

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

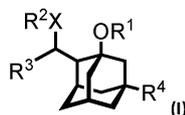
(11) **043204**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.28</p> <p>(21) Номер заявки
201891688</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2017.01.26</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>C07C 233/47</i> (2006.01)
<i>A61K 31/198</i> (2006.01)
<i>A61K 31/221</i> (2006.01)
<i>A61K 31/223</i> (2006.01)
<i>A61K 31/655</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01)
<i>A61P 25/00</i> (2006.01)
<i>A61P 25/16</i> (2006.01)
<i>A61P 25/18</i> (2006.01)
<i>A61P 25/28</i> (2006.01)
<i>A61P 43/00</i> (2006.01)
<i>C07C 229/28</i> (2006.01)
<i>C07C 247/14</i> (2006.01)
<i>C07D 213/40</i> (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) **АДАМАНТАНОВОЕ ПРОИЗВОДНОЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

- | | |
|--|--|
| <p>(31) 2016-012392</p> <p>(32) 2016.01.26</p> <p>(33) JP</p> <p>(43) 2018.12.28</p> <p>(86) РСТ/JP2017/002760</p> <p>(87) WO 2017/131097 2017.08.03</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТОХОКУ ЮНИВЕРСИТИ (JP)</p> <p>(72) Изобретатель:
Моригути Сигеки, Фукунага Кодзи,
Ивабути Йосихару (JP)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) WO-A1-2015087262
CN-A-104001150
WO-A1-2011142246
WO-A1-2009020140
WO-A2-2010043953
JP-A-2011529057
JP-A-2010522203
JP-A-2009508956</p> |
|--|--|

- (57) Изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения или профилактики когнитивного заболевания или расстройства, содержащую соединение, представленное формулой (I), его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль.

**B1****043204****043204
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к алмадантовому производному и его фармацевтически приемлемой соли. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей такое соединение, и способу лечения или профилактики заболевания с использованием такого соединения.

Предпосылки создания изобретения

АТФ-чувствительный K^+ канал (K_{ATP} канал) представляет собой K^+ канал внутреннего выпрямления, соединяющий внутриклеточный метаболизм и возбуждение клеточной мембраны и известный как имеющий гетерологичную октамерную структуру, состоящую из рецептора сульфонилмочевины (SUR), относящегося к ABC семейству белков, и две трансмембранные субъединицы Kir6.1 и Kir6.2. Активность K_{ATP} канала контролируется различными типами открывателей, ингибиторов K^+ канала или внутриклеточными нуклеотидами. Все из них имеют активные сайты в SUR субъединицах. Сообщалось о том, что их реакции различаются в зависимости от подтипа SUR (NPL 1).

Некоторые из алмадантовых производных, имеющих структуру типа клетки, используют в качестве медицинских препаратов. Амантадин используют в качестве противовирусного лекарственного средства и терапевтического средства от болезни Паркинсона. Мемантин гидрохлорид одобрен в качестве терапевтического средства от умеренной/тяжелой деменции альцгеймеровского типа даже в Японии. Мемантин представляет собой неконкурентный ингибитор NMDA-рецептора и, как сообщалось, имеет механизм действия, который предотвращает гибель нервных клеток из-за чрезмерного выделения глутаминовой кислоты, вызванного ишемией (NPL 2).

Алмадантовые производные, обладающие активностью в качестве медицинского препарата, описаны в различной литературе (патентная литература 1-3).

Перечень ссылочных документов

Патентная литература.

Патентная литература 1: национальная публикация международной патентной заявки № 2011-529057.

Патентная литература 2: японская выложенная патентная заявка № 2010-522203.

Патентная литература 3: национальная публикация международной патентной заявки № 2009-508956.

Непатентная литература.

Непатентная литература 1: Folia pharmacologica Japonica, 126, 311 to 316 (2005).

Непатентная литература 2: Folia pharmacologica Japonica, 124, 145 to 151 (2004).

Сущность изобретения

Техническая задача.

Терапевтический и профилактический способ, обеспечивающий достаточный эффект на когнитивное заболевание или расстройство, такое как болезнь Альцгеймера, до сих пор отсутствует, и, таким образом, необходима разработка нового терапевтического и профилактического средства, отличающегося механизмом действия от существующих медицинских препаратов. Кроме того, очень желательна разработка нового терапевтического и профилактического средства от диабета.

В одном аспекте целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для применения в лечении или профилактике когнитивного заболевания или расстройства. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения или профилактики когнитивного заболевания или расстройства с использованием заранее определенного алмадантового производного.

В одном аспекте целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для применения в лечении или профилактике диабета или диабетического осложнения. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения или профилактики диабета или диабетического осложнения с использованием заранее определенного алмадантового производного.

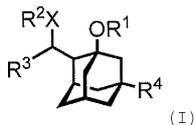
АТФ-чувствительный K^+ канал (K_{ATP} канал) содержит субъединицы Kir6.1 и Kir6.2, и известно, что он служит в качестве активного сайта, например, антидиабетического лекарственного средства.

В одном аспекте целью настоящего изобретения является обеспечение ингибитора канала против Kir6.1 или ингибитора канала против Kir6.2 канала K_{ATP} . Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для применения в лечении или профилактике заболевания, связанного с каналом Kir6.1 или каналом Kir6.2 канала K_{ATP} . Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа лечения или профилактики заболевания, связанного с каналом Kir6.1 или каналом Kir6.2 канала K_{ATP} , с использованием заранее определенного алмадантового производного.

Решение задачи.

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования с целью достижения указанных выше целей. В результате они обнаружили, что алмадантовое производное обладает ингибиторной активностью в отношении Kir6.2 канала, ингибиторной активностью в отношении Kir6.1 канала, терапевтическим эффектом на когнитивное заболевание или расстройство и гипогликемическим эффектом. На основании этого было создано настоящее изобретение. В описании раскрываются следующие изобретения, представленные в [1-1]-[1-20].

[1-1] Соединение, представленное формулой (I)



Химическая формула 1

где R¹ представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

R² представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

X представляет собой O или NR⁵;

R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, 5- или 6-членный гетероарил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, или COOR⁶;

R⁴ представляет собой атом водорода, атом галогена, азида, -OR⁷ или -NHR⁸;

R⁵ представляет собой атом водорода или C₁₋₆алкил;

R⁶ представляет собой атом водорода или C₁₋₆алкил;

R⁷ представляет собой атом водорода, C₁₋₆алкил, C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкил или (C₁₋₆алкил) карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

R⁸ представляет собой атом водорода, C₁₋₆алкил или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена; и

X¹ представляет собой C₁₋₆алкил, атом галогена, C₁₋₆алкокси, нитро или циано, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль.

[1-2] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [1-1], где R⁴ представляет собой атом хлора или азида.

[1-3] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [1-1] или [1-2], где R¹ представляет собой трифторацетил.

[1-4] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с любым из [1-1]-[1-3], где R² представляет собой (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена.

[1-5] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [1-4], где R² представляет собой трифторацетил.

[1-6] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с любым из [1-1]-[1-5], где R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, или пиридил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹.

[1-7] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [1-1], выбранное из

(R)-((1R,2S,3R,5R,7S)-5-азидо-1-гидроксиадамantan-2-ил)(фенил)метилацетата;

этил (S)-2-ацетиамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамantan-2-ил)ацетата;

этил (R)-2-ацетиамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамantan-2-ил)ацетата;

(1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-2-((S)-2-метокси-2-оксо-1-(2,2,2-трифторацетиамидо)этил)адамantan-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиамидо)метил)адамantan-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(S)-2-амино-2-((1R,2S,3R,5R,7S)-1,5-дигидроксиадамantan-2-ил)уксусной кислоты;

N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамantan-2-ил)(фенил)метил)-2,2,2-трифторацетиамид;

(1S,2R,3S,5R,7S)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиамидо)метил)адамantan-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(1S,2R,3S,5S,7R)-5-(2-метоксиэтокси)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиамидо)метил)адамantan-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамantan-2-ил)(пиридин-3-ил)метил)-2,2,2-трифторацетиамида;

2,2,2-трифтор-N-((R)-((1S,2R,3S,5R,7S)-1-гидроксиадамantan-2-ил)(фенил)метил)ацетиамид; и

(1S,2R,3S,5S,7R)-5-метокси-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиамидо)метил)адамantan-1-ил 2,2,2-трифторацетата; или

энантиомера, диастереомера или фармацевтически приемлемой соли такого соединения.

