaptycznych (M_1) w mózgu. Z chińskiego opisu patentowego nr CN1096031A wiadomo, że sarsasapogenina (SaG) może dodatnio regulować cholinergiczne receptory M_1 .

Opublikowano zgłoszenia patentowe, w których zastrzeżono przydatność szeregu steroidowych sapogenin o strukturze spirostanu, furospirostanu, spirostanu lub solanidyny, w leczeniu chorób. Szczególne znaczenie mają w tym aspekcie dwie publikacje patentowe: chiński opis patentowy nr CN1096031A ujawnia dwukierunkowe działanie regulacyjne sapogeniny spirostanowej, sarsasapogeniny, na receptory β -adrenergiczne i M-cholinergiczne. Jednakże ujawnienie w tym dokumencie jest lakoniczne. Drugim znaczącym dokumentem jest publikacja patentowa DE 4303214A1, w której zastrzeżono zastosowanie wielu różnych saponin i sapogenin w leczeniu wielu różnych chorób, które twórcy uważają za choroby o podłożu wirusowym. Ujawnienie to ma jednak wątpliwą wartość, gdyż dobrze wiadomo, że nie ma żadnego składnika zakaźnego w bardzo dużej liczbie stanów charakteryzujących się zubożonym przekazem synaptycznym i w związku z tym podstawowa przesłanka powołanego wynalazku obciążona jest wadami. Na dodatek nie podano tam żadnych danych, które mogłyby pomóc fachowcowi wybrać korzystny związek spośród wielkiej liczby zastrzeżonych związków.

Wynalazcy stwierdzili, że pewne pochodne sapogenin wykazują zdolność regulowania receptorów. W szczególności stwierdzono, że związki te zwiększają liczbę receptorów M_2 w mózgu.

Wynalazek dotyczy zastosowania pochodnych sapogeniny o ogólnym wzorze I lub II:



oraz ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli, gdzie w ogólnym wzorze (I) R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil,

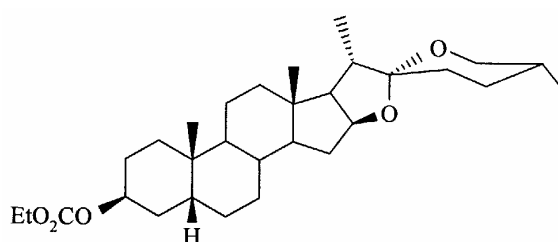
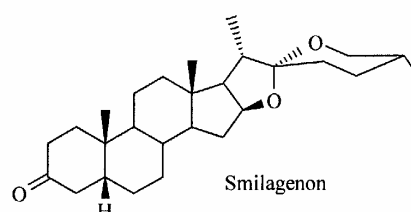
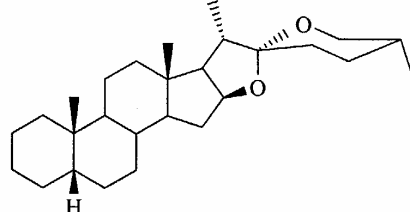
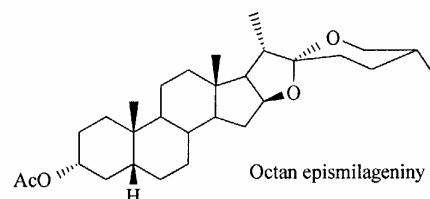
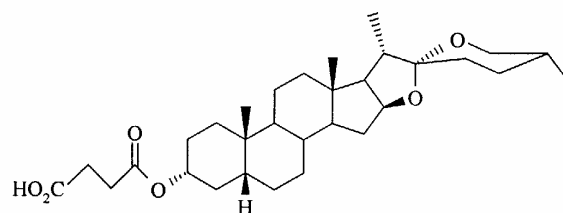
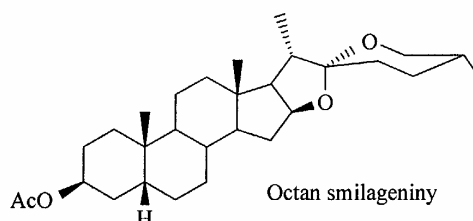
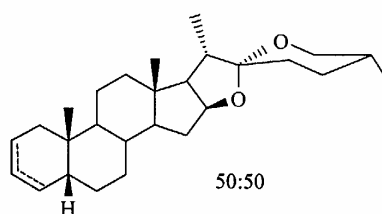
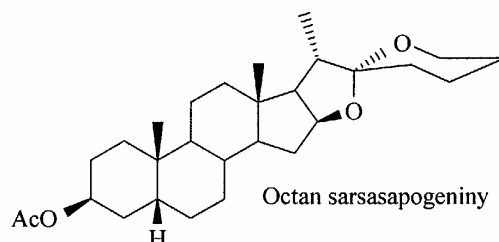
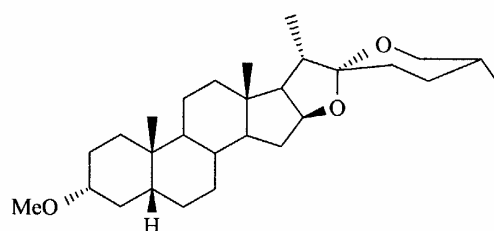
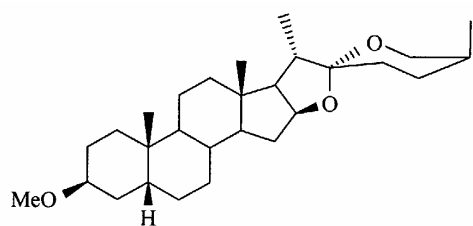
ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_3 oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_9 , R_{12} , R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil, --- oznacza ewentualne wiązanie podwójne, a w ogólnym wzorze (II) R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_3 niezależnie oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_9 , R_{12} , R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil; R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a --- oznacza ewentualne wiązanie podwójne, do wytwarzania leku do wzmacniania funkcji poznawczej lub leczenia dysfunkcji poznawczej.

Korzystnie w związku o ogólnym wzorze (I) R_4 , R_9 , R_{12} i R_{13} oznaczają H; R_1 , R_2 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_3 niezależnie oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil, a --- oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

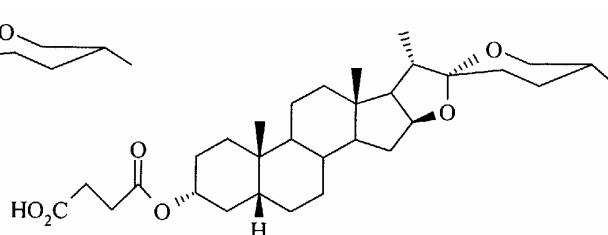
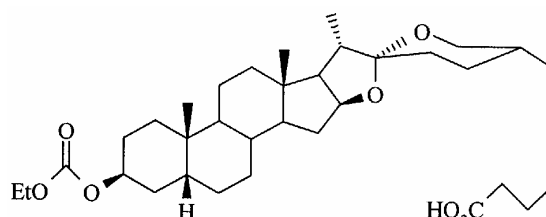
Korzystniej w związku o ogólnym wzorze (I) R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_{10} , R_{11} , R_9 , R_{12} i R_{13} oznaczają H, R_3 oznacza H, -OH, -OMe, -OCOCH₃, =O, -O-CO₂Et lub -O-CO-(CH₂)₂-CO₂H; R_{14} = CH₃.

Także korzystnie w związku o ogólnym wzorze (II) R_4 , R_9 , R_{12} i R_{13} oznaczają H; R_1 , R_2 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_3 oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, karbamoil lub alkoksycarbonyl; R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil; R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a --- oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

Szczególnie korzystnie związek wybiera się spośród:



a najkorzystniej związek wybiera się spośród:



Korzystnie lek stosuje się do wzmacniania funkcji poznawczej u pacjenta cierpiącego na dysfunkcję poznawczą związaną z wiekiem, a korzystniej do leczenia choroby wybranej spośród choroby Alzheimera, otępienia starczego typu Alzheimera, choroby Parkinsona, choroby rozsianych ciał Lewy'ego, podciśnienia ortostatycznego, autyzmu, zespołu przewlekłego zmęczenia, miastonii, choroby Lamberta i Eatona, chorób i problemów związanych z zespołem Wojny w Zatoce, pracy ze związkami fosforoorganicznymi i problemów związanych ze starzeniem.

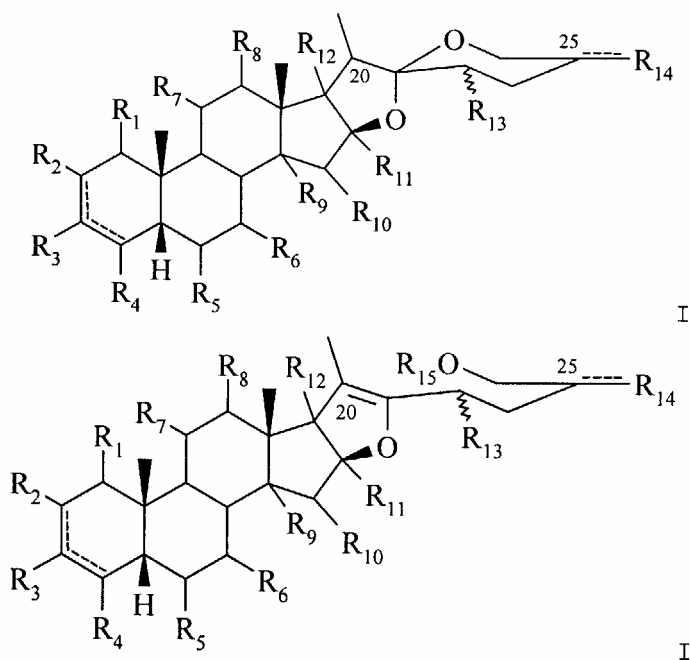
Jeszcze korzystniej lek stosuje się do leczenia choroby wybranej spośród choroby Alzheimera lub otępienia starczego typu Alzheimera.

