

Цей винахід відноситься до способів і фармацевтичних композицій для стимуляції росту невритів у нервових клітинах. Ці композиції містять нейротрофічну кількість сполуки і нейро-трофічний фактор, такий як фактор росту нервової тканини (ФРН). Способи передбачають обробку нервових клітин вищезначеними композиціями або композиціями без нейротрофічного фактору. Способи за цим винаходом можуть використатись для прискорення репарації пошкоджень нервових клітин, викликаних патологічним процесом або фізичною травмою.

Передуючий рівень техніки

Неврологічні хвороби асоціюються з загибеллю або пошкодженням нервових клітин. Втрата допамінергічних нейронів у substantia nigra є етіологічною причиною хвороби Паркінсона. Хоч молекулярний механізм нейродегенерації при хворобі Альцгеймера поки не встановлений, очевидним є те, що запалення головного мозку і відкладення бета-амілоїдного протеїну, а також інших таких речовин, може подавляти живучість нейронів і сповільнювати рост невритів, що виконують функції комунікації між нейронами. У пацієнтів, страждаючих від ішемії головного мозку або травм спинного мозку, спостерігається екстенсивна загибель нервових клітин. У теперішній час не існує задовільного лікування цих захворювань.

Стандартне лікування неврологічних хвороб передбачає використання препаратів, здатних інгібувати загибель нервових клітин. Підхід, розроблений останнім часом, передбачає створення умов, що сприяють регенерації нервів завдяки прискоренню відростання невритів.

Відростання невритів, яке має вирішальне значення для виживання нейронів, стимулюється *in vitro* факторами росту нервової тканини (ФРН). Наприклад, нейротрофічний фактор, похідний від лінії гліальних клітин (ГПНФ), демонструє нейротрофічну активність як *in vivo*, так і *in vitro* і у теперішній час досліджується для застосування у лікуванні хвороби Паркінсона. Показано, що інсуліновий і інсуліноподібні фактори росту стимулюють рост невритів у клітинах феохромоцитом PC12 пацюка, а також у культурі симпатичних і сенсорних нейронів [Recio-Pinto et al., J. Neurosci., 6, pp. 1211-1219 (1986)]. Інсуліновий і інсуліноподібні фактори росту стимулюють також регенерацію пошкоджених рухових нервів *in vivo* і *in vitro* [Near et al., PNAS, pp. 89, 11716-11720 (1992); i Edblad et al., Brain Res., 641, pp. 76-82 (1994)]. Подібним же чином, фібробластний фактор росту (ФБР) стимулює проліферацію [D. Gospodarowicz et al., Cell Differ., 19, p. 1 (1986)] і рост [M. A. Walter et al., Lymphokine Cytokine Res., 12, p.135 (1993)] нервових клітин.

Проте, існує декілька вад, пов'язаних з використанням факторів росту нервів для лікування неврологічних хвороб. Вони важко переборюють гематоенцефалічний бар'єр. Вони нестабільні у плазмі. І вони мають незадовільні властивості відносно діставки лікарської речовини.

Останнім часом було показано, що дрібні молекули стимулюють відростання невритів *in vivo*. У індивідумів, страждаючих неврологічними хворобами, така стимуляція відростання невритів захищає нейрони від подальшої дегенерації і прискорює регенерацію нервових клітин. Наприклад, показано, що естроген сприяє росту аксонів і дендритів, які є невритами, що використовуються нервовими клітинами для комунікації між собою у дорослому головному мозку, що розвивається або пошкоджений [(C. Dominique Toran-Allerand et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 56, pp. 169-78 (1996); i B. S. McEwen et al., Brain Res. Dev. Brain Res., 87, pp. 91-95 (1995)]. Прогресування хвороби Альцгеймера сповільнюється у жінок, що приймають естроген. Висувалось припущення про те, що естроген доповнює ФРН і інші нейротрофіни і тим самим допомагає нейронам диференціювати і виживати.

Було продемонстровано, що такролімус, імуносупресивний препарат, діє у синергізмі з ФРН у стимуляції відростання невритів у клітинах PC12, а також у сенсорних гангліях [Lyons et al., PNAS, 91, pp. 3191-3195 (1994)]. Показано також, що ця сполука є нейропротекторною при вогнищевій ішемії головного мозку [J. Sharkey & S. P. Butcher, Nature, 371, pp. 336-339 (1994)] і збільшує швидкість регенерації аксонів у пошкодженому сидничому нерві [Gold et al., J. Neurosci., 15, pp. 7509-16 (1995)].

Хоч шляхом стимуляції відростання невритів можна лікувати широке коло неврологічних дегенеративних розладів, відома відносно невелика кількість препаратів, що мають такі властивості. Таким чином, відчувається велика потреба у нових, фармацевтично сприйнятних сполуках і композиціях, які мають здатність стимулювати відростання невритів у пацієнтів.

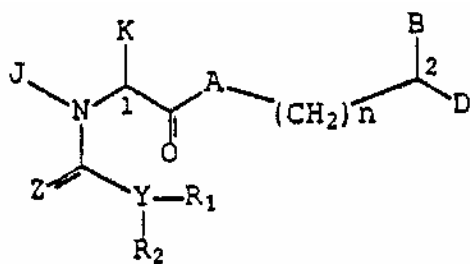
Суть винаходу

Заявники вирішили вищезначену проблему, встановивши, що сполуки, раніше розроблені одним із співзаявників для подолання резистентності до багатьох лікарських препаратів, несподівано і надзвичайно мають також нейротропічну активність. Ці сполуки описані у Патенті США №5543423 і у заявці США №08/377,283, що знаходиться на стадії розгляду. Цитування цих матеріалів супроводжується відповідними посиланнями.

Такі сполуки стимулюють відростання невритів у присутності екзогенного або ендогенного ФРН. Композиції, описані тут, містять сполуки з родів, описаних вище, і фактор росту нейронів. Методи для стимуляції відростання невритів, описані тут, використовують вищезначені амінокислотні похідні або окремо, або у комбінації з фактором росту нейронів. Ці методи використовуються у лікуванні пошкодження нервів, що викликано різними неврологічними хворобами і фізичними травмами, а також у регенерації нервів *ex vivo*.