[1-8] Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [1-1]-[1-7].

[1-9] Фармацевтическая композиция в соответствии с [1-8] для применения в лечении или профилактике когнитивного заболевания или расстройства.

[1-10] Фармацевтическая композиция в соответствии с [1-9], где когнитивное заболевание или расстройство выбрано из деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания.

[1-11] Фармацевтическая композиция в соответствии с [1-8] для применения в лечении или профилактике диабета или диабетического осложнения.

[1-12] Ингибитор Kir6.2 канала, содержащий соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [1-1]-[1-7].

[1-13] Ингибитор Kir6.1 канала, содержащий соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [1-1]-[1-7].

[1-14] Способ лечения или профилактики когнитивного заболевания или расстройства, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, его энантиомера, его диастереомера или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из [1-1]-[1-7].

[1-15] Способ в соответствии с [1-14], где когнитивное заболевание или расстройство выбрано из деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания.

[1-16] Способ лечения или профилактики диабета или диабетического осложнения, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, его энантиомера, его диастереомера или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из [1-1]-[1-7].

[1-17] Способ лечения или профилактики заболевания, связанного с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, его энантиомера, его диастереомера или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из [1-1]-[1-7] в качестве ингибитора Kir6.1 канала или ингибитора Kir6.2 канала.

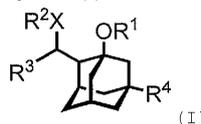
[1-18] Способ в соответствии с [1-17], где заболевание, связанное с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом, представляет собой когнитивное заболевание или расстройство или диабет или диабетическое осложнение.

[1-19] Способ в соответствии с [1-17] или [1-18], где заболевание, связанное с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом, представляет собой когнитивное заболевание или расстройство, выбранное из деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания.

[1-20] Способ в соответствии с [1-17] или [1-18], где заболевание, связанное с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом, представляет собой диабет или диабетическое осложнение.

В описании раскрываются следующие изобретения, представленные в [2-1]-[2-12].

[2-1] Соединение, представленное формулой (I)



Химическая формула 2

где R¹ представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

R² представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

X представляет собой O или NR⁵;

R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, или COOR⁶;

R⁴ представляет собой атом водорода, атом галогена, азидо-, -OR⁷ или -NHR⁸;

R⁵ представляет собой атом водорода или C₁₋₆алкил;

R⁶ представляет собой атом водорода или C₁₋₆алкил;

R⁷ представляет собой атом водорода, C₁₋₆алкил или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

R⁸ представляет собой атом водорода, C₁₋₆алкил или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена; и

X¹ представляет собой C₁₋₆алкил, атом галогена, C₁₋₆алкокси, нитро или циано,

его энантиомер, его диастереомер, или его фармацевтически приемлемая соль.

[2-2] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [2-1], где R⁴ представляет собой атом хлора или азидо.

[2-3] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [2-1] или [2-2], где R¹ представляет собой трифторацетил.

[2-4] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в

соответствии с любым из [2-1]-[2-3], где R² представляет собой трифторацетил.

[2-5] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с любым из [2-1]-[2-4], где R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹.

[2-6] Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с [2-1], выбранное из

(R)-((1R,2S,3R,5R,7S)-5-азидо-1-гидроксиадамтан-2-ил)(фенил)метилацетата;

этил (S)-2-ацетамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)ацетата;

этил (R)-2-ацетамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)ацетата;

(1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-2-((S)-2-метокси-2-оксо-1-(2,2,2-трифторацетамидо)этил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетамидо)метил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата; и

(S)-2-амино-2-((1R,2S,3R,5R,7S)-1,5-дигидроксиадамтан-2-ил)уксусной кислоты,

или энантиомера, диастереомера или фармацевтически приемлемой соли такого соединения.

[2-7] Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [2-1]-[2-6].

[2-8] Фармацевтическая композиция в соответствии с [2-7] для применения в лечении или профилактике когнитивного заболевания или расстройства.

[2-9] Фармацевтическая композиция в соответствии с [2-8], где когнитивное заболевание или расстройство выбрано из деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания.

[2-10] Фармацевтическая композиция в соответствии с [2-7] для применения в лечении или профилактике диабета или диабетического осложнения.

[2-11] Ингибитор Kir6.2 канала, содержащий соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [2-1]-[2-6].

[2-12] Ингибитор Kir6.1 канала, содержащий соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из [2-1]-[2-6].

Полезные эффекты изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для применения в лечении или профилактике когнитивного заболевания или расстройства. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает ингибитор Kir6.1 канала или Kir6.2 канала K_{ATP} канала.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет график, показывающий СаМКII активность, усиленную соединением по настоящему изобретению, в клетках (Neuro2A клетки), сверхэкспрессирующих Kir6.2 канал. Все показатели, относящиеся к значимой разнице, указаны по отношению к контролю (С: Kir6.2 экспрессирующие клетки, не обработанные лекарственным средством). На чертежах в настоящей заявке значимая разница, помеченная как ** или ++, означает P<0,01; или значимая разница, помеченная как + или *, означает P<0,05.

Фиг. 2a показывает (результаты) экспрессию Kir6.2 канала в N2A клетках, которую контролируют, применяя иммуноблоттинг с использованием анти-Kir6.2 канал антитела к Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующим клеткам. Случай, имеющий значимую разницу с не обработанной лекарственным средством группой (-), указан как **.

Фиг. 2b показывает результаты анализа пэтч-кламп методом в формате целой клетки, показывающие, что TP-014 подавляет выходящий ток калия в Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующих клетках. Результаты показывают, что TP-014 ингибирует Kir6.2 канал и уменьшает ток калия.

Фиг. 3a показывает результаты анализа кальций-визуализирующим методом, показывающие, что внутриклеточная концентрация кальция в Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующих клетках повышается при введении TP-014. Изменение концентрация-зависимого количества кальция с течением времени (4 мин) контролировали в случаях обработки соединением по настоящему изобретению и мемантином. Результаты показывают, что TP-014 ингибирует Kir6.2 канал и повышает внутриклеточную концентрацию кальция.

Фиг. 3b показывает результаты анализа методом визуализации кальция, показывающие, что внутриклеточная концентрация кальция в Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующих клетках повышается при введении TP-014. Количество кальция измеряли через 4 мин после обработки мемантином и соединением по настоящему изобретению. Подтверждали, что группа, где использовали Kir6.2-экспрессирующие клетки (Neuro2A клетки), имела значимую разницу по сравнению с не обработанной лекарственным средством группой (-). Результаты показывают, что TP-014 ингибирует Kir6.2 канал и повышает внутриклеточную концентрацию кальция.

Фиг. 4a показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с бо-

лезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшалась.

Фиг. 4b показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. Случай, имеющий значимую разницу между мышами дикого типа (WT) и APP23 в проценте правильных ответов (изменение) при обучении запоминанию, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу между APP мышами и контролем (необработанная группа), указан как ++.

Фиг. 4c представляет график, показывающий результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи теста на распознавание новых объектов, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. Случай значимой разницы между Новым (новый объект) и Знакомым (тот же самый объект) в каждой группе мышей указан как **

Фиг. 4d показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи испытания методом условно-рефлекторного замирания, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. В испытаниях способности запоминания случай, имеющий значимую разницу с WT, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с APP23 мышами, указан как +.

Фиг. 4e показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 4f показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 4g показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши) (возраст 12 месяцев) в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащего показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом. Случай, имеющий значимую разницу с WT, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с APP23 мышами, указан как ++ или +.

Фиг. 5a показывает полосы (изображение), полученные при помощи электрофореза иммуноблотов, показывающие результаты фосфорилирования белков, которые анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK.

Фиг. 5b показывает результаты количественного анализа интенсивности сигнала полос (на фиг. 5a), полученных электрофорезом иммуноблотов. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-) (группа, не обработанная лекарственным средством), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с группой APP23 мышей, не обработанных лекарственным средством (-), указан как +.

Фиг. 5c показывает полосы (изображение), полученные при помощи электрофореза иммуноблотов, показывающие результаты фосфорилирования белков, которые анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK.