Fachowcy powinni zdawać sobie sprawę z zależności między saponinami i odpowiadającymi im sapogeninami, oraz że te ostatnie są rozpuszczalne w tłuszczach, podczas gdy saponiny są raczej rozpuszczalne w wodzie. Z tego względu sapogeniny mogą łatwiej przekraczać barierę krew-mózg. Fachowcy powinni również zdawać sobie sprawę, że pewne sapogeniny mogą ulegać epimeryzacji w warunkach hydrolizy kwasowej.

Zmienność właściwości farmakologicznych i działania farmakodynamicznego różnych typów sapogenin leży u podstaw konieczności wyboru środków najbardziej przydatnych w leczeniu AD/SDAT. Odkrycie nowych faktów odnośnie działania pochodnych sapogeniny umożliwiło ustalenie, które substancje są najbardziej przydatne w leczeniu AD/SDAT i podobnych stanów.

Stwierdzono, że wyżej opisane właściwości wykazują pochodne sapogeniny, w których konformacja pierścieni A/B w układzie skondensowanych pierścieni jest cis.

Zatem znaczenie z punktu widzenia wynalazku mają pochodne sapogeniny określone następującymi wzorami ogólnymi (I) lub (II):



oraz ich stereoizomery i mieszaniny racemiczne, a także ich farmaceutycznie dopuszczalne proleki i sole.

We wzorze ogólnym (I):

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_9, R_{12}, R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil,

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne,

ale z wyłączeniem przypadku, gdy równocześnie:

$R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = R_{10} = R_{11} = R_9 = R_{12} = R_{13} = H,$

$R_3 = \beta OH,$

$R_{14} = \text{CH}_3$

grupa metylowa przy C22 ma konfigurację α ,
przy C20 występuje konfiguracja α , a przy C25 występuje konfiguracja S.

Korzystnie w ogólnym wzorze (I):

R_4, R_9, R_{12} i R_{13} oznaczają H,

$R_1, R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil, a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne, ale z wyłączeniem przypadku, gdy równocześnie:

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{10}, R_{11}, R_9, R_{12}$ i R_{13} oznaczają H,

R_3 oznacza βOH ,

R_{14} oznacza CH_3

grupa metylowa przy C22 ma konfigurację α ,

przy C20 występuje konfiguracja α , a przy C25 występuje konfiguracja S.

Korzystniej w ogólnym wzorze (I):

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{10}, R_{11}, R_9, R_{12}$ i R_{13} oznaczają H,

R_3 oznacza H, -OH, -OMe, -OCOCH₃, =O, -O-CO-OEt lub -O-CO-(CH₂)₂CO₂H,

R_{14} oznacza CH_3

ale z wyłączeniem przypadku, gdy równocześnie:

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{10}, R_{11}, R_9, R_{12}$ i R_{13} oznaczają H,

R_3 oznacza βOH ,

R_{14} oznacza CH_3 ,

przy C25 występuje konfiguracja S,

przy C20 występuje konfiguracja α , a grupa metylowa przy C22 ma konfigurację α .

We wzorze ogólnym (II):

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_9, R_{12}, R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil;

R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

Korzystnie w ogólnym wzorze (II):

R_4, R_9, R_{12} i R_{13} oznaczają H

$R_1, R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

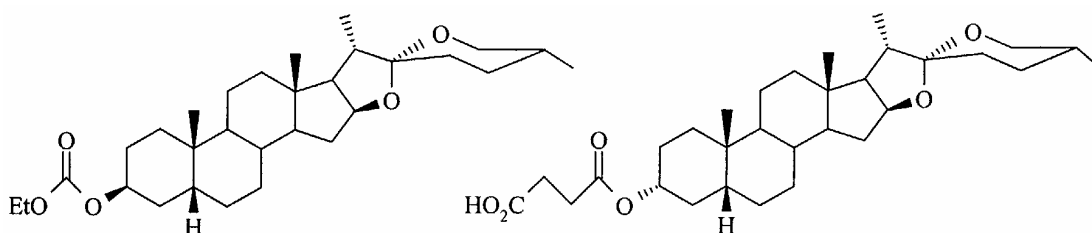
R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil

R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

Szczególnie korzystne są następujące związki:



W znaczeniu użytym powyżej i poniżej:

„Acył” oznacza grupę H-CO- lub alkil-CO-, w której alkil ma podane znaczenie. Korzystne acyle zawierają niższy alkil. Do przykładowych grup acylowych należy formyl, acetyl, propanoil, 2-metylopropanoil, butanoil i palmitoil.

„Alkil” oznacza alifatyczną grupę węglowodorową, która może być prosta lub rozgałęziona, zawierającą około 1-20 atomów węgla w łańcuchu. Korzystne grupy alkilowe zawierają od 1 do około 12 atomów węgla w łańcuchu. Rozgałęziony oznacza, że jeden lub większa liczba niższych alkili, takich jak metyl, etyl lub propyl, przyłączonych jest do liniowego łańcucha alkilowego. „Niższy alkil” zawiera około 1-4 atomy węgla w łańcuchu, który może być prosty lub rozgałęziony. Do przykładowych alkili należy metyl, etyl, n-propyl, i-propyl, n-butyl, t-butyl, n-pentyl, 3-pentyl.

„Ewentualnie podstawiony” oznacza, że grupa może być podstawiona jednym lub większą liczbą podstawników, które mogą być takie same lub różne, wybranych z grupy obejmującej atom chlorowca, alkil, cykloalkil, hydroksyl, alkoksyl, grupę aminową, grupę acyloaminową, aryl, grupę aroiloaminową, karboksyl, alkoksykarbonyl, aralkoksykarbonyl, heteroaralkoksykarbonyl, ewentualnie podstawiony karbamoil.

Określenie „środek farmaceutyczny” oznacza środek zawierający związek o wzorze I lub II i co najmniej jeden składnik wybrany z grupy obejmującej farmaceutycznie dopuszczalne nośniki, rozcieńczalniki, środki pomocnicze, zaróbki lub rozczynniki, takie jak środki konserwujące, wypełniacze, środki rozsadzające, środki zwilżające, środki emulgujące, środki suspendujące, środki słodzące, środki aromatyzujące, środki zapachowe, środki przeciwbakteryjne, środki przeciwwgrzybicze, środki poślizgowe i środki dyspergujące, w zależności od charakteru trybu podawania i postaci dawkowanych.

„Farmaceutycznie dopuszczalny” oznacza, w zakresie rzetelnej wiedzy medycznej, przydatny do stosowania w kontakcie z komórkami ludzi i niższych istot żywych, bez niepożądanego toksyczności, podrażnienia, odpowiedzi alergicznej itp., przy uwzględnieniu rozsądnego stosunku korzyści do ryzyka.

„Farmaceutycznie dopuszczalne postacie dawkowane” oznaczają postacie dawkowane związku według wynalazku, i obejmują np. tabletki, drażetki, proszki, eliksiry, syropy, ciekłe preparaty, w tym suspensje, spreje, tabletki do inhalatorów, pastylki, emulsje, roztwory, granulaty, kapsułki i czopki, a także ciekłe preparaty do iniekcji, w tym preparaty liposomowe. Sposoby i receptury można znaleźć w *Remington, Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, najnowsze wydanie.

W użytym znaczeniu określenie „farmaceutycznie dopuszczalne proleki” oznacza te proleki związków przydatnych według wynalazku, które są, w zakresie rzetelnej wiedzy medycznej, odpowiednie do stosowania w kontakcie z tkankami ludzi i niższych istot żywych, bez niepożądanego toksyczności, podrażnienia, odpowiedzi alergicznej itp., przy uwzględnieniu rozsądnego stosunku korzyści do ryzyka, oraz skuteczne w przewidywanym zastosowaniu, a także, gdy jest to możliwe, postacie amfoteryczne związków według wynalazku. Określenie „prolek” oznacza związek, który ulega łatwo przemianie *in vivo* z wytworzeniem macierzystego związku o powyższym wzorze, np. na drodze hydrolizy w krwi. Grupy funkcyjne, które mogą łatwo ulec przemianie, na drodze metabolicznego rozszczepiania *in vivo*, stanowią klasę grup reagujących z grupą karboksylową związków według wynalazku. Z uwagi na łatwość, z jaką metabolicznie rozszczepialne grupy w związkach przydatnych według wynalazku ulegają rozszczepianiu *in vivo*, związki zawierające takie grupy działają jako proleki. Szczegółowe omówienie proleków dostarczają następujące publikacje: *Design of Prodrugs*, H. Bundgaard, red., Elsevier, 1985; *Methods in Enzymology*, K. Widder i inni, red., Academic Press, 42, str. 309-396, 1985; *A Textbook of Drug Design and Development*, Krogsaard-Larsen i H. Bundgaard, red., rozdział 5; *Design and Applications of Prodrugs*, str. 113-191, 1991; *Advanced Drug Delivery Reviews*, H. Bundgaard, 8, str. 1-38, 1992; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77, str. 285, 1988; *Chem. Pharm. Bull.*, N. Nakaya i inni, 32, p. 692, 1984; *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, T. Higuchi i V. Stella, tom 14 *A.C.S. Symposium Series*, oraz *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Edward B. Roche, red., American Pharmaceutical Association i Pergamon Press, 1987, które wprowadza się jako źródła literaturowe.

Określenie „farmaceutycznie dopuszczalne sole” oznacza stosunkowo nietoksyczne, nieorganiczne i organiczne sole addycyjne z kwasami, oraz sole addycyjne z zasadami związków według wynalazku. Sole można wytwarzać *in situ* podczas końcowego wydzielania i oczyszczania związków. W szczególności sole addycyjne z kwasami można wytwarzać przez poddanie oczyszczonego związku w postaci wolnej zasady oddzielnej reakcji z kwasem organicznym lub nieorganicznym, oraz wydzielenie powstałej w ten sposób soli. Patrz np. S. M. Berge i inni, *Pharmaceutical Salts*, *J. Pharm. Sci.*, 66: str. 1-19 (1977), publikacja, którą wprowadza się jako źródło literaturowe. Sole addycyjne z zasadami można również wytwarzać przez poddanie oczyszczonego związku w postaci wolnego

kwasu oddzielnej reakcji z odpowiednią organiczną lub nieorganiczną zasadą, oraz wydzielenie powstałej w ten sposób soli. Do soli addycyjnych z zasadami należą farmaceutycznie dopuszczalne sole z metalami i aminami.