Докладний опис винаходу

Цей винахід стосується фармацевтичних композицій, які містять три компонента. Першим компонентом є сполука, що має структурну формулу (I):



Формула (I) і його фармацевтичні сприйнятні похідні,

де A представляє собою CH₂, кисень, NR_i·

де R₁, B і D незалежно представляють собою:

Ag, лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6), лінійний або розгалужений алкеніл або алкініл (C2-C6), заміщений циклоалкілом (C5-C7) лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6), лінійний або розгалужений алкеніл або алкініл (C3-C6); заміщений циклоалкенілом (C5-C7) лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6), лінійний або розгалужений алкеніл або алкініл (C3-C6), заміщений Ag лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6) або заміщений Ag лінійний або розгалужений алкеніл або алкініл (C3-C6), де будь-яка з груп CH₂ згаданих алкільних ланцюжків за бажанням може бути замінена гетероатомом, обраним з групи, що складається з O, S, SO, SO₂ і NR, де R - обирається з водню, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C4), лінійний або розгалужений алкеніл або алкініл (C3-C4) або з'єднувальний алкіл (C1-C4), у якому місток знаходиться між азотом і атомом вуглецю згаданого ланцюжка, що містить гетероатом, утворюючи кільце. Це кільце за бажанням можна зростити з Ag-групою;

J обирається з водню, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6), лінійного або розгалуженого алкенілу (C3-C6) або -CH₂Ag;

K обирається з лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C4), -CH₂Ag або циклогексилметилу;

або J і K беруться разом такими, щоб утворилось 5-7-членне гетероциклічне кільце, яке за бажанням може містити гетероатом, обраний з O, S, SO або SO₂;

Z представляє собою O або S;

Y представляє собою O або N, де,

якщо Y представляє собою O, то R₁ є неподіленою парою (термін «неподілена пара», як він використовується тут, відноситься до неподіленої пари електронів, присутньої на двох-валентному кисні), а R₂ обирається з Ag, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6) або лінійного або розгалуженого алкенілу або алкінілу (C3-C6); а

якщо Y представляє собою N, то R₁ і R₂ незалежно обираються з Ag, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6) або лінійного або розгалуженого алкенілу або алкінілу (C3-C6); або R₁ і R₂ беруться разом такими, щоб утворити гетероциклічне 5-6-членне кільце, обране з піролідину, імідазолідину, піразолідину, піперидину або піперазину;

де Ag обирається з фенілу, 1-нафтилу, 2-нафтилу, інденілу, азуленілу, флуоренілу або антраценілу,

2-фурилу, 3-фурилу, 2-тієнілу, 3-тієнілу, 2-піридилу, 3-піридилу, 4-піридилу, піролілу, оксазолілу, тіазолілу, імідазолілу, піразолілу, 2-піразолінілу, піразолідинілу, ізоксазолілу, ізотриазолілу, 1,2,3-оксадіазолілу, 1,2,3-триазолілу, 1,2,3-тіадіазолілу, піридазинілу, піримідинілу, піразинілу, 1,3,5-триазинілу, 1,3,5-тритіанілу, індолизинілу, індолілу, ізоіндолілу, 3H-індолілу, індолінілу, бензо[б]фуранілу, бензо[б]тіофенілу, 1H-індазолілу, бензімідазолілу, бензтіазолілу, пуринілу, 4H-хіноизинілу, хіноінілу, 1,2,3,4-тетрагідрохіноінілу, ізохіноінілу, 1,2,3,4-тетрагідрізохіноінілу, циннолінілу, фтала-зинілу, хіназолінілу, хіноксалінілу, 1,8-нафтиридинілу, птеридинілу, карбазолілу, акридинілу, феназинілу, фенотіазинілу або феноксазинілу;

де Ag за бажанням може містити 1-3 замінні групи, які незалежно обираються з водню, галогена, гідроксильної, нітро-, -SO₃H, трифторметилу, трифторметокси-групи, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6), лінійного або розгалуженого алкенілу (C2-C6), O-[прямого або розгалуженого алкілу (C1-C6)], O-[лінійного або розгалуженого алкенілу (C3-C6)], O-бензилу, O-фенілу, 1,2-метилendioкси-, -NR₃R₄, карбоксильної, N-(лінійний або розгалужений алкіл C1-C5 або лінійний або розгалужений алкеніл C3-C5) карбоксамідів, N,N-ді-(лінійний або розгалужений алкіл C1-C5 або лінійний або розгалужений алкеніл C3-C5) карбоксамідів, морфолінілу, піперидинілу, O-Z, CH₂-(CH₂)_q-Z, O-(CH₂)_q-Z, (CH₂)_q-Z-O-Z або CH=CH-Z;

де R₃ і R₄ незалежно обираються з прямого або розгалуженого алкілу (C1-C6), лінійного або розгалуженого алкенілу (C3-C6), водню або бензилу; або де R₃ і R₄ беруться разом такими, щоб утворити 5-6-членне або 8-11-членне гетероциклічне кільце, таке як, наприклад, піперидиніл, морфолініл або піролідиніл;

де Z обирається з 4-метоксифенілу, 2-піридилу, 3-піридилу, 4-піридилу, піразилу, хіноілу, 3,5-диметилізоксазоілу, ізоксазоілу, 2-метилтіазоілу, тіазоілу, 2-тієнілу, 3-тієнілу або піримідилу;

де q дорівнює 0-2 і

n дорівнює 0 або 1.

Термін «гетероциклічний», як він використовується тут відносно R₃ і R₄, відноситься до сталого 5-6-членного моноциклу або 8-11-членного біциклічного гетероциклу, який може бути насиченим або ненасиченим і який, на випадок моноциклу, за бажанням може бути зрощений через бензольну групу. Кожен гетероцикл складається з атомів вуглецю і 1-4 гетероатомів, обраних з групи, яка містить азот, кисень і сірку. Термін «гетероатоми азоту і сірки», як він використовується тут, містить будь-яку окислену форму азоту і сірки, а також кватернізовану форму будь-якого основного азоту. Таке гетероциклічне кільце може бути приєднано до будь-якого гетероатому циклу, що приводить до створення стійкої структури. Типовими прикладами таких гетероциклів є піперидиніл, морфолініл або піролідиніл.