Фиг. 5d показывает результаты количественного анализа интенсивности сигнала полос (на фиг. 5c), полученных электрофорезом иммуноблотов. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-) (группа, не обработанная лекарственным средством), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с группой APP23 мышей, не обработанных лекарственным средством (-), указан как ++.

Фиг. 6a показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается.

Фиг. 6b показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. У OBX мышей, случай, имеющий значимую разницу с WT в проценте правильных ответов (изменение) при обучении запоминанию, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу между контрольными (необработанная группа) и OBX мышами, указан как ++.

Фиг. 6c показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи теста на распознавание новых объектов, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. Случай значимой разницы между Новым (новый объект) и Знакомым (знакомый объект) в каждой группе мышей, указан как **

Фиг. 6d показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в

течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи испытания методом условно-рефлекторного замирания, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. В испытаниях способности запоминания случай, имеющий значимую разницу с WT, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с OBX мышами, указан как +.

Фиг. 6e показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 6f показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 6g показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили модельным мышам с нейродегенеративным заболеванием, т.е. мышам с удаленными обонятельными луковицами (OBX мыши), в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом. Случай, имеющий значимую разницу с имитацией, указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с OBX мышами, как ++ или +.

Фиг. 7a показывает полосы (изображение), полученные при помощи электрофореза иммуноблотов, показывающие результаты фосфорилирования белков, которые анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK.

Фиг. 7b показывает результаты количественного анализа интенсивности сигнала полос (на фиг. 7a), полученных электрофорезом иммуноблотов.

Фиг. 7c показывает полосы (изображение), полученные при помощи электрофореза иммуноблотов, показывающие результаты фосфорилирования белков, которые анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK.

Фиг. 7d показывает результаты количественного анализа интенсивности сигнала полос (на фиг. 7c), полученных электрофорезом иммуноблотов. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-) (группа, не обработанная лекарственным средством), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с группой OBX мышей, не обработанных лекарственным средством (-), указан как ++.

Фиг. 8a представляет график, показывающий результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается.

Фиг. 8b показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли методом Y-образного лабиринта, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. Случай, имеющий значимую разницу между Kir6.2-дефицитными мышами и WT в проценте правильных ответов (изменение) при обучении запоминанию, указан как * или **.

Фиг. 8c представляет график, показывающий результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи теста на распознавание новых объектов, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. Случай значимой разницы между Новым (новый объект) и Знакомым (знакомый объект) в каждой группе мышей, указан как **.

Фиг. 8d представляет график, показывающий результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли при помощи испытания методом условно-рефлекторного замирания, показывающие, что когнитивная функция эффективно улучшается. В испытаниях способности запоминания случай, имеющий значимую разницу с WT, показан как *.

Фиг. 8e показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 8f показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом.

Фиг. 8g показывает результаты эксперимента, в котором TP-014 вводили Kir6.2 канал-дефицитным мышам в течение двух месяцев и анализ осуществляли на феномен длительной потенциации (LTP), служащий показателем формирования памяти, электрофизиологическим методом. Случай, имеющий значимую разницу с WT, указан как ** или *.

Фиг. 9a показывает полосы (изображение), полученные при помощи электрофореза иммуноблотов, показывающие результаты фосфорилирования белков, которые анализировали иммуноблоттингом с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK.

Фиг. 9b показывает результаты количественного анализа интенсивности сигнала полос (на фиг. 9a), полученных электрофорезом иммуноблотов. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-) (группа, не

обработанная лекарственным средством), указан как ** или *.

Фиг. 10 показывает результаты окрашивания секций срезов мозга APP23 мыши, показывающие эффект соединения по настоящему изобретению на A β агрегацию.

Фиг. 11a показывает результаты испытания, которое исследует, обладает или нет соединение по настоящему изобретению эффектом улучшения депрессия-подобного симптома у OBX мышей. Случай, имеющий значимую разницу с имитацией (контрольная группа), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с OBX мышами, указан как +.

Фиг. 11b показывает результаты испытания, которое исследует, обладает или нет соединение по настоящему изобретению эффектом улучшения депрессия-подобного симптома у OBX мышей. Случай, имеющий значимую разницу с имитацией (контрольная группа), указан как **, а имеющий значимую разницу с OBX мышами указан как +.

Фиг. 12a показывает результаты испытания, которое исследует, обладает или нет соединение по настоящему изобретению эффектом улучшения на депрессию путем ингибирующего действия на Kir6.1 канал. Случай, имеющий значимую разницу с WT (контрольная группа), указан как **.

Фиг. 12b показывает результаты испытания, которое исследует, обладает или нет соединение по настоящему изобретению эффектом улучшения на депрессию путем ингибирующего действия на Kir6.1 канал. Случай, имеющий значимую разницу с WT (контрольная группа), указан как **.

Фиг. 13a показывает результаты испытания, которое исследует, действительно ли соединение по настоящему изобретению ингибирует Kir6.1 канал и активирует CaMKIV, оказывая таким образом улучшающее действие на депрессию. Случай, имеющий значимую разницу с WT (контрольная группа), указан как **.

Фиг. 13b показывает результаты испытания, которое исследует, действительно ли соединение по настоящему изобретению ингибирует Kir6.1 канал и активирует CaMKIV, оказывая таким образом улучшающее действие депрессия-подобный симптом. Случай, имеющий значимую разницу с WT (контрольная группа), указан как **.

Фиг. 14 показывает результаты испытания, которое исследует, обладает или нет соединение по настоящему изобретению гипогликемическим эффектом. Термин "недели" относится к периоду времени длительного введения, случай, имеющий значимую разницу между ob/ob (солевой раствор) на каждой неделе, указан как *.

Фиг. 15 представляет иллюстрацию, показывающую механизм действия TP-014. Когда Kir6.2 канал, локализованный в спинном мозге, ингибируется, калий, присутствующий в клетках, не может вытекать из них, повышая порог клеточной мембраны. В результате, кальций вне клетки быстрее поступает в клетку, активирует CaMKII, активирует GluA1 (Ser-831)(AMPA акцептор) на пути ниже от CaMKII и предположительно улучшает когнитивную функцию. TP-014 подобным образом ингибирует Kir6.1 канал, расположенный в теле нервной клетки. В результате кальций проникает в клетки аналогичным механизмом. Приток кальция активирует CaMKIV, активирует CREB (Ser-133) и предположительно индуцирует нейрогенез, улучшая депрессию. TP-014 представляет собой новое улучшающее когнитивную функцию лекарственное средство, обладающее как эффектом улучшения когнитивной функции (главный симптом болезни Альцгеймера) на основании ингибирующего Kir6.2 канал действия, так и эффектом улучшения депрессии (периферический симптом болезни Альцгеймера) на основании ингибирующего Kir6.1 действия.

Фиг. 16 показывает структуру плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 17-1 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 17-2 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 17-3 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 17-4 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 17-5 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.2.

Фиг. 18a представляет график, показывающий активность CaMKIV, усиленную соединением по настоящему изобретению в клетках (Neuro2A клетки), сверхэкспрессирующих Kir6.1 канал. Все случаи, имеющие значимую разницу с контролем (C: Kir6.1 экспрессирующие клетки, не обработанные лекарственным средством), отмечены.

Фиг. 18b показывает результаты экспрессии Kir6.1 канала в N2A клетках, которую контролируют, применяя иммуноблоттинг с использованием анти-Kir6.1 канал антитела к Kir6.1 канал-сверхэкспрессирующим клеткам. Случай, имеющий значимую разницу с не обработанной лекарственным средством группой (-), указан как **.

Фиг. 18c показывает результаты определения тока калия, вытекающего из клеток, проверяемого с использованием Kir6.1 канал-сверхэкспрессирующих клеток и измеренного обычным пэтч-кламп методом.

Фиг. 19a показывает результаты анализа чувствительности групп мышей (используемых в испытании) к беспokoйству методом приподнятого крестообразного лабиринта. Что касается времени пребывания мыши в открытом рукаве лабиринта, случай, имеющий значимую разницу с WT(-), указан как ** или *; и случай, имеющий значимую разницу с WT (CORT), указан как ++.

Фиг. 19b показывает фотографию аппарата, используемого в методе приподнятого крестообразного лабиринта.

Фиг. 19c показывает результаты метода испытания свет/темнота. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с WT (CORT), указан как ++.