Pewne pochodne sapogeniny interesujące z punktu widzenia wynalazku mogą występować w postaci naturalnej w różnych gatunkach roślin, zwłaszcza z rodzajów *Smilax*, *Asparagus*, *Anemarrhena*, *Yucca* i *Agave*. Do obecnie najbardziej interesujących gatunków należą: *Smilax regelii* Kilip & Morton - powszechnie znana jako sarsaparilla hondurańska; *Smilax aristolochiaefolia* Miller - powszechnie znana jako sarsaparilla meksykańska; *Smilax ornata* Hooker - powszechnie znana jako sarsaparilla jamajska; *Smilax aspera* - powszechnie znana jako sarsaparilla hiszpańska; *Smilax glabra* Roxburgh; *Smilax febrifuga* - Kunth - powszechnie znana jako sarsaparilla ekwadorska lub peruwiańska; *Anemarrhena asphodeloides* Bunge; *Yucca schidigera* Roezl ex Orteies; i *Yucca brevifolia* Engelm. Interesujące pochodne sapogeniny mogą również występować w przyrodzie w innych rodzajach roślin, np. *Dioscorea*, *Trillium*, *Solanum*, *Strophanthus*, *Digitalis* i *Trigonella*. Jednakże pewne pochodne sapogeniny z tych źródeł mają niepożądane właściwości i w związku z tym nie są zalecane do stosowania zgodnie z wynalazkiem.

Pochodne sapogeniny według wynalazku mogą być również dostępne w handlu; do dostawców, dobrze znanych fachowcom, należą Sigma Aldrich, Research Plus Inc., Steraloids Inc., itp.

Podstawione sapogeniny stosowane według wynalazku można wytwarzać na drodze syntezy. Można je np. wytwarzać z niepodstawionych pochodnych sapogeniny, które mogą występować w przyrodzie lub są dostępne w handlu, jak to zaznaczono powyżej.

Jeśli wychodzi się z niepodstawionych sapogenin, reakcja może obejmować co najmniej jeden etap podstawiania, w którym pochodną sapogeniny podstawia się grupą funkcyjną; zazwyczaj substancję wyjściową stanowi niepodstawiona sapogenina o wymaganej stereochemii, i reakcja może obejmować podstawienie jednej grupy OH żadaną grupą funkcyjną; smilagenina i epismilagenina są korzystnymi substancjami wyjściowymi.

Użyteczne związki można wytwarzać z zastosowaniem lub dostosowaniem znanych sposobów, czyli sposobów stosowanych dotychczas lub opisanych w literaturze, np. opisanych w podręczniku R. C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, 1989.

W opisanych poniżej reakcjach konieczne może być zabezpieczanie reaktywnych grup funkcyjnych, np. grup hydroksylowych lub karboksylowych, gdy są one pożądane w produkcie końcowym, aby uniknąć ich niepożądanego udziału w reakcjach. Stosować można zwykle grupy zabezpieczające, zgodnie ze znaną praktyką; patrz np. T.W. Green i P.G.M. Wuts, „*Protective Groups in Organic Chemistry*” John Wiley and Sons, 1991; J.F.W. McOmie, „*Protective Groups in Organic Chemistry*” Plenum Press, 1973.

Otrzymane w ten sposób związki można wydzielić z mieszaniny reakcyjnej znanymi sposobami. Związki można np. odzyskać przez odparowanie rozpuszczalnika z mieszaniny reakcyjnej lub, w razie potrzeby, po odparowaniu rozpuszczalnika z mieszaniny reakcyjnej, wylanie pozostałości do wody, a następnie ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym nie mieszającym się z wodą, oraz oddestylowanie rozpuszczalnika z ekstraktu. W razie potrzeby produkt można dodatkowo dalej oczyszczać różnymi, dobrze znanymi sposobami, takimi jak rekrytalizacja, powtarzane wytrącanie lub różne techniki chromatograficzne, a zwłaszcza chromatografia kolumnowa lub preparatywna chromatografia cienkowarstwowa.

Środek farmaceutyczny o działaniu wzmacniającym funkcje poznawcze zawiera skuteczną ilość pochodnej sapogeniny.

Pochodne sapogeniny według wynalazku są steroidalne; korzystnie nie wykazują one działania estrogenowego.

Środek farmaceutyczny o działaniu wzmacniającym funkcje poznawcze zawiera skuteczną ilość pochodnej sapogeniny w postaci ekstraktu pochodzącego z rośliny z rodzaju *Smilax*, *Asparagus*, *Anemarrhena*, *Yucca* lub *Agave*.

Sposób wzmacniania funkcji poznawczych polega na podawaniu człowiekowi lub innej istocie skutecznej dawki środka.

Sposób wzmacniania funkcji poznawczych u człowieka lub innych istot żywych polega na podawaniu człowiekowi lub innej istocie żywej skutecznej dawki pochodnych sapogeniny. Możliwe jest zastosowanie pochodnych sapogeniny w produktach lub napojach spożywczych, do wzmacniania funkcji poznawczych.

W użytym znaczeniu określenie „funkcja poznawcza” odnosi się do działań, takich jak myślenie, rozumienie, zapamiętywanie, wyobrażanie i uczenie się.

W kolejnej postaci wynalazek dotyczy środka o działaniu wzmacniającym funkcje poznawcze, zawierającego co najmniej dwie, korzystnie dwie, pochodne sapogeniny według wynalazku.

Przy identyfikacji związków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu SDAT i innych chorób charakteryzujących się zmniejszeniem liczby receptorów lub osłabieniem przekazu synaptycznego, rozważono konieczność identyfikacji związków, które wykazują żądane działanie, ale są pozbawione działania estrogenowego, gdyż związki te mogłyby być niedopuszczalne, zwłaszcza u osobników płci męskiej. Szereg związków zastrzeżonych jako aktywne w zgłoszeniu patentowym DE 4303214A1 wykazuje znaczące działanie estrogenowe i są one w związku z tym niedopuszczalne. Jednakże korzystnie pochodne sapogeniny według wynalazku nie wykazują działania estrogenowego. Zbadano ponadto działanie tych związków w odniesieniu do innych receptorów steroidowych i stwierdzono, że nie wykazują one aktywności w stosunku do następujących receptorów:

progesteronu
glukokortykoidu
testosteronu

Pochodne sapogeniny według wynalazku zbadano również pod względem działania w szeregu testach *in vitro*. Próby/doświadczenia, które uznano za mające kluczowe znaczenie w ustaleniu ewentualnej aktywności w podwyższaniu liczby receptorów związanych z błoną, były następujące:

Komórki jajnika chomika chińskiego (CHO) transfekowano fragmentem DNA kodującym receptor muskarynowy. Jako linię komórek w większości doświadczeń zastosowano linię komórek eksprymującą receptor m_2 .

Poniżej opisano sposoby przeprowadzania tych doświadczeń i otrzymane wyniki.

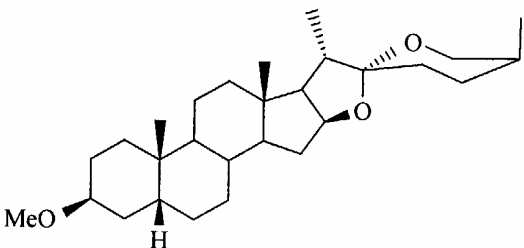
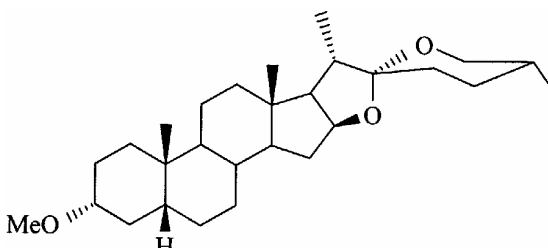
Doświadczenia z linią komórek CHO

Zbadano wpływ różnych związków na ekspresję receptorów m_2 na komórkach CHO transfekowanych DNA dla receptora m_2 . Liczbę receptorów oceniano na podstawie wiązania trytowanego QNR, z odejmowaniem wiązania nieswoistego. Związki rozpuszczano w DMSO i DMSO stosowano jako kontrolę. Związki badano w pewnym zakresie ostatecznego stężenia. Związki badano również w obecności i w nieobecności tamoksyfenu w celu próby odróżnienia mechanizmu pośredniczonego przez receptor estrogenowy.

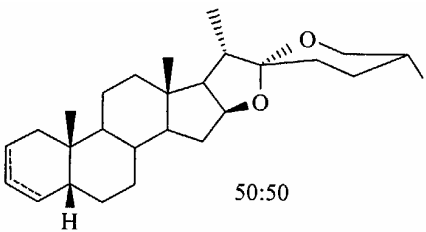
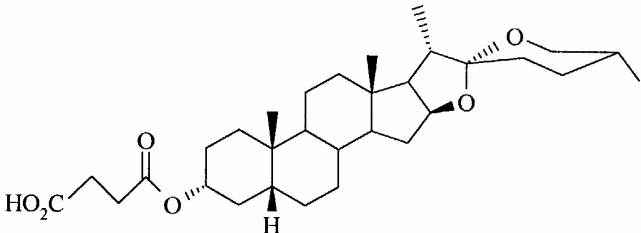
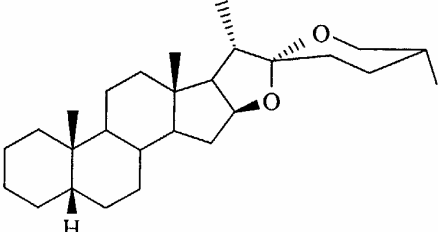
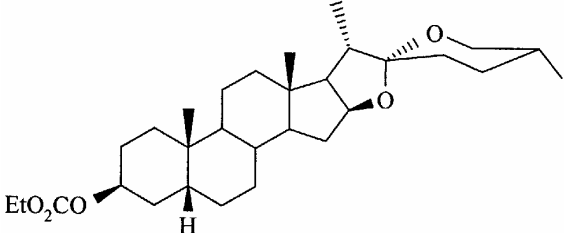
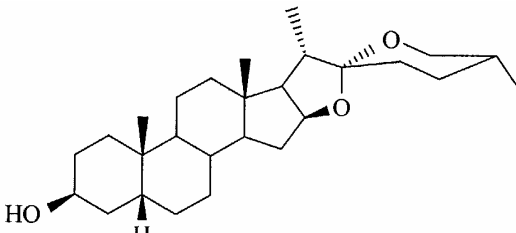
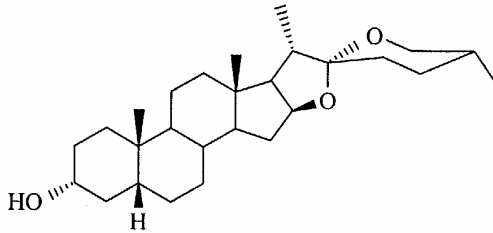
Związki są aktywne, gdy oddziaływanie na ekspresję receptora powoduje wzrost w porównaniu z kontrolą o ponad 15%.

