



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120099** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

**A61K 31/4439** (2006.01)

**A61P 5/26** (2006.01)

**A61P 19/08** (2006.01)

**A61P 21/06** (2006.01)

**A61P 21/00**

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

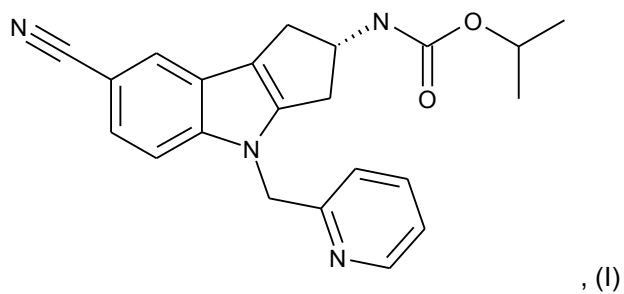
<p>(21) Номер заявки: <b>а 2017 01774</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>08.09.2015</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.10.2019</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>62/049,192</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>11.09.2014</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>12.06.2017, Бюл.№ 11</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.10.2019, Бюл.№ 19</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/US2015/048801, 08.09.2015</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Бенсон Чарльз Томас (US), Річі Речел (US), Ю Ханна (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ЕЛІ ЛІЛЛІ ЕНД КОМПАНІ,</b> Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: <b>Шляховецький Ілля Олександрович, реєстр. №190</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2010/069404 A1, 18.03.2010 WENQING GAO ET AL, "Selective Androgen Receptor Modulator Treatment Improves Muscle Strength and Body Composition and Prevents Bone Loss in Orchidectomized Rats", ENDOCRINOLOGY, US, (20051101), vol. 146, no. 11, doi:10.1210/en.2005-0572, ISSN 0013-7227, pages 4887 - 4897 ROHAYEM J ET AL, "Androgen deprivation therapy in prostate cancer ; Indication and systemic consequences ; Antiandrogene Therapie des Prostatakarzinoms ; Indikation und systemische Folgen", DER UROLOGE, AUSGABE A ; ZEITSCHRIFT FÜR KLINISCHE UND PRAKTISCHE UROLOGIE ORGAN DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR UROLOGIE, SPRINGER, BERLIN, DE, (20120405), vol. 51, no. 4, doi:10.1007/S00120-012-2808-7, ISSN 1433-0563, pages 557 - 566 P. YI ET AL, "Disposition and Metabolism of LY2452473, a Selective Androgen Receptor Modulator, in Humans", DRUG METABOLISM AND DISPOSITION, (20120907), vol. 40, no. 12, doi:10.1124/dmd.112.047613, pages 2354 - 2364</p>
---	--

## (54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ СИМПТОМІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З АНДРОГЕН-ДЕПРИВАЦІЙНОЮ ТЕРАПІЄЮ

(57) Реферат:

UA 120099 C2

У цьому винаході запропонований спосіб лікування симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, який включає введення пацієнту, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки Формули I:



або її фармацевтично прийнятної солі.

Цей винахід має відношення до лікування симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, з використанням ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі.

Цей винахід має відношення до лікування симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією. Андроген-деприваційна терапія (ADT) або андроген-супресивна терапія являє собою загальну терапію, що використовується для зменшення агресивності раку передміхурової залози, в поєднанні з іншими терапевтичними варіантами, зосередженими на викорененні раку. При здійсненні ADT рівні андрогенів, або чоловічих гормонів, в організмі знижуються для запобігання їх потрапляння до ракових клітин передміхурової залози. Андрогени, такі як тестостерон і дигідротестостерон (DHT), стимулюють ріст ракових клітин передміхурової залози. При цьому було виявлено, що рак передміхурової залози може розвиватись повільніше або пухлина може навіть зморщуватись у разі зниження рівнів андрогенів. За оцінками у Сполучених Штатах приблизно одну третину пацієнтів з раком передміхурової залози піддають ADT в певний момент під час лікування їх захворювання.

Існує кілька доступних варіантів лікування для зниження рівня андрогенів, наприклад, орхіектомія або хірургічна кастрація, застосування аналогів рилізінг-фактору лютеїнізуючого гормону (LHRH), таких як лейпролід (leuprolide) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Lupron<sup>®</sup>, Eligard<sup>®</sup>), гозерелін (goserelin) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Zoladex<sup>®</sup>), трипторелін (triptorelin) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Trelstar<sup>®</sup>) та гістрелін (histrelin) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Vantas<sup>®</sup>), і антагоністів LHRH, таких як дегарелікс (degarelix) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Firmagon<sup>®</sup>) та абіратерон (abiraterone) (у Сполучених Штатах наявний у продажу як Zytiga<sup>®</sup>).

Більшість чоловіків із давнім раком передміхурової залози добре реагує на ADT. Зазвичай ADT призначають, коли рак передміхурової залози поширюється за межі капсули простати, виходячи з клінічної стадії захворювання (пухлина стадії T3), як терапія першої лінії при лікуванні метастатичного раку передміхурової залози із застосуванням агоністів/антагоністів GnRH (гонадотропін-вивільнювальний гормон) або здійсненням хімічної кастрації.

Існують потенційні побічні ефекти, пов'язані з гормональною терапією, які можуть мати шкідливий вплив на якість життя і підвищувати ступінь ризику, пов'язаного з припиненням здійснення пацієнтом андроген-деприваційної терапії. Наприклад, побічні ефекти можуть включати зниження або відсутність лібідо, еректильну дисфункцію, зморщування чоловічих статевих органів, нападоподібне відчуття жару ("приливи"), остеопороз, анемію, зниження м'язової маси, зниження м'язової сили, збільшення жирових відкладень, а також збільшення маси у зв'язку зі змінами рівнів гормонів, тестостерону та естрогену. В даній галузі відомі сучасні методи лікування побічних ефектів, пов'язаних з ADT. Дивись US 2009/0143344 (нападоподібне відчуття жару ("приливи") – 5HT2A або антагоніст D2R); US 2007/0281977 (нападоподібне відчуття жару ("приливи") – антагоніст мускаринових рецепторів); US 2008/0080143 (остеопороз, переломи кісток, зниження BMD (мінеральна густина кісткової тканини), нападоподібне відчуття жару ("приливи"), гінекомастія, випадання волосся – тореміфен (torimifene)). Проте, в даній галузі залишається потреба в альтернативних методах лікування, за допомогою яких можуть бути зменшені деякі побічні ефекти ADT. Насправді, до недавнього часу з метою зведення до мінімального рівня несприятливих наслідків медичної кастрації була рекомендована переміжна андроген-деприваційна терапія (IAD), яка полягала у припиненні лікування пацієнтів, які реагували на ADT, з подальшим поновленням ADT у разі появи ознак рецидивування або прогресування захворювання. Проте дослідження, проведене на 1749 пацієнтах, довільно розподілених для безперервної ADT у зіставленні з IAD з середнім періодом вивчення віддалених результатів 9,8 року, показало, що безперервна ADT є кращою за IAD. Терапія для поліпшення переносності побічних ефектів ADT могла б привести до полегшення одержання від пацієнта згоди на лікування і забезпечення кращих результатів лікування.

Було встановлено, що селективні модулятори рецепторів андрогенів (SARM) виявляють диференційований профіль активності в андрогенних тканинах. Зокрема, такі агенти переважно виявляють андроген-агоністичну активність в анаболічних тканинах, таких як м'язи або кістки, але виявляються лише частковими агоністами або навіть антагоністами в інших андрогенних тканинах, таких як передміхурова залоза або сім'яні пухирці. Отже, використання модулятора андрогенних рецепторів (AR) може полегшити симптоми, пов'язані з андроген-деприваційною терапією у пацієнтів з раком передміхурової залози.

На Фіг. 1 показано, що сполука Прикладу 1 після лікування протягом 8 тижнів не призводила до значного збільшення маси сім'яних пухирців у пацюків, орхіектомізованих у віці 8 тижнів, які

виявляли гіперреактивність на будь-яку андрогенну стимуляцію.

На Фіг. 2 показано, що сполука Прикладу 1 призвела до значного збільшення мінеральної щільності трабекулярної кісткової тканини поперекового хребця (LV-TBMD) і спричинила тенденцію до збільшення вмісту мінералів у трабекулярній кістковій тканині поперекового хребця (LV-TBMC) і площини поперечного перерізу (LV-TA) після проведення протягом 8 тижнів лікування пацієнтів, орхієктомізованих у віці 8 тижнів.

На Фіг. 3 показано, що комбінація тестостерона енантата (TE) (1 мг/кг/маси тіла добу) і різних доз сполуки Прикладу 1 спричинює тенденцію до зменшення маси (у мг) сім'яних пухирців у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах, яка індукується лише TE.

На Фіг. 4 показано, що наслідком сукупного лікування пацієнтів SD сполукою Прикладу 1 разом з TE у дозі 1 мг/кг маси тіла було дозозалежне зменшення маси (у мг) передміхурової залози у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах.

На Фіг. 5 показано, що комбінація TE (1 мг/на кг/маси тіла на добу) і різних доз сполуки Прикладу 1 спричинює тенденцію до зменшення маси (у мг) сім'яних пухирців у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах, яка індукується лише TE.

На Фіг. 6 показано, що наслідком сукупного лікування пацієнтів SD сполукою Прикладу 1 разом з TE у дозі 1 мг/кг маси тіла було дозозалежне зменшення маси (у мг) передміхурової залози у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах.

На Фіг. 7 показано збільшення площини м'язу задньої частини гомілки, як було визначено шляхом візуалізації засобами периферичної комп'ютерної томографії литкового м'язу (площина м'язу задньої частини гомілки) після введення сполуки Прикладу 1 здоровим пацієнтам-волонтерам.

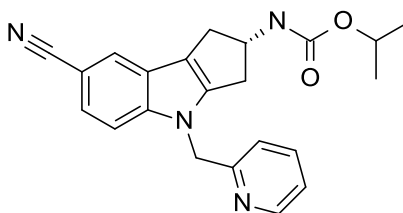
На Фіг. 8 показано збільшення сухої м'язової маси всього тіла після введення сполуки Прикладу 1 здоровим пацієнтам-волонтерам, як визначено засобами DEXA (двоенергетична рентгенівська абсорбціометрія). Результат у чоловіків (стовпчик синього кольору) при рівні дози 5 мг є статистично значущим у порівнянні з дозою 0 мг у плацебо, використовували критерій Даннетта ( $p < 0,05$ ).

На Фіг. 9 показана відсутність будь-яких істотних змін рівнів простатичного специфічного антигену (PSA) від вихідного рівня в порівнянні з плацебо в будь-який момент часу або з будь-якою дозою сполуки Прикладу 1

На Фіг. 10 показано зниження рівня тестостерону в сироватці після введення сполуки Прикладу 1 здоровим пацієнтам-волонтерам, які мають нормально функціонуючі статеві залози. Зниження після обробки є більш вираженим у чоловіків, беручи до уваги їх відносно більш високий рівень тестостерону в сироватці крові. На Фіг. 10 таблиця праворуч відображає оцінку впливу після фази 1а дослідження в дозі 5 мг.

На Фіг. 11 показано позитивну залежність "експозиція-реакція" для N-кінцевого пропептида проколагена 1 типу (P1NP), біомаркера анаболізму кісткової тканини, після введення сполуки Прикладу 1 здоровим пацієнтам-волонтерам, які мають нормально функціонуючі статеві залози.

Було показано, що сполука-модулятор AR, ізопропіловий складний ефір (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти, альтернативно згадана як 1-метилетилловий складний ефір N-[(2S)-7-ціано-1,2,3,4-тетрагідро-4-(2-піридинілметил)циклопент[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти, яка репрезентована структурною формулою I, збільшує суху м'язову масу і зменшує жирову масу у здорових пацієнтів-волонтерів. Крім того, після лікування ізопропіловим складним ефіром (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти протягом 12 тижнів жодних істотних змін гематокриту або зміни простатичного специфічного антигену (PSA) у здорових пацієнтів-волонтерів не спостерігалось. Крім того, лікування орхієктомізованих пацієнтів ізопропіловим складним ефіром (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти не призводить до істотного збільшення маси сім'яних пухирців.



Формула I

Відповідно, у цьому винаході запропонований спосіб лікування симптомів як результату

вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією, який включає введення пацієнтові, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки Формули I. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу згаданим пацієнтом є пацієнт з раком передміхурової залози. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу запропонований спосіб лікування втрати кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. У ще одному іншому варіанті здійснення цього винаходу запропонований спосіб лікування втрати лібідо і нападоподібного відчуття жару ("приливів") як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.

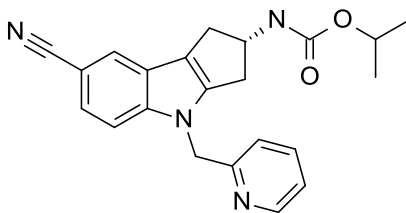
Крім того, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в терапії, зокрема, для лікування симптоми, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, в пацієнтів, які цього потребують. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу згаданим пацієнтом є пацієнт з раком передміхурової залози. Крім того, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі при лікуванні симптомів як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. На додаток до цього, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі при лікуванні симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, у пацієнтів з раком передміхурової залози. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване використання сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, у пацієнтів з раком передміхурової залози. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване використання сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування симптомів, як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в терапії, зокрема, для лікування втрати кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. На додаток до цього, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі для лікування втрати кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. У ще одному варіанті здійснення цього винаходу запропоноване використання сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування втрати кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.

Крім того, цим винаходом запропоноване застосування сполуки Формули I або її фармацевтично прийнятної солі в терапії, зокрема, для лікування втрати лібідо і нападоподібного відчуття жару ("приливів") як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. На додаток до цього, цим винаходом запропоноване застосування сполуки за цим винаходом або її фармацевтично прийнятної солі для лікування втрати лібідо і нападоподібного відчуття жару ("приливів"), як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією. У ще одному варіанті здійснення, даний винахід пропонує використання сполуки за даним винаходом або її фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування втрати лібідо і нападоподібного відчуття жару ("приливів"), як результату вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.

Сполука-модулятор андрогенного рецептора Формули I і способи одержання і використання вказаних сполук як корисних терапевтичних засобів у разі терапевтичних показань, таких як гіпогонадізм, зниження кісткової маси або щільності, а також зниження м'язової маси або сили, наведені в US-2010-0069404, опублікованій 18 березня 2010 року, включений в цей опис шляхом посилання. Дивись також WO 2008/063867. Сполука-модулятор андрогенного рецептора (AR) Формули I являє собою потужний і селективний модулятор андрогенного рецептора.

Конкретніше, цим винаходом запропонований спосіб лікування симптомів, пов'язаних з андроген-деприваційною терапією, у пацієнтів з раком передміхурової залози, який включає введення пацієнту, який потребує такого лікування, ефективної кількості сполуки Формули I, представленої структурно як



або її фармацевтично прийнятної солі.

У значенні, вживаному в цьому описі, термін "пацієнт" означає людину.

У значенні, вживаному в цьому описі, терміни "лікування", "лікувати" або "виліковування" означають гальмування, уповільнення, зупинку, зменшення або зворотання прогресування або тяжкості наявного симптому, розладу, стану або захворювання.