Фиг. 19d показывает фотографию устройства, используемого в методе испытания свет/темнота.

Фиг. 19e показывает результаты испытания методом "закапывания шариков". Случай, имеющий значимую разницу с WT(-), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с WT (CORT), указан как +.

Фиг. 19f показывает фотографию устройства, используемого в методе "закапывания шариков".

Фиг. 19g показывает результаты испытания методом открытого поля. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-), указан как **; и случай, имеющий значимую разницу с WT (CORT), указан как ++.

Фиг. 19h показывает фотографию устройства, используемого в методе открытого поля.

Фиг. 19i показывает результаты испытания методом условно-рефлекторного замирания. Случай, имеющий значимую разницу с WT(-), указан как ** или *; и случай, имеющий значимую разницу с WT (CORT), указан как ++.

Фиг. 20 показывает структуру плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

Фиг. 21-1 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

Фиг. 21-2 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

Фиг. 21-3 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

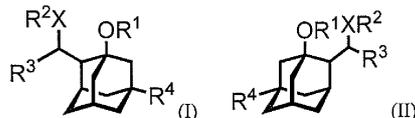
Фиг. 21-4 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

Фиг. 21-5 показывает последовательность плазмидного вектора: pcDNA3.1-Kir6.1.

Описание вариантов осуществления

Настоящее изобретение более конкретно описано ниже.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается фармацевтическая композиция для лечения или профилактики когнитивного заболевания или расстройства, содержащая соединение, представленное формулой (I), его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль. Более конкретно, соединение по настоящему изобретению включает соединение, представленное следующими формулами (I) и (II).



Химическая формула 3

В описании изобретения "C₁₋₆алкил" относится к линейной, разветвленной, циклической или частично циклической алкильной группе, содержащей 1-6 атомов углерода. Примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, н-пентил, 3-метилбутил, 2-метилбутил, 1-метилбутил, 1-этилпропил, н-гексил, 4-метилпентил, 3-метилпентил, 2-метилпентил, 1-метилпентил, 3-этилбутил и 2-этилбутил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и циклопропилметил. Например, C₁₋₄алкил и C₁₋₃алкил также включены.

В описании изобретения "C₁₋₆алкокси" относится к алкокси группе [-O-(C₁₋₆алкил)], содержащей алкильную группу с 1-6 атомами углерода, определенную выше. Примеры включают метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, изобутокси, трет-бутокси, н-пентокси, 3-метилбутокси, 2-метилбутокси, 1-метилбутокси, 1-этилпропокси, н-гексилокси, 4-метилпентокси, 3-метилпентокси, 2-метилпентокси, 1-метилпентокси, 3-этилбутокси, циклопентилокси, циклогексилокси и циклопропилметилокси. Например, C₁₋₄алкокси и C₁₋₃алкокси также включены. В описании изобретения, "C₁₋₄алкокси" включает, например C₁₋₃алкокси.

В описании изобретения "азидо" относится к -N₃.

В описании изобретения "(C₁₋₆алкил)карбонил" относится к алкилкарбонильной группе, содержащей C₁₋₆алкильную группу, определенную выше. Примеры включают метилкарбонил(ацетил), этилкарбонил, трет-бутилкарбонил и (C₁₋₃ алкил)карбонил.

В описании изобретения "5- или 6-членный гетероарил" конкретно не ограничивается, при условии, что он представляет собой гетероарил, состоящий из 5-членного кольца или 6-членного кольца, содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из атома кислорода, атома азота и атома серы. Примеры включают пиридил, пиримидил, пиридазинил, пиазил, фуранил (фурил), тиофенил (тиенил), оксазолил, оксадиазолил, пирролил, имидазолил, пиразолил, триазолил и тетразолил.

В описании изобретения "C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкил" относится к C₁₋₆алкилу, содержащему заместитель C₁₋₆алкокси, определенный выше, и алкильная часть C₁₋₆алкила является такой, как определено выше. Примеры включают метоксиметил, этоксиметил, 2-метоксиэтил, 1-метоксиэтил, 3-метоксипропил, 2-метоксипропил и 1-метоксипропил.

Примеры атома галогена включают атом фтора, атом хлора, атом брома и атом иода.

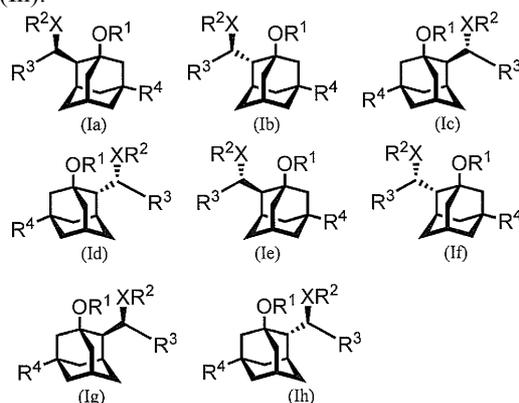
В описании изобретения примеры "(C₁₋₆алкил)карбонила, необязательно замещенного одним или несколькими атомами галогена" включают трифторацетил, дифторацетил, 2,2,2-трифторэтилкарбонил и

перфторэтилкарбонил.

Если соединение, представленное формулой (I), образует сольват, такой как гидрат, настоящее изобретение может быть осуществлено с использованием сольвата. Кроме того, соединение по настоящему изобретению может быть соответствующим образом осуществлено с использованием соединения в состоянии смеси или раствора или кристаллического полиморфизма.

В описании изобретения "замещенный одним или несколькими заместителями" включает, например, замещение 1-3 заместителями.

Настоящее изобретение, относящееся к соединению, представленному формулой (I), включает таутомер, геометрический изомер, различные стереоизомеры, такие как оптический изомер, и диастереомер и их смесь. Примеры соединения, представленного формулой (I), включают соединение, представленное следующими формулами (Ia)-(Ih).



Химическая формула 4

В качестве соединения по настоящему изобретению можно использовать, например, соединение, описанное в примерах в настоящем описании. Более конкретно, можно использовать следующие соединения:

- (R)-((1R,2S,3R,5R,7S)-5-азидо-1-гидроксиадамантан-2-ил)(фенил)метилацетат (TP-009);
- этил (S)-2-ацетиламино-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамантан-2-ил)ацетат (TP-010);
- этил (R)-2-ацетиламино-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамантан-2-ил)ацетат (TP-011);
- (1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-2-((S)-2-метокси-2-оксо-1-(2,2,2-трифторацетиламино)этил)адамантан-1-ил 2,2,2-трифторацетат (TP-012);
- (1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиламино)метил)адамантан-1-ил 2,2,2-трифторацетат (TP-014);
- (S)-2-амино-2-((1R,2S,3R,5R,7S)-1,5-дигидроксиадамантан-2-ил)уксусная кислота (TP-015);
- N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамантан-2-ил)(фенил)метил)-2,2,2-трифторацетиламид (TP-048);
- (1S,2R,3S,5R,7S)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиламино)метил)адамантан-1-ил 2,2,2-трифторацетат (TP-049);
- (1S,2R,3S,5S,7R)-5-(2-метоксиэтокси)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиламино)метил)адамантан-1-ил 2,2,2-трифторацетат (TP-050);
- N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамантан-2-ил)(пиридин-3-ил)метил)-2,2,2-трифторацетиламид (TP-051);
- 2,2,2-трифтор-N-((R)-((1S,2R,3S,5R,7S)-1-гидроксиадамантан-2-ил)(фенил)метил)ацетиламид (TP-052); и
- (1S,2R,3S,5S,7R)-5-метокси-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетиламино)метил)адамантан-1-ил 2,2,2-трифторацетат (TP-053).

"Фармацевтически приемлемая соль" соединения, представленного формулой (I), конкретно не ограничивается, при условии, что она представляет собой соль, которую можно использовать в качестве фармацевтического продукта.

Примеры соли, образованной соединением по настоящему изобретению и основанием, включают соль с неорганическим основанием, таким как натрий, калий, магний, кальций и алюминий; и соль с органическим основанием, таким как метиламин, этиламин и этаноламин. Соль может быть кислотной аддитивной солью. Примеры кислотной аддитивной соли включают соль с минеральной кислотой, такой как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, иодистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота и фосфорная кислота; и кислотную аддитивную соль с органической кислотой, такой как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, щавелевая кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, молочная кислота, яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, метансульфоновая кислота и этансульфоновая кислота.