Переважно, щоб не менше як щось одне, B або D, незалежно представляло собою лінійний ланцюжок, що закінчується арильною групою, тобто групою, яку представлено формулою -(CH₂)_r-(X)-(CH₂)_s-Ag, де

г дорівнює 1-4;

s дорівнює 0-1;

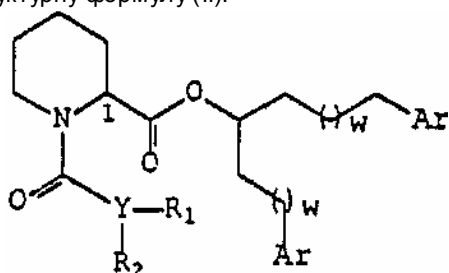
Ar - такий, як визначено вище, і кожне X незалежно обирається з CH₂, O, S, SO, SO₂ або NR, де R обирається з водню, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C4), лінійного або розгалуженого алкенілу або алкінілу (C3-C4) або з'єднувального алкілу (C1-C4), у якому місток знаходиться між атомом азоту і Ar-групою.

Переважні Ar-групи по даному винаходу містять феніл, 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, індоліл, ізоіндоліл, хіноніл, ізохіноніл, 1,2,3,4-тетрагідроізохіноніл і 1,2,3,4-тетрагідрохіноніл. Ar-групи можуть містити від 1 до 3 замінних груп, які незалежно обираються з водню, гідроксильної групи, нітро-групи, трифторметилу, лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6), O-[лінійного або розгалуженого алкілу (C1-C6)], галогену, SO₃H або NR₃R₄, де R₃ і R₄ такі, як визначено вище.

Сполуки по даному винаходу містять всі оптичні і рацемічні ізомери.

Термін «фармацевтичне сприйняття похідне», як він використовується тут, позначає будь-яку фармацевтичне сприйнятну сіль, ефір або сіль такого ефіру сполуки по даному винаходу або іншої сполуки, яка, будучи введеною пацієнтові, здатна дати (прямо або непрямо) сполуку по даному винаходу, його метаболіт або залишок, що характеризуються здатністю сприяти відростанню невритів або посилювати його.

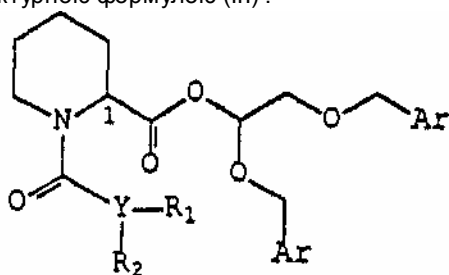
Згідно переважному втіленню фармацевтичні композиції за цим винаходом містять сполуку, що має структурну формулу (II):



Формула (II)

і її фармацевтичне сприйнятні похідні, де R₁, R₂, Y, w і Ar є такими, як визначено вище.

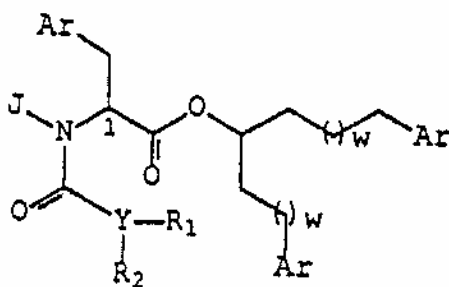
Згідно іншому переважному втіленню фармацевтичні композиції за цим винаходом містять сполуку з структурною формулою (III):



Формула (III)

і її фармацевтичне сприйнятні похідні, де R₁, R₂, Y, w і Ar є такими, як визначено вище.

Згідно ще одному переважному втіленню фармацевтичні композиції за цим винаходом містять сполуку з структурною формулою



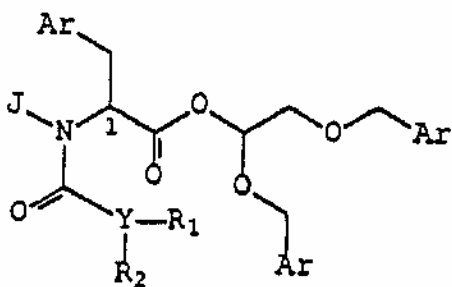
(IV):

Формула (IV)

і її фармацевтичне сприйнятні похідні, де R₁, R₂, Y, w і Ar є такими, як визначено вище, а J представляє собою водень, лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6) або лінійний або розгалужений алкеніл (C3-C6).

Згідно ще одному переважному втіленню фармацевтичні композиції за цим винаходом містять сполуку з структурною формулою

(V):



Формула (V)

і її фармацевтичне сприйнятні похідні, де R_1 , R_2 , Y, w і Ar є такими, як визначено вище, а J представляє собою водень, лінійний або розгалужений алкіл (C1-C6) або лінійний або розгалужений алкеніл (C3-C6).

Якщо використовуються фармацевтичне сприйнятні солі цих сполук, то ці солі переважно є похідними від неорганічних або органічних кислот і основ. В число таких кислотних солей входять такі: ацетат, адипат, альгінат, аспартат, бензоат, бензолсульфо-нат, бісульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентапропіонат, диглюконат, додецилсульфат, етансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, гліцерофосфат, гемісульфат, пентаноат, гексаноат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, 2-гідроксипентансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталінсульфонат, нікотинат, оксалат, пальмоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, сукцинат, тартрат, тіоціанат, тосилат і ундеканат. Основні солі містять солі амонію, солі лужних металів, такі як натрієві і калієві солі, солі лужноземельних металів, такі як кальційові і магнієві солі, солі з органічними основами, такі як солі дициклогексаміну, N-метил-О-глюкамін і солі з амінокислотами, такі як аргінін, лізин і тому подібне. Окрім цього, основні азот-вміщуючі групи можуть бути кватернізовані з такими агентами, як алкілгалогеніди з більшою молекулярною вагою, такі як метил, етил, пропіл і бутіл хлорид, броміди і йодиди; діалкілсульфати, такі як диметил, діетил, дибутил і діаміл-ульфати, галогеніди з довгим ланцюжком, такі як децил, лаурил, міристил і стеарилхлориди, броміди і йодиди, аралкілгалогеніди, такі як бензил і фенетилброміди, та інші. Таким способом одержують водо- або маслорозчинені або диспергуємі продукти.

Сполуки, використовувані у композиціях і методах за цим винаходом, можуть також модифікуватись за рахунок надання їм відповідних функціональних груп з метою посилення вибірних біологічних властивостей. Такі модифікації відомі у цій області і містять ті, які збільшують біологічне проникання у дану біологічну систему (наприклад, кров, лімфатична система, центральна нервова система), підвищують оральну біодоступність, підвищують розчинюваність, що дозволяє вводити їх шляхом ін'єкування, змінюють метаболізм і змінюють швидкість екскреції.