У значенні, вживаному в цьому описі, терміни "T1-T4" означають категорію T системи визначення стадії раку передміхурової залози (TNM) американського Об'єднаного комітету з питань раку (AJCC) для опису того, як далеко поширився рак. Категорія T вказує на наявність пухлин і описує ступінь поширення первинної пухлини. Більш високі числа вказують на більший розмір, величину або ступінь проникнення. Кожен тип раку має специфічні особливості, закодовані під певним номером. У разі раку передміхурової залози T1 вказує на те, що лікар не може виявити пухлину або побачити її зображення за допомогою візуалізації, такої, наприклад, як трансректальне ультразвукове дослідження. T2 вказує на те, що лікар може виявити ракову пухлину засобами цифрового ректального дослідження (DRE) або побачити її зображення, наприклад, за допомогою трансректального ультразвукового дослідження, але вона все ще, як видається, залишається у межах передміхурової залози. T3 вказує на те, що рак почав рости і поширюватися за межі передміхурової залози, і може поширитись в сім'яні пухирці. T4 вказує на те, що рак проріс в тканини, що знаходяться поруч з передміхурою залозою (інші, крім сім'яних пухирців), такі як уретральний сфінктер (м'яз, який допомагає контролювати сечовипускання), пряма кишка, сечовий міхур і/або стінки таза.

У значенні, вживаному в цьому описі, термін "ефективна кількість" означає кількість або дозу сполуки Формули I чи її фармацевтично прийнятної солі, яка при введенні пацієнту, забезпечує бажаний результат у цього пацієнта при призначенні лікування або при лікуванні. При визначенні ефективної кількості для пацієнта лікар, який призначає лікування, розглядає ряд чинників, в тому числі, але не обмежуючись ними, розмір, вік і загальний стан здоров'я пацієнта; конкретне наявне захворювання або розлад; ступінь або наявність чи тяжкість захворювання або розладу; реакція окремого пацієнта; конкретна введена сполука; спосіб введення; характеристики біодоступності введеного препарату; вибрана схема прийому; використання супутнього лікарського засобу; та інші відповідні обставини.

Сполука Формули I та її фармацевтично прийнятні солі є загалом ефективними в широкому діапазоні доз. Наприклад, добові дози окремих агентів зазвичай знаходяться в інтервалі від приблизно 1 мг/добу до приблизно 1000 мг/добу, за варіантом, якому віддають перевагу, від приблизно 1 мг/добу до приблизно 500 мг/добу, від приблизно 1 мг/добу до приблизно 250 мг/добу, від приблизно 1 мг/добу до приблизно 100 мг/добу, від 1 мг/добу до приблизно 75 мг/добу і від 1 мг/добу до приблизно 25 мг/добу. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, добові дози окремих агентів зазвичай знаходяться в інтервалі від приблизно 1 мг/добу до приблизно 5 мг/добу. За варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, сполуку Формули I використовують в добовій дозі, вибраній з-посеред 1 мг/добу, 5 мг/добу, 25 мг/добу і 75 мг/добу.

Сполучі-модулятору андрогенного рецептора Формули I надають переважно форму фармацевтичної композиції, яку вводять будь-яким шляхом, який забезпечує біологічну доступність вказаної сполуки. Шлях введення може змінюватись будь-яким чином, і обмежений фізичними властивостями лікарських засобів і зручністю для пацієнта і особи, що забезпечує догляд за ним. Сполучі-модулятору андрогенного рецептора Формули I надають переважно форму, прийнятну для перорального або парентерального введення, включаючи внутрішньовенне або підшкірне введення. Такі фармацевтичні композиції і способи їх одержання добре відомі в цій галузі. (Дивись, наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Сполука Формули I переважно являє собою вільну основу.

Препаративні методики і Приклад

Наведені нижче методи, препаративні методики і приклади додатково ілюструють цей винахід і описують типовий синтез сполуки за цим винаходом. Реагенти та початкові матеріали легко доступні або можуть бути легко синтезовані пересічним фахівцем в цій галузі. Слід розуміти, що Препаративні методики і Приклади наведені з метою ілюстрації, а не обмеження, і

що фахівцем в цій галузі можуть бути здійснені різні модифікації. Специфічні стадії синтезу для кожного з описаних шляхів можна комбінувати різними способами або поєднувати зі стадіями з різних схем для одержання сполуки Формули I або її солей. Продукти на кожній стадії можуть виділятися традиційними методами, добре відомими у цій галузі, у тому числі екстракцією, випарюванням, осадженням, хроматографуванням, фільтрацією, розтиранням та кристалізацією. Крім того, усі замісники, якщо не вказано інше, є такими, як визначено вище.

Якщо не вказано інше, сполукам, наведеним у цьому описі, можуть бути надані назви і вони можуть бути пронумеровані з використанням програми Accelrys<sup>®</sup> Draw версії 4.0 (компанія Accelrys, Inc., San Diego, штат Каліфорнія), IUPACNAME ACDLABS або ChemDraw<sup>®</sup> Ultra 12.0. R-конфігурацію або S-конфігурацію сполуки за цим винаходом можна визначати стандартними методами, такими як рентгеноструктурний аналіз і порівняння з часом утримування хіральної HPLC. Окремі ізомери, енантіомери та діастереомери можуть бути відокремлені або розділені фахівцем у цій галузі в будь-якій зручній точці у процесі синтезу сполуки Формули I такими методами як селективна кристалізація або хіральна хроматографія (Дивись, наприклад, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, та E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Позначення "ізомер 1" і "ізомер 2" означають сполуки, які елюються при здійсненні хірального хроматографування першою та другою, відповідно, і, у разі, якщо хіральна хроматографія ініціюється на початку синтезу, те ж саме позначення застосовується до подальших проміжних хімічних сполук і прикладів. На додаток до цього деякі проміжні хімічні сполуки, описані в наведених нижче схемах, можуть містити одну або більше азотзахисну(-их) групу(-п). Змінна захисна група може бути однаковою або різною в кожному випадку, залежно від конкретних умов реакції і конкретного перетворення, яке має відбутись. Умови захисту і відщеплення захисних груп добре відомі фахівцям і описані в літературі (дивись, наприклад, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Реагенти та вихідні матеріали є легко доступними для пересічного фахівця в цій галузі. У патенті США № 7,968,587, включеному в цей опис шляхом посилання, розкривають синтез ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти.

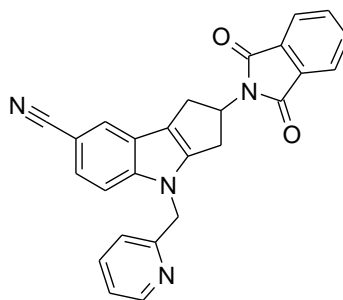
У значенні, вживаному в цьому описі, наведені нижче терміни мають зазначені значення: "ADME" означає всмоктування, розподіл, метаболізм та виділення; "DMAC" означає N, N-диметилацетамід; "DMF" означає диметилформамід; "ECG" означає електрокардіографію; "EDTA" означає етилендіамінтетраоцтову кислоту; "ee" означає енантіомерний надлишок; "EtOAc" означає етилацетат; "EtOH" означає етанол; "HOAc" означає оцтову кислоту; "HPLC" означає високоефективну рідинну хроматографію; "LCMS" означає рідинну хроматографію/мас-спектрометрію; "LY" означає сполуку Прикладу 1; "MeOH" означає метанол; "mp" означає хвилини; "MS" означає мас-спектрометрію; "MTBE" означає трет-бутилметиловий ефір; "NOAEL" означає рівень спостережуваного негативного ефекту; "Orx" означає орхієктомізований; "SE" означає середню квадратичну помилку; "TE" означає тестостерону енантат; "TFA" означає трифтороцтову кислоту; "THF" означає тетрагідрофуран; і "UV" означає ультрафіолет.

Проміжна хімічна сполука 1

(±)-2-(1,3-діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-іл)-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрил (±)-2-(3-Оксоциклопентил)-ізоіндол-1,3-діон (12,7 г, 55,3 ммоль) і 4-ціанофенілгідразин-HCl (8,53 г, 50,3 ммоль) змішують в HOAc (200 мл) і 4н розчині HCl діоксану (50 мл). Реакційну суміш з механічним перемішуванням нагрівають до температури 90 °C протягом 18 год., потім додають додаткову кількість 4н розчину HCl діоксану (20 мл). Реакційну суміш нагрівають до температури 100 °C протягом 18 год. Реакційну суміш розбавляють водою (600 мл), і вакуумним фільтруванням збирають тверду речовину чорного кольору. Вказану тверду речовину обробляють ультразвуком у присутності MeOH (200 мл), потім збирають, сушать у вакуумній печі, і одержують 10,94 г (66 %) твердої речовини сіро-брунатного кольору. MS (m/z): 328 (M+H), 326 (M-H).

Проміжна хімічна сполука 2

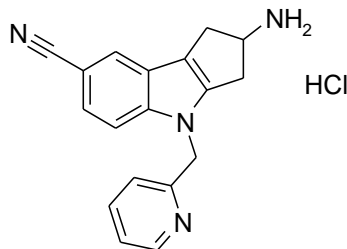
(±)-2-(1,3-діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-іл)-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрил



Суміш 2-(1,3-діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-іл)-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-7-карбонітрилу (5 г, 15,3 ммоль) в DMF (25 мл) нагрівають до температури 40 °С. Додають карбонат цезію (10,4 г, 32,4 ммоль) і 2-(бромметил)піридину гідробромід (4,05 г, 16 ммоль). Суміш перемішують при температурі 40 °С протягом 24 год. Цю суміш додають у воду (250 мл), і перемішують протягом 1 год. Тверду речовину відфільтровують, і зібраний матеріал висушують під вакуумом. Тверду речовину додають в EtOH (25 мл), і гріють зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Суміш охолоджують до температури 22 °С, і фільтрують. Тверду речовину сушать під вакуумом до постійної маси, і одержують 4,8 г (75 %) вказаної в заголовку сполуки. MS (m/z): 419 (M+H).

Проміжна хімічна сполука 3

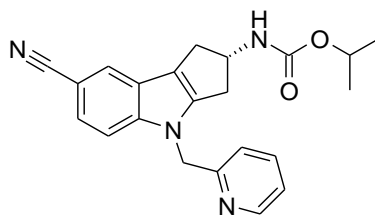
(±)-2-аміно-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-7-карбонітрилу гідрохлорид



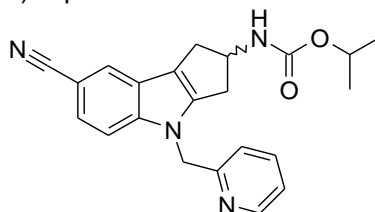
2-(1,3-діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-іл)-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-7-карбонітрил (77 г, 184 ммоль) додають в THF (1,3 л) і EtOH (230 мл). Суміш перемішують протягом 10 хв, після чого додають моногідрат гідазину (20 мл, 400 ммоль). Суміш перемішують при температурі 22 °С протягом 16 год. Суміш фільтрують, і упарюють матковий розчин. Залишок розчиняють в дихлорметані (300 мл). Додають 4М розчин HCl в діоксані (50 мл), і суміш перемішують протягом 2 год. Виділену тверду речовину фільтрують, сушать під вакуумом до постійної маси, і одержують 54 г (90 %) вказаної в заголовку сполуки. MS (m/z): 289 (M+H).

Приклад 1

Ізопропіловий ефір (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-2-іл)-карбамінової кислоти



Стадія 1: Ізопропіловий ефір (±)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-2-іл)-карбамінової кислоти



До розчину (±)-2-аміно-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[б]індол-7-карбонітрилу (2,32 г, 8,05 ммоль) і діізопропілетиламіну (9,65 ммоль, 1,68 мл) в дихлорметані



(10 мл) додають ізопропілхлорформіат (8,86 ммоль, 8,9 мл), і перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розбавляють етилацетатом, і промивають 10 % розчином  $K_2CO_3$  (2×). Органічну частину сушать над  $Na_2SO_4$ , фільтрують, концентрують, і одержують 3,3 г. Очищають засобами колонкової хроматографії (0-100 % розчину етилацетат/дихлорметан), і одержують 2,48 г (82 %) рацемічного продукту. LCMS 375.2 (M+H).

Альтернативна процедура:

(±)-2-аміно-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрилу гідрохлорид (35 г, 108 ммоль) додають в суміш дихлорметану (350 мл) і піридину (70 мл). Вказану суміш перемішують в атмосфері азоту і охолоджують до температури 5 °C. Додають ізопропілхлорформіат (1M розчин в толуолі, 162 мл, 162 ммоль). Льодяну баню прибирають, і суміш перемішують при температурі 22 °C. Через 16 год. розчинник випарюють. Одержаний залишок додають у воду (350 мл), і перемішують протягом 2 год. Зібрану тверду речовину фільтрують, і сушать під вакуумом при температурі 45 °C. Тверду речовину додають в етилацетат (400 мл), і суміш нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником. Потім охолоджують до температури 22 °C, і тверду речовину відфільтровують. Вологу тверду речовину додають в етилацетат (200 мл), і нагрівають до кипіння зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Суміш охолоджують до температури 22 °C протягом однієї години, після чого протягом 5 хв охолоджують до температури 0-5 °C. Суміш фільтрують, виділену тверду речовину сушать під вакуумом до постійної маси, і одержують 23 г (62 %) вказаної в заголовку сполуки. MS (m/z): 374 (M+H).

Стадія 2: Ізопропіловий складний ефір (R)- і (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти

Енантіомери Прикладу 1 розділяють засобами препаративної хіральної хроматографії з використанням колонки Chiralpak AD (8×33 см), елюючи 100 % EtOH при 375 мл/хв і 250 нм. Ізомер 1 (R): 1,14 г, 99,9 % ee (аналітичні умови: колонка Chiralpak AD-H, елювання сумішшю 100 % EtOH/0,2 % диметилетиламін; LCMS 375,2 (M+H). Ізомер 2 (S): 1,67 г, 99,4 % ee; LCMS 375,2 (M+H).

Альтернативний шлях одержання сполуки Прикладу 1, Ізомер 2: Ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти

Ізопропіловий ефір (S)-(7-ціано-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти (13 г, 41,3 ммоль) додають в DMF (100 мл), і розчин нагрівають до температури 40 °C. Однією порцією додають карбонат цезію (42 г, 129 ммоль), і суміш перемішують протягом 30 хв при температурі 40 °C. Порціями протягом 4 год. додають 2-бромметилпіридину гідробромід (21 г, 83 ммоль). Суміш перемішують при температурі 40 °C протягом 18 год. Суміш додають в охолоджену воду (1 л) при температурі від 0 °C до 5 °C, і перемішують протягом 30 хв. Тверду речовину відфільтровують, і сушать під вакуумом до постійної маси. Матеріал пропускають через шар силікагелю, елюючи сумішшю  $CH_2Cl_2$ /EtOAc (7/3). Фракції, що містять продукт, об'єднують, розчинник випарюють, і одержують тверду речовину блідо-брунатного кольору. Перекристалізують з етилацетату, і одержують 15,3 г (77 %) вказаної в заголовку сполуки. LC/MS (m/z) 375 (M+H).

Другий альтернативний шлях:

(Умови проведення HPLC – колонка: Zorbax® SB-Phenyl, швидке розділення, 4,6×75 мм, 3,5 мкм; розчинник: 10 % ацетонітрилу/90 % води з 0,05 % TFA; UV при 230 нм).