Атомы (например, атом водорода, атом углерода, атом кислорода, атом азота и атом серы), содер-

жащиеся в соединении, представленном формулой (I), могут быть атомами изотопов, отличными от тех, которые наиболее часто встречаются. Атомы изотопов могут представлять собой радиоактивные изотопы. Более конкретно, в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предлагается соединение, представленное формулой (I), уже определенное в описании и меченное атомом изотопа, или его соль. Мечение изотопом может представлять собой, например, мечение радиоактивным изотопом (например, ^3H , ^{14}C , ^{32}P). Чтобы легко получить соединение, мечение при помощи ^3H является предпочтительным.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение, представленное формулой (I), его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль вводят в виде пролекарства с преобразованием в активное соединение *in vivo*.

В настоящем изобретении примеры лечения когнитивного заболевания или расстройства включают лечение деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания. В настоящем изобретении фармацевтическую композицию можно применять для улучшения дисфункций мозга, например, дисфункции головного мозга, вызванной сердечно-сосудистыми заболеваниями, черепно-мозговой травмой, опухолью головного мозга, вирусным энцефалитом, гипоксической энцефалопатией и алкогольной интоксикацией. Настоящее изобретение можно применять, в частности, для когнитивных дисфункций, таких как нарушение памяти, дефицит внимания, расстройство исполнительной функции и нарушение социального поведения. Примеры когнитивной дисфункции включают нейродегенеративное заболевание (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Пика и болезнь Гентингтона и т.д.), психическое заболевание (шизофрения, биполярное расстройство, депрессия, фобия, расстройство сна, наркомания и т.д.) и общее расстройство развития (аутизм, синдром Аспергера, умственная отсталость, расстройство гиперактивности, тиковое расстройство и т.д.).

В настоящем изобретении примеры диабетического осложнения включают гипергликемию, диабетическую кому, кетоновую кому, некетолическую гиперосмолярную кому, лактоацидоз, гипогликемическую кому, острую инфекцию, микроангиопатию, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетическую невропатию, макроангиопатию, церебральные сосудистые заболевания, ишемическую болезнь сердца, диабетическую гангрену, гиперлипидемию, хроническую инфекцию, желчекаменную болезнь и катаракту.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединение, представленное формулой (I), его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль используют в качестве ингибитора канала Kir6.2 или ингибитора канала Kir6.1. Более конкретно, соединение, представленное формулой (I), его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль можно использовать для лечения или профилактики заболевания, в которое вовлечен канал Kir6.2, такого как когнитивное заболевание или расстройство, гипергликемия, диабет и диабетическое осложнение; и для лечения или профилактики заболевания, в которое вовлечен канал Kir6.1, такого как когнитивное заболевание или расстройство, гипергликемия, диабет, диабетическое осложнение и психическое заболевание.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может иметь различные лекарственные формы. Примеры лекарственных форм для перорального введения включают таблетку, капсулу, порошкообразный препарат, гранулу, пилюлю, жидкий препарат, эмульсию, суспензию, раствор, спрей, сироп, экстракт и эликсир. Примеры лекарственных форм для парентерального введения включают инъекцию, такую как подкожная инъекция, внутривенная инъекция, внутримышечная инъекция, внутривентрикулярная инъекция; чрескожное введение или пластырь, а также мазь или лосьон. Примеры лекарственных форм для интраорального введения включают сублингвальную форму и пероральный пластырь. Примеры назального введения включают аэрозоль. Однако лекарственные формы не ограничиваются этим. Эти препараты можно получить способами, известными в данной области и обычно используемыми для формулирования лекарственных средств.

Фармацевтическая композиция может содержать различные обычно используемые компоненты; например, может содержать по меньшей мере один тип фармакологически приемлемого эксципиента, разрыхлителя, разбавителя, смазывающего вещества, ароматизатора, красителя, подсластителя, корригента, суспендирующего вещества, смачивающего вещества, эмульгатора, диспергирующего вещества, адьюванта, консерванта, буфера, связующего, стабилизатора и агента покрытия. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может представлять собой форму пролонгированного действия или форму замедленного высвобождения.

Дозу терапевтического средства, профилактического средства или фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно соответствующим образом выбрать в зависимости от, например, способа введения, размера тела, возраста, физического состояния пациента, тяжелого или слабого симптома заболевания и периода заболевания после начала заболевания. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать терапевтически эффективное количество и/или профилактически эффективное количество соединения, представленного формулой (I). В настоящем изобретении соединение, представленное формулой (I), можно использовать обычно при дозе 1-1000 мг/день для взрослого пациента или от 0,01 до 20 мг/день/кг массы тела. Введение фармацевтической композиции

может быть разовым или с использованием нескольких доз.

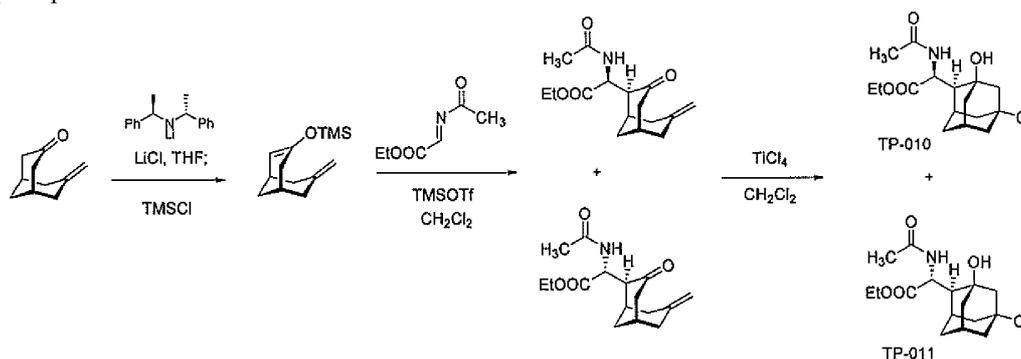
Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, если необходимо, компоненты, известные в данной области, такие как краситель, консервант, химический ароматизатор, отдушка, агент покрытия, антиоксидант, витамин, аминокислота, пептид, белок и минерал (железо, цинк, магний, йод и т.д.). Терапевтическое средство или профилактическое средство по настоящему изобретению может иметь лекарственные формы, подходящие, например, для фармацевтической композиции, функциональной пищи, здоровой пищи, напитка и добавки, например, твердые препараты, такие как гранула (включая сухой сироп), капсула (мягкая капсула, твердая капсула), таблетка (включая жевательную лекарственную форму), порошкообразная лекарственная форма (порошок) и пилюля, или жидкие препараты, такие как раствор для внутреннего введения (включая жидкое лекарственное средство, суспензию, сироп). Терапевтическое средство или профилактическое средство по настоящему изобретению можно использовать непосредственно, например, в виде фармацевтической композиции, функционального пищевого продукта, здорового питания и добавки.

Примеры добавок для формулирования лекарственного продукта включают эксципиент, смазывающее вещество, связующее, разрыхлитель, разжижающую добавку, диспергирующее вещество, смачивающее вещество, консервант, загуститель, модификатор pH, краситель, ароматизатор, поверхностно-активное вещество и солюбилизующее вещество. Для формулирования жидкого лекарственного средства можно добавить в смесь загуститель, такой как пектин, ксантановая камедь и гуаровая камедь. Кроме того, таблетки с покрытием можно получить с использованием агента покрытия, и может быть образован пастообразный клей. В случае других лекарственных форм лекарственные продукты можно получить в соответствии с обычным способом.

Примеры

Настоящее изобретение будет более конкретно описано при помощи примеров; однако, настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

Пример 1.



Химическая формула 5

К раствору бис((R)-1-фенилэтил)амин (1,8 г, 18 ммоль) в THF (30 мл) добавляли по каплям раствор *n*-BuLi в гексане (1,56 М, 4,8 мл, 7,33 ммоль) при охлаждении льдом. Реакционный раствор перемешивали в течение 30 мин при этой же температуре, реакционный раствор охлаждали до температуры -78°C . Затем добавляли триметилсилилхлорид (TMSCl, 1,7 мл, 13,3 ммоль) и после этого добавляли раствор 7-метиленилбисцикло[3.3.1]нонан-3-она (1,0 г, 16,6 ммоль) в THF (5 мл) через канюлю. После перемешивания в течение 1 ч к реакционному раствору добавляли воду и раствор экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=9:1) с получением целевого вещества, TMS енолового эфира (1,24 г, 84%) в виде бесцветного масла.