Другим компонентом у всіх фармацевтичних композиціях, описаних вище, є нейротрофічний фактор. Термін «нейротрофічний фактор», як він використовується тут, відноситься до сполук, які здатні стимулювати ріст і проліферацію нервової тканини. Термін «нейротрофічний фактор», як він використовується у цій заявці, виключає ті сполуки, які в ній описані.

Ідентифіковані численні нейротрофічні фактори, і будь-який з цих факторів може використовуватись у композиціях згідно цьому винаходу. Такі нейротрофічні фактори містять, не обмежуючись їми, фактор росту нервової тканини (ФРН), інсуліновий фактор росту (ІФР-1) і його активні стовбурні похідні, такі як дІФР-1, кислотний і основний фібробластні фактори росту (аФРФ і бФРФ, відповідно), похідні від тромбоцитів фактори росту (ПТФР), похідні від головного мозку нейротрофічні фактори (ПГМНФ), циліарні нейротрофічні фактори (ЦНТФ), похідний від ліній гліальних клітин нейротрофічний фактор (ПГНФ), нейротрофін-3 (НТ-3) і нейротрофін 4/5 (НТ-4/5). Самим переважним нейро-трофічним фактором у композиціях згідно цьому винаходу є ФРН.

Третім компонентом фармацевтичне сприйнятних композицій за цим винаходом є фармацевтичне сприйнятний носій. Фармацевтичне сприйнятні носії, які можна використати у цих фармацевтичних композиціях, містять, не обмежуючись їми, іонообмінні смоли, глинозем, алюміній стеарат, лецитин, сироваточні білки, такі як альбумін сироватки людини, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінова кислота, калію сорбат, парціальні гліцеридні суміші з насичених рослинних жирних кислот, вода, солі або електроліти, такі як протамін сульфат, динатрію гідрофосфат, калію гідрофосфат, натрію хлорид, солі цинку, колоїдний кремнезем, магнію трисилікат, полівініл піролідон, речовини на основі целюлози, поліетилен гліколь, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози, поліактилати, воски, полімери блока поліетилен-поліоксипропілен, поліетилен гліколь і ланолін.

Композиції згідно цьому винаходу можуть вводитись орально, парентерально, у вигляді аерозолі для інгаляції, місцево, ректально, назально, буккально, вагінально або шляхом імплантованого резервуара. Термін «парентеральне введення», як він використовується тут, містить підшкірне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньосуглобове, інтрасиновіальне, інтракраніальне, інтратеральне, інтратекальне, внутрішньопечінкове, всередину поразки і інтракраніальне ін'єкування або вливання. Переважно ці композиції вводяться орально, інтраперитонеально або внутрішньовенно.

Стерильні ін'єкуємі форми композицій згідно цьому винаходу можуть представляти собою водні або маслянисті суспензії. Ці суспензії можуть бути приготовлені згідно з методами, відомими у цій області, з використанням відповідних диспергуючих або зволожуючих агентів або суспендуємих агентів. Такий стерильний препарат, призначений для ін'єкування, може також представляти собою стерильний розчин або суспензію у нетоксичному, парентерально сприйнятному розріджувачі або розчиннику, наприклад розчині 1,3-бутандіолу. У числі тих сприйнятних носіїв і розчинників, які можна використати, знаходяться вода, розчин Рінгера і ізотонічний розчин натрію хлориду. Окрім цього, як розчинники або середовища для суспендування

широко використовуються стерильні нелетючі масла. Для цього можна використати будь-яке легке нелетюче масло, включаючи синтетичні моно- і диґліцериди. Жирні кислоти, такі як олеїнова кислота і її гліцеридні похідні, використовуються при одержанні ін'єкуємих форм, як і природні фармацевтичне сприйнятні масла, такі як оливкове і касторове, особливо у їх поліоксидетированих версіях. Такі масляні розчини або суспензії можуть також містити розріджувач або диспергатор у вигляді спирту з довгим ланцюжком, такого як Ph. Helv або подібний спирт.

Фармацевтичні композиції згідно цьому винаходу можуть вводитись орально у будь-якій орально сприйнятній дозовій формі, включаючи, але не обмежуючись їми, капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. На випадок таблеток для орального використання широко використовуваними наповнювачами є лактоза і кукурудзяний крохмаль. Звичайно додаються також інгредієнти для змащування, такі як магній стеарат. Для орального введення у вигляді капсул використовувани наповнювачі містять лактозу і висушений кукурудзяний крохмаль. Якщо для орального використання треба приготувати водну суспензію, активний інгредієнт комбінується з емульгуючими або суспендуєчими агентами. За бажанням можуть додаватись підсолоджуючі речовини, отдушки і барвники.

Як варіант, фармацевтичні композиції згідно цьому винаходу можуть вводитись у вигляді супозиторіїв для ректального введення, їх можна приготувати шляхом змішування лікарської речовини з придатним не подразнюючим наповнювачем, який є твердим при кімнатній температурі, але рідким при температурі прямої кишки, де він буде плавитись, вивільнюючі лікарську речовину. Такі матеріали містять масло какао, бджолиний віск і поліетилен гліколі.

Фармацевтичні композиції згідно цьому винаходу можна також вводити місцеве, особливо коли об'єктом лікування є ділянки або органи, легко доступні при місцевому нанесенні препарату, наприклад при захворюваннях ока, шкіри і нижнього відділу кишкового тракту. Відповідні суміші для місцевого застосування легко готуються для кожної з цих ділянок або органів.

Місцеве застосування для нижнього відділу кишкового тракту можна здійснити за допомогою ректальних супозиторіїв (дивись вище) або відповідного складу для клізми. Можна використати і трансдермальні накладки.

Для місцевого застосування фармацевтичні композиції можуть бути складені у вигляді відповідної мазі, яка містить активний компонент, суспендований або розчинений у одном або більш носіїв. Носії для місцевого введення сполук згідно цьому винаходу містять, не обмежуючись їми, мінеральне масло, рідкий петролатум, білий петролатум, пропілен гліколь, поліоксидетирен, поліоксипропілен, емульгуючий віск і воду. Як варіант, фармацевтичні композиції можуть бути приготовлені у вигляді відповідного лосьйона або крему, що містить активні компоненти, суспендовані або розчинені у одном або більш фармацевтично сприйнятних носіїв. Такі носії містять, не обмежуючись їми, мінеральне масло, сорбіт моностеарат, полісорбат 60, цетилові ефіри, віск, цетеариловий спирт, 2-октилдодеканол, бензиловий спирт і воду.

