

Винахід стосується використання агоністів рецептора 4-амінобуганової кислоти (В) (ГАБК_В) для придушення тимчасових релаксацій нижнього сфінктера стравоходу і для лікування хвороби гастроєзофагіального рефлюкса і/або регургітації у малюків.

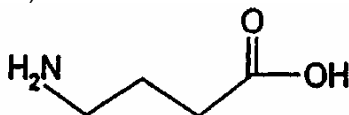
У деяких людей нижній сфінктер стравоходу (НСС) розслаблюється частіше, ніж у інших. Як наслідок, рідина з шлунку може пройти у стравохід, оскільки у таких випадках зникає механічний бар'єр для неї. Таке явище має назву рефлюкса.

Хвороба гастроєзофагіального рефлюкса (ХГЕР) є найбільш поширеною хворобою верхнього шлунково-кишкового тракту. Сучасна терапія спрямована на зменшення секреції шлункової кислоти або зменшення дії шлункової кислоти на стравохід шляхом очищення стравоходу, підвищення тону НСС і спорожнення шлунку. Вважалось, що рефлюкс викликається, головним чином, гіпотонією НСС. Однак, останні дослідження (див., наприклад, Holloway & Dent (1990) *Gastroenterol. Clin. N. Amer.*, 19, 517-535) показали, що явище рефлюкса трапляється найчастіше як наслідок тимчасових релаксацій НСС (ТРНСС), тобто релаксацій, не викликаних ковтанням. Було також показано, що секреція шлункової кислоти у хворих на ХГЕР є нормальною.

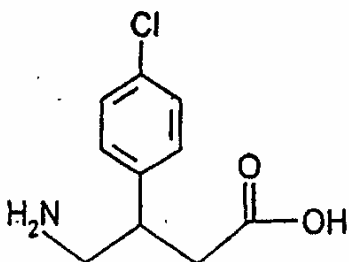
Таким чином, виникає потреба у сполуках, які знижують частоту ТРНСС і, отже, відвертають рефлюкс. У ідеальному випадку така сполука має мати тривалість дії приблизно 12 год., оскільки рефлюкс найчастіше трапляється удень і після прийому їжі. У WO 87/04077 і US 5 036 057 описано фармацевтичну композицію з локальним анестетиком, призначену для придушення релаксації НСС.

ГАБК є ендogenousним нейротрансмітером у центральній і периферійній нервових системах. Рецептори для ГАБК традиційно ділять на підтипи ГАБК_А і ГАБК_В. Рецептори ГАБК_В (див. Kerg D.I.B. and Ong J., (1995) *Pharmac. Ther.* vol. 67, pp. 187-246) належать до надродини рецепторів, з'єднаних G-протеїном. Описано агоністи рецептора ГАБК_В, які використовуються для лікування таких розладів ЦНС, як релаксація м'язів при спинальній еластичності, розлади серцево-судинної системи, астма, розлади кишкової перистальтики, наприклад, синдром подразнення кишок, і є прокінетиками і протикашлевими агентами. Було описано використання агоністів рецептора ГАБК_В як антиблювотного засобу (WO 96/11680).

Агоніст рецептора ГАБК_В баклофен (4-аміно-3-(4-хлорфеніл)бутанова кислота) (патент Швейцарії CH 449 046) є найбільш вивченим аналогом ГАБК.



ГАБК



баклофен

Інші агоністи та напівагоністи рецептора ГАБК_В описано у EP 0356128, EP 0181833, EP 0399949, EP 0463969 і FR 2 722 192. Огляд хімії модуляторів ГАБК_В - див. Froestl W. and Mickel S.J., *The GABA receptors*, pp. 271-296 (Eds. S.J. Enna and N.G. Bowery, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 1997).

Фахівцям відомо, що скринінг застосування ліків можна полегшити, використовуючи клітини, трансфектовані геном клонованого рецептора. Застосування таких трансфектованих клітин забезпечує кілька переваг порівняно з звичайним скринінгом, головною з яких вважається селективність. Іншою перевагою є можливість оцінити активність ліків на клонованих рецепторах людини. Той факт, що рецептор ГАБК_В був нещодавно клонований (Kaupmann et al., *Nature* 386(6622), 239-246, 20/03/1997), дає можливість створити більш специфічні ліки, що діють на рецептор ГАБК_В. Ця публікація описує два типи рецептора щура, названі ГАБК_В1а і ГАБК_В1b, але підкреслено, що можна ізолювати і інші типи.

Було виявлено, що агоніст рецептора ГАБК_В можна використати для придушення ТРНСС, тобто для лікування ХГЕР.