Стадія 1: Трет-бутиловий складний ефір (±)-(7-ціано-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти

12 л 3-горлу круглодонну колбу споряджають верхнім перемішуванням, термopарою, краплинною лійкою, засобом для подавання азоту і охолоджувальною банею. У колбу вносять (±)-2-(1,3-діоксо-1,3-дигідроізоіндол-2-іл)-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрил (500 г, 1,53 моль) і THF (5 л). Одержану суспензію перемішують при температурі навколишнього середовища. Повільним потоком через краплинну лійку протягом 10 хв додають моногідрат гідразину (185,6 мл, 3,82 моль). Одержану суміш перемішують при температурі навколишнього середовища протягом ночі (протягом приблизно 18 год.). В баню додають холодну воду, і в краплинну лійку завантажують ди-трет-бутилдікарбонат (875,1 г, 4,01 моль; попередньо розплавлений до рідкого стану). Додають в реакційну суміш протягом 2 год., підтримуючи температуру колби нижче 30 °C. Через 15 хв аналізують засобами HPLC з віднаходженням повного вичерпання проміжного аміну. Реакційну суміш фільтрують на поліпропіленову подушку в настільному фільтрі з нержавіючої сталі, і одержаний відфільтрований осад промивають етилацетатом (2×1 л). Фільтрат концентрують in vacuo для видалення більшої частини THF. Одержану суміш (близько 1 л) очищають через шар силікагелю (4 кг Kieselgel-60) з елюванням

етилацетатом. Відновлений елюент концентрують in vacuo, і одержують масло темного кольору. Додають гептан (2 л) і етилацетат (350 мл), і центрифугують вміст на ротаційному випарнику при температурі навколишнього середовища протягом 2 год. У баню додають лід, і одержану суспензію додатково центрифугують при температурі 5 °C протягом 2 год. Тверду речовину відфільтровують, промивають сумішшю (90/10) гептан/етилацетат (2×500 мл), і сушать під вакуумом при температурі 35 °C. Одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини жовто-брунатного кольору з 91,6 % виходом.

Стадія 2: Трет-бутиловий складний ефір (±)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти

20 л Колбу з нижнім засобом для подавання споряджають верхнім перемішуванням, термopарою і засобом для подавання азоту. У колбу вносять трет-бутиловий складний ефір (±)-(7-ціано-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти (500 г, 1,68 моль) і дихлорметан (5 л). Починають перемішування, і додають спочатку тетра-н-бутиламонію гідросульфат (58,9 г, 0,168 моль), потім 2-(бромметил)піридину гідробромід (510,4 г, 2,02 моль). Додають деіонізовану воду (2 л) з подальшим додаванням 50 % розчину NaOH (445,3 мл, 8,41 моль). Одержану суміш енергійно перемішують з вечора (близько 21 год.). Перемішування припиняють, відстоюють з розділенням шарів, і водний (верхній) шар видаляють. Органічні речовини промивають деіонізованою водою (3×4 л), сушать над сульфатом натрію, і концентрують in vacuo до приблизно 500 мл. Неочищений матеріал очищають через шар силікагелю (7 кг Kieselgel 60) з використанням суміші (1:1) етилацетат/гептан як елюент. Елюент концентрують in vacuo, і одержують 560 г вказаної в заголовку сполуки у вигляді твердої речовини не зовсім білого кольору (81,4 %).

Стадія 3: Ізомер 1, (R)- і Ізомер 2, (S)-трет-бутилового складного ефіру (7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти

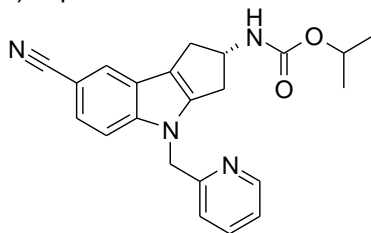
Для аналізу енантіомерів використовують аналітичний метод хіральної HPLC: колонка Chiralpak AD-H (компанія Chiral Technologies) 4,6×150 мм, рухома фаза: 20:80:0,2 ацетонітрил/денатурований етанол марки 3A/диметилетиламін, швидкість потоку 0,6 мл/хв, УФ-детектування при 255 нм. Енантіомер 1 елюється на 4,0 хв. і енантіомер 2 елюється на 5,2 хв. 8 % Домішок (255 нм) елюються на 3,6 хв. Трет-бутиловий складний ефір (±)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти (528 г) очищають засобами препаративної хіральної HPLC з використанням таких умов: колонка Chiralpak AD 8×33 см, така сама рухома фаза, що і у разі аналітичної HPLC, швидкість потоку 375 мл/хв, УФ-детектування при 270 нм. 108 г Зразку розчиняють в рухомій фазі при кінцевій концентрації 75 мг/мл. Завантажують із розрахунку 4,0 г/впорскування; фракція з енантіомером 1 елюється у межах 3,5-5,5 хв і енантіомер 2 елюється у межах 6-10 хв. Кінцеву тривалість роботи встановлюють на рівні 7,5 хв/ на впорскування з частковим ступінчастим зміщенням профілю елювання енантіомеру 2 відразу після кожного впорскування для зменшення споживання розчинника. Залишкові 420 г очищають через шар силікагелю з використанням силікагелю Merck 9385, 60 ангстрем, 230-400 меш (0,063-0,038 мм) з елюванням сумішшю (1:2:7) розчинників (дихлорметан/гептан/метилтретбутиловий простий ефір). Використовують 3,5 кг шар силікагелю з вакуумною фільтрацією при 140 г зразку/ на шар. Рацемат починає з'являтися після 5 об'ємів колонки. Для видалення залишку рацемату з шару силікагелю застосовують 100 % метилтретбутиловий ефір з подальшим доданням 100 % ацетону. Так одержують в цілому 358,5 г рацемату 98+ % чистоти. Цей матеріал розділяють, як описано вище, засобами препаративної хіральної HPLC. Одержують 208,8 г (99,9 % ee) енантіомера 1 (R-ізомер) і 197 г (99,6 % ee) енантіомера 2 (S-ізомер).

Стадія 4: (S)-2-аміно-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрилу гідрохлорид

3 л 3-Горлу круглодонну колбу споряджають нагрівальною сорочкою, повітряною мішалкою, датчиком температури, засобом для подавання азоту і краплинною лійкою. У колбу вносять трет-бутиловий складний ефір (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти (85,0 г, 0,22 моль) і EtOH (850 мл). Однією порцією додають концентровану HCl (180 мл, 2,20 моль). Одержаний розчин нагрівають до температури 45-50 °C, і перемішують протягом 90 хв, після чого аналізують засобами HPLC з виявленням повного вичерпання вихідного матеріалу. Суміш переносять в колбу Büchi, розбавляють деіонізованою водою (595 мл), і концентрують in vacuo для видалення EtOH. Двома порціями (2×170 мл) додають EtOAc, і повторно упарюють для видалення як EtOAc, так і залишкового EtOH. Водний концентрат переносять у 5 л реакційну колбу, і охолоджують до температури 10-15 °C. При підтримці температури реакційної суміші <30 °C, pH розчину доводять до 11-12 додаванням краплями 5M розчину NaOH (950 мл). Одержану суміш

екстрагують  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1300 мл, 800 мл). Об'єднані екстракти  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  промивають деіонізованою водою (500 мл), сушать над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , концентрують in vacuo, і одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді твердої речовини світло-зеленого кольору (65,0 г, 103 %).

Стадія 5. Ізопропіловий складний ефір (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти



2 л Реакційну колбу споряджають охолоджувальною банею, повітряною мішалкою, датчиком температури і краплинною лійкою. У колбу вносять (S)-2-аміно-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-7-карбонітрилу гідрохлорид (62,8 г, 0,218 моль), DMF (188 мл) і триетиламін (33,4 мл, 0,240 моль). Одержаний розчин на льодоацетоновій бані охолоджують до температури 0 °C. При підтримці температури <10 °C, краплями через краплинну лійку додають ізопропілхлороформіат (218 мл, 0,218 моль, 1М розчин в толуолі). Після завершення додавання охолоджувальну баню видаляють, і суміш витримують з нагріванням до температури навколишнього середовища. Через 1 год. аналізують за допомогою HPLC для визначення завершення реакції, і суміш виливають в розчин деіонізованої води (1256 мл) та EtOAc (1884 мл). Шари розділяють, органічний шар фільтрують, і повторно промивають розчином (1:1) води:розсолу, після чого сушать над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Концентрують in vacuo при температурі 55 °C до приблизно 15 об'ємів, одержаний матеріал витримують з охолодженням до температури навколишнього середовища, і одержують осад білого кольору. Додають гептан (628 мл), і перемішують протягом 20 хв. Суміш піддають зворотній концентрації до приблизно 15 об'ємів. Тверду речовину відфільтровують, промивають гептаном, сушать і одержують вказану в заголовку сполуку у вигляді пухкої твердої речовини білого кольору (68,9 г, 84,5 %).  $^1\text{H}$ -ЯМР (500 МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$  8,49 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H,  $J=1,5$ ), 7,71-7,75 (m, 1H), 7,60 (d, 1H,  $J=9,0$ ), 7,57 (d, 1H,  $J=9,0$ ), 7,36 (dd, 1H), 7,28-7,26 (m, 1H), 7,14 (d, 1H,  $J=7,5$ ), 5,44 (s, 2 H), 4,79-4,72 (m, 1H), 4,71-4,66 (m, 1H), 3,22-3,20 (m, 1H), 3,16-3,12 (m, 1 H), 2,73-2,66 (m, 2 H), 1,16 (dd, 6 H).

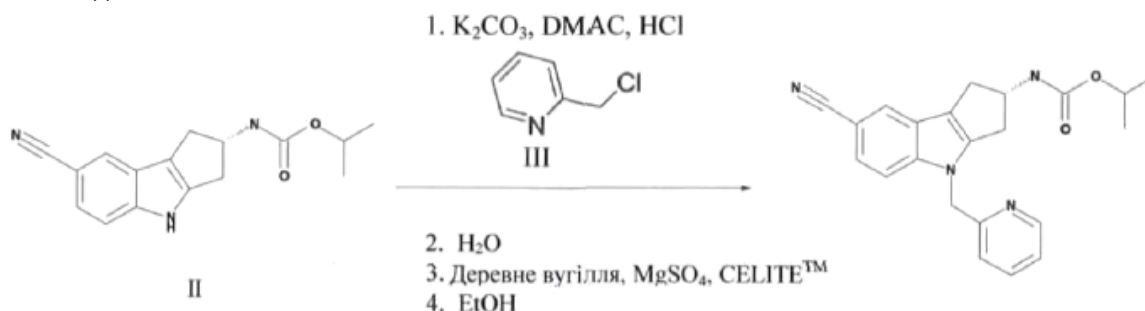
Третій альтернативний синтез

Стадія 1



Ізопропіловий складний ефір (I) (7-бром-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти обробляють  $\text{Zn}(\text{CN})_2$ ,  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ , Zn і  $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$  в DMAC, і одержують ізопропіловий складний ефір (II) (7-ціано-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти. Додають воду для осадження проміжної хімічної сполуки технічного сорту II. Повторно розчиняють проміжну хімічну сполуку II в суміші MTBE і ацетону, і одержану суспензію фільтрують для видалення неорганічних компонентів. Фільтрат, який містить II, обробляють деревним вугіллем,  $\text{MgSO}_4$  і FLORISIL<sup>TM</sup> перед виділенням II у вигляді кристалічної твердої речовини після кристалізації з гептану.

## Стадія 2



Проміжну хімічну сполуку II піддають взаємодії з гідрохлоридом 2-піколілхлориду (III) і  $K_2CO_3$  в DMAC, і одержують проміжну хімічну сполуку технічного сорту Прикладу 1. Проміжну хімічну сполуку технічного сорту Прикладу 1 виділяють додаванням води і фільтруванням. Тричі перекристалізують з EtOH, і одержують сполуку Прикладу 1.

Аналізи, дослідження *in vivo* та клінічні дослідження

Аналіз на орхієктомізованих пацюках

В цілому було використано 86 незайманих пацюків-самців лінії Sprague-Dawley (компанія Harlan Sprague Dawley Inc). У 6-місячному віці 14 пацюків були псевдооперовані (sham) і 72 пацюки були кастровані (орх). Пацюків утримували з 12 год. циклом чергування світла і темряви при температурі 22 °C з *ad lib* доступом до корму (TD 89222 з 0,5 % Ca і 0,4 % P, компанія Teklad, Madison, штат Вісконсін) і води. Процес втрати кісткової тканини у орх пацюків тривав 2 місяці, після чого їх зважували і довільно розподіляли на досліджувані групи, як докладно вказано в наведений нижче Таблиці 1. Тварини груп 1 і 2 були умертвлені в перший день як вихідний контроль, тварини груп 3 і 4 (sham і орх контролі) були призначені для введення носія (0,25 % розчин СМС/Twin80). Тваринам групи 5 вводили PTH (1-38) sc (підшкірно) шляхом ін'єкції. Тваринам груп 6-13 вводили SARM ро (перорально) через шлунковий зонд. Усі процедури здійснювали один раз на добу протягом 2 місяців.

Таблиця 1

Група №	Досліджувана група	8 місяців День 0	10 місяців День 60	Шлях введення
1	Sham		7	po
2	Orx		6	po
3	Перед-Sham		7	po
4	Перед-Orx		7	po
5	Orx+PTH (10 мкг/кг маси тіла/добу)		6	sc
6	Orx+сполука Прикладу 1 (1 мг/кг маси тіла/добу)		6	po
7	Orx+сполука Прикладу 1 (3 мг/кг маси тіла/добу)		7	po
8	Orx+сполука Прикладу 1 (10 мг/кг маси тіла/добу)		7	po
9	Orx+сполука Прикладу 1 (20 мг/кг маси тіла/добу)		7	po

Для динамічної гістоморфометрії, у перший день на початку дослідної обробки всім пацюкам, за виключенням початкових ліній, вводять ксиленол помаранчевий у дозі 90 мг/кг маси тіла підшкірно. Всім пацюкам у День 14 і День 13, а також у День 4 і День 3 перед умертвінням вводили кальцеїн у дозі 10 мг/кг підшкірно.

Досліджувані препарати:

PTH (1-38) (компанія Zeneca (Cambridge Research Biochemicals) № - DG-12-14071, партія 14071): носій (підкислений фізіологічний розчин) з 2 % інактивованої пацючої сироватки

Сполука Прикладу 1: 1 % СМС/0,25 % Tween 80, 0,5 мл на пацюка в перерахунку на масу тіла.

Кінцеві точки та вимірювані параметри

1. Маса тіла: перед і двічі на тиждень, відповідно коригують об'єм дози

2. ЯМР: на початку і в кінці дослідження

3. М'язи: лівий литковий, чотириголовий м'яз, камбаловидний, леватор заднього проходу, сім'яні пухирці (SV), передміхурова залоза і серце. Спочатку визначають масу у вологому стані, потім збирають для аналізу РНК або гістологічного аналізу.

4. Зразки сироватки на кінцевій стадії дослідження відбирають у всіх тварин, і зберігають при температурі -80 °C, 1×100 мкл (OCN), 2×150 мкл (IGF-1 і для зберігання), 1×300 мкл (Chem 18), 2×500 мкл (один для BSALP, один для зберігання).

5. Зразки кісткової тканини: по одній стегновій кістці та одному поперековому хребцю фіксують (50:50 етанол/фізіологічний розчин) для КТ (комп'ютерна томографія) і біомеханічних випробувань; одну великогомілкову кістку відбирають для PALP/кальцеїнового аналізу з відокремленням епіфізу (в 70 % етанолі), іншу великогомілкову кістку відбирають для гістоморфометричних аналізів (70 % етанол).

6. РК визначення: за декілька днів перед умертвінням у 3 пацюків з кожної групи, якій вводиться певна доза (n=3 лише в групах введення досліджуваної сполуки), з хвостової вени відбирають приблизно 0,2 мл крові в пробірки з EDTA в таких часових точках: 0,25 год., 0,5 год., 1 год., 2 год., 3 год., 4 год., 8 год. і 24 год. Зразки переносять в ADME для аналізу концентрації в плазмі.