Для офтальмологічного використання фармакологічні композиції можуть бути приготовлені у вигляді суспензій, пропущених через мікронний колоїдний млин, у ізотонічному стерильному сольовому розчині з відрегульованим рН, до якого може додаватись консервант, такий як бензилульоній. Як варіант, для офтальмологічного застосування фармацевтичні композиції можуть бути приготовлені у вигляді мазі на основі петролатума.

Фармацевтичні композиції згідно цьому винаходу можуть вводитись також у вигляді назального аерозолі або інгаляції. Такі композиції одержують методами, добре відомими у цій області, у вигляді розчинів у сольовому розчині, з використанням бензилового спирту або інших придатних консервантів, речовин, сприяючих всмоктуванню для посилення біодоступності, фторвуглеців і/або інших звичайних солюбілізуючих або диспергуючих агентів.

Кількість сполуки і нейротрофічного фактору, які можуть комбінуватись з носіями, для одержання окремих дозових форм може варіюватись залежно від пацієнта і конкретного способу введення. Два активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях згідно цьому винаходу діють у синергізмі для стимуляції відростання невритів. Отже, кількість нейротрофічного фактору у таких композиціях буде менше кількості, яка потрібна для монотерапії, що використовує тільки цей фактор. Переважно композиції повинні готуватись таким чином, щоб доза сполуки, яку вводять пацієнтові, становила 0,01-100мг/кг ваги тіла/день, а доза вводимого нейротрофічного фактору - 0,01-100мкг/кг ваги тіла/день.

Має бути зрозуміло, що конкретна доза і схема лікування для кожного окремого пацієнта будуть залежати від множини факторів, включаючи активність використовуваної сполуки, вік, вагу тіла, загальний стан здоров'я, статі, раціон харчування, час введення, швидкість екскреції, сполучення з іншими лікарськими препаратами, а також рішення лікуючого лікаря і тяжкість того патологічного стану, який лікується. Кількість активних інгредієнтів буде також залежати від того, які сполуки і нейротрофічний фактор використані у цій фармацевтичній композиції.

Згідно з іншим втіленням, цей винахід стосується методів стимуляції відростання невритів. Згідно з одним аспектом цього втілення такий метод використовується для стимуляції відростання невритів у пацієнта і здійснюється шляхом введення цьому пацієнтові фармацевтичне сприйнятної композиції, яка містить будь-яку з вищеописаних сполук і фармацевтичне сприйнятний носій. Кількість сполуки, яку використовують у цих методах, знаходиться між 0,01 і 100мг/кг ваги тіла/день.

Згідно з іншим аспектом цього втілення такий метод використовується для стимуляції росту нервів *ex vivo*. Для цього вищеописані сполуки можуть вводитись безпосередньо у культуру нервових клітин. Цей аспект винаходу використовується для регенерації нервів *ex vivo*.

Згідно з іншим втіленням метод стимуляції відростання невритів передбачає додаткову стадію лікування пацієнта або обробки нервових клітин у культурі *ex vivo* нейротрофічним фактором, таким як ті, що містяться у фармацевтичних композиціях згідно цьому винаходу, описаних вище. Це втілення передбачає введення пацієнтові такої сполуки і такого нейротрофічного фактору у вигляді комбінованої дозової форми або декількох окремих дозових форм. Якщо використовуються окремі дозові форми, їх можна вводити одночасно,

послідовно або з інтервалом, не перевищуючим приблизно 5 годин.

Методи і композиції згідно цьому винаходу можуть використовуватись для лікування пошкодження нервів, викликаних широким колом захворювань або фізичних травм. Вони містять, не обмежуючись їми, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона, ALS, розсіяний склероз, інсульт і ішемія, що асоціюється з ним, нев-ральна паропатія, інші нервові дегенеративні захворювання, хвороба рухових нейронів, роздавлювання однічного нерва, периферійна нейропатія, особливо нейропатія, що асоціюється з діабетом, травма спинного мозку і поразки лицевого нерва.

Щоб описаний тут винахід було краще зрозуміло, нижче приведені конкретні приклади його втілення. Має бути зрозуміло, що ці приклади слугують тільки ілюстративним цілям і ні в якому разі не обмежують обсяг винаходу.

Приклади Загальні методи

Спектри протонного ядерного магнітного резонансу (^1H ЯМР) були записані при 500мгц на приладі «Bruker AMX 500». Хімічні зсуви приведені у частинах на мільйон (δ) по відношенню до Me_4Si (δ 0,0). Аналітична високоефективна рідкісна хроматографія здійснювалась на рідкісному хроматографі «Waters 600E» або «Hewlett Packard 1050».

Приклад 1

1,7-Дипіридин-3-іл-гепт-1,6-діін-4-ол (1):

Суміш 1,6-гептадіін-4-ола (25 г; 0,231 моль), паладію (II) ацетату (2,6г; 11,0 ммоль), міді (I) йодиду (3,3г; 11,0 ммоль) і трифенілфосфіну (9,1г; 35,0 ммоль) у дегазованому триетиламіні (300 мл) оброблялась 3-бромпіридином (77г; 0,49 моль). Після перемішування протягом 24 годин при кімнатній температурі реакційну суміш фільтрували через тампон з целіту, і промивали целіт етилацетатом (EtOAc). Фільтрат концентрували до одержання темно-коричневого масла. Цей матеріал розчиняли у 2N соляній кислоті (HCl) і промивали етилацетатом (2х). рН водного шару регулювали до >8 за допомогою додавання 3N гідроокису натрію, а потім екстрагували етилацетатом (2х). Екстракти об'єднували, промивали півнасиченим водним натрієм хлоридом, соляним розчином, сушили над магнієм сульфатом (MgSO_4) , фільтрували і концентрували. Залишок пропускали через шар силікагелю (SiO_2 , елюювання етилацетатом) , щоб після сушки одержати 33,1г сполуки 1 у вигляді твердої речовини.

Приклад 2 1,7-Дипіридин-3-іл-гептан-4-ол (2) :

Суспензію оксиду платини (280мг) у абсолютному етиловому спирті (1мл) розводили абсолютним метиловим спиртом (10мл), після чого додавали сполуку 1 (2,81г; 10,73 ммоль). Цю суспензію вміщували у атмосферу водню під тиском 40 фунтів/кв. дюйм. Після припинення споживання водню, водень заміняли на азот; реакційну суміш фільтрували і концентрували, щоб одержати 2,87г сполуки 2 у вигляді в'язкого масла.