Wyniki zestawiono poniżej w tabeli 1.

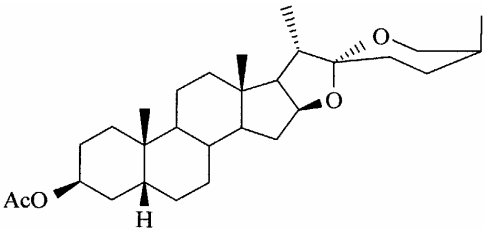
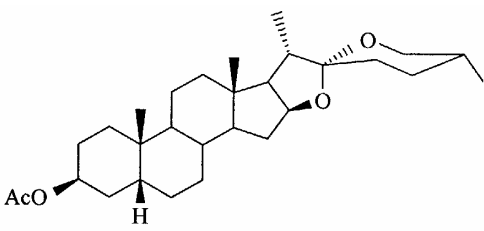
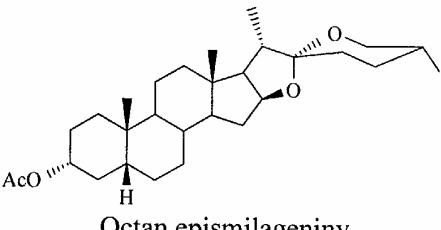
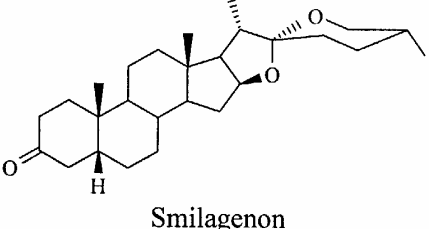
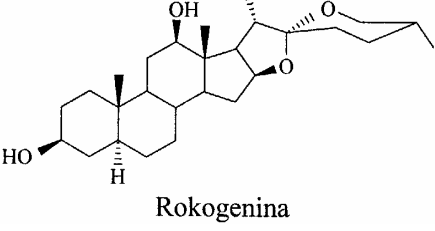
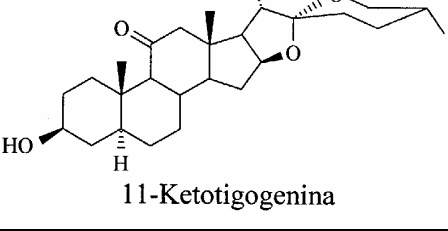
Tabela 1
Wpływ pochodnych sapogeniny na ekspresję receptorów m_2 na komórkach CHO

Związek	Stężenie molowe	Aktywność
1	2	3
	10^{-5}	aktywny
	10^{-5}	aktywny

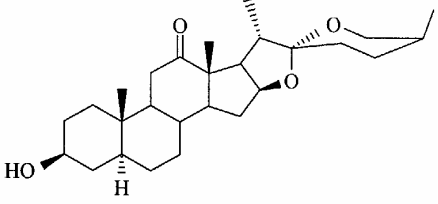
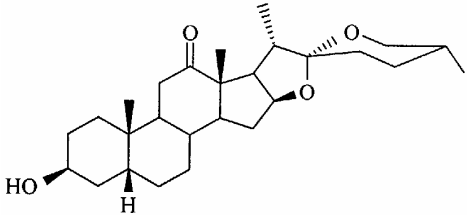
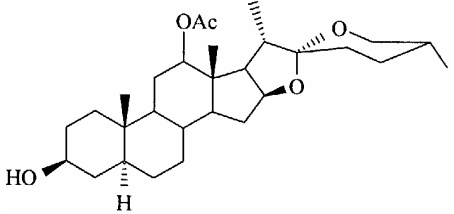
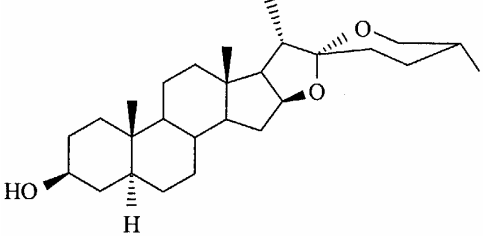
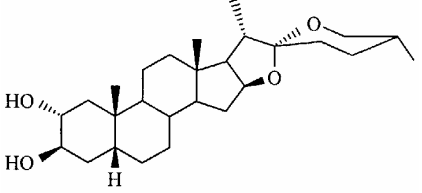
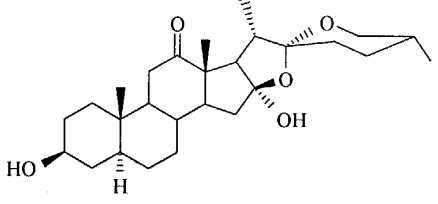
cd. tabeli 1

1	2	3
 50:50	10^{-5}	aktywny
	10^{-5}	aktywny
	10^{-5}	aktywny
	10^{-5}	aktywny
 Smilagenina	10^{-5}	aktywna
 Epismilagenina	10^{-5}	aktywna

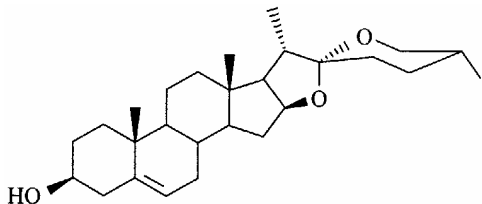
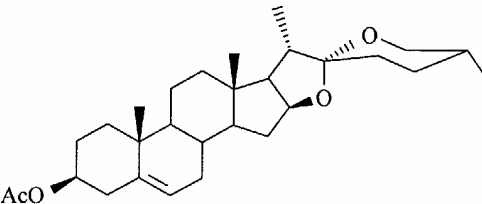
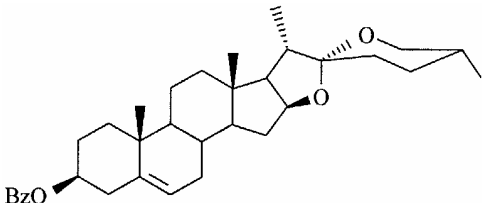
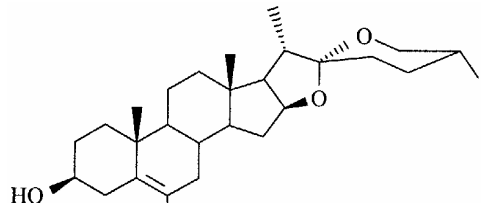
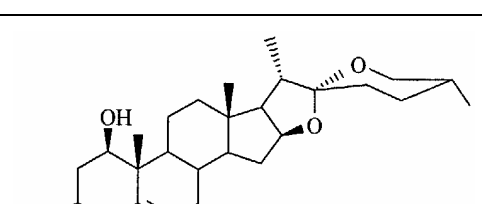
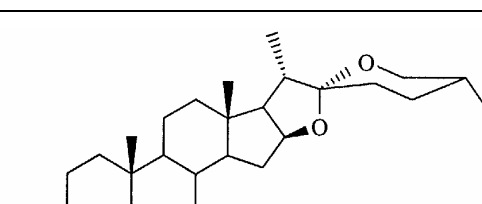
cd. tabeli 1

1	2	3
 Octan sarsasapogeniny	10^{-5}	aktywny
 Octan smilageniny	10^{-5}	aktywny
 Octan epismilageniny	10^{-5}	aktywny
 Smilagenon	10^{-5}	aktywny
 Rokogenina	10^{-5}	nieaktywna
 11-Ketotigogenina	10^{-5}	nieaktywna

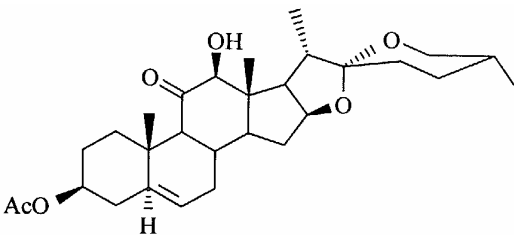
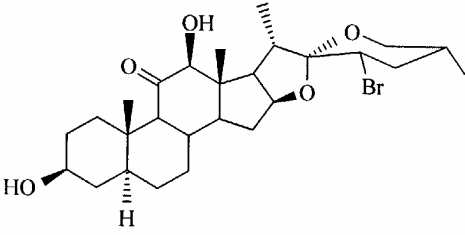
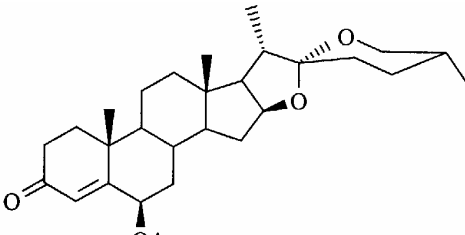
cd. tabeli 1

1	2	3
 Hekogenina	10^{-5}	nieaktywna
 Sisalagenina	10^{-5}	nieaktywna
	10^{-6}	nieaktywna
 12-Acetoksytigogenina	10^{-5}	nieaktywna
 Tigogenina	10^{-5}	nieaktywna
	10^{-6}	nieaktywna
 Gitogenina	10^{-5}	nieaktywna
 16α-Hydroksyhekogenina	10^{-5}	nieaktywna

cd. tabeli 1

1	2	3
 Diosgenina	10^{-5}	nieaktywna
 Octan diosgeniny	10^{-5}	nieaktywny
 Benzoesan diosgeniny	10^{-5}	nieaktywny
 6-Metylodiosgenina	10^{-5}	nieaktywna
 Ruskogenina	10^{-5}	nieaktywna
	10^{-6}	nieaktywna
 7-Ketodiosgenina	10^{-5}	nieaktywna

cd. tabeli 1

1	2	3
 11-Ketorokogenina	10^{-5}	nieaktywna
 23-Bromo-11-ketorokogenina	10^{-5}	nieaktywna
 6β-Acetoksytigogenon	10^{-5}	nieaktywny

Zatem doświadczenia wykazują, że pochodne sapogeniny według wynalazku były zdolne do zwiększania liczby receptorów muskarynowych ekspresjonowanych na powierzchni komórek CHO hodowanych *in vitro*. Działanie to nie było antagonizowane przez tamoksyfen, co wskazuje, że stosowany mechanizm nie obejmował receptorów estrogenowych.