Таблиця 2

Група №	Досліджувана група	Маса SV, % Sham
2	Orx	5,7
5	Orx+PTH (10 мкг/кг маси тіла/добу)	5,6
6	Orx+сполука Прикладу 1 (1 мг/кг маси тіла/добу)	5,6
7	Orx+сполука Прикладу 1 (3 мг/кг маси тіла/добу)	5,5
8	Orx+сполука Прикладу 1 (10 мг/кг маси тіла/добу)	6,0
9	Orx+сполука Прикладу 1 (20 мг/кг маси тіла/добу)	6,1

Після завершення дослідження за протоколом, який по суті відповідає опису, наведеному вище, було встановлено, що сполука Прикладу 1, після проведення лікування протягом 8 тижнів, не спричинила значного збільшення маси сім'яних пухирців у орхіектомізованих (у 8-тижневому віці) пацюків, які демонстрували гіперреактивність на будь-яку андрогенну стимуляцію.

Таблиця 3

Група №	Досліджувана група	LV-TBMC (мг) ± SD (середнє квадратичне відхилення)	LV-TBMD (мг/см <sup>3</sup> ) ± SD	LV-TA (см <sup>2</sup> ) ± SD (середнє квадратичне відхилення)
1	Sham	1,7871±0,0509	574,471±13,385	0,3463±9,71E-03
2	Orx	1,5814±0,0521	508,314±13,037	0,3456±7,61E-03
3	Orx+сполука Прикладу 1 (1 мг/кг маси тіла/добу)	1,54±0,0256	507,4±6,931	0,3378±7,08E-03
4	Orx+сполука Прикладу 1 (3 мг/кг маси тіла/добу)	1,79±0,095	549±15,965	0,362±0,0138
5	Orx+сполука Прикладу 1 (10 мг/кг маси тіла/добу)	1,7757±0,0607	562,843±16,104	0,3521±0,0125
6	Orx+сполука Прикладу 1 (20 мг/кг маси тіла/добу)	1,6943±0,0264	529,357±10,052	0,3563±0,0102

Наслідком обробки сполукою Прикладу 1 було значне збільшення мінеральної щільності трабекулярної кісткової тканини поперекового хребця (LV-TBMD) і тенденція до збільшення вмісту мінералів у трабекулярній кістковій тканині поперекового хребця (LV-TBMC) і площі поперечного перерізу (LV-TA) після проведення лікування протягом 8 тижнів орхіектомізованих (у 8-тижневому віці) пацюків, як показано на Фіг. 2 і в Таблиці 3.

In vivo дослідження для вивчення прямої антагоністичної дії сполуки Прикладу 1 в присутності TE

У цілому було використовують 36 Orx і 6 псевдооперованих пацюків-самців лінії Wistar (орхіектомізованих у 8-тижневому віці з подальшим відновленням протягом 4 тижнів). Пацюків утримують з 12 год. циклом чергування світла і темряви при температурі 22 °C з ad lib доступом

- до корму (TD 5001 з 0,95 % Ca і 0,67 % P, компанія Teklad, Madison, штат Вісконсін) і води. Пацюків довільно розподіляють на досліджувані групи (n=6) в залежності від маси тіла. Шлях введення для всіх груп, за виключенням ТЕ, є пероральним (po). ТЕ вводять підшкірно (Sc). Через 8 тижнів щоденного введення доз пацюків умертвлюють, зважують і збирають тканини.
- 5 Від кожної тварини збирали леватор заднього проходу, передміхурові залози і сім'яні пухирці. Результати наведені як середнє значення  $\pm$  SE (середня квадратична помилка).

Таблица 4

Група №	Досліджувана група	3 місяці День 0	5 місяців День 60	Шлях введення, сполука Прикладу 1	Шлях введення, ТЕ
1	Sham		6	po	Sc
2	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу		6	po	Sc
3	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг маси тіла/добу		6	po	Sc
4	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу		6	po	Sc
5	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг маси тіла/добу		6	po	Sc

- 10 Комбінація тестостерона енантату (1 мг/кг маси тіла/добу) і різних доз сполуки Прикладу 1 свідчить про тенденцію зменшення маси (у мг) сім'яних пухирців у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах, яка індукується лише ТЕ, як показано на Фіг. 3 і в Таблиці 4.

Порівняння середнього значення маси сім'яних пухирців у вологому стані

Порівняння з контролем з використання методу Даннетта

- 15 Контрольна група=d-ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу

|d| Alpha  
2,069715 0,005

Таблица 5

Група №	Група	Abs(Dif)-LSD	p-значення
1	Sham	0,979	<0,0001
2	ORX+TE, 1 мг/кг/добу	-0,52	1,0000
3	ORX+TE, 1 мг/кг/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг/добу	-0,34	0,8628
4	ORX+TE, 1 мг/кг/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг/добу	0,078	0,0187
5	ORX+TE, 1 мг/кг/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг/добу	0,536	<0,0001
6	ORX+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг/добу	1,411	<0,0001
7	ORX, Носій	1,422	<0,0001

Позитивні значення показують пари середніх, які значно відрізняються.

- 20 Наслідком сукупного лікування пацюків SD сполукою Прикладу 1 разом з ТЕ у дозі 1 мг/кг маси тіла було дозозалежне зменшення маси (у мг) передміхурової залози у вологому стані, нормалізованої відносно маси тіла в грамах, як показано на Фіг. 4 і в Таблиці 5.

Порівняння середнього значення маси передміхурової залози

Порівняння з контролем з використання методу Даннетта

Контрольна група=d-ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу

|d| Alpha  
2,69715 0,05

Таблиця 6

Група №	Група	Abs(Dif)-LSD	p-значення
1	Sham	0,509	<0,0001*
2	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу	-0,15	1,0000
3	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг маси тіла/добу	-0,11	0,9774
4	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг маси тіла/добу	0,025	0,0167*
5	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	0,036	0,0099*
6	ORX, носій	0,356	<0,0001*
7	ORX+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	0,357	<0,0001*

Позитивні значення показують пари середніх, які значно відрізняються, порівняно з групою лише з TE.

5

Таблиця 7

Група №	Досліджувана група	Маса SV, % Sham	Маса передміхурової залози, % Sham
2	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу	58,5	45,5
3	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг маси тіла/добу	53,5	42,7
4	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	42,0	30,3
5	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг маси тіла/добу	29,2	31,2

Таблиця 8

	hAR Ki (нМ)	Експресія гена LnCAP EC50 (нМ)		
		PSA	AR	CLUSTERIN
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Сполука Прикладу 1	1,95	2,64	1,64	>100

Порівняння сполуки Прикладу 1 з синтетичним тестостероном, R1881, свідчать, що сполука Прикладу 1, у разі застосування in vitro з клітинами раку передміхурової залози людини, є менш андрогенною, ніж R1881. У супереч цьому, біохімічна зв'язувальна спорідненість з людським андрогенним рецептором (Ki в нМ) є лише незначно зменшеною.

Чотиритижневе дослідження пероральної токсичності на пацюках

Це дослідження проводять з метою оцінки потенційної токсичності і токсикокінетики сполуки Прикладу 1 на пацюках після 4-тижневої експозиції. Трьом досліджуваним групам з 10 пацюків-самців і 10 пацюків-самиць лінії CD® [CrI:CD® (SD)] вводять досліджувану сполуку у відповідних дозах 15 мг/кг маси тіла/добу, 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу. Одна додаткова група з 10 тварин/стать є контролем і одержує носій, 5 % вітаміну Е TPGS (токоферилполіетиленглікольсукцинат), 1 % гідроксіетилцелюлози, 0,05 % протиспінювача компанії Dow Corning 1510-US у воді, очищеній зворотнім осмосом. Досліджувану сполуку або носій вводять всім групам через шлунковий зонд один раз на добу протягом 28 послідовних днів у дозі об'ємом 15 мл/кг маси тіла. На додаток до цього, три групи з 18 тварин/стать/групу є токсикокінетичним (ТК) контролем і одержують досліджувану сполуку тим самим шляхом і у дозі такого самого об'єму, що і основні досліджувані групи у дозах відповідного рівня 15 мг/кг маси тіла/добу, 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу. Ще одна додаткова група з трьох тварин/стать є токсикокінетичним контролем і одержує носій тим самим шляхом і у дозі такого самого об'єму, що і досліджувані групи.

Спостереження за захворюваністю, смертністю, травматизмом, а також наявністю корму і води здійснюються двічі на день для всіх тварин. Спостереження за клінічними ознаками здійснюються щотижня тільки для тварин основної досліджуваної групи. Масу тіла вимірюють і реєструють щотижня для всіх тварин, а споживання корму визначають і реєструють щотижня

для тварин основних досліджуваних груп. Офтальмоскопічні обстеження здійснюють перед початком дослідження на всіх тваринах, а перед кінцевою автопсією лише на тваринах основної досліджуваної групи. Зразки крові для клініко-патологічної оцінки відбирають від усіх тварин основної досліджуваної групи при автопсії. Зразки сечі збирають в останній день введення

препарату. Зразки крові для визначення концентрації досліджуваної сполуки в плазмі відбирають у тварин з груп ТК контролів у визначених часових точках в День 1 та День 28. Після кінцевого збору крові, тварин з груп ТК контролів умертвлюють, і тушки викидають без подальшої оцінки.

Зразки печінки для аналізу індукції печінкових ферментів збирають під час кінцевої автопсії від тварин основної досліджуваної групи. Після закінчення дослідження проводять патологоанатомічні обстеження, реєструють масу органів, і здійснюють мікроскопічне дослідження тканини передміхурових залоз і сім'яних пухирців. Додаткове мікроскопічне дослідження виконують на лівому сім'янику перших п'яти пацюків-самців групи при автопсії. Яєчники, матку з шийкою матки, піхву і молочні залози самиць визначають як органи-мішені.

Відповідно до протоколу, по суті як описано вище, системна експозиція ( $AUC_{0-24 \text{ год.}}$ ) сильно варіює і збільшується менше ніж дозопропорційно, причому експозиція самиць перевищує експозицію, яка спостерігалась у самців. Після 28 днів введення відповідних доз жодних ознак індукції мікросомальних ферментів печінки не спостерігають.

Під час дослідження не було жодних позапланових випадків смерті і появи клінічних ознак, пов'язаних з досліджуваним виробом. Маса тіла і споживання корму були більшими серед самиць, які одержували  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу, у порівнянні з контрольними тваринами. Ці особливості не впливають на загальний стан здоров'я тварин і не вважаються несприятливими. У самців не спостерігалось жодних особливостей, пов'язаних з масою тіла або зі споживанням корму.

У жодної статі не спостерігалось впливу на гематологію, коагуляцію або параметри дослідження сечі, пов'язаного з досліджуваним виробом; у самців не спостерігалось впливу на біохімічні параметри, пов'язаного з досліджуваним виробом. Вплив досліджуваного виробу на клінічні біохімічні параметри у самиць обмежується підвищенням рівня лужної фосфатази при дозах 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу (зростання у 1,33 рази і 1,45 рази, відповідно), зниженням рівня загального білка при дозах 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу (9 % і 10 % зниження, відповідно), зниженням рівня альбуміну при дозах 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу (12 % зниження при обох дозах) і зменшенням рівня глобулінів лише при дозі 1500 мг/кг маси тіла/добу (11 % зниження в порівнянні з контролем). Ці зміни мають мінімальну величину і не вважаються несприятливими.

У жодної статі не спостерігають макроскопічних змін або змін маси органів, пов'язаних з досліджуваним виробом; у самців не спостерігають мікроскопічних змін, пов'язаних з досліджуваним виробом. Мікроскопічні зміни, пов'язані з досліджуваним виробом, спостерігають в молочних залозах і яєчниках самиць при дозах  $\geq 15$  мг/кг маси тіла/добу, а в матці (з шийкою) і піхві при дозах  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу. Ці мікроскопічні зміни, які узгоджуються із пов'язаним з дозами подовженням репродуктивного циклу у пацюків-самиць при дозах  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу, вважаються пов'язаними з фармакологією досліджуваного виробу і не вважаються несприятливими.

На підставі результатів, викладених вище, NOAEL для цього дослідження вважається 1500 мг/кг маси тіла/добу, найвища доза, що вводилась. Середня усталена системна експозиція ( $AUC_{0-24 \text{ год.}}$ ) при NOAEL дозі 1500 мг/кг маси тіла/добу становить 102337 нг·год./мл у самців і 216853 нг·год./мл у самиць.

Шестимісячне дослідження пероральної токсичності на пацюках

Метою даного дослідження є вивчення токсичності та визначення токсикокінетики сполуки Прикладу 1 на пацюках лінії Sprague-Dawley після щоденного перорального введення через зонд протягом 26 тижнів і оцінка оборотності будь-яких змін після 12-тижневого відновного періоду. Досліджувані тварини одержують сполуку Прикладу 1 в 5 % вітаміну Е TPGS, 1 % гідроксіетилцелюлози, 0,05 % протиспінювача компанії Dow Corning 1510-US в очищеній воді перорально через зонд в добових дозах 15 мг/кг маси тіла/добу, 150 мг/кг маси тіла/добу або 1500 мг/кг маси тіла/добу. Контрольним тваринам, які одержували носій (15 пацюків/стать в основному дослідженні і 5 пацюків/стать у відновному дослідженні), щоденно перорально через зонд вводять дозу 5 % вітаміну Е TPGS, 1 % гідроксіетилцелюлози, 0,05 % протиспінювача компанії Dow Corning 1510-US в очищеній воді. Кожна основна досліджувана група складається з 15 самців і 15 самиць. Для відновного дослідження призначено 5 самців і 5 самиць: контрольна група для введення носія і група для введення дози об'ємом 150 мг/кг маси тіла/добу. Додаткові аналогічні групи з 6 пацюків/стать для контрольної групи, яка одержує



носій, і 12 пацюків/стать для груп, які одержують сполуку Прикладу 1, оцінювали на токсикокінетику. Усі дози вводили в об'ємі 15 мл/кг маси тіла.

Після щоденного перорального введення через зонд, як у самців, так і у самиць спостерігався сильно змінний вплив сполуки Прикладу 1 при всіх дозах, хоча і без перекриття середніх значень AUC (0-24 год.) між найнижчими та найвищими дозами, особливо в День 91 і День 182. Загалом, одно- і багатодозові експозиції ( $C_{max}$  і AUC (0-24 год.)) збільшуються менш ніж пропорційно від 15 мг/кг маси тіла/добу до 1500 мг/кг маси тіла/добу як у самців, так і у самиць. У самиць протягом усіх днів спостерігається більш висока експозиція, ніж у самців. У перший день експозиція самиць майже у 7 разів вища, ніж у самців, але ця різниця зменшується від 1 до 3 разів до Дня 182. Після багаторазових доз у жодній досліджуваній групі до Дня 182 не спостерігається накопичення сполуки Прикладу 1.

Відповідно до протоколу, по суті як описано вище, протягом дослідження не спостерігалось випадків загибелі, які могли б пов'язуватись із введенням сполуки Прикладу 1. Жодного впливу на офтальмологічні параметри або параметри аналізу сечі, пов'язаного з вказаною сполукою, не спостерігалось.

Дозозалежні клінічні ознаки, пов'язані зі сполукою Прикладу 1, спостерігались в самиць, які одержували лікування, і вони полягали у збільшенні випадків появи жирної шерсті і зменшенні випадків порідшання шерсті. Протягом перших 6 тижнів відновного періоду жирна шерсть спостерігалась також у самиць, які раніше одержували 150 мг/кг маси тіла/добу, але це явище зникало у цих тварин в другій половині 12-тижневого періоду відновлення. Наприкінці відновного періоду різниці у кількості випадків порідшання шерсті між досліджуваними і контрольними самицями не спостерігалось.

У самців, які одержували сполуку Прикладу 1, спостерігалось зниження маси тіла при дозах всіх рівнів, яке досягало -12 % у порівнянні з контрольними самцями наприкінці періоду лікування. У самиць спостерігалась протилежна тенденція, причому наприкінці періоду лікування маса тіла оброблених самиць була на 22 % вищою, ніж маса тіла аналогічних контрольних тварин. Зміна у самців, на відміну від самиць, все ще спостерігалась наприкінці періоду відновлення.