Полученный TMS еноловый эфир (400 мг, 1,80 ммоль) и этил (E)-2-(ацетилимино)ацетат (5,4 ммоль), полученный в соответствии со способом, раскрытым в литературе (Kobayashi S et al., J. Combi. Chem., 2001, 3, 401), растворяли в дихлорметане (9 мл). Реакционный раствор охлаждали до 0°C . К этому раствору добавляли триметилсилилтрифторметансульфонат (TMSOTf, 240 мл, 900 ммоль). Раствор перемешивали при этой же температуре в течение 1 ч и затем добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 для остановки реакции. Реакционный раствор экстрагировали этилацетатом. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении с получением неочищенного продукта (410 мг, масло) реакции Манниха. Неочищенный продукт (400 мг) растворяли в дихлорметане (7 мл) и охлаждали до -30°C . К раствору добавляли TiCl_4 (120 мл, 1,09 ммоль). После перемешивания раствора в течение 1 ч при этой же температуре добавляли воду для остановки реакции. Раствор экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и затем сушили над MgSO_4 , растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=10:1 до 9:1) с получением TP010 (148 мг, 25%) и

TP-011 (228 мг, 52%).

TP-010 (84% эи): аморфный;

$[\alpha]_D^{29} = 3,4$ ($c=1,832$, CHCl_3); (^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 6,15 (д, $J=8,8$ Гц, 1H), 4,90 (т, $J=9,6$ Гц, 1H), 4,22-4,15 (м, 2H), 3,00 (с, 1H), 2,29 (шир.с, 1H), 2,15-1,95 (м, 8H), 2,04 (с, 3H), 1,85-1,78 (м, 2H), 1,50 (шир.д, $J=12,7$ Гц, 1H), 1,37 (шир.д, $J=13,4$ Гц, 1H), 1,28 (т, $J=7,3$ Гц, 3H);

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 173,1, 170,3, 70,8, 66,6, 61,8, 56,7, 51,8, 51,7, 47,9, 46,6, 37,7, 33,3, 31,8, 29,4, 23,4, 14,0;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3336, 1725, 1654;

MS (EI): m/z 329 (M^+), 256 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{Cl}$ (M^+) 329,1394, найдено 329,1399.

TP-011 (84% эи): т. пл. 65-68°C (Et_2O -н-гексан);

$[\alpha]_D^{29} = -2,4$ ($c=1,72$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,64 (шир.с, 1H), 4,42 (д, $J=10,1$, 3,9 Гц, 1H), 4,20 (кв., $J=7,1$ Гц, 2H), 3,70 (с, 1H), 2,30 (шир.с, 1H), 2,20-1,88 (м, 9H), 1,98 (с, 3H), 1,88 (шир.д, $J=13,9$ Гц, 1H), 1,57 (шир.д, $J=12,5$ Гц, 1H), 1,38 (шир.д, $J=12,5$ Гц, 1H), 1,28 (т, $J=7,1$ Гц, 3H);

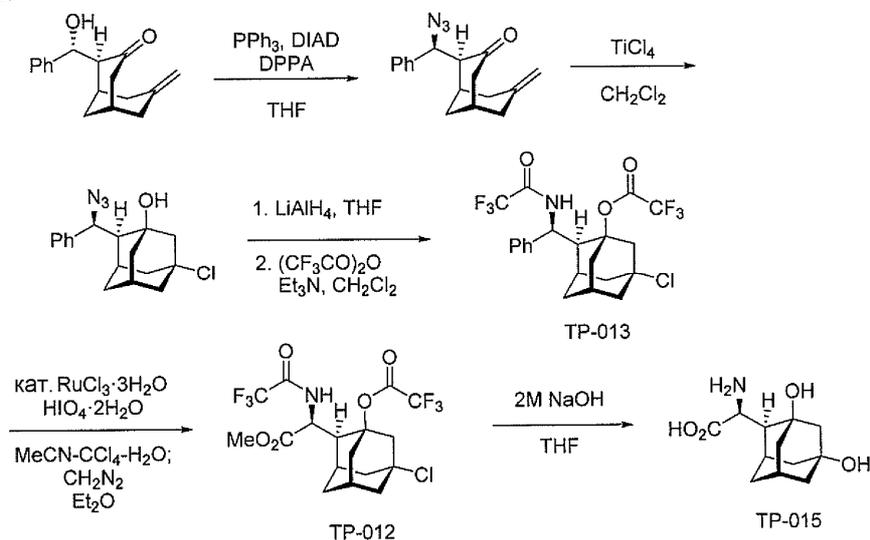
^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 171,7, 170,4, 72,6, 66,0, 61,1, 56,6, 55,1, 48,9, 47,3, 46,2, 38,3, 34,3, 31,8, 29,0, 22,9, 14,1;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3377, 1739, 1650;

MS (EI): m/z 329 (M^+), 256 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{Cl}$ (M^+) 329,1394, найдено 329,1415.

Пример 2.



К раствору (1R,2S,5S)-2-((R)-гидрокси(фенил)метил)-7-метиленилбисцикло[3.3.1]нонан-3-она (750 мг, 2,9 ммоль), который был получен в соответствии со способом, описанным в J. Am. Chem. Soc., 2014, 136, 17591-17600, дифенилфосфатазида (DPPA, 820 мл, 3,81 ммоль) и трифенилфосфина (1,20 г, 4,4 ммоль) в THF (15 мл) добавляли при охлаждении льдом диизопропилазодикарбоксилат (DIAD, 2,2 мл, 4,4 ммоль). После перемешивания в течение 1 ч при этой же температуре растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (15 мл) и добавляли при охлаждении льдом TiCl_4 (820 мл, 2,3 ммоль). После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 4 ч добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 при охлаждении льдом. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка). Фильтрат экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным солевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=10:1) с получением (1R,2S,3R,5R,7R)-2-((S)-азидо(фенил)метил)-5-хлорадамантан-1-ола (756 мг, 92%) в виде белого твердого вещества.

К раствору полученного азидного соединения (750 мг, 2,67 ммоль) в THF (14 мл) добавляли LiAlH_4 (300 мг, 8,00 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания в течение 1 ч при этой же температуре к реакционному раствору добавляли водный раствор аммиака. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка), растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (15 мл) и затем добавляли при охлаждении льдом триэтиламин (2,2 мл, 16,0 ммоль) и безводную трифторуксусную кислоту (TFAA, 1,2 мл, 8,0 ммоль). После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение ночи добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 раствор. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали коло-

ночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=15:1) с получением TP-013 (871 мг, 56%) в виде белого твердого вещества.

Т. пл. 83-85°C (бесцветные игольчатые кристаллы, н-гексан-Et₂O);

$[\alpha]_D^{31} = -84,1$ (c=1,08, CHCl₃);

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,35-7,27 (м, 5H), 6,63 (д, J=11,1 Гц, 1H), 5,44 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,26 (д, J=11,1 Гц, 1H), 2,99 (д, J=11,1 Гц, 1H), 2,45-2,41 (м, 3H), 2,26-2,13 (м, 5H), 1,96 (шир.д, J=12,4 Гц, 2H), 1,47 (шир.д, J=14,0 Гц, 1H);

¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ 156,2 (кв., J=37,4 Гц), 154,9 (кв., J=42,3 Гц), 139,1, 129,2, 128,7, 127,1, 115,8 (кв., J=288,1 Гц), 113,3 (кв., J=287,3 Гц), 86,6, 65,1, 53,4, 50,2, 48,0, 46,9, 46,1, 35,6, 34,6, 31,7, 28,5;

ИК (без растворителя, см⁻¹): 3296, 2945, 1775, 1698;

MS (EI): m/z 483 (M⁺), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для C₂₁H₂₀ClF₆NO₃ (M⁺) 483,1036, найдено 483,1046.