Z przeprowadzonych prac doświadczalnych wynika, że związki według wynalazku działają w ten sposób, że normalizują liczbę receptorów muskarynowych - czyli zapobiegają spadkowi liczby receptorów w czasie, a także mogą powodować odtworzenie liczby receptorów do normalnych poziomów, gdy przedostaną się do komórek, w których liczba receptorów uległa zmniejszeniu.

Przypuszcza się, że aktywne związki mogą działać poprzez wpływanie na białko G, oraz że wpływ na liczbę receptorów jest wtórny w stosunku do działania na białko G. Gdy związany z błoną receptor połączony z białkiem G zostaje pobudzony, zainicjowane zostają dwa podstawowe zestawy zjawisk: odpowiedź efektorowa i internalizacja receptora. Okazuje się, że zachodząca następnie obróbka receptora do stanu, w którym jest on ponownie na powierzchni komórki lub powierzchni innej błony w postaci, w której może oddziaływać z ligandami innych receptorów, zależy od szeregu czynników. Okazało się, że szereg tych czynników lub mechanizmów związanych jest z białkiem G. Istnieją dowody na to, że uaktywnienie receptorów m_3 może wywierać wpływ na ekspresję lub poziom białka G. Przypuszcza się, że działanie opisanych związków może polegać na oddziaływaniu w procesach regeneracji receptorów, połączeniu białka G lub homeostazy białka G.

Według wariantowej hipotezy związki intensyfikują syntezę lub uwalnianie, albo zmniejszają szybkość rozkładu czynników neurotropowych, takich jak czynnik wzrostu pochodzący z mózgu i/lub czynnik wzrostu nerwów. To działanie na czynniki wzrostu może być spowodowane działaniem związku receptor cytosolyczny lub jądrowy, albo wiązaniem się związku z obszarem promotora, z wynikającym stąd bezpośrednim wpływem na szybkość wytwarzania mRNA dla czynnika wzrostu lub w wyniku

zwiększania wytwarzania innego czynnika materiałowego, takiego jak białko G, bądź też efekty końcowe mogą stanowić efekt wtórny działania na receptor lub przetwarzanie białka G.

Wzrost ekspresji i/lub nienormalne przetwarzanie prekursorowego białka amyloidu (APP) jest związany z tworzeniem się płytek amyloidowych i mózgowo-naczyniowych złogów amyloidowych, które stanowią główne morfologiczne znamiona choroby Alzheimerera. Szczególnie interesujące są procesy regulujące proteolityczne rozszczepianie APP na fragment amyloidogenowy i nieamyloidogenowy. Rozszczepianie APP przez enzym α -sekrează w sekwencji β -amyloidu białka powoduje powstanie nieamyloidogenowego fragmentu C-końcowego, oraz rozpuszczalnego fragmentu APPs α ; wykazano, że ten ostatni fragment ma działanie neurotropowe i neuroochronne, a także wzmacnia pamięć u myszy po wstrzyknięciu do komory mózgowej (ICV). Natomiast przetwarzanie APP przez β -sekrează odsłania N-końiec β -amyloidu, który uwalniany jest przez rozszczepienie γ -sekrezą zmiennego końca C. Wykazano, że powstałe peptydy β -amyloidowe, zawierające 39-43 aminokwasy, są neurotoksyczne i gromadzą się w płytkach, które zakłócają połączenia międzyneuronowe.

W szeregu badań wykazano, że połączonych z kinazą białkową (PKC) receptorów muskarynowych M₁ i M₃ powoduje wzrost aktywności α -sekrează. W wyniku tego nasila się przetwarzanie APP do APPs α z jego działaniem neuroochronnym. Równocześnie osłabia się przetwarzanie APP przez β - i γ -sekrează, a w efekcie zmniejsza się ilość β -amyloidu. Inne przekazy, takie jak czynnik wzrostu nerwów (NGF) i pochodzący z mózgu czynnik neurotrofowy (BDNF), a także bradykinina i wazopresyna mogą wywierać podobne działanie zwiększające udział przetwarzania APP do APPs α . Szereg efektorów może odgrywać rolę w działaniach NGF, które mogą obejmować wiązanie czynnika z receptorem kinazy tyrozynowej (TrkA) i pobudzanie fosfolipazy C γ , z wynikającym stąd fosforylowaniem i uaktywnianiem kinazy białkowej C (PKC) i wzrost względnej aktywności α -sekreazy.

Można w związku z tym oczekiwać, że jakiegokolwiek leczenie zwiększające selektywnie aktywność kinazy białkowej C w mózgu mogłoby być przydatne w postępowaniu w chorobie Alzheimerera. Do niedawna selektywne substancje agonistyczne receptora M₁ nie były dostępne. Można oczekiwać, że nieselektywne substancje agonistyczne będą pobudzać presynaptyczne receptory M₂, które powodują ujemne sprzężenie zwrotne i w związku z tym mogą silnie zakłócać przekaz muskarynowy. Sелеktywne substancje agonistyczne receptora M₁ stały się obecnie dostępne (talsaklidyna) i obecnie bada się przydatność takich środków w leczeniu AD. Istnieje jednak znaczne ryzyko, że z uwagi na to, iż przy długotrwałym podawaniu jakiegokolwiek agonisty receptora, obserwowane kliniczne korzyści będą silnie ograniczone w odniesieniu do zakresu korzyści, w wyniku zmniejszenia liczby receptorów lub zmniejszenia selektywności, oraz w odniesieniu do skutków ubocznych, z uwagi na brak swoistości względem receptora. W związku z tym należy oczekiwać, że związki według wynalazku, które selektywnie regulują liczbę i działanie receptorów muskarynowych, nie dostarczą problemów obserwowanych w przypadku agonistów muskarynowych i z tego względu będą szczególnie przydatne. W rzeczywistości można zaobserwować potrójną korzyść.

1. Sелеktywny wzrost liczby receptorów M₁, prowadzący do wzrostu przekazu synaptycznego. Długotrwałe podawanie selektywnego agonisty w najlepszym przypadku nie będzie wykazywać niekorzystnego wpływu na przekaz;

2. Oprócz wzrostu liczby receptorów, zwiększone pobudzanie PKC, co w konsekwencji powoduje wzrost aktywności α -sekreazy, co prowadzi do:

2.1 Zmniejszenia wytwarzania β -amyloidu i w konsekwencji zmniejszenie tworzenia się płytek i ubytku neuronów;

2.2 Wzrost APPs α i w konsekwencji poprawę działania mózgu, czego świadectwem jest poprawa pamięci świeżej i wstecznej.

Wynalazek zostanie lepiej zilustrowany przy pomocy nie ograniczającego go przykładu, z odniesieniem do załączonych rysunków i do podanego poniżej przykładu; przy czym:

Fig. 1, 2 i 3 ilustrują wyniki otrzymane w poniższym przykładzie 1,

Fig. 4 ilustruje hipotetyczny sposób działania pochodnych sapogeniny;

Na fig. 4 przedstawiono schematycznie działanie pochodnych sapogeniny stosowanych według wynalazku. Sądzi się, że pochodne sapogeniny działają przede wszystkim na jądro komórki; jednakże wynalazek nie ogranicza się do jakiegokolwiek konkretnego sposobu działania. Uważa się, że zaobserwowany wzrost liczby receptorów muskarynowych w wyniku podawania pochodnych sapogeniny prowadzi do zwiększonej ekspresji białka receptora muskarynowego. Ewentualny związek sekrează z tworzeniem się białka β -amyloidowego (opisanym powyżej) przedstawiono na rysunku.

Poniższe przykłady podano w celu zilustrowania wynalazku w nieograniczający sposób.

Przykład 1

W linii komórek CHO eksprymujących zrekombinowane ludzkie receptory muskarynowe *in vitro*, liczba receptorów muskarynowych wykazuje tendencję spadkową w czasie. Pochodne sapogeniny według wynalazku (1-10 μM) inkubowane przez 72 godziny zwiększają gęstość receptorów muskarynowych.

Metodyka:

Wpływ pochodnych sapogeniny według wynalazku na gęstość receptorów muskarynowych w komórkach CHO eksprymujących zrekombinowane ludzkie receptory muskarynowe.