Самці, які одержували лікування, демонстрували більш низьке споживання корму, а самиці, які одержували лікування, в цілому демонстрували більш високий рівень споживання корму в порівнянні з контрольними тваринами протягом усього дослідження, що корелює з впливом на масу тіла, пов'язаним з лікуванням. Рівень споживання корму самцями, які одержували лікування, протягом періоду відновлення залишався нижчим в порівнянні з контрольними тваринами, але величина різниці наприкінці 12-тижневого періоду стала незначною. Різниці в споживанні корму протягом періоду відновлення між самицями, які одержували лікування, і контрольними тваринами не спостерігалось.

Введення сполуки Прикладу 1 у дозах  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу пов'язували зі збільшенням числа нейтрофілів, абсолютної кількості ретикулоцитів, підвищенням рівнів лужної фосфатази, калію і зниженням рівня глобулінів у самиць. При дозі 1500 мг/кг маси тіла/добу у самців спостерігали підвищення рівнів аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази, гамма-глутамілтрансферази, лужної фосфатази і загального білірубіну. При всіх об'ємах доз у самиць спостерігалось мінімальне зменшення загального вмісту білка і альбуміну. Після 12-тижневого відновного періоду у пацюків, які одержували 150 мг/кг маси тіла/добу, не спостерігалось жодних відмінностей в гематології, клінічній біохімії та параметрах аналізу сечі, що вказувало на оборотність цих змін.

Зміни, пов'язані з обробкою сполукою Прикладу 1, в основному пов'язували з репродуктивними тканинами самців і самиць та в цілому приписували фармакології молекули. Неприятливі зміни обмежувались сім'яниками і реєструвались в усіх групах, які одержували сполуку Прикладу 1. Зменшення маси сім'яників і придатків сім'яників спостерігалось в групі, яка одержувала 1500 мг/кг маси тіла/добу, а також у окремих самців, що одержували 15 мг/кг маси тіла/добу або 150 мг/кг маси тіла/добу, які мали ураження сім'яників. Макроскопічні зміни в репродуктивних тканинах самців, пов'язані з введенням сполуки Прикладу 1, спостерігались в сім'яниках і придатках сім'яників. М'які і/або невеликі сім'яники і невеликі придатки спостерігали у самців, які одержували  $\geq 50$  мг/кг маси тіла/добу, і у одного самця, який одержував 15 мг/кг маси тіла/добу. Мікроскопічні зміни в сім'яниках спостерігались при всіх рівнях доз, вони носили дегенеративний характер і включали вичерпання сперматидів з подовженими ядрами, атрофію інтерстиціальних ендокриноцитів та "моноклітинний" некроз сперматоцитів. Зміни в сім'яниках співпадали зі зменшенням циркулюючого лютеїнізуючого гормону (LH), що призводило до зниження передачі сигналів LH на рівні інтерстиціальних ендокриноцитів. Крім того, зниження рівнів циркулюючого LH привело до зниження секреції тестостерону сім'яниками, зі зменшенням

унаслідок цього сигналізації андрогенів на рівні сім'яних каналців. Лікування сполукою Прикладу 1 також пояснювалось зниженням маси передміхурової залози, що спостерігалось у самців, які одержували  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу. Ці репродуктивні та ендокринні зміни у самців можуть бути пов'язаними з фармакологічною активністю сполуки Прикладу 1, але раніше вони не були ідентифіковані впродовж 4-тижневого дослідження. Незважаючи на узгодження з фармакологією, пов'язаною зі сполукою Прикладу 1, базуючись на розмірі, морфологічні зміни в сім'яниках, які спостерігають на всіх рівнях доз, були віднесені до числа несприятливих. Вплив на репродуктивні тканини самців, а також на рівні LH і тестостерону, був звернутим к кінцю 12-тижневого періоду відновлення.

Введення сполуки Прикладу 1 було пов'язаним зі зниженням маси яєчника і макроскопічно малими яєчниками у самиць при всіх дозах. Зниження маси гіпофізу і рівнів циркулюючого LH спостерігалось у самиць, які одержували  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу. У репродуктивних тканинах самиць спостерігались мікроскопічні зміни, пов'язані з введенням сполуки Прикладу 1. Мікроскопічні зміни в матці і піхві спостерігались при дозах  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу, тоді як зміни в яєчнику і молочній залозі спостерігались при дозах всіх рівнів. Мікроскопічні зміни, які спостерігались в репродуктивних тканинах самиць, і зниження рівнів циркулюючого LH були, ймовірно, пов'язані з фармакологічною активністю сполуки Прикладу 1. Зміни в репродуктивних тканинах самиць, включаючи молочну залозу, відповідали змінам, про які раніше повідомлялось в 4-тижневому дослідженні токсичності повторних доз. Зміни в репродуктивних тканинах самиць могли ймовірно вплинути на репродуктивну здатність, але не на загальний стан здоров'я тварин. Вплив на репродуктивні тканини самиць і LH був звернутий до кінця 12-тижневого періоду відновлення.

Введення сполуки Прикладу 1 було пов'язане зі зниженням маси тимусу в самиць при усіх рівнях дози і у самців, які одержували  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу. Макроскопічні зміни малого тимусу спостерігались у самців, які одержували 1500 мг/кг маси тіла/добу. Додаткові мікроскопічні зміни, пов'язані з введенням сполуки Прикладу 1, спостерігались в печінці, селезінці, тимусі (у самців) і шкірі (у самиць) при дозах  $\geq 150$  мг/кг маси тіла/добу. Мікроскопічні зміни в шкірі спостерігались при всіх рівнях дози. Усі ці зміни зникли в кінці 12-тижневого періоду відновлення. Жодних інших мікроскопічних змін, змін маси органів і макроскопічних змін, пов'язаних з введенням сполуки Прикладу 1, не було.

На закінчення, щоденне пероральне введення сполуки Прикладу 1 через зонд в дозах 0 мг/кг маси тіла/добу, 15 мг/кг маси тіла/добу, 150 мг/кг маси тіла/добу і 1500 мг/кг маси тіла/добу протягом 26 тижнів було пов'язане з морфологічними і гормональними змінами в репродуктивних тканинах самців і самиць, які в цілому відносили на рахунок фармакології молекули, і які були обернуті через 12 тижнів у тварин, які попередньо одержували 150 мг/кг маси тіла/добу. Несприятливі зміни обмежувались сім'яниками і відбулись в усіх групах, які одержували сполуку Прикладу 1. На підставі величини цих дегенеративних змін сім'яників рівень спостережуваного негативного ефекту (NOAEL) не може бути встановленим у цьому дослідженні, і тому вважається таким, що становить  $< 15$  мг/кг маси тіла/добу.

Фертильність самців і токсикокінетичне дослідження на пацюках

Мета цього дослідження полягає у визначенні можливих несприятливих впливів в репродуктивному процесі в результаті лікування пацюків-самців до і під час періоду парування. Це включає в себе ідентифікацію функціональних репродуктивних ефектів у самця. Крім того, на аналогічних тваринах проводять токсикокінетичну оцінку рівнів сполуки Прикладу 1 в плазмі.

Сполуку Прикладу 1 вводять перорально за допомогою шлункового зонда в дозах 0 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла, 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла. Пацюків-самців (20/ на групу) обробляють щодня протягом 10 тижнів до спарювання, протягом 3-тижневого періоду спарювання і впродовж дня, який передуює умертвінню (у цілому від 100 доз до 101 дози). Пацюків-самиць не обробляють. Усіх тварин спостерігають двічі на день на випадок захворювання і смерті. Клінічні спостереження стосовно пацюків-самців реєструють щодня; масу тіла і споживання корму пацюками-самцями реєструють двічі на тиждень. Усіх пацюків-самців умертвлюють через 1 день після останнього введення дози. Сперматогенні оцінки кінцевих точок, яким піддають всіх самців, включають моторику, морфологію і концентрацію сперми у придатках. Сім'яники, придатки, передміхурові залози і сім'яні пухирці/коагуляційні залози/рідину від усіх самців зважують і зберігають. Сім'яники, придатки, передміхурові залози, сім'яні пухирці і коагуляційні залози самців, які вижили, піддають мікроскопічному дослідженню. Кожну самицю з ознаками спарювання на 15 день вагітності піддають черезочеревинній гістеректомії. Додатковим 3 самцям, 18 самцям, 18 самцям і ще 18 самцям, призначеним для використання на токсикокінетичному етапі дослідження, вводять сполуку в дозах 0 мг/кг маси тіла, 3 мг/кг маси тіла, 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла, відповідно, з подальшим

відбиранням проб для токсикокінетичної оцінки через відповідні проміжки часу після введення дози у День Дослідження 0 і День Дослідження 70.

Після щоденного перорального введення пацюкам-самцям сполуки Прикладу 1, час до досягнення  $C_{\max}$  становить від 2 год. до 8 год. у День 0, і від 0,5 год. до 2 год. у День 70. Середня експозиція (вимірюється AUC<sub>0-24 год.</sub>) збільшується у діапазоні доз 3-30 мг/кг маси тіла приблизно у 7,8 рази і в 4,5 рази у День 0 і День 70, відповідно, але залишається аналогічною в діапазоні доз 30-1000 мг/кг маси тіла, що дозволяє припустити наявність плато експозиції за межами дози 30 мг/кг маси тіла. Експозиції загалом схожі між разовими і багаторазовими дозами.

Відповідно до протоколу, по суті як описано вище, один самець в групі токсикокінетичного етапу, яка одержувала дозу 30 мг/кг, і 1 самець в контрольній групі основного етапу, яка одержувала носій, були знайдені мертвими в День Дослідження 24 і День Дослідження 70, відповідно. При відсутності смертності в групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, смерть в групі, яка одержувала дозу 30 мг/кг маси тіла, не визнали як таку, що є пов'язаною зі сполукою. Під час щоденних оглядів у 4 самців в групі, яка одержувала дозу 30 мг/кг маси тіла, і 3 самців у групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, помітили збільшення кількості випадків появи матеріалу червоного кольору навколо 1 ока або обох очей починаючи вже з Дня Дослідження 8 і Дня Дослідження 20, відповідно. Жодних інших, пов'язаних зі сполукою, клінічних змін у самців в групах, які одержували дози у 3 мг/кг маси тіла, 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла під час щоденних оглядів або приблизно через 1 год. після введення дози помічено не було. Введення сполуки при всіх рівнях доз впливу на середню масу тіла, приріст маси тіла і споживання корму не справляло.

Дозозалежна нижча абсолютна і відносна (до маси тіла і головного мозку) маса репродуктивних органів самців, у тому числі сім'яників, придатків (інтактних і каудальної частини), передміхурової залози, сім'яних пухирців/коагуляційної залози/допоміжних рідин спостерігалась в групах, які одержували дозу 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла. Вплив маси органу, що спостерігався в сім'яниках, відповідав гістологічним змінам, що характеризувались атрофією інтерстиціальних ендокриноцитів і зародкового епітелію. Ці зміни, разом зі скороченням популяції зрілих сперматозоїдів у придатках сім'яників у обох групах і зниженням секреції в додаткових статевих залозах, які спостерігались в групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, були визнані такими, що відповідають пригніченню синтезу андрогенів (тестостерону) і/або секреції клітин Лейдіга чи пригніченню рецепторів гормонів в органах-мішенях. Впливи, які спостерігались в репродуктивних органах у групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, відповідали зниженню репродуктивної функції. У групах, які одержували дозу 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла, вплив на масу органів, який спостерігався в допоміжних статевих залозах (передміхуровій залозі, сім'яних пухирцях і коагуляційних залозах), визнали пов'язаними з фармакологією сполуки.

Пов'язаний зі сполукою вплив на кінцеві точки сперматогенезу спостерігався в групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла. Зменшену масу придатків спостерігали в групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, і це відповідало більш низькій середній концентрації сім'яної рідини в придатках в цій групі. Крім того, в групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, спостерігалось пов'язане зі сполукою зменшення відсотку морфологічно нормальної сім'яної рідини, як наслідок більшого числа сперматозоїдів з головкою, відсутньою або відокремленою від джгутика. Ці впливи у самців групи, яка одержувала дозу 1000 мг/кг маси тіла, корелювали з більш низькими показниками спарювання, фертильності і копулювання. Крім того, у групі, яка одержувала дозу 1000 мг/кг, спостерігався трохи довший передкоітальний інтервал, у порівнянні з контрольною групою. У групах, які одержували дозу 3 мг/кг маси тіла і 30 мг/кг маси тіла, введення сполуки на кінцеві точки сперматогенезу і репродуктивні характеристики не впливало.

Введення самцям сполуки у дозах 3 мг/кг маси тіла, 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла не впливало на внутрішньоматкову виживаність ембріонів.

На закінчення, жодний рівень дозування не впливав на масу тіла самців, споживання корму або пов'язані зі сполукою негативні клінічні зміни. Пов'язаний зі сполукою несприятливий вплив на репродуктивні тканини і параметри сперматогенезу самців спостерігали при дозах 30 мг/кг маси тіла і 1000 мг/кг маси тіла. Зменшення маси репродуктивних органів самців відбувалось при дозі 1000 мг/кг маси тіла, і відповідало впливу на концентрацію і морфологію сім'яної рідини в придатках. Крім того, спостерігались мікроскопічні зміни в сім'яниках, придатках, передміхуровій залозі, сім'яних пухирцях і коагуляційній залозі при дозі 1000 мг/кг маси тіла, що відповідало зниженню показників спарювання, фертильності і копулювання в цій групі. Хоча зниження репродуктивної функції в цілому корелювало з гістологічними змінами репродуктивної

тканини самців на груповій основі, кореляція на індивідуальній тваринній основі не завжди була очевидною. У групі, яка одержувала дозу 30 мг/кг маси тіла, спостерігали зменшення маси репродуктивних органів і мікроскопічні зміни в сім'яниках і придатках. У групі, яка одержувала дозу 30 мг/кг маси тіла, не спостерігали відповідного впливу на репродуктивну функцію, що наводить на думку про те, що фармакологічний сигнал, незважаючи на присутність, не був досить великим, щоб вплинути на функціональну репродукцію. Грунтуючись на цих висновках, NOAEL для репродуктивної токсичності та системної токсичності самців дорівнював 3 мг/кг маси тіла. Доза 3 мг/кг маси тіла відповідає значенню експозиції ( $AUC_{0-24 \text{ год.}}$ ) у День Дослідження 70 10,954 нг·год./мл.

Чотири тижневе дослідження пероральної токсичності на собаках

Це дослідження проводять з метою оцінки потенційної токсичності та токсикінетики сполуки Прикладу 1, селективного модулятора андрогенних рецепторів (SARM), на собаках після перорального введення капсул двічі на день протягом 4 тижнів. Трьом групам, які одержували лікування, з трьох самців і трьох самок собак породи коротконогий гончак вводять досліджуваний засіб у дозах відповідних рівнів 6 мг/кг маси тіла/добу, 60 мг/кг маси тіла/добу або 300 мг/кг маси тіла/добу. Ще одна додаткова група з трьох тварин/стать служить контролем і одержує носій, 80 % ПЕГ 3350/20 % вітаміну Е TPGS (у об'ємному відношенні) у капсулах для перорального введення. Вказаний досліджуваний засіб або носій вводять усім групам у капсулах для перорального введення двічі на день протягом 28 послідовних днів у дозі об'ємом 1,5 мл/кг маси тіла/дозу.