К раствору, содержащему TP-013 (550 мг, 1,14 ммоль) в ацетонитриле (1,8 мл)-тетрахлориде углерода (1,8 мл)-воде (1,8 мл) добавляли при охлаждении льдом RuCl₃×3H₂O (114 ммоль) и HIO₄×2H₂O (3,6 г, 16,0 ммоль). Реакционный раствор интенсивно перемешивали при этой же температуре в течение 8 ч. К реакционному раствору добавляли воду. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. К полученному органическому слою добавляли раствор диазометана в диэтиловом эфире при охлаждении льдом, пока раствор не стал желтым. Через 30 мин раствор продували азотом для удаления диазометана и затем растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=15:1) с получением TP-012 (235 мг, 44%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_D^{24} = -22,7$ (c=1,84, CHCl₃);

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 7,10 (д, J=9,8 Гц, 1H), 5,02 (д, J=10,1 Гц, 1H), 3,76 (с, 3H), 2,92 (дд, J=10,3, 2,0 Гц, 1H), 2,74 (д, J=11,5 Гц, 1H), 2,69 (дд, J=11,5, 1,7 Гц, 1H), 2,43 (шир.с, 1H), 2,30-2,10 (м, 7H), 1,86 (д, J=14,1 Гц, 1H), 1,46 (д, J=14,1 Гц, 1H);

¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ 171,1, 157,1 (кв., J=37,9 Гц), 155,2 (кв., J=41,2 Гц), 115,5 (кв., J=285,4 Гц), 113,8 (кв., J=284,6 Гц), 87,0, 64,8, 53,0, 51,3, 49,8, 47,6, 46,5, 45,9, 34,2, 33,5, 31,7, 28,8;

ИК (без растворителя, см⁻¹): 3319, 1780, 1714;

MS (EI): m/z 406 (M-CO₂CH₃);

HRMS (EI): рассчитано для C₁₅H₁₅NO₃F₆Cl (M⁺) 406,0645, найдено 406,0651.

К раствору TP-012 (256 мг, 550 ммоль) в THF (2,0 мл) добавляли водный раствор NaOH (2 M, 2,0 мл) при охлаждении льдом. Реакционный раствор перемешивали в течение 2 ч. THF отгоняли, затем реакционный раствор нейтрализовали 10% водным раствором HCl, подвергали ионообменной хроматографии (DOWEX50), элюировали 0,23 N водным раствором хлорида аммония и подвергали лиофилизации с получением TP-015 (48,5 мг, 34%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_D^{28} = -46,3$ (c=0,78, MeOH);

¹H-ЯМР (600 МГц, CD₃OD): δ 3,87 (д, J=9,6 Гц, 1H), 2,26 (шир.с, 1H), 2,19 (шир.с, 1H), 2,12 (д, J=10,9 Гц, 1H), 2,08 (д, J=12,4 Гц, 1H), 1,80-1,62 (м, 5H), 1,66 (шир.с, 2H), 1,50 (шир.д, J=12,4 Гц, 1H), 1,37 (шир.д, J=13,1 Гц, 1H);

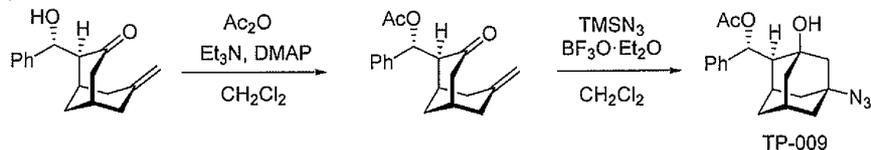
¹³C-ЯМР (150 МГц, CD₃OD): δ 174,6, 70,3, 68, 6, 54,7, 53,8, 49,4, 44,3, 43,4, 38,7, 32,9, 30,9, 29,2;

ИК (без растворителя, см⁻¹): 3336, 1730;

MS (FAB): m/z 242 (M+1);

HRMS (FAB): рассчитано для C₁₂H₂₀NO₄ (M+1) 242,1387, найдено 252,1383.

Пример 3.



Химическая формула 7

К раствору (1R,2S,5S)-2-((R)-гидрокси(фенил)метил)-7-метиленибицикло[3.3.1]нонан-3-она (256 мг, 1,00 ммоль) в дихлорметане (5 мл) добавляли триметиламин (0,42 мл, 3 ммоль), диметиламинопиридин (DMAP, 12 мг, 0,1 ммоль) и безводную уксусную кислоту (0,14 мл, 1,5 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 20 мин добавляли насыщенный водный раствор NaHCO₃ при охлаждении льдом и экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO₄ и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=4:1) с получением (1R,2S,5S)-2-((R)-ацетокси(фенил)метил)-7-метиленибицикло[3.3.1]нонан-3-она (289 мг, 97%) в виде белого твердого вещества.

К раствору полученного продукта (75,2 мг, 0,252 ммоль) в дихлорметане (2,5 мл) добавляли триметилсилилазид (TMSN₃, 0,10 мл, 0,76 ммоль) и BF₃×OEt₂ (0,04 мл, 0,30 ммоль) при -20°C. Температуру

реакционного раствора постепенно повышали до комнатной температуры и реакционный раствор перемешивали в течение 3 ч. После этого к реакционному раствору добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 при охлаждении льдом. Полученный реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO_4 и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=2:1) с получением TP-009 (33,5 мг, 39%) в виде белого твердого вещества.

Т. пл. 114°C (бесцветные кристаллы, Н-гексан- Et_2O);

$[\alpha]_D^{19} = +56,0$ ($c=0,67$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,37-7,31 (м, 5H), 6,01 (д, $J=10,6$ Гц, 1H), 2,95 (шир.с, 1H), 2,27 (шир.с, 1H), 2,25 (д, $J=10,6$ Гц, 1H), 2,15 (д, $J=13,0$ Гц, 1H), 2,01 (с, 3H), 1,89-1,83 (м, 2H), 1,76-1,61 (м, 7H), 1,18 (д, $J=13,0$ Гц, 1H);

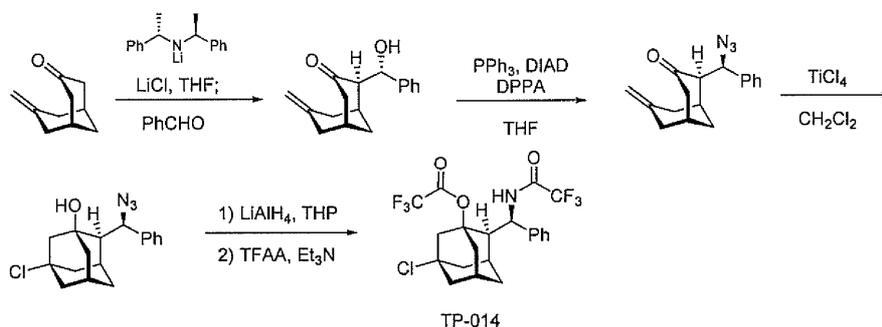
^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 169,6, 138,9, 128,7, 128,5, 127,3, 77,0, 71,3, 60,0, 51,9, 50,7, 41,6, 40,4, 38,8, 32,5, 30,6, 29,3, 21,6;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3460, 2931, 2091, 1732;

MS (EI): m/z 323 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 107 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$ ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$) 323,1634, найдено: 323,1613.

Пример 4.



Химическая формула 8

К раствору бис ((S)-1-фенилэтил)амин (10,0 мл, 44 ммоль) и хлорида лития (3,4 г, 80 ммоль) в THF (100 мл) добавляли по каплям раствор н-бутиллития в гексане (1,56 М, 28,2 мл, 44 ммоль) при охлаждении льдом. Реакционный раствор перемешивали при этой же температуре в течение 30 мин и затем охлаждали до -78°C . К реакционной смеси добавляли раствор 7-метиленбicyclo[3.3.1]нонан-3-она (6,00 г, 40 ммоль) в THF (60 мл) через канюлю. После перемешивания реакционного раствора в течение 1 ч добавляли раствор бензальдегида (6,1 мл, 60 ммоль) в THF (40 мл) через канюлю. После перемешивания реакционного раствора в течение 2 ч к реакционному раствору последовательно добавляли уксусную кислоту и насыщенный водный раствор хлорида аммония. Реакционный раствор экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=4:1) с получением (1S,2R,5R)-2-((S)-гидрокси(фенил)метил)-7-метиленбicyclo[3.3.1]нонан-3-она (8,3 г, 81%) в виде белого твердого вещества. Это вещество перекристаллизовывали из диэтилового эфира с получением бесцветных игольчатых кристаллов.