Приклад 3

(S)-Піперидин-1,2-дикарбонова кислота 1-трет-бутиловий ефір-2-(1-піридин-3-іл-пропіл)-4-піридин-3-іл)-бутиловий ефір (3):

До розчину сполуки 2 (9,5г; 35,18 ммоль) і (S)-піперидин-1,2 дикарбонова кислота 1-трет-бутилового ефіру (12,1г; 52,78 ммоль) і N,N-диметил-4-амінопіридину (427мг; 3,5 ммоль) у метилєну хлориді (CH_2Cl_2 , 50мл) при 0°C додавали 1-(3-диметиламіно-пропіл)-3-етилкарбодііміду гідрохлориду (10,1г; 52,78 ммоль). Реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом 16 годин. Реакційну суміш розводили етилацетатом, промивали водою, 5% водним натрієм бікарбонатом (NaHCO_3) , соляним розчином, сушили над безводним магнієм сульфатом (MgSO_4) і концентрували, щоб одержати 16, 67г сполуки 3 у вигляді в'язкого масла.

Приклад 4

(S)-Піперидин-1,2-карбонова кислота 2-(1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-4-піридин-3-іл)-бутиловий ефір (4) :

До розчину сполуки 3 (16,67 г; 34,66 ммоль) у метилєну хлориді (40 мл) додавали трифтороцтову кислоту (40 мл) . Після закінчення додавання реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом 4 годин. Реакційну суміш концентрували, а залишок розчиняли у воді і робили основним за допомогою твердого карбонату калію (K_2CO_3) . Продукт екстрагували метилєном хлоридом (2х). Екстракти об'єднували, сушили над (MgSO_4), фільтрували і концентрували, щоб одержати 13,20г сполуки 4 у вигляді в'язкого масла.

Приклад 5

(S)-1-(3,4,5-Триметоксифеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (5):

До суміші N-метил-3,4,5-триметоксифеніліну (130мг; 0,66 ммоль) і діізопроїлетиламіну ($i\text{-PR}_2\text{Net}$, 215мкл; 1,2 ммоль) у метилєну хлориді (1мл) додавали 1,2М фосгену у толуолі (1,65мл). Після перемішування протягом 2 годин реакційну суміш концентрували і розташовували під вакуумом, щоб віддалити залишковий фосген. До розчину сполуки 4 (225мг; 0,59 ммоль) у метилєну хлориді (1,5мл), вміщуючому $i\text{-PR}_2\text{Net}$ (215 мкл; 1,2 ммоль), додавали раніше приготовлений ацил хлорид у CH_2Cl_2 (1/5мл) . Після перемішування протягом 1 години, реакційну суміш розводили етилацетатом, промивали 5% водним NaHCO_3 , соляним розчином, сушили над MgSO_4 , фільтрували і концентрували у вакуумі, щоб одержати в'язке масло. Хроматографія залишку на SiO_2 (елюювання 30-60% ацетоном:гексанами) дала 238мг (67%) сполуки 5 у вигляді в'язкого масла. ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 8,44-8,40 (m, 4H), 7,35 (m, 2H), 7,22-7,18 (m, 2H), 6,43 (br s, 1H) , 4,98 (m, 1H), 4,74 (m, 1H), 3,84 (s, 9H), 3,42 (br s, 1H), 3,18 (s, 3H), 2,92 (m, 1H), 2,65-2,56 (m, 5H) , 2,06-1,98 (m, 1H) , 1,70-1,53 (m, 15H) .

Приклад 6

(S)-1-(3-Трифторметилфеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (6):

Сполуку 6 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксифенілін був замінений N-метил-3-трифторметиланіліном.

^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 8,42-8,39 (m, 4H), 7,50-6,16 (m, ЮH), 4,99 (m, 1H) , 4,64 (m, 1H) , 3,29 (m, 1H), 3,20 (s, 3H) , 2,93 (m, 1H), 2,67-2,53 (m, 4H) , 2,03-1,99 (m, 1H) , 1,69-1,53 (m, 13H) .

Приклад 7

(S)-1-((4-Трет-бутилфеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (7):

Сполуку 7 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений M-метил-4-трет-бутиланіліном,

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,40 (m, 4H), 7,49-7,42 (m, 2H), 7,30 (d, 2H), 7,17 (m, 2H), 7,05 (d, 2H), 4,99 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,14 (s, 3H), 2,84 (dt, 1H), 2,64-2,52 (m, 4H), 2,00-1,95 (m, 1H), 1,70-1,48 (m, 11H), 1,27 (s, 9H), 1,20-1,02 (m, 2H).

Приклад 8

(S)-1-((4-Ізопропілфеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (8):

Сполуку 8 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений N-метил-4-ізопропіланіліном.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,42-8,38 (m, 4H), 7,49-7,43 (m, 2H), 7,18 (m, 2H), 7,14 (d, 2H), 7,06 (d, 2H), 4,99 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 3,35 (br d, 1H), 3,15 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 2,59 (m, 4H), 1,97 (m, 1H), 1,70-1,49 (m, 11H), 1,21 (d, 6H), 1,20-1,02 (m, 2H).

Приклад 9

(S)-1-(Піперидин-1-карбоніл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (9):

Сполуку 9 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений N-піперидином,

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,42-8,39 (m, 4H), 7,50-7,43 (m, 2H), 7,24-7,16 (m, 2H), 4,98 (m, 1H), 4,67 (t, 1H), 3,32-3,09 (m, 8H), 2,64-2,52 (m, 6H), 2,01-1,96 (m, 1H), 1,80-1,30 (m, 15H).

Приклад 10

(S)-1-((3,4,5-Триметоксифеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 4-піридин-1-іл-1-(3-піридин-1-іл-пропіл)-бутиловий ефір (10):

Сполуку 10 було одержано згідно з протоколами для прикладів 1-5, за винятком того, що 3-бромпіридин був замінений 1-бромпіридином.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,50 (t, 2H), 7,56 (dq, 2H), 7,18-7,08 (m, 4H), 6,43 (s, 2H), 4,97 (q, 1H), 4,78 (m, 1H), 3,83 (s, 9H), 3,44 (br d, 1H), 3,19 (s, 3H), 2,89 (dt, 1H), 2,82-2,73 (m, 4H), 2,07 (br d, 1H), 1,81-1,52 (m, 12H).