Таким чином, винахід передбачає використання агоніста рецептора ГАБК_В для виготовлення медикамента, що придушує ТРНСС, і, зокрема, для лікування ХГЕР. Далі термін "агоніст" означатиме як повні агоністи, так і напівагоністи, тобто сполуки, здатні частково (не повністю) активувати рецептор ГАБК_В.

Здатність придушувати ТРНСС означає, що зазначені сполуки можна використовувати для лікування регургітації у малюків. Така можливість дозволяє запобігти легеновим захворюванням, викликаним вдихом регургітованого вмісту шлунку, а також погіршенню розвитку, викликаному втратою проковтнутих поживних продуктів.

Згідно з бажаним втіленням винаходу, зазначений агоніст рецептора ГАБК_В являє собою заміщене похідне амінопропілової кислоти, у якій кислотним залишком є карбонова група, фосфінова група, фосфонова група або сульфінатова група.

Сполуками, які мають агоністичну або напівагоністичну спорідненість з ГАБК_В і можуть бути використані згідно з винаходом, є:

4-амінобутанова кислота,

4-аміно-3-(4-хлорфеніл)бутанова кислота (баклофен),
 4-аміно-3-фенілбутанова кислота,
 4-аміно-3-гідроксибутанова кислота,
 4-аміно-3-(4-хлорфеніл)-3-гідроксифенілбутанова кислота,
 4-аміно-3-(тієн-2-іл)бутанова кислота,
 4-аміно-3-(5-хлортієн-2-іл)бутанова кислота,
 4-аміно-3-(5-бромтієн-2-іл)бутанова кислота,
 4-аміно-3-(5-метилтієн-2-іл)бутанова кислота,
 4-гуанідин-3-(4-хлорфеніл)бутанова кислота,
 3-аміно-2-(4-хлорфеніл)-1-нітропропан,
 (3-амінопропіл)фосфонова кислота,
 (3-амінобут-2-ил)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-метилпропіл)фосфонова кислота,
 (3-амінобугил)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-хлорфеніл)пропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-хлорфеніл)-2-гідроксипропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-фторфеніл)пропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-фенілпропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-гідроксипропіл)фосфонова кислота,
 (E)-(3-амінопропен-1-іл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-циклогексилпропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-бензилпропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-метоксифеніл)пропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-хлорфеніл)-2-гідроксипропіл)фосфонова кислота,
 (3-амінопропіл)метилфосфінова кислота,
 (3-аміно-2-гідроксипропіл)метилфосфінова кислота,
 (3-амінопропіл)(дифторметил)фосфінова кислота,
 (4-амінобут-2-ил)метилфосфінова кислота,
 (3-аміно-1-гідроксипропіл)метилфосфінова кислота,
 (3-аміно-2-гідроксипропіл)(дифторметил)фосфінова кислота,
 (E)-(3-амінопропен-1-іл)метилфосфінова кислота,
 (3-аміно-2-оксопропіл)метилфосфінова кислота,
 (3-амінопропіл)гідроксиметилфосфінова кислота,
 (5-амінопент-3-ил)метилфосфінова кислота,
 (4-аміно-1,1,1-трифторбут-2-ил)метилфосфінова кислота,
 (3-аміно-2-(4-хлорфеніл)пропіл)сульфінова кислота,
 3-амінопропілсульфінова кислота,
 Бажаними сполуками, які мають агоністичну або напівагоністичну спорідненість з ГАБК_B, є:
 4-аміно-3-(4-хлорфеніл)бутанова кислота (баклофен),
 (3-амінопропіл)метилфосфшова кислота,
 (3-аміно-2-гідроксипропіл)метилфосфінова кислота,
 4-амінобутанова кислота (ГАБК),
 (3-амінопропіл)(дифторметил)фосфінова кислота,
 (3-аміно-2-оксопропіл)метилфосфінова кислота,
 4-аміно-3-(5-хлортієн-2-іл)бутанова кислота,
 (3-амінопропіл)фосфонова кислота,
 (3-аміно-2-(4-хлорфеніл)пропіл)сульфінова кислота.

Винахід також передбачає використання для зазначених вище цілей фармацевтичне прийнятних солей лігандів ГАБК_B. Добре відомі ліганди ГАБК_B, наприклад, баклофен, (3-амінопропіл)метилфосфінова кислота і (3-аміно-2-(S)-гідроксипропіл)метилфосфінова кислота, мають амфотерну природу і можуть бути присутніми у вигляді внутрішніх солей. Вони можуть також утворювати солі приєднання кислот і солі з основами. Такі солі є особливо фармацевтично прийнятними. Кислотами, придатними для утворення таких солей є, наприклад, такі мінеральні солі, як соляна, бромиста, сіркова або фосфорна, або такі органічні кислоти, як сульфонові і карбонові. Прикладами солей лігандів ГАБК_B, утворених з основами, є солі лужних металів, наприклад, натрію або калію, або лужноземельних металів, наприклад, кальцію або магнію, а також амонійні солі, наприклад, амонію або амінів.