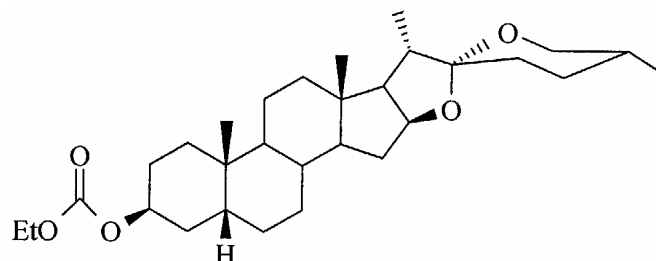
Komórki jajnika chomika chińskiego (CHO) eksprymujących w wysokim poziomie receptor (około 2,2 pmol receptora/mg białka) hodowano w kolbach (150 ml) przez 24 godziny przed rozpoczęciem doświadczenia. Nośnik (DMSO) i pochodne sapogeniny (1 i 10 μM) dodano do ośrodka na 48 godzin. Ośrodek hodowli odrzucono, komórki zdrapano i zdyspergowano w roztworze Hanksa, odwirowano i poziomy receptorów m oznaczono przez inkubowanie z [^3H]-QNB przez 30 minut, a następnie zliczanie w cieczowym liczniku scyntylicyjnym. Poziom białka oznaczano metodą mikro-Lowry'ego.

Wyniki:

Wyniki te zilustrowano na fig. 1-3. W okresie hodowli pochodne sapogeniny według wynalazku zapobiegają spadkowi liczby receptorów muskarynowych w sposób zależny od stężenia.

Przykład 2

3-O-Etoksykarbonylo-5 β ,20 α ,22 α ,25R-spirostan-3 β -ol



W trakcie mieszania do roztworu smilageniny (2,08 g, 5,0 mmoli) w bezwodnym dichlorometanie (15 ml) i bezwodnej pirydynie (1,02 g, 12,9 mmola) wdroplono chloromrówczan etylu (1,40 g, 12,9 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin, po czym rozdzielono ją pomiędzy wodę (30 ml) i dichlorometan. Fazę wodną wyekstrahowano dwukrotnie dichlorometanem, po czym połączone warstwy organiczne przemyto wodą i wysuszono nad MgSO_4 (bezwodnym). Rozpuszczalnik odparowano pod próżnią i otrzymano olej (2,1 g), który szybko skrzystalizował. Materiał ten poddano chromatografii na krzemionce (około 70 g). W wyniku eluowania mieszaniny octan etylu-heksan (1:9) i rekrytalizacji z metanolu otrzymano białe kryształy 3-O-etoksykarbonylo-5 β ,20 α ,22 α ,25R-spirostan-3 β -olu (1,08 g): temperatura topnienia 154-156°C; m/z 488 (M^+ dla $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$);

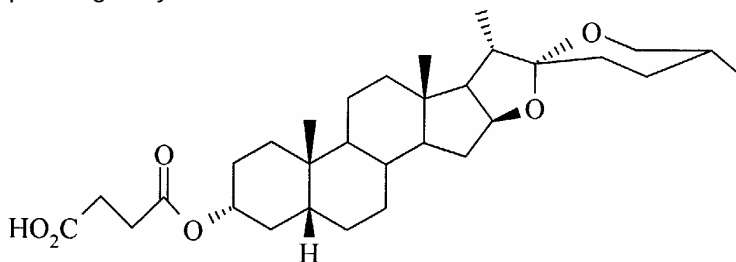
^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 0,76 (3H, s, 18- CH_3), 0,78 (3H, s, 27- CH_3), 0,95 (3H, s, 21- CH_3), 0,98 (3H, s, 19- CH_3), 1,0-2,05 (27H, złożony m, alifatyczne), 1,31 (3H, t, $J = 7$ Hz, $\text{CO}_2\text{-C-CH}_3$), 3,33-3,46 (2H, m, 26- OCH_2), 4,18 (2H, q, $J = 7$ Hz, CO_2CH_2), 4,40 (1H, m, 16- OCH), 4,95 (1H, m, H-3) ppm;

^{13}C NMR (270 MHz, CDCl_3) 14,3 ($\text{C-C-O}_2\text{C}$), 14,5, 16,5, 17,1, 20,9, 23,7, 25,0, 26,4, 28,8, 30,3, 30,6, 31,4, 31,8, 35,0, 35,3, 37,0, 40,0, 40,3, 40,7, 41,6, 56,4 (C-14), 62,3 (C-17), 63,6 ($\text{C-O}_2\text{C}$), 66,9 (C-26), 74,8 (C-3), 80,9 (C-16), 109,2 (C-22), 154,8 (karbonyl) ppm;

R_f 0,65 (krzemionka, octan etylu-heksan, 1:9)

Przykład 3

Bursztynian epismilageniny



Roztwór epismilageniny (200 mg, 0,48 mmola) i bezwodnika bursztynowego (60 mg, 0,59 mmola) w bezwodnej pirydynie mieszano przez noc w temperaturze pokojowej w atmosferze azotu. Dodano kolejną porcję bezwodnika bursztynowego (120 mg, 1,18 mmola) i mieszaninę reakcyjną mieszano przez kolejne 24 godziny. Po dodaniu kolejnej porcji bezwodnika bursztynowego (120 mg, 1,18 mmola) mieszaninę reakcyjną ogrzewano w 50°C w trakcie mieszania przez kolejne 24 godziny. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej dodano wody (10 ml) i roztwór wodny wyekstrahowano eterem dietylowym (4 x 20 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto wodą (3 x 20 ml), wysuszono (MgSO_4 , bezwodny) i przesączono. Rozpuszczalnik odparowano pod próżnią i otrzymano pomarańczowy olej (1,8 g), który poddano chromatografii na żelu krzemionkowym z użyciem mieszaniny octan etylu/eter naftowy (1:4) jako eluenta. W wyniku rekrystalizacji produktu z acetonu otrzymano białe kryształy bursztynianu epismilageniny (87 mg); temperatura topnienia 180-182°C;

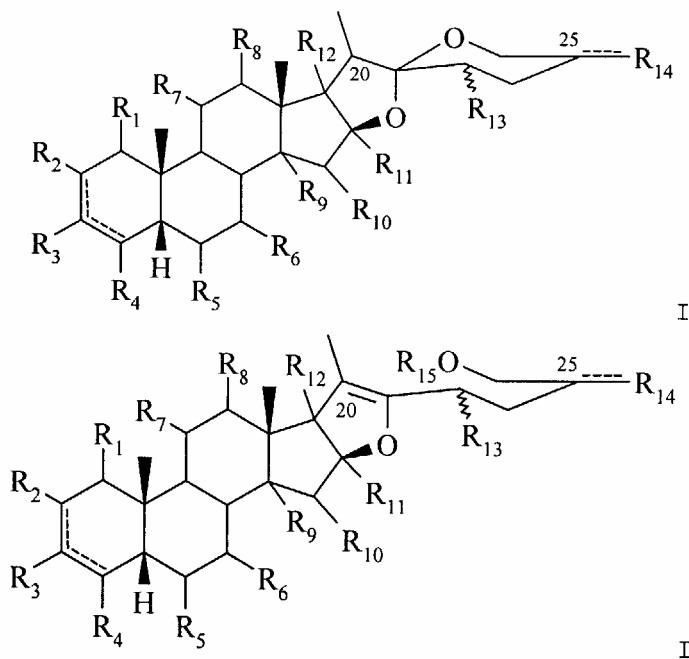
widmo ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz): dane częściowe δ 4,75 (1H, m), 4,6 (1H, m), 3,50 (1H, dd), 3,40 (1H, t), 2,6 (4H, br dd), 0,98 (3H, d), 0,95 (3H, s), 0,80 (3H, d), 0,75 (3H, s) ppm;

widmo ^{13}C NMR (CDCl_3 , 68 MHz): δ 171,81, 109,27, 80,91, 74,90, 66,85, 62,25, 56,29, 41,84, 41,62, 40,65, 40,51, 40,18, 35,44, 35,01, 34,72, 32,17, 31,77, 31,38, 30,25, 29,33, 28,79, 26,93, 26,55, 23,58, 20,58, 17,11, 16,43, 14,48 ppm;

R_f 0,11 (krzemionka, octan etylu/eter naftowy, 3:7)

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie pochodnych sapogeniny o ogólnym wzorze I lub II:



oraz ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli,
gdzie:

w ogólnym wzorze (I):

R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_3 oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_9 , R_{12} , R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil,

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne,

a w ogólnym wzorze (II):

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_3 niezależnie oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_9, R_{12}, R_{11} i R_{13} niezależnie oznaczają H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil;

R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne,

==== do wytwarzania leku do wzmacniania funkcji poznawczej lub leczenia dysfunkcji poznawczej.

2. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym w związku o ogólnym wzorze (I):

R_4, R_9, R_{12} i R_{13} oznaczają H;

$R_1, R_2, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_3 niezależnie oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil, a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

3. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 2, w którym w związku o ogólnym wzorze (I):

$R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_{10}, R_{11}, R_9, R_{12}$ i R_{13} oznaczają H,

R_3 oznacza H, -OH, -OMe, -OCOCH₃, =O, -O-CO₂Et lub -O-CO-(CH₂)₂-CO₂H

R_{14} = CH₃.

4. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym w związku o ogólnym wzorze (II):

R_4, R_9, R_{12} i R_{13} oznaczają H,

$R_1, R_2, R_5, R_6, R_7, R_8$ i R_{10} niezależnie oznaczają H, OH, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_3 oznacza H, =O lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, ewentualnie podstawiony karbamoil lub alkoksykarbonyl;

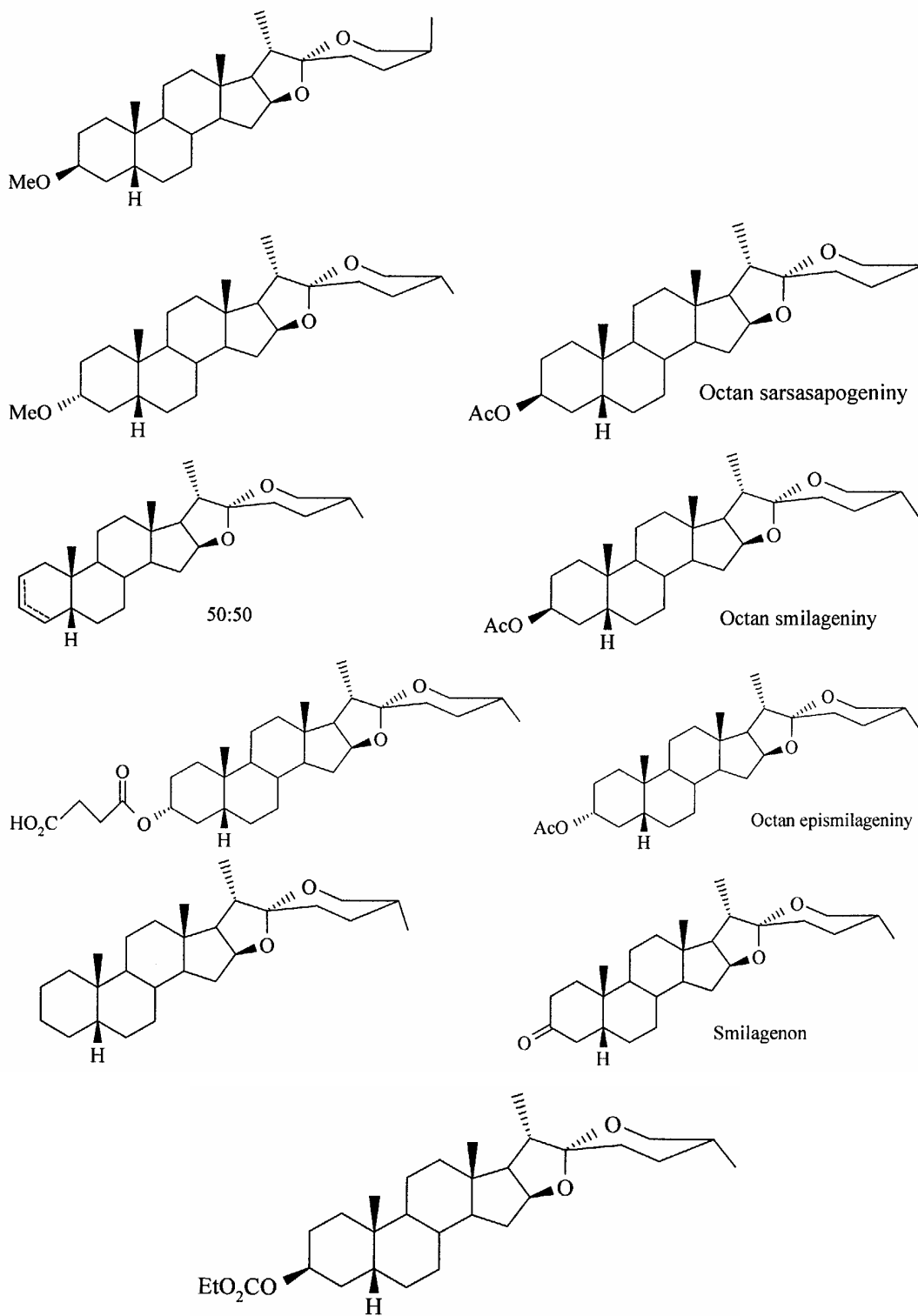
R_{11} oznacza H, OH lub OR, gdzie R oznacza ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl, karbamoil lub alkoksykarbonyl;

R_{14} oznacza ewentualnie podstawiony alkil

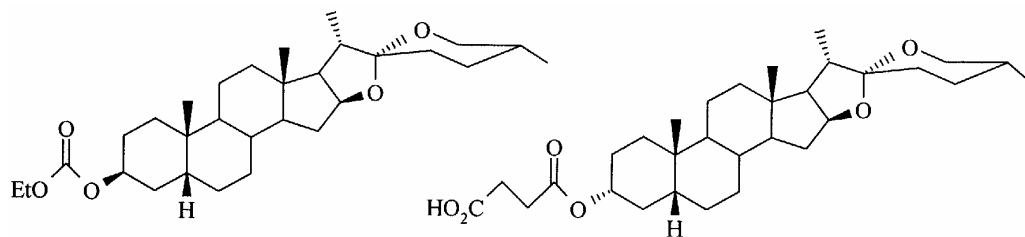
R_{15} oznacza H, ewentualnie podstawiony alkil, ewentualnie podstawiony acyl lub glukozył; a

==== oznacza ewentualne wiązanie podwójne.

5. Zastosowanie według zastrz. 1, gdzie związek wybiera się spośród:



6. Zastosowanie według zastrz. 5, gdzie związek wybiera się spośród:



7. Zastosowanie według zastrz. 1 - 6, w którym lek stosuje się do wzmacniania funkcji poznawczej u pacjenta cierpiącego na dysfunkcję poznawczą związaną z wiekiem.

8. Zastosowanie według zastrz. 1 - 7, w którym lek stosuje się do leczenia choroby wybranej spośród choroby Alzheimera, otępienia starczego typu Alzheimera, choroby Parkinsona, choroby rozsianych ciał Lewy'ego, podciśnienia ortostatycznego, autyzmu, zespołu przewlekłego zmęczenia, miażdżycy, choroby Lamberta i Eatona, chorób i problemów związanych z zespołem Wojny w Zatoce, pracy ze związkami fosforoorganicznymi i problemów związanych ze starzeniem.

9. Zastosowanie według zastrz. 8, w którym lek stosuje się do leczenia choroby wybranej spośród choroby Alzheimera lub otępienia starczego typu Alzheimera.