Приклад 11

(3)-Піперидин-1,2-дикарбонова кислота 1-(3,4,5-триметоксифеніл ефір 2-(4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутил) ефір (11):

Сполуку 11 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений 3,4,5-триметоксифенолом. Сполуку 11 було одержано як суміш ротомерів:

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,42-8,35 (m), 7,50-7,32 (m), 7,28-7,18 (m), 6,34 (s), 6,27 (s), 5,34-4,90 (m), 4,19-4,01 (m), 3,78 (s), 3,75 (s), 3,22 (br dt), 3,14 (quintet), 3,05-2,90 (m), 2,65-2,53 (m), 2,27-2,21 (m), 2,02 (s), 1,80-1,45 (m).

Приклад 12

(S)-Піперидин-2-карбонова кислота 2-(1-(2-феніл-етил)-3-феніл-пропіловий ефір (12):

Сполуку 12 було одержано згідно з протоколами для Прикладів 3-4, за винятком того, що сполуку 2 у Прикладі 3 було замінено 1,5-дифенілпентан-3-олом.

Приклад 13

(S)-1-((3,4,5-Триметоксифеніл)-метил-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 1-(2-феніл-етил)-3-феніл-пропіловий ефір (13):

Сполуку 13 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що сполуку 4 було замінено сполукою 12. ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,27 (m, 4H), 7,20-7,14 (m, 6H), 6,47 (s, 2H), 5,01 (m, 1H), 4,87 (m, 1H), 3,84 (s, 6H), 3,83 (s, 3H), 3,48 (br d, 1H), 3,23 (s, 3H), 2,94 (dt, 1H), 2,72-2,44 (m, 4H), 2,17-2,10 (m, 1H), 2,00-1,85 (m, 4H), 1,67-1,60 (m, 2H), 1,45-1,40 (m, 1H), 1,30-1,18 (m, 2H).

Приклад 14

4-(Метил)-(2-(1-фенетил-3-феніл-пропоксикарбоніл)-піперидин-1-карбоніл)-аміно-бензолсульфонова кислота (14):

Сполуку 14 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 13, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений N-метил-4-амінофеніл сульфоновою кислотою.

Приклад 15

(S)-Піперидин-2-карбонова кислота 1-бензилоксиметил-2-бензил-оксиетилловий ефір (15):

Сполуку 15 було одержано згідно з протоколами для Прикладів 3-4, за винятком того, що сполуку 2 у Прикладі 3 було замінено 1,3-добензилоксипропан-2-олом.

Приклад 16

(S)-1-(Метил-(4-морфолін-1-іл-феніл)-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 2-бензилокси-1-(бензшіоксид-метил)-етилловий ефір (16):

Сполуку 16 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 5, за винятком того, що сполуку 4 було замінено сполукою 15, а N-метил-3, 4, 5-триметоксианілін N-метил-4-морфоліноаніліном. ¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,34-7,11 (m, 10H), 7,09 (d, 2H), 6,84 (d, 2H), 5,29 (quintet, 1H), 4,81 (br t, 1H), 4,54 (d, 2H), 4,49 (dd, 2H), 3,84 (t, 2H), 3,67 (t, 2H), 3,40 (br d, 1H), 3,15 (s, 3H), 3,09 (t, 4H), 2,86 (dt, 1H), 2,08-2,05 (m, 1H), 1,60-1,44 (m, 2H), 1,27-1,08 (m, 3H).

Приклад 17

(S)-1-(Метил-(4-піперидин-1-іл-феніл)-карбамоїл)-піперидин-2-карбонова кислота 2-бензилокси-1-(бензилоксид-метил)-етилловий ефір (17):

Сполуку 17 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 16, за винятком того, що N-метил-3,4,5-

триметоксианілін був замінений N-метил-4-піперидиноаніліном.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 7,36-7,25 (m, 10H), 7,06 (d, 2H), 6,86 (d, 2H), 5,29 (quintet, 1H), 4,79 (m, 1H), 4,55-4,48 (m, 4H), 3,66 (m, 4H), 3,41 (br d, 1H), 3,14 (s, 3H), 3,10 (m, 4H), 2,87 (dt, 1H), 2,05 (br d, 1H), 1,73-1,67 (m, 4H), 1,61-1,45 (m, 4H), 1,25-1,08 (m, 3H).

Приклад 18

(S)-Піперидин-1,2-дикарбонова кислота 2-(2-бензилокси-1-(бензилоксиметил)-етил) ефір 1-хіноін-5-іловий ефір (18);

Сполуку 18 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 16, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений 5-гідроксихіноїном. Сполука 18 представляла собою суміш ротомерів.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,89 (dd), 8,86 (dd), 8,90 (d), 8,24 (d), 7,89 (t), 7,67 (t), 7,63 (t), 7,36-7,18 (m), 5,44 (quintet), 5,36 (quintet), 5,20 (d), 5,02 (d), 4,56-4,44 (m), 4,34 (br d), 4,14 (br d), 3,72-3,56 (m), 3,39 (dt), 3,09 (dt), 2,38 (brt), 1,90-1,49 (m), 1,40-1,29 (m).

Приклад 19

(S)-Піперидин-1,2-дикарбонова кислота 2-(2-бензилокси-1-(бензилоксиметил)-етил) ефір 1-піридин-3-іловий ефір (19):

Сполуку 19 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 16, за винятком того, що N-метил-3,4,5-триметоксианілін був замінений 3-гідроксипіридином. Сполука 19 представляла собою суміш ротомерів.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8,46-8,41 (m), 7,48 (dt), 7,43 (dt), 7,34-7,24 (m), 7,18 (dd), 5,40-5,33 (m), 5,03 (dd), 4,57-4,47 (m), 4,17 (br d), 3,69-3,66 (m), 3,27 (dt), 3,05 (dt), 2,33 (br d), 1,81-1,71 (m), 1,69-1,64 (m), 1,56-1,43 (m), 1,35-1,27 (m).

Приклад 20

2-(1,3-Диметил-3(3,4,5-триметоксифенілуреїдо)-3-феніл-пропано-ва кислота 4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)-бутиловий ефір (20):

Сполуку 20 було одержано по протоколах Прикладів 3-5 зі заміною (S)-піперидин-1,2-дикарбонова кислота 1-трет-бутило-вого ефіру на N-(трет-бутоксикарбоніл)-L-фенілаланін.