Крім того, винахід передбачає використання для зазначених вище цілей оптичних ізомерів лігандів ГАБК_B. Численні відомі ліганди ГАБК_B, наприклад, баклофен і (3-аміно-2-(S)-гідроксипропіл)метилфосфінова кислота є хіральними сполуками завдяки присутності асиметричного атома карбону. Залежно від наявності асиметричних атомів ліганди ГАБК_B можуть існувати у формі суміші ізомерів, зокрема рацематів, або у формі чистих ізомерів, зокрема енантіомерів.

Винахід також включає спосіб придушення ТРНСС, який передбачає введення ссавцю, включаючи людину, що потребує такого лікування, ефективної кількості агоніста рецептора ГАБК_B.

У об'єм винаходу також входить фармацевтична композиція для придушення ТРНСС. Зокрема, зазначену фармацевтичну композицію можна використовувати для лікування ХГЕР і/або регургітації у малюків. Активним інгредієнтом такої композиції може бути один з згаданих вище агоністів рецептора ГАБК_B.

Денна доза

Для придушення ТРНСС і рефлюкса агоніст рецептора ГАБК_B можна застосовувати у дозах, придатних для лікування інших станів, при яких використання агоністів рецептора ГАБК_B визнано доцільним. Типова

денна доза активного інгредієнта може варіюватись у широких межах і залежить від різних факторів, таких, як, наприклад, індивідуальна потреба пацієнта і спосіб введення. Взагалі дози можуть становити від 1мкг до 100мг на день на кг маси пацієнта, бажано від 10мкг до 10мг на день на кг маси пацієнта.

Фармацевтичні композиції

Для клінічних потреб сполуки згідно з винаходом використовуються у вигляді фармацевтичних композицій для орального, ректального, парентерального або іншого способу введення. Фармацевтична композиція містить сполуку згідно з винаходом разом з одним або більше фармацевтично прийнятними інгредієнтами. Носій може мати вигляд твердого, напівтвердого або рідкого розріджувача або капсули. Фармацевтичні препарати також входять у об'єм винаходу.

Звичайні кількості активних сполук становить 0,1-95% (за масою), бажано 0,2-20% (за масою) препарату для парентерального введення і, бажано, 1-50% (за масою) препарату для орального введення.

Для приготування дозованих фармацевтичних композицій з сполукою згідно з винаходом цю сполуку можна змішувати з твердими порошковими інгредієнтами, наприклад, лактозою, сахарозою, сорбітолом, манітолом, крохмалем, амілопектином, похідними целюлози, желатином або іншим придатним для цього інгредієнтом, а також з дезінтегруючими і зм'ягчуючими агентами, наприклад, стеаратом магнію або кальцію, стеарилфумаратом натрію і поліетиленгліколевим воском. Суміш потім перетворюють у гранули або у таблетки пресуванням.

М'які желатинові капсули можуть містити суміш активних інгредієнтів згідно з винаходом з рослинною олією, жиром або іншим придатним носієм. Тверді желатинові капсули можуть містити гранули активного інгредієнта, або гранули активного інгредієнта в суміші з твердими порошковими інгредієнтами, наприклад, лактозою, сахарозою, сорбітолом, манітолом, картопляним або кукурудзяним крохмалем, амілопектином, похідними целюлози або желатином.

Дозовані форми для ректального введення можна виготовляти (i) у вигляді супозиторіїв, які містять активний інгредієнт у суміші з нейтральною жировою основою, (ii) у вигляді желатинової ректальної капсули, яка містить активний інгредієнт у суміші з рослинною олією, парафіновим маслом або іншим придатним для цього інгредієнтом, (iii) у вигляді заздалегідь виготовлених мікроклізм або (iv) у вигляді сухих композицій для мікроклізми, призначених для перетворення у належний розчин безпосередньо перед введенням.

Рідкі препарати для орального введення можуть бути виготовлені у вигляді сиропів або суспензій, наприклад, розчинів або суспензій з вмістом від 0,2 до 20% (за масою) активного інгредієнта і рештою, яка складається з цукру або цукрових спиртів і суміші етанолу, води, гліцеролу, пропіленгліколя і поліетиленгліколя. За бажанням такі рідкі препарати можуть містити забарвлювачі, смакові агенти, сахарин і карбоксиметилцелюлозу або інший загущувач. Рідкі препарати для орального введення можуть бути також виготовлені у вигляді сухого порошка, який змішують з придатним розчинником перед введенням.