Спостереження за смертністю, захворюваністю, травматизмом, а також наявністю корму і води проводяться двічі на день для всіх тварин. Докладні клінічні спостереження проводяться щотижня. Маса тіла вимірюють і реєструють у день після прийому, перед довільним розподілом і щотижнево протягом дослідження. Споживання корму визначається і реєструється щотижня. Офтальмоскопічні обстеження проводять перед кінцевою автопсією. Об'єктивні обстеження проводять перед випробуванням. Неврологічні обстеження проводять протягом Тижня 1 і Тижня 4. Електрокардіографічні обстеження проводять двічі перед початком введення лікарського препарату і перед та приблизно через 2 год. ( $\pm 15$  хв) після ранкового введення досліджуваного виробу у День 3 і День 26. Зразки крові збирають двічі перед проведенням випробування, а зразки крові і сечі для клініко-патологічної оцінки збирають від усіх тварин перед кінцевою автопсією. Проби крові для визначення концентрації досліджуваного виробу в плазмі відбирають у всіх тварин у визначених часових точках в День 1 та День 28. Токсикокінетичні параметри досліджуваного виробу визначають у досліджуваних тварин за даними залежності "концентрація-час". Після закінчення дослідження проводять патологоанатомічні обстеження, реєструють масу органів і здійснюють мікроскопічне дослідження сім'яників, придатків і передміхурових залоз. Потенціал сполуки Прикладу 1 щодо індукції цитохрому P450 визначається шляхом аналізу заморожених зразків печінки на загальний вміст цитохрому P450.

Відповідно до протоколу, по суті як описано вище, у жодному зі зразків плазми від контрольних тварин не було виявлено вимірних ( $< 1$  нг/мл) концентрацій сполуки Прикладу 1. Жодних відмінностей в концентрації сполуки Прикладу 1 в плазмі самців і самок відзначено не було, що вказує на відсутність статевого впливу на експозицію. Експозиція сполуки Прикладу 1 збільшилась менш ніж дозопропорційно у тварин, які одержували 6 мг/кг маси тіла/добу і 60 мг/кг маси тіла/добу, і, як видається, досягала плато при 60 мг/кг маси тіла/добу, оскільки концентрації в плазмі були аналогічними концентраціям при 300 мг/кг маси тіла/добу.

52-тижневе дослідження токсичності і токсикінетики на собаках

Мета цього дослідження полягає в оцінюванні токсичності і визначенні токсикінетики досліджуваного засобу, сполуки Прикладу 1, при щоденному введенні собакам у капсулах протягом щонайменше 52 тижнів, а також в оцінюванні оборотності, стійкості або уповільненого виникнення будь-яких впливів після 13-тижневого відновного періоду.

Самців і самок чистокровної породи коротконогих гончаків розподіляють на групи, і дози вводять відповідно до Таблиці 9 у капсулах для перорального введення, що містять (1 мл/кг маси тіла) 0 мг [1 % (у відношенні маси до об'єму) карбоксиметилцелюлози натрію (низька в'язкість/25-50 сантипуаз), 0,5 % (у відношенні маси до об'єму) лаурилсульфата натрію і 0,05 % (у об'ємному відношенні) протиспінювача компанії Dow Corning® 1510-US у воді, очищений шляхом зворотного осмосу] 3 мг, 10 мг або 100 мг сполуки Прикладу 1/кг маси тіла маси тіла. Усі тварини одержують однакову кількість капсул, а тварини Групи 1 одержують капсули, що містять лише контрольний носій. По три тварини/стать з Групи 1 і Групи 4 призначають у групу тварин для відновлення.

Таблиця 9

Група	Кількість тварин		Доза	Концентрація дози
	Самці	Самиці	(мг сполуки Прикладу 1/кг маси тіла)	(мг сполуки Прикладу 1/кг маси тіла)
1 (Контроль)	7	7	0	0
2 (Низька)	4	4	3	3
3 (Середня)	4	4	10	10
4 (Висока)	7	7	100	100

Оцінка токсичності базується на смертності, клінічних ознаках, масі тіла і зміні маси тіла, споживанні корму, офтальмологічних та неврологічних оцінках, електрокардіографічних вимірах, аналізах гормонів (тестостерону, прогестерону, лютеїнізуючого гормону і фолікулостимулюючого гормону), оцінці сім'яної рідини (об'єм еякуляту і кількість сперматозоїдів, густина, морфологія і рухливість), а також клініко-анатомічній патології. Проби крові збирають для аналізу досліджуваного метаболіту і токсикокінетичних оцінок.

Відповідно до протоколу, по суті як описано вище, системний вплив сполуки Прикладу 1 збільшується зі збільшенням рівня дози від 3 мг/кг до 100 мг/кг. Збільшення середніх  $C_{max}$  і  $AUC_{0-24 \text{ год.}}$ , як правило, є меншим за дозопропорційне. Суттєвої різниці токсикокінетичних параметрів, пов'язаної зі статтю, не спостерігалось. Накопичення сполуки Прикладу 1 у собак спостерігалось після багаторазових введень вказаного лікарського препарату.

Усі тварини вижили до запланованого умертвіння. Клінічними ознаками, пов'язаними зі сполукою, було посилення сльозотечі у тварин, які одержували >3 мг/кг, і зниження або відсутність тічкового циклу у самиць, які одержували >3 мг/кг.

Токсикологічно важливих відмінностей середньої маси тіла, приросту маси тіла і споживання їжі відзначено не було. Жодних офтальмологічних або неврологічних порушень не відбулось.

Триваліший інтервал QT і виправлений інтервал QT (QTc) спостерігали перед введенням дози і через 2 год. після введення дози в День 3, День 86, і День 359 етапу введення лікарського препарату в групі об'єднаних статей, яка одержувала дозу 100 мг/кг маси тіла. Величина збільшення середнього інтервалу QTc в групі об'єднаних статей, яка одержувала дозу 100 мг/кг маси тіла протягом всього етапу введення лікарського препарату, становила від 14 мс до 21 мс (від 6 % до 9 %) у порівнянні з середніми значеннями для контрольних тварин. Пов'язаних зі сполукою змін інтервалу QT або QTc в День 88 етапу відновлення в групі об'єднаних статей, яка одержувала дозу 100 мг/кг маси тіла, або у День 3, День 86 або День 359 етапу введення лікарського препарату у тварин, які одержували дозу 3 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла, відзначено не було. Пов'язаних зі сполукою Прикладу 1 змін інтервалу PR, тривалості QRS, інтервалу RR або частоти серцевих скорочень в День 3, День 86 або День 359 етапу введення лікарського препарату у тварин, які одержували дозу 3 мг/кг маси тіла, 10 мг/кг маси тіла або 100 мг/кг маси тіла або в День 88 етапу відновлення у тварин, які одержували дозу 100 мг/кг, не спостерігалось. У ході якісної оцінки електрокардіограм не було виявлено порушень ритму або якісних змін ЕКГ, які могли б бути віднесені на рахунок сполуки Прикладу 1.

На етапі введення лікарського препарату в самців при всіх рівнях дози відбулось пов'язане зі сполукою Прикладу 1 дозозалежне зниження загальної кількості сперматозоїдів, яке було віднесено на рахунок зменшення маси еякуляту. При оцінюванні на 52 тижні (День 355 і День 360 етапу введення лікарського препарату), загальна кількість сперматозоїдів в порівнянні з контролем була знижена >55 %, >50 % і >91 % у самців, яким вводили дозу 3 мг/кг маси тіла, 10 мг/кг маси тіла або 100 мг/кг маси тіла, відповідно. Вплив на загальну кількість сперматозоїдів повністю зник на етапі відновлення. У жодній групі не спостерігали пов'язаного зі сполукою Прикладу 1 впливу на середню густину сперми, рухливість або морфологію.

Гормональні зміни спостерігали у самців і самиць, які одержували дозу >3 мг/кг маси тіла. Зміни були такими, що не протирічать фармакології досліджуваного продукту і корелювали з мікроскопічними змінами. У самців спостерігалось зниження рівня тестостерону і підвищення рівня LH. Підвищені рівні LH і знижені рівні прогестерону в самиць були сумісними з анеструсом і зменшенням кількості жовтих тіл, виявленим мікроскопічним шляхом. Гормональні рівні повернулись до контрольних рівнів на етапі відновлення.

Пов'язані зі сполукою клініко-патологічні впливи обмежувались підвищенням (від мінімального до помірного) активності аланінамінотрансферази у самців і самиць на всіх рівнях дози (найбільший вплив припадав на самиць, які одержували дозу 100 мг/кг маси тіла) і зниженням (від мінімального до помірного) рівня холестерину у самців і самиць, які одержували дозу 3 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла (найбільший вплив припадав на тварин, які

одержували дозу 3 мг/кг маси тіла). Вплив на активність аланінамінотрансферази при дозі 100 мг/кг демонстрував зворотність після етапу відновлення. Зворотність впливу на концентрацію холестерину при дозі 3 мг/кг маси тіла і 10 мг/кг маси тіла не змогла бути оцінена, оскільки на етапі відновлення не було жодної тварини з цими рівнями доз. Жоден з цих впливів не був пов'язаний зі співвідносними мікроскопічними змінами.

У репродуктивних тканинах самців і самиць спостерігали фармакологічно очікувані пов'язані зі сполукою морфологічні зміни. У самців спостерігалась пов'язана зі сполукою і зворотно зменшена маса передміхурової залози, придатків і печінки/жовчного міхура, що, за винятком змін в печінці/жовчному міхурі, корелювало з мікроскопічними змінами. У передміхуровій залозі самців, які одержували дозу >3 мг/кг маси тіла, спостерігалась зворотна атрофія гронаподібної структури епітелію передміхурової залози. Самці, які одержували дозу >3 мг/кг маси тіла, мали зворотно зменшений каналцевий діаметр каудальної (хвостової) частини придатку, а самці, які одержували дозу 100 мг/кг маси тіла, мали зворотну атрофію каналцевого епітелію придатку. Самиці, які одержували дозу >3 мг/кг маси тіла, мали зменшену кількість або відсутність жовтих тіл зі стадією анаструса в яєчнику. Ця зміна зазвичай супроводжується відсутністю розвитку частки молочної залози, а також очікуваними реакціями вторинних репродуктивних тканин на анаструс: матка, шийка матки, піхва і молочна залоза мають відповідні етапу відмітні ознаки атрофії, що відповідає тривалому анаструсу.

Разом ці зміни у самиць узгоджуються з пов'язаним зі сполукою порушенням нормального репродуктивного циклу. На етапі відновлення у 2/3 самиць, які одержували дозу 100 мг/кг маси тіла, спостерігали діеструс на етапі репродуктивного циклу і розвиток часток молочної залози, що вказує на повернення до нормальної циклічної активності, хоча ніяких клінічних ознак репродуктивного циклу на етапі відновлення не спостерігали.

Крім того, в наднирковій залозі і шкірі/підшкірному шарі спостерігались пов'язані зі сполукою зворотні мікроскопічні зміни. У наднирковій залозі самців, які одержували дозу >10 мг/кг маси тіла, і самиць, які одержували дозу 100 мг/кг маси тіла, спостерігали зменшену вакуолізацію пучкової і сітчастої зони. У шкірі тварин, які одержували дозу >3 мг/кг маси тіла, спостерігали зменшення вакуолізації сальної залози.

Отже, щоденне введення сполуки Прикладу 1 капсулою собакам протягом 52 тижнів в дозі 3 мг/кг маси тіла, 10 мг/кг маси тіла або 100 мг/кг маси тіла не призвело до негативних змін, пов'язаних зі сполукою. Зміни репродуктивної функції у самців (зниження кількості сперматозоїдів і об'єму еякуляту) і самиць (скорочення/відсутність течкового циклу) відбулись в усіх групах, які одержували сполуку Прикладу 1, і корелювали з мікроскопічними змінами. Ці зміни не впливають на загальний стан здоров'я тварин, узгоджуються з фармакологічною дією досліджуваного виробу і є оборотними. Тому NOAEL становить 100 мг/кг маси тіла. Після 361 дня введення лікарського препарату, доза 100 мг/кг маси тіла відповідала середнім значенням  $C_{\max}$  1496 нг/мл і 1885 нг/мл зі значенням  $AUC_{0-24 \text{ год}}$  22582 нг·год./мл і 31505 нг·год./мл у самців і самиць, відповідно.

Таблиця 10

Підсумки змін передміхурової залози у пацюків та собак, лікованих сполукою за Прикладом 1

Тривалість лікування (міс)	Пацюки						Фертильність самців (3 міс)		
	1 <sup>a</sup>			6 <sup>a</sup>					
Доза (мг/кг маси тіла/добу)	15	150	1500	15	150	1500	3	20	1000
Маса передміхурової залози (середній % зменшення)	--	--	--	--	↓ 30%	↓ 34%	--	↓ 23%	↓ 39%
Атрофія передміхурової залози (кількість уражених / кількість оглянутих)	--	--	--	--	--	4/15	--	--	--
Середня $AUC_{0-24 \text{ год}}$ у самців незадовго до закінчення дослідження (нг·год./мл)	35733	72283	102337	15902	34132	82690	10954	49734	56009

-- Жодного впливу не спостерігалось

<sup>a</sup> Носій, 5 % вітамін Е TPGS, 1 % гідроксіетилцелюлози, 0,05 % протиспінювача DC 15-10-US у очищеній воді

Таблиця 10

Підсумки змін передміхурової залози у пацюків та собак, лікованих сполукою за Прикладом 1

Пацюки									
Тривалість лікування (міс)	1 <sup>a</sup>			6 <sup>a</sup>			12 <sup>b</sup>		
Доза (мг/кг маси тіла/добу)	3	30	150	3	30	300	3	10	100
Маса передміхурової залози (середній % зменшення)	--	--	--	↓ 63%	↓ 66%	↓ 75%	↓ 60%	↓ 62%	↓ 80%
Атрофія передміхурової залози (кількість уражених / кількість оглянутих)	--	--	1/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	4/4
Середня AUC <sub>0-24 год</sub> у самців незадовго до закінчення дослідження (нг·год/мл)	17984	61674	46528	6492	44448	53032	3621	13408	22582

-- Жодного впливу не спостерігалось

<sup>a</sup> Носій, 80 % ПЕГ 1350, 20 % вітамін Е TPGS (у об'ємному відношенні),

<sup>b</sup> Носій, 1 % (у відношенні маси до об'єму) натрійкарбоксиметилцелюлоза, 0,5 % (у відношенні маси до об'єму) лаурилсульфату натрію, 0,05 % (у об'ємному відношенні) протиспінювача компанії Dow CorningT 15-10-US у воді, очищеній шляхом зворотного осмосу

Наслідком лікування сполукою Прикладу 1 інтактних пацюків або собак протягом періоду часу тривалістю від 1 міс. до 12 міс. було значне зменшення розміру передміхурової залози, що додатково вказує на те, що вказана сполука не збільшує андрогенного ризику гіперплазії передміхурової залози з часом.

In vivo дослідження для вивчення будь-якого прямого антагоністичного ефекту сполуки Прикладі 1 в присутності ТЕ

Усього було використано 36 орхіектомізованих (ORX) і 6 псевдооперованих пацюків-самців лінії Wistar (орхіектомізованих у 8-тижневому віці з подальшим відновленням протягом 4 тижнів). Пацюків утримували з 12 год. циклом чергування світла і темряви при температурі 22 °C з ad lib доступом до корму (TD 5001 з 0,95 % Ca і 0,67 % P, компанія Teklad, Madison, штат Вісконсін) і води. Пацюків довільно розподіляли на досліджувані групи (n=6) в залежності від маси тіла. Шлях введення для всіх груп, за виключенням ТЕ, є пероральним. ТЕ вводять підшкірним шляхом. Через 8 тижнів щоденного введення лікарського препарату пацюків забивали, зважували і збирали тканини. Від кожної тварини збирали леватор заднього проходу, передміхурові залози і сім'яні пухирці. Результати наведені як середнє значення ±SE (середня квадратична помилка).