Rysunki

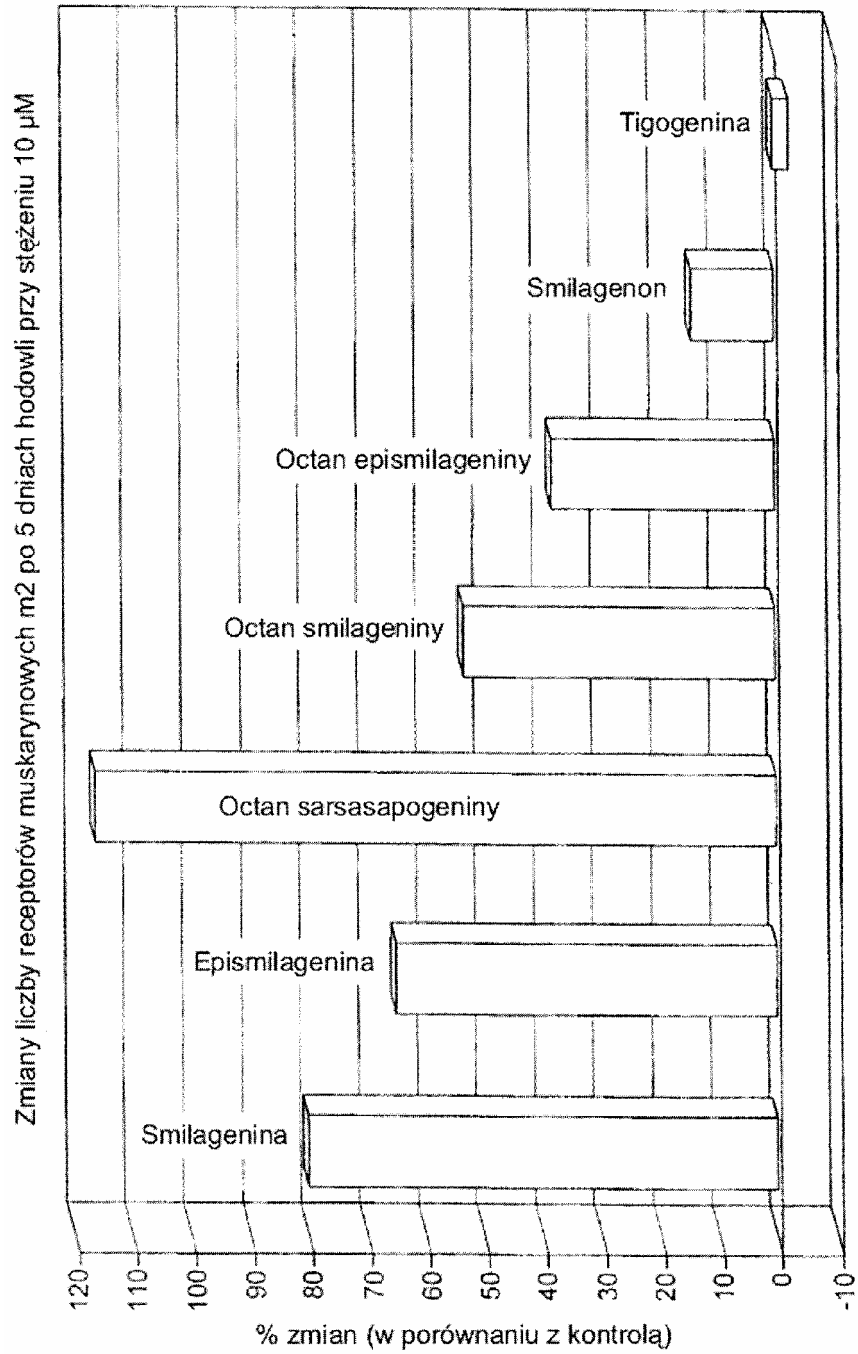


FIG. 1

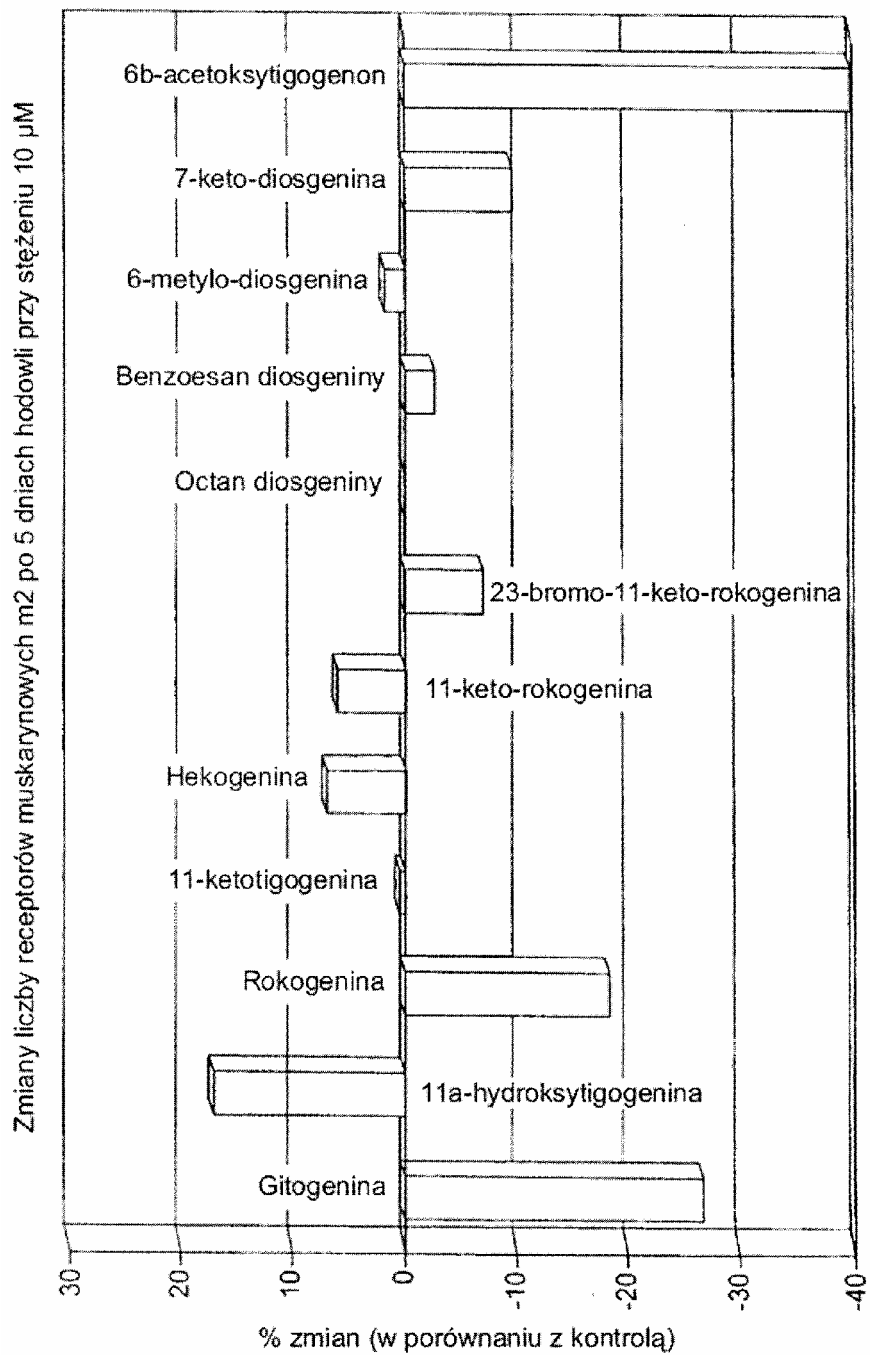


FIG. 2

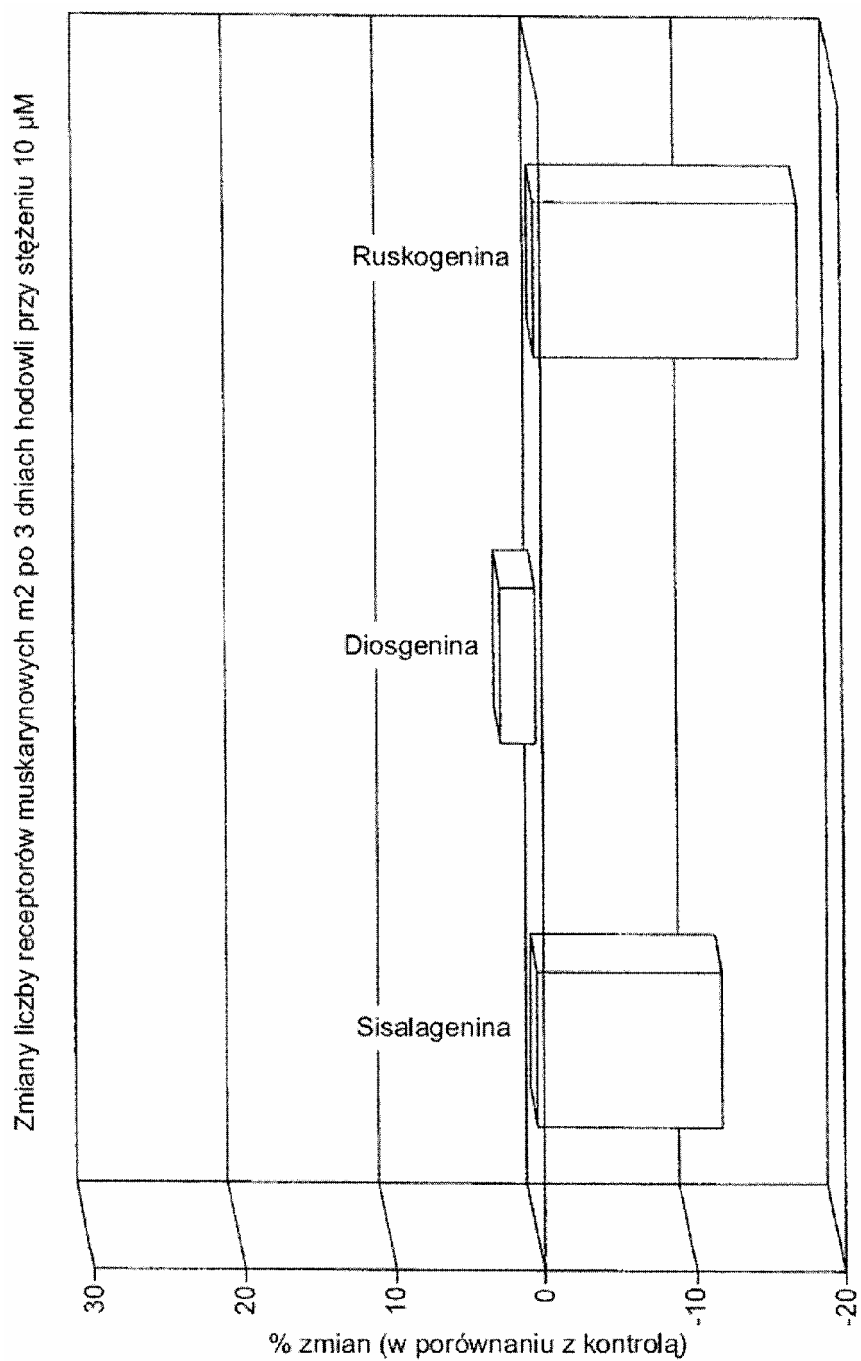


FIG. 3

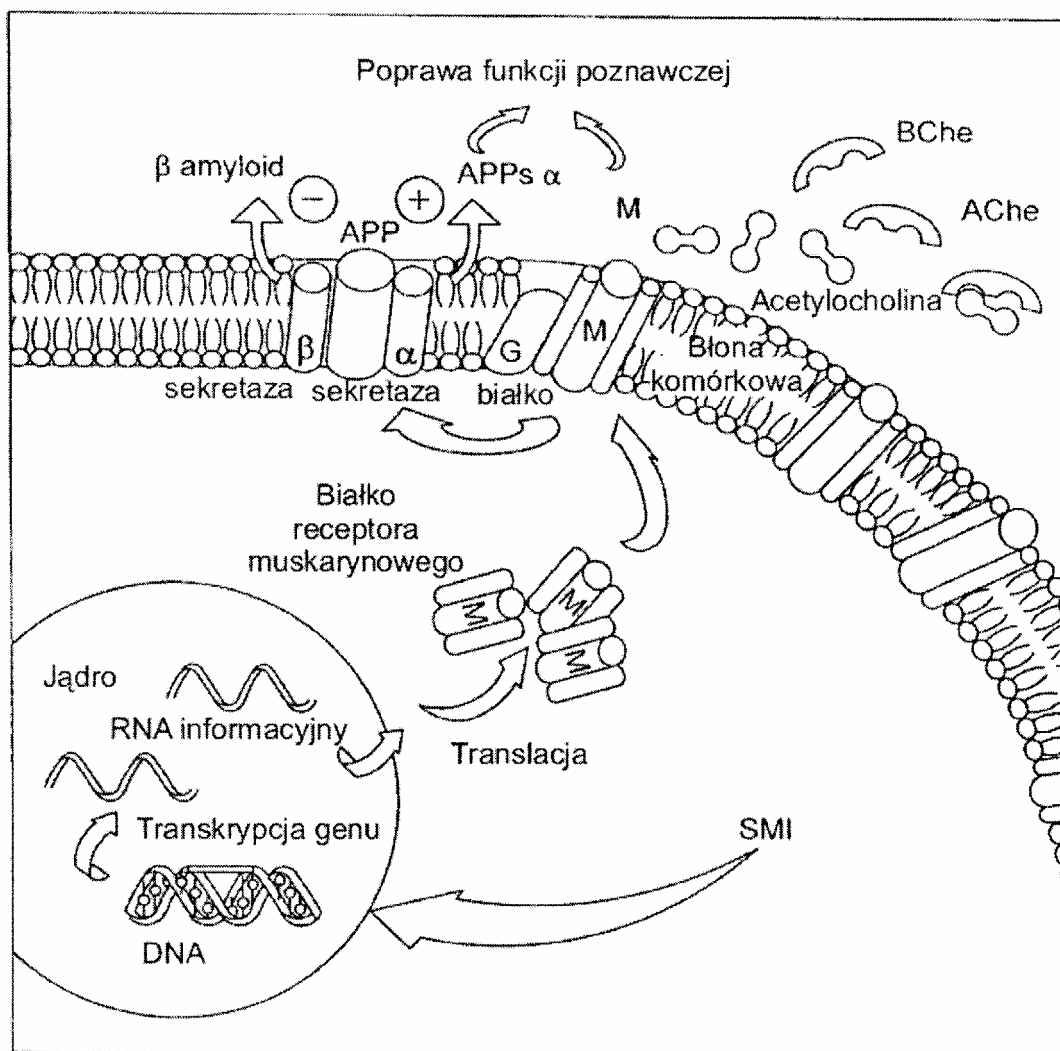


FIG. 4