Розчини для парентерального введення можна приготувати у вигляді розчину сполуки згідно з винаходом у фармацевтично прийнятному розчиннику, бажано у концентрації від 0,1 до 10% за масою. Такі розчини можуть також містити стабілізуючі і/або буферуючі інгредієнти, і знаходитись у ампулах денними дозами. Розчини для парентерального введення можуть бути також виготовлені у вигляді сухого порошка, який змішують з придатним розчинником безпосередньо перед введенням.

Скринінг сполук, активних проти TRHCC

Винахід також включає використання клітин, трансфектованих нуклеотидною послідовністю, що кодує рецептор ГАБК_в, для скринінга з метою ідентифікувати інгібітори TRHCC. Зазначений рецептор ГАБК_в може бути одним з підтипів генів рецептора ГАБК_в, наприклад, ГАБК_вR1a або ГАБК_вR1b або ще неклонованим підтипом рецептора ГАБК_в. Зазначену нуклеотидну послідовність можна одержати від будь-якого біологічного виду, але бажано від ссавця, зокрема людини.

Таким чином, винахід пропонує спосіб скринінгу сполук-інгібіторів TRHCC, який передбачає використання нуклеотидної послідовності, що кодує рецептор ГАБК_в. У бажаному варіанті спосіб включає операції (а) трансфектування окультурованої клітини нуклеотидною послідовністю, яка кодує рецептор ГАБК_в таким чином, що він виявляє дію на поверхні клітини, (б) введення сполуки, що випробується, у контакт з зазначеною клітиною і (в) визначення, чи ця сполука зв'язується з рецептором ГАБК_в і/або активує його. Зазначеним рецептором ГАБК_в можуть бути, наприклад, ГАБК_вR1a або ГАБК_вR1b.

Приклади

Матеріали і способи

Використовувались собаки-лабрадори обох статей (5 самців, 3 самиці) масою 20-30кг. Було зроблено цервікальну езофагостомію, щоб уможливити інтубацію. Після одужання собаки використовувались для контрольних експериментів до одержання стабільних і надійних реакцій. Собаки використовували у інших експериментах перед введенням їм агоністів рецептора ГАБК_в, але їм надавали два дні для очищення, протягом яких ніякі ліки не вводились. Кожний четвертий експеримент був контрольним, що забезпечувало стабільність і відтворюваність результатів.

Експерименти було почато о 8 год. ранку, причому тваринам перед тим не давали їсти протягом 17 год. Собаку ставили у стійку Павлова, до якої її привчали заздалегідь. У глотку через езофагостомію дисимулятивно вводили тонкий силіконовий катетер з дистальним отвором, щоб реєструвати ковтання. Катетер перфузували повітрям з швидкістю приблизно 2мл/хвил. Для вимірювання тиску у дистальному шлунку, НСС і чотирьох боках стравоходу був встановлений багатоканальний пристрій. Цей пристрій був оснащений шестисантиметровим рукавом для надійного вимірювання тиску у НСС. Шлунковий канал і канал НСС були перфузовані дистильованою дегазованою водою з швидкістю приблизно 0,45мл/хвил., а стравохідні канали з швидкістю 0,1мл/хвил. Для створення оптимальних умов перфузії використовувалась низькоподатлива пневмогідравлічна помпа. Тиск у каналах вимірювали датчиками зовнішнього тиску. Прийом і підсилення сигналів здійснювались системою програм Lab Windows/CV1 (ver. 3.1). Калібрування тиску виконувалось при 0-100мм рт. ст., причому багатоканальний пристрій був розташований на рівні

трохи нижче датчиків тиску. Собаку ставили таким чином, щоб середній внутрішньошлунковий тиск становив приблизно 0мм рт. ст. На відстані 3см від верхньої межі НСС у напрямку рота був встановлений сурмовий рН-електрод, зйом сигналів якого здійснювався, як описано вище. Аналіз сигналів виконувався системою Lab Windows.