Порівняння середньої маси сім'яних пухирців у вологому стані

Порівняння з контрольними тваринами з використанням методу Даннетта

Контрольна група=d-ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу

|d| Альфа  
2,69715 0,05

Таблиця 11

Група №	Група	Abs(Dif)-LSD	p-значення
1	Sham	0,979	<0,0001
2	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу	-0,52	1,0000
3	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг маси тіла/добу	-0,34	0,8628
4	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	0,078	0,0187
5	ORX+TE, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг маси тіла/добу	0,536	<0,0001
6	ORX+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	1,411	<0,0001
7	ORX, Носій	1,422	<0,0001

Позитивні значення показують пари середніх, які значно відрізняються.

Комбінація тестостерона енантата (1 мг/кг маси тіла/добу) і різних доз сполуки Прикладу 1

виявляє тенденцію до зниження маси (у мг) сім'яних пухирців у вологому стані, нормалізованої відносно маси (у г) тіла, яке індукується лише ТЕ, як показано на Фіг. 5 і в Таблиці 11.

Порівняння середнього значення маси передміхурової залози

Порівняння з контролем з використання методу Даннетта

5 Контрольна група=d-ORX+ТЕ, 1 мг/кг маси тіла/добу

|d| Alpha

2,69715 0,05

Таблиця 12

Група №	Група	Abs(Dif)-LSD	p-значення
1	Sham	0,509	<0,0001*
2	ORX+ТЕ, 1 мг/кг маси тіла/добу	-0,15	1,0000
3	ORX+ТЕ, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 3 мг/кг маси тіла/добу	-0,11	0,9774
4	ORX+ТЕ, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 30 мг/кг маси тіла/добу	0,025	0,0167*
5	ORX+ТЕ, 1 мг/кг маси тіла/добу+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	0,036	0,0099*
6	ORX, Носій	0,356	<0,0001*
7	ORX+сполука Прикладу 1, 10 мг/кг маси тіла/добу	0,357	<0,0001*

Позитивні значення показують пари середніх, які значно відрізняються, порівняно з групою лише з ТЕ.

10 Наслідком сукупного лікування пацюків SD сполукою Прикладу 1 разом з ТЕ у дозі 1 мг/кг маси тіла було дозозалежне зменшення маси (у мг) передміхурової залози у вологому стані, нормалізованої відносно маси (у г) тіла, як показано на Фіг. 6 і в Таблиці 12.

Таблиця 13

	HAR Ki (нМ)	Експресія гена LnCAP EC50 (нМ)		
		PSA	AR	CLUSTERIN
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Сполука Прикладу 1	1,95	2,64	1,64	>100

15 Порівняння сполуки Прикладу 1 з синтетичним тестостероном, R1881, показують, що сполука Прикладу 1, у разі застосування in vitro з клітинами раку передміхурової залози людини, є менш андрогенною, ніж R1881. У супереч цьому біохімічна зв'язувальна спорідненість з людським андрогенним рецептором (hAR; Ki в нМ) є лише незначно зменшеною.

Дослідження Фази Ia на здорових волонтерах

20 Дане дослідження фази 1 являє собою рандомізоване, плацебо-контрольоване, подвійне сліпе, однодозове, частково перехресне дослідження зі збільшенням дози, яке проводиться на 3 групах для введення лікарського препарату, що складаються зі здорових чоловіків і жінок постклімактеричного періоду. Тридцять осіб (10 на групу) довільно розподіляються в кожну групу для введення лікарського препарату.

25 Протягом обох періодів введення лікарського препарату особи запрошуються для ночівель до клінічного дослідного підрозділу (CRU). Суб'єктам вводять лікарський препарат пероральним шляхом після сніданку у День 1, і вони залишаються в CRU протягом приблизно 24 год. після введення дози. У кожній групі тривалість періоду вимивання між періодами введення лікарського препарату становить від 14 днів до 45 днів. Візит для виключення з дослідження відбувається приблизно через 5 днів після останнього введення лікарського препарату, Період 30 2. Доцільність підвищення дози встановлюється шляхом визначення безпеки на кожному етапі підвищення. Це дослідження здійснюють за подвійною сліпою, перехресною схемою з відсутністю інформації як у суб'єкта, так і у дослідника, для забезпечення одержання міжсуб'єктних даних для всіх визначень безпеки і переносності. Ця схема полегшує об'єктивну оцінку неблагоприятних явищ (АЕ).

35 Додержувались протоколу, який по суті відповідає наведеному вище. У результаті частково перехресної схеми приблизно 50 % суб'єктів одержали одноразову дозу сполуки Прикладу 1 і дозу плацебо з метою поліпшення виявлення значущих сигналів безпеки або переносності. Приблизно 50 % суб'єктів одержали 2 дози сполуки Прикладу 1, що дозволило провести



міжсуб'єктний аналіз даних з метою виявлення дозозалежності фармакокінетичних параметрів та інших кінцевих точок. Було вибрано мінімум 5-денний інтервал між періодами введення лікарського препарату для зведення до мінімуму перехідних ефектів між періодами лікування.

- Запланований діапазон доз для цього дослідження становив від 5 мг до 1000 мг сполуки Прикладу 1 і засновувався на *in vivo* ефективності на пацюках, виходячи з припущення про те, що експозиція, необхідна для спричинення 80 % кісткового ефекту (середнє значення величини навантаження середньої частини стрижневидної структури кістки і шийки стегнової кістки), у щурів така сама, як і експозиція, необхідна для людини. На основі алометрично спрогнозованого виведення (33 л/год., 90 % довірчий інтервал [CI]: від 24 л/год. до 46 л/год.) і біодоступності (49 %) у людини, така реакція в організмі людини, як очікується, відбудеться при дозах приблизно 71 мг/добу (90 % CI: від 29 мг/добу до 321 мг/добу).

- Ці дані свідчать про збільшення площини м'язу задньої частини гомілки, як було визначено шляхом візуалізації за допомогою периферичної комп'ютерної томографії литкового м'язу (площина м'язу задньої частини гомілки) після введення сполуки Прикладу 1 здоровим волонтерам, як показано на Фіг. 7.

Таблиця 14

Підсумки зміни сухої м'язової маси від вихідного рівня дозою на День 28 – Чоловіки

Досліджувана група	n	Середня мінімальна значуща різниця (95% CI)	Різниця у порівнянні з плацебо (95% CI) (P-значення)
Плацебо	7	-873.45 [-2318.30, 571.39]	
1 mg LY	7	675.52 [-762.14, 2113.18]	1548.97 [-491.08, 3589.02] [.130]
5 mg LY	8	587.66 [-757.35, 1932.67]	1461.11 [-510.41, 3432.63] [.139]
15 mg LY	2	2329.08 [-453.16, 5111.33]	3202.54 [100.93, 6304.14] [.044]
25 mg LY	2	956.18 [-1773.88, 3686.23]	1829.63 [-1281.37, 4940.62] [.236]
75 mg LY	4	-1557.21 [-3500.36, 385.94]	-683.76 [-3129.22, 1761.70] [.569]
Змішана модель: <code>chg=base dose ddfm=kr;</code>			
Одиниця: г			
Програма: <code>Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smim_update.sas</code>			

Таблиця 15

Підсумки зміни сухої м'язової маси від вихідного рівня дозою на День 28 – Жінки

Досліджувана група	n	Середня мінімальна значуща різниця (95% CI)	Різниця у порівнянні з плацебо (95% CI) (P-значення)
Плацебо	3	-742.27 [-3136.75, 1652.21]	
5 mg LY	3	1555.95 [-1092.94, 4204.84]	2298.22 [-2183.05, 6779.50] [.271]
15 mg LY	2	2919.58 [-679.64, 6518.81]	3661.85 [-1742.10, 9065.81] [.157]
25 mg LY	4	1482.24 [-1013.85, 3978.33]	2224.51 [48.22, 4400.81] [.046]
75 mg LY	2	1583.65 [-506.14, 3673.45]	2325.92 [-1178.94, 5830.78] [.164]
Змішана модель: <code>chg=base dose ddfm=kr;</code>			
Одиниця: г			
Програма: <code>Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smim_update.sas</code>			

- Ці дані, визначені за допомогою DEXA (двоенергетична рентгенівська абсорбціометрія), свідчать про збільшення сухої м'язової маси всього тіла після введення сполуки Прикладу 1 здоровим волонтерам. Ефект у чоловіків (стовпчик синього кольору) при рівні дози 5 мг є статистично значущим в порівнянні з дозою плацебо 0 мг, використовуючи критерій Даннетта

( $p < 0,05$ ), як показано на Фіг. 8 і в Таблиці 14 і Таблиці 15.

Таблиця 16

Підсумки зміни простатичного специфічного антигену від вихідного рівня  
у залежності від дози і часу – Чоловіки

Досліджувана група	Час/день	n	Середня мінімальна значуща різниця (95% CI)	Різниця у порівнянні з плацебо (95% CI) (P-значення)
Плацебо	14	7	0.04[-0.11, 0.20]	
	28	7	0.05[-0.11, 0.20]	
	35	7	0.03[-0.13, 0.18]	
1 mgLY	14	7	-0.06[-0.21, 0.09]	-0.10[-0.31, 0.12] [.362]
	28	7	-0.05[-0.20, 0.10]	-0.09[-0.31, 0.12] [.390]
	35	7	0.02[-0.13, 0.17]	-0.01[-0.22, 0.21] [.940]
5 mgLY	14	8	0.20[0.06, 0.34]	0.16[-0.05, 0.37] [.140]
	28	8	-0.00[-0.15, 0.14]	-0.05[-0.26, 0.16] [.635]
	35	8	0.20[0.06, 0.34]	0.17[-0.04, 0.35] [.106]
15 mgLY	14	2	-0.11[-0.40, 0.17]	-0.16[-0.48, 0.16] [.331]
	28	2	-0.27[-0.55, 0.01]	-0.31[-0.63, 0.01] [.055]
	35	2	0.25[-0.03, 0.53]	0.22[-0.10, 0.54] [.174]
25 mgLY	14	2	-0.15[-0.43, 0.13]	-0.19[-0.51, 0.13] [.243]
	28	2	-0.22[-0.50, 0.06]	-0.27[-0.59, 0.05] [.097]
	35	2	-0.14[-0.42, 0.14]	-0.17[-0.49, 0.15] [.295]
75 mgLY	14	4	-0.13[-0.33, 0.07]	-0.17[-0.43, 0.09] [.185]
	28	3	0.07[-0.15, 0.30]	0.03[-0.25, 0.30] [.851]
	35	4	0.03[-0.17, 0.23]	0.00[-0.26, 0.26] [.997]

Змішана модель: `chq=base dose VISITDY dose*VISITDY/ddfm=kr;repeated VISITDY/subject=subject type=cs;`

Одиниця: мкг/л

Програма: `Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smlab_update.sas`

- Дані, наведені на Фігурі, свідчать про відсутність будь-яких істотних змін рівнів простатичного специфічного антигену (PSA) від вихідного рівня в порівнянні з плацебо в будь-який момент часу або з будь-якою дозою сполуки Прикладу 1, як показано на Фіг. 9 і в Таблиці 16.

Дослідження Фази Ib на здорових волонтерах

- Це дослідження фази 1 являє собою рандомізоване, плацебо-контрольоване, з відсутністю інформації як у суб'єкта, так і у дослідника, багатодозове, зі збільшенням дози, паралельне дослідження сполуки Прикладу 1 на здорових суб'єктах. Це дослідження проводиться на 6 досліджуваних групах, і суб'єкти довільно розподіляються для введення добових доз сполуки Прикладу 1 або плацебо впродовж 4 тижнів. Перед кожним підвищенням дози здійснюють оцінку безпеки і переносності. Основні критерії включення/виключення до/з цього дослідження: суб'єктами є здорові чоловіки або здорові жінки постклімактеричного періоду віком від 30 років до 80 років з індексом маси тіла (BMI) у межах від 18 кг/м<sup>2</sup> до 32 кг/м<sup>2</sup> включно.

- Суб'єктів залучають до дослідження і довільно розподіляють після відбору. У День 1 та День 29 суб'єкти є стаціонарними пацієнтами науково-дослідного підрозділу (CRU). У День 1, День 2 і День 28 суб'єктам перорально вводять лікарський препарат після сніданку. Всі лабораторні аналізи, пов'язані з безпекою, збирають до сніданку і після нічного голодування тривалістю не менше 12 год.

- Після Дня 1 суб'єктів відпускають у День 2 після здійснення планових процедур, сніданку і введення лікарського препарату (приблизно через 24 год. після введення дози у День 1). Після Дня 28 суб'єктів відпускають у День 29 після здійснення планових процедур (приблизно через 24 год. після введення дози у День 28).

- Ці дані свідчать про зниження рівня тестостерону в сироватці після введення сполуки Прикладу 1 здоровим волонтерам, які мають нормально функціонуючі статеві залози. Зниження після обробки є більш вираженим у чоловіків, приймаючи до уваги їх відносно більш високий рівень тестостерону в сироватці крові. Таблиця відображає оцінку впливу після дослідження фази 1a в дозі 5 мг, як показано на Фіг. 10.

Таблиця 17

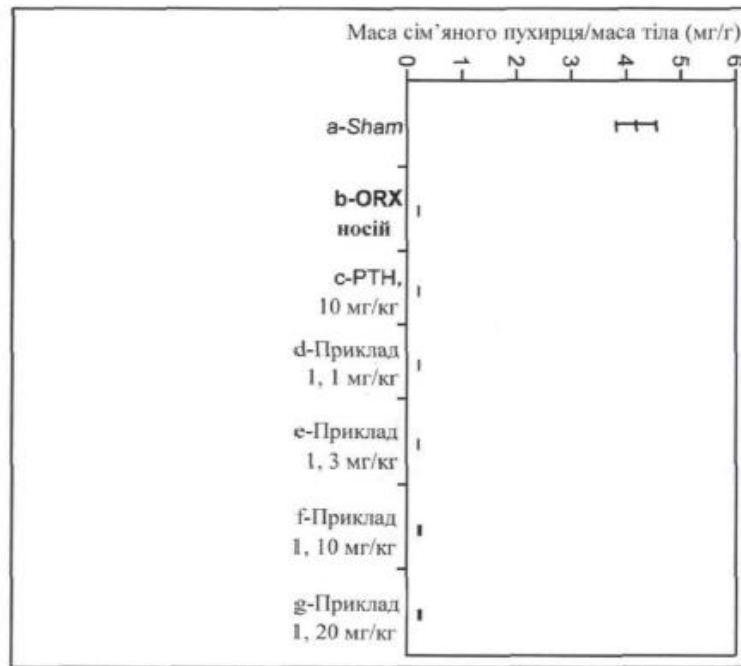
Підсумки зміни пропептида проколагена 1 типу (P1NP) від вихідного рівня у залежності від дози і часу – Чоловіки

Досліджувана група	Час/день	n	Середня мінімальна значуща різниця (95% CI)	Різниця у порівнянні з плацебо (95% CI) (P-значення)
Плацебо	14	7	-1.15 [-7.55, 5.24]	
	28	7	-1.32 [-7.72, 5.07]	
	35	7	-3.44 [-9.83, 2.96]	
1 mg LY	14	7	-3.55 [-9.70, 2.59]	-2.40 [-11.09, 6.29] [.580]
	28	7	0.16 [-5.98, 6.30]	1.49 [-7.20, 10.17] [.731]
	35	7	-5.70 [-11.84, 0.45]	-2.26 [-10.94, 6.43] [.602]
5 mg LY	14	8	2.11 [-3.66, 7.88]	3.27 [-5.56, 12.09] [.458]
	28	8	2.88 [-2.90, 8.65]	4.20 [-4.62, 13.02] [.341]
	35	8	-2.31 [-8.08, 3.46]	1.13 [-7.70, 9.95] [.797]
15 mg LY	14	2	1.34 [-10.64, 13.32]	2.49 [-11.62, 16.60] [.723]
	28	2	2.09 [-9.89, 14.07]	3.41 [-10.70, 17.52] [.627]
	35	2	-3.41 [-15.39, 8.57]	0.03 [-14.08, 14.14] [.997]
25 mg LY	14	2	-2.07 [-13.70, 9.56]	-0.92 [-14.54, 12.70] [.892]
	28	2	1.43 [-10.20, 13.06]	2.75 [-10.86, 16.37] [.685]
	35	2	-2.97 [-14.60, 8.66]	0.47 [-13.15, 14.08] [.945]
75 mg LY	14	4	-4.96 [-13.02, 3.09]	-3.81 [-14.06, 6.44] [.457]
	28	3	1.48 [-7.27, 10.24]	2.81 [-8.02, 13.64] [.604]
	35	4	-1.09 [-9.15, 6.97]	2.35 [-7.90, 12.60] [.646]