Приклад 21

2-(1,3-Диметил-3(3,4,5-триметоксифенілуреїдо)-3-феніл-пропано-ва кислота 3-піридин-3-іл-1-(2-піридин-3-іл-етил)-пропіловий ефір (21):

Сполуку 21 було одержано по протоколах Прикладів 3-5 з заміною (S)-піперидин-1,2-дикарбонова кислота 1-трет-бутило-вого ефіру на N-(трет-бутоксикарбоніл)-L-фенілаланін і 1,7-дипіридин-3-іл-гептан-4-ола на 1,5-дипіридин-3-іл-пентан-3-ол.

Приклад 22

N-Метил-2-фенілетиламін-1, 2-дикарбонова кислота 1-(3,4,5-триметоксифеніл) ефір 2-(4-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-1-(3-піридин-3-іл-пропіл)бутіл)ефір (22):

Сполуку 22 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 21 з заміною N-метил-3,4,5-триметоксианіліну на 3,4,5-триметоксифенол.

Приклад 23

N-Метил-2-фенілетиламін-1,2-дикарбонова кислота 1-(3,4,5-триметоксифеніл) ефір 2-(3-піридин-3-іл-1-(2-піридин-3-іл-етил) пропіл)ефір (23):

Сполуку 23 було одержано згідно з протоколом для Прикладу 21 з заміною N-метил-3,4,5-триметоксианіліну на 3,4,5-триметоксифенол.

Приклад 24

Щоб безпосереднім чином визначити нейротрофічну активність сполук, описаних у цьому винаході, проба на відростання невритів виконувалась на клітинах феохромоцитом PC12, як описано Lyons et al. (1994).

Клітини PC12 підтримувались при 37°C і 5% CO₂ у модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (MDCI), доповненому 10% кінською сироваткою, інактивованою нагріванням, 5% фетальною бичачою сироваткою (ФБС), інактивованою нагріванням, і 1% глютамату. Потім клітини переносили по 10⁵ на лунку на 96-луночні пластини, покриті 5мкг/см² колагеном з хвоста пацюка, і давали прикріпитись протягом ночі. Це середовище потім замінювалось на MDCI, 2% кінської сироватки, інактивованої нагріванням, 1% глю-тамату, 1-5нг/мл ФРН (Sigma) і різні концентрації сполуки (0,1М - 10нМ). В фонову контрольну культуру вводили тільки 105нг/мл ФРН без сполуки. В позитивні контрольні культури вводили високу концентрацію ФРН (50нг/мл).

Сполуки, які описані у цьому винаході, викликають достовірне збільшення відростання невритів в порівнянні з фоновими контрольними куль турами.

Хоч ми представили тут цілий ряд втілень даного винаходу, очевидно, що основний задум можна змінити таким чином, щоб одержати інші втілення, які використовують методи згідно цьому винаходу. Отже, має бути зрозуміло, що обсяг винаходу визначається скоріше формулою винаходу, що додається, ніж представленими тут конкретними втіленнями, які слугують тільки для цілей ілюстрації.

ДОКАЗ А

МЕТОД 1

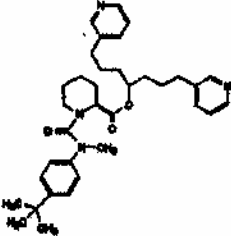
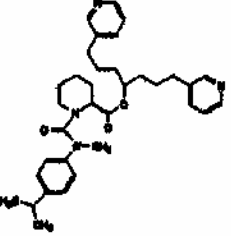
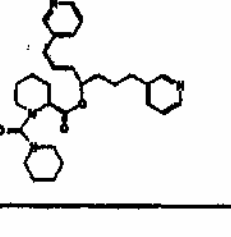
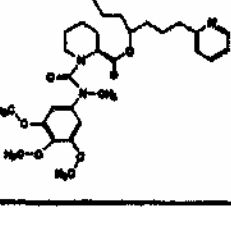
Нейротрофічну активність десяти сполук, описаних у цю--му винаході, визначали пробою на відростання невритів у культурі PC12. Нейротрофічна дія демонструється величинами концентрації випробуваної сполуки, що викликає збільшення відростання невритів у контрольних культурах, що відчувають недостачу такої сполуки.

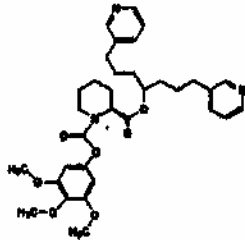
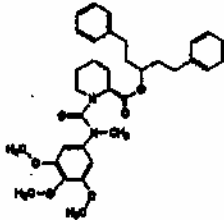
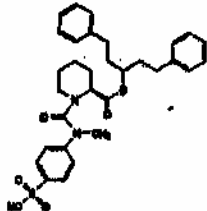
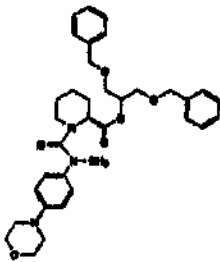
Клітки феохромоцитом миші PC12 підтримувались при 37°C і 5% CO₂ у модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), доповненому 10% інактивованою нагріванням кінською сироваткою, 5% інактивованою нагріванням ембріонально бичачою сироваткою, 2мМ глютаміну, 1мМ натрію пірувату і Perm/Strep. Для диференціювання в присутності фактора росту нервової тканини, клітки переносили в кількості 2x10⁴ кліток на 1,88см² культури на пластини, добре покриті колагеном із хвоста пацюка в кількості 5мкг/см², і давали прикріпитися. Через 24 години середовище замінювали на DMEM, доповнене 1% кінською сироваткою, 2мМ глютаміну, 1мм натрію пірувату, Penn/Strep, 2,5 S фактором росту нервової тканини миші

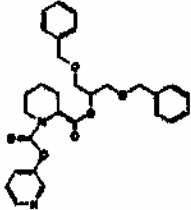
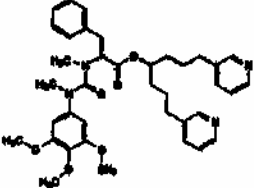
(NGF) (субоптимальна концентрація) і DMSO або сполукою. Кожну пробу за даних умов дублювали тричі. Кожний із трьох дублів розміщали на своїй пластині культури. Усі сполуки додавали й оцінювали їхню дію в умовах затемнення. При розвитку нейронів більш 1X, клітинну культуру вважали позитивною.

Результати вищеописаної проби показані нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

Сполука №	Структура	Проба в культурі РС12 Активна при нМ
7		1000
8		1000
9		10
10		1000

Сполука №	Структура	Проба в культурі РС12 Активна при нМ
11		100
13		1000
14		10
16		100

Сполука №	Структура	Проба в культурі РС12 Активна при нМ
19		1000
20		1000