Початкові вимірювання виконувались протягом щонайменше 10хвил., після чого вводили носій (0,9% NaCl, 0,5мл/кг) або агоніст рецептора ГАБК_В (внутрішньовенне, протягом 2хвил.). Через 10хвил. після завершення цього введення, через багатоканальний пристрій вводили поживну речовину з швидкістю 100мл/хвил (30мл/кг). За 10хвил. до цього введення було почато безперервне внутрішньовенне введення ГАБК, а за 30хвил. до введення поживної речовини у деяких випадках у шлунок вводили К,8-баклофен. Поживна речовина містила 10% пептону (ма-са/обе'м), 5% Intralipid (об'єм/об'єм) і 5% D-глюкози (маса/обе'м) і була підкислена соляною кислотою до рН 3,0. Негайно після введення було почато вдування повітря з розходом 40мл/хвил., щоб довести повний час до 90хвил. з початку введення поживної речовини. Потім собаку екстубували і виконували вимірювання, подібні початковим, щоб упевнитись у відсутності залишкових явищ.

ТРНСС визначали за такими критеріями. Різниця між НСС і внутрішньошлунковим тиском становила менше 2мм рт. ст., тривалість перевищувала 0,5с, а релаксація не викликала первинною перистальтикою (тобто глоточним сигналом). Швидкість падіння тиску перевищувала 10 мм рт. ст./с. У більшості випадків, але не завжди, ТРНСС можна було виявити за характерним шумом у езофагостомії (відрижкою). Загальну кількість ТРНСС обчислювали для перших 45хвил. і для усього експерименту (90хвил.). Ефективність агоніста рецептора ГАБК_В визначали відносно індивідуальних контрольних даних (n ≥ 5). Кожний агоніст був випробуваний щонайменше на двох різних собаках.

Результати і їх аналіз

ТРНСС практично ніколи не відбувались у голодному стані, але завжди після введення поживної речовини і вдування повітря. Частота ТРНСС помітно варіювалась для різних собак, але варіації у одного собаки були невеликими.

Агоністи рецептора ГАБК_В зменшують частоту ТРНСС в залежності від дози. Придушення протягом перших 45хвил. було більшим за обчислене для усього періоду експеримента (90хвил.). Оскільки розширення шлунка є головним стимулятором ТРНСС, значення вимірювань для перших 45хвил. є найбільш вірогідним показником дії уведених сполук-інгібіторів. Зниження ТРНСС веде до поліпшення викликаного газом розширення шлунка і, отже, нового порогу. Невизначеність дії менш помітна на початку експеримента (див. нижче).

Придушуюча дія агоністів рецептора ГАБК_В на ТРНСС була помітною за відсутності побічних поведінкових явищ, за винятком великої дози R,S-баклофена, яка мала деяку седативну дію, що закінчувалась приблизно через одну годину після введення.

У контрольних експериментах під час введення поживної речовини і вдування повітря внутрішньошлунковий тиск підвищувався від 0 до 4мм рт. ст. Уведення доз агоністів рецептора ГАБК_В, які майже повністю придушували ТРНСС, супроводжувалось більшим підвищенням цього тиску (10-13мм рт. ст.). Такі значні підвищення внутрішньошлункового тиску іноді викликали блювання наприкінці експеримента. Це викликалось тим, що внаслідок придушення ТРНСС собаки були нездатні вивільнити повітря з шлунка.

Результати (табл. 1) вказують на те, що агоністи рецептора ГАБК_В придушують ТРНСС після прийому рідкої їжі і подальшого вдування повітря. Ця дія не є вторинною після седативної снотворної дії. Можна зробити висновок, що сполуки з спорідненістю до рецепторів ГАБК_В можуть бути корисними лікувальними агентами при лікуванні ХГЕР.

ТАБЛИЦЯ 1

Дія різних агоністів рецептора ГАБК_В на ТРНСС у собак (середнє значення ± стандартне відхилення).
Усі сполуки вводились внутрішньовенно, якщо не зазначено інше.

Сполука	Доза (мг/кг)	% від контр. за 45хвил.	% від контр. за 90хвил.
R, -баклофен	0,3	41 ± 6	66 ± 8
	1,5	11 ± 6	43 ± 19
R,S-баклофен (внутрішньошлункове введення)	1,5	12 ± 6	54 ± 12
R-баклофен	0,3	36 ± 10	40 ± 11
S-баклофен	1,5	76 ± 10	92 ± 10
(3-амінопропш)метилфосфінова кислота	0,003	57 ± 12	76 ± 5
	0,01	32 ± 8	39 ± 7
	0,03	25 ± 4	50 ± 17
	0,1	5 ± 5	33 ± 9
(3-аміно-2(S)-гідроксипропіл)-метилфосфінова кислота	0,03	53 ± 7	65 ± 10
	0,3	0 ± 0	38 ± 6
ГАБК	1,8 ¹	62 ± 2	61 ± 3
	5,4 ¹	57 ± 6	54 ± 10

1 - внутрішньовенне введення протягом 100хвил., починаючи з моменту за 10хвил. перед введенням

поживної речовини і вдуванням повітря.