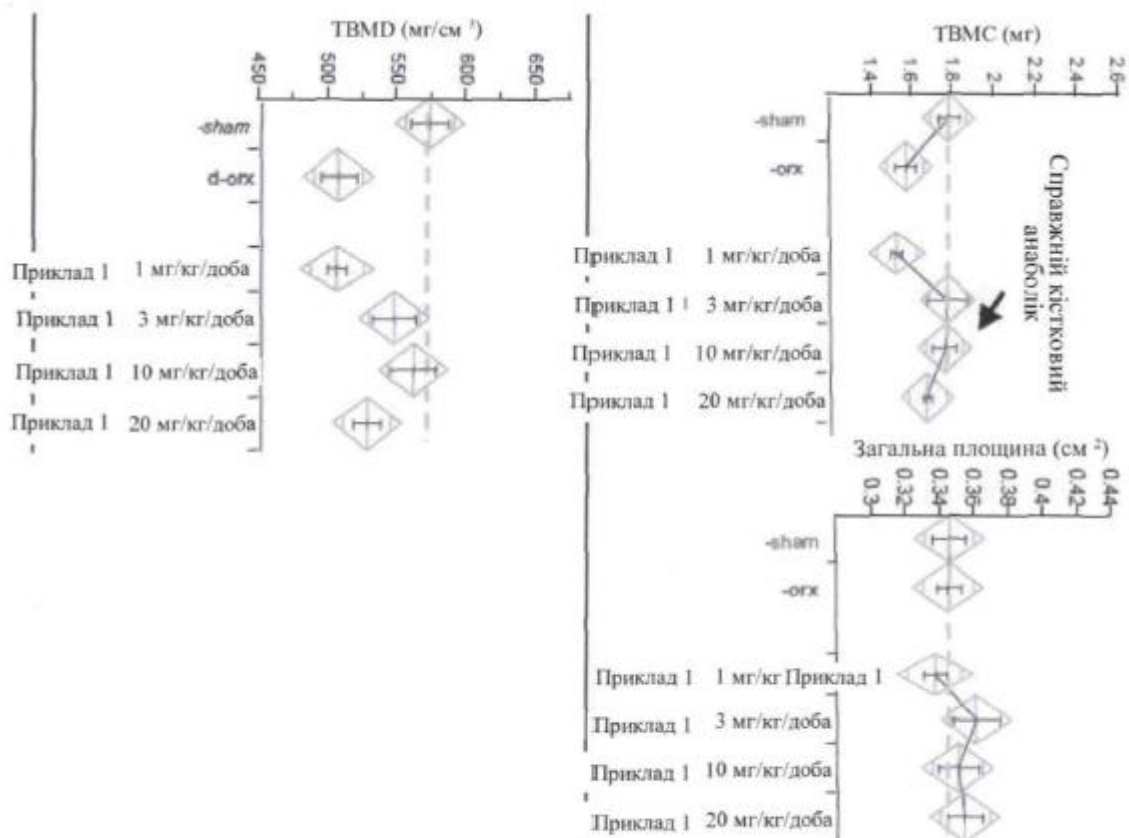
Змішана модель: `chg=base dose VISITDY dose*VISITDY/ddfm=kr;repeated VISITDY/subject=subject type=cs;`  
 Одиниця: мкг/л  
 Програма: `Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smlab_update.sas`

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

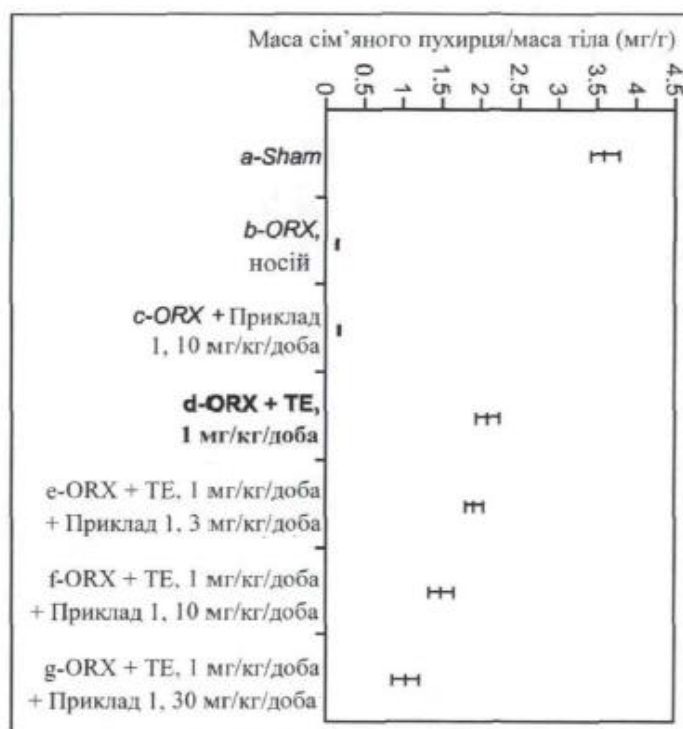
- 5 1. Спосіб лікування симптомів, що є наслідком вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією, який включає введення пацієнту, який потребує такого лікування, ефективної кількості ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі.
- 10 2. Спосіб за п. 1, де вказаними симптомами є втрата кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили.
3. Спосіб за п. 1, де вказаними симптомами є втрата лібідо і нападоподібне відчуття жару ("припливи").
4. Застосування сполуки ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі при лікуванні симптомів, які є наслідком вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.
- 15 5. Застосування за п. 4, де вказаними симптомами є втрата кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили.
- 20 6. Застосування за п. 4, де вказаними симптомами є втрата лібідо і нападоподібне відчуття жару ("припливи").
7. Застосування сполуки ізопропілового складного ефіру (S)-(7-ціано-4-піридин-2-ілметил-1,2,3,4-тетрагідроциклопента[b]індол-2-іл)-карбамінової кислоти або його фармацевтично прийнятної солі для виготовлення лікарського засобу для лікування симптомів, які є наслідком
- 25 вторинного гіпогонадізму, індукованого андроген-деприваційною терапією.
8. Застосування за п. 7, де вказаними симптомами є втрата кісткової маси, міцності кісток, м'язової маси або м'язової сили.
9. Застосування за п. 7, де вказаними симптомами є втрата лібідо і нападоподібне відчуття жару ("припливи").



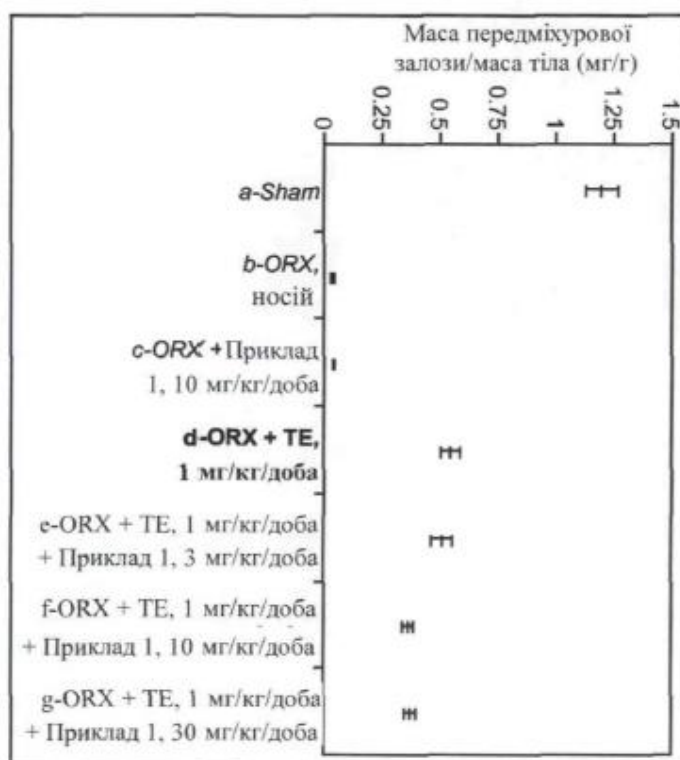
Фіг.1



Фіг.2



Фіг.3



Фіг.4

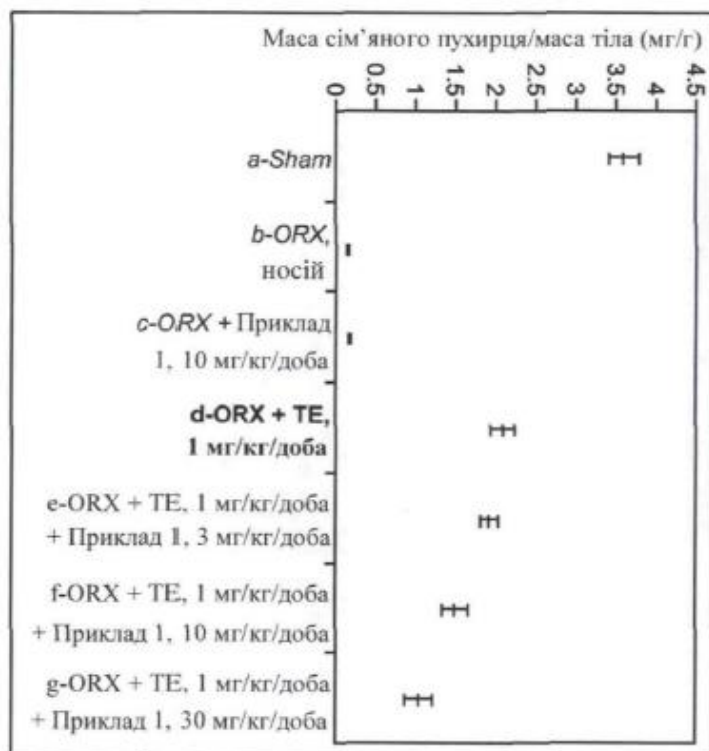


Fig.5

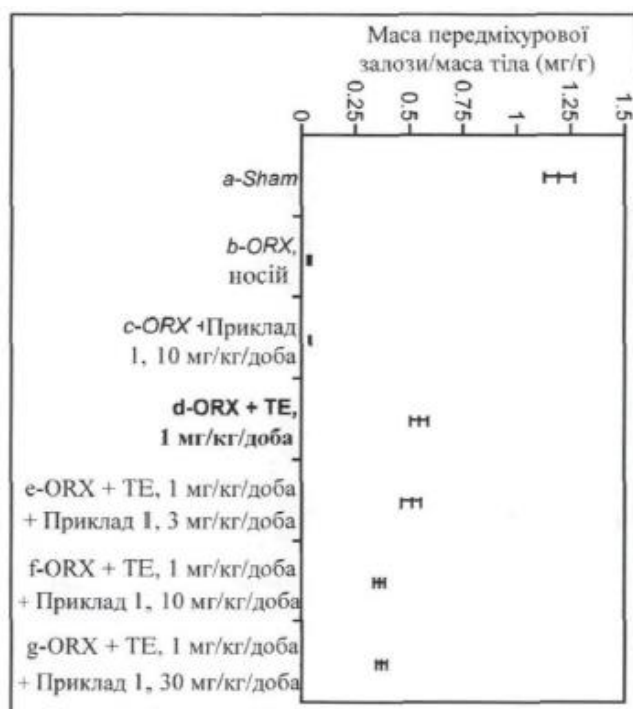
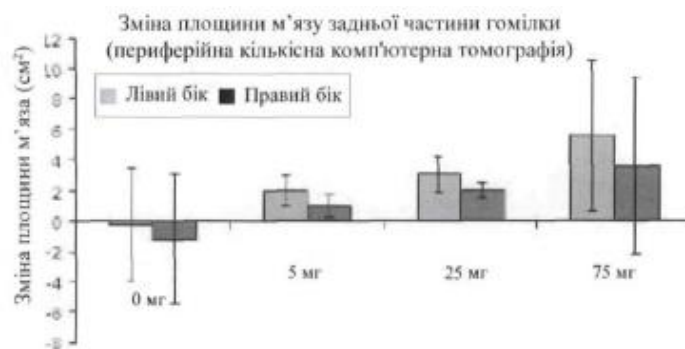
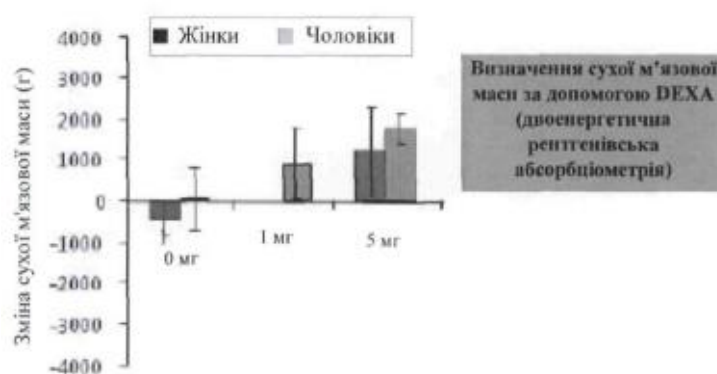


Fig.6

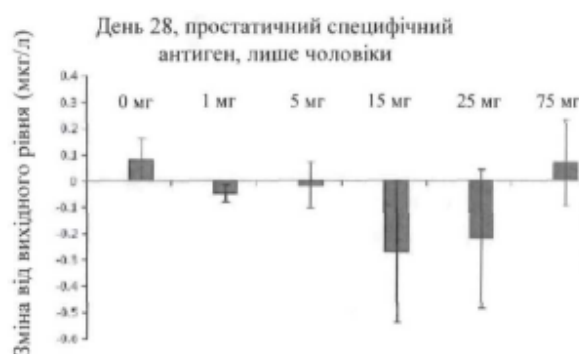




Фіг.7



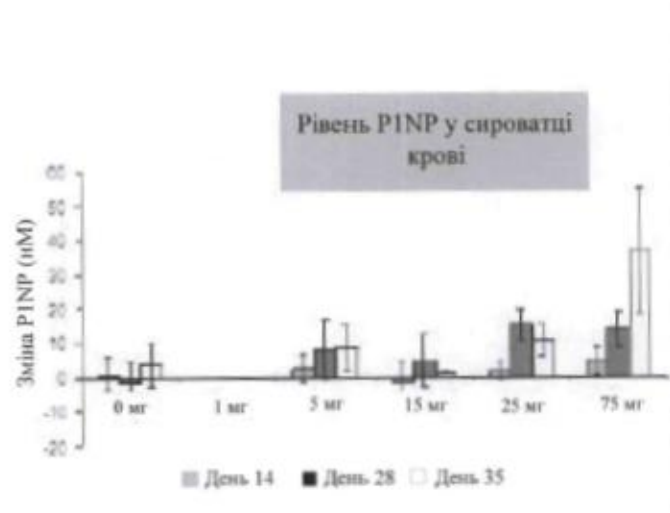
Фіг.8



Фіг.9



Фіг.10



Фіг.11

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601