Т. пл. 122°C ;

$[\alpha]_D^{21} = -17,9$ ($c=0,32$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,38-7,25 (м, 5H), 4,79 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 4,76 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 4,71 (д, $J=6,8$ Гц, 1H), 2,90 (с, 1H), 2,64 (дд, $J=15,7$, 6,8 Гц, 1H), 2,48-2,18 (м, 6H), 2,01 (шир.д, $J=14,3$ Гц, 1H);

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 211,0, 141,6, 128,8, 127,6, 114,8, 74,6, 62,7, 45,7, 42,2, 41,3, 32,4, 31,9, 28,4;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3390, 1711;

MS (EI): m/z 256 (M^+), 95 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (M^+) 256,1463, найдено 256,1450.

К раствору (1S,2R,5R)-2-((S)-гидрокси(фенил)метил)-7-метиленбicyclo[3.3.1]нонан-3-она (2,00 г, 7,5 ммоль), DPPA (2,3 мл, 11 ммоль) и трифенилфосфина (3,0 г, 11 ммоль) в THF (38 мл) добавляли DIAD (2,2 мл, 11 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания в течение 1 ч при этой же температуре растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (38 мл) и добавляли при охлаждении льдом TiCl_4 (0,8 мл, 7,5 ммоль). После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 4 ч добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 при охлаждении льдом. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка) и фильтрат экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и к остатку добавляли тетрагидропиран (THP, 40 мл). К смеси добавляли LiAlH_4 (430 мг, 11 ммоль) при охлаждении

льдом. Реакционную смесь перемешивали при этой же температуре в течение 30 мин и к реакционному раствору добавляли водный раствор аммиака. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка) и растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (40 мл) и затем добавляли триэтиламин (6,3 мл, 45 ммоль) и TFAA (3,2 мл, 23 ммоль) при охлаждении льдом. Полученный реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 и затем экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=15:1) с получением неочищенного продукта в виде белого твердого вещества. Это вещество перекристаллизовывали из диэтилового эфира-гексана с получением TP-014 (1,27 г, 35%) в виде белого твердого вещества.

Т. пл. 89°C ;

$[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +89,1$ ($c=0,31$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,35-7,27 (м, 5H), 6,63 (д, $J=11,1$ Гц, 1H), 5,44 (т, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,26 (д, $J=11,1$ Гц, 1H), 2,99 (д, $J=11,1$ Гц, 1H), 2,45-2,41 (м, 3H), 2,26-2,13 (м, 5H), 1,96 (шир.д, $J=12,4$ Гц, 2H), 1,47 (шир.д, $J=14,0$ Гц, 1H);

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 156,2 (кв., $J=37,4$ Гц), 154,9 (кв., $J=42,3$ Гц), 139,1, 129,2, 128,7, 127,1, 115,8 (кв., $J=288,1$ Гц), 113,3 (кв., $J=287,3$ Гц), 86,6, 65,1, 53,4, 50,2, 48,0, 46,9, 46,1, 35,6, 34,6, 31,7, 28,5;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3296, 2945, 1775, 1698;

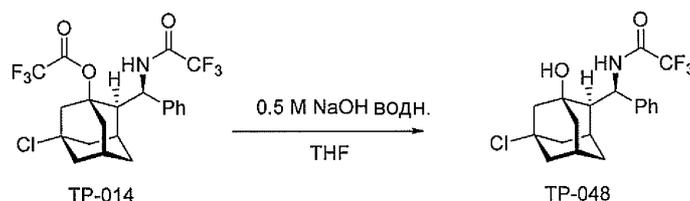
MS (EI): m/z 483 (M^+), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClF}_6\text{NO}_3$ (M^+) 483,1036, найдено 483,1046;

Анал.: рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ClF}_6\text{NO}_3$: C, 52,13; H, 4,17;

N, 2,89; найдено C, 52,27; H, 4,18; N, 2,88.

Пример 5.



К раствору TP-014 (84,7 мг, 0,175 ммоль) в THF (2 мл) добавляли 0,5 М водный раствор NaOH (1 мл) при охлаждении льдом. Реакционный раствор перемешивали при этой же температуре в течение 15 мин и добавляли насыщенный водный раствор NH_4Cl и экстрагировали этилацетатом. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=8:1 до 4:1) с получением TP-048 (65,5 мг, 96%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +109,2$ ($c=0,772$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,41-7,32 (м, 5H), 6,98 (шир., 1H), 5,34 (т, $J=9,7$ Гц, 1H), 2,36-2,29 (м, 3H), 2,19-2,00 (м, 7H), 1,77 (шир.д, $J=11,6$ Гц, 1H), 1,41-1,33 (м, 2H);

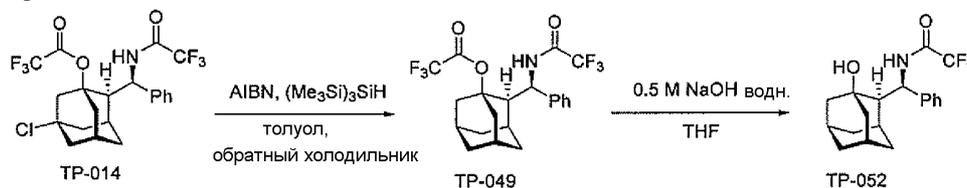
^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 156,2 (кв., $J=37,1$), 140,5, 129,4, 128,6, 127,4, 115,8 (кв., $J=288,1$ Гц), 72,3, 66,1, 56,7, 54,2, 52,4, 47,7, 46,3, 38,6, 34,4, 31,8, 28,8;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3553, 3297, 2940, 1698, 1552, 1208, 1183, 1165;

MS (EI): m/z 387 (M^+), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClF}_3\text{NO}_2$ (M^+) 387,1213, найдено 387,1196.

Пример 6.



К раствору TP-014 (30,0 мг, 0,062 ммоль) в толуоле (2 мл) добавляли трис(триметилсилил)силан (29 мл, 0,095 ммоль) и азобисизобутиронитрил (AIBN, 2,0 мг, 0,012 ммоль) при комнатной температуре. Реакционный раствор нагревали с обратным холодильником в течение ночи, затем растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=15:1) с получением TP-049 (23,0 мг, 83%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_{\text{D}}^{29} = +106,4$ ($c=0,385$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,33-7,27 (м, 5H), 6,31 (шир.д, $J=10,1$ Гц, 1H), 5,50 (дд, $J=10,9$, 10,1 Гц, 1H), 3,20 (шир.д, $J=10,9$ Гц, 1H), 2,60 (шир.д, $J=11,6$ Гц, 1H), 2,45 (шир.д, $J=12,1$ Гц, 1H), 2,28-2,27 (м,

3H), 2,04-1,80 (м, 6H), 1,72 (шир.с, 2H);

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 156,0 (кв., $J=37,1$ Гц), 155,1 (кв., $J=41,8$ Гц), 139,8, 129,0, 128,4, 127,2, 115,8 (кв., $J=288,1$ Гц), 113,5 (кв., $J=287,3$ Гц), 87,5, 53,6, 49,4, 41,3, 37,2, 36,1, 33,0, 30,6, 30,4, 30,2;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3335, 2927, 1775, 1700, 1556, 1218, 1169;

MS (EI): m/z 449 (M^+), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{NO}_3$ (M^+) 449,1426, найдено 449,1447.

К раствору TP-049 (61,5 мг, 0,137 ммоль) в THF (1,4 мл) добавляли водный раствор NaOH (0,5 М, 0,5 мл) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при этой же температуре в течение 5 мин к реакционному раствору добавляли 2 М хлористоводородной кислоты. Реакционный раствор экстрагировали этилацетатом. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=4:1 до 2:1) с получением TP-052 (49,4 мг, количественн.) в виде белого твердого вещества.

TP-052: $[\alpha]_{\text{D}}^{14} +130, 7$ ($c=0,243$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,39-7,31 (м, 5H), 6,77 (шир.д, $J=8,9$ Гц, 1H), 5,40 (дд, $J=9,7, 8,9$ Гц, 1H), 2,32 (шир.д, $J=9,7$ Гц, 1H), 2,31-2,07 (м, 4H), 1,85-1,79 (м, 2H), 1,72-1,57 (м, 5H), 1,52-1,44 (м, 2H), 1,29 (шир., 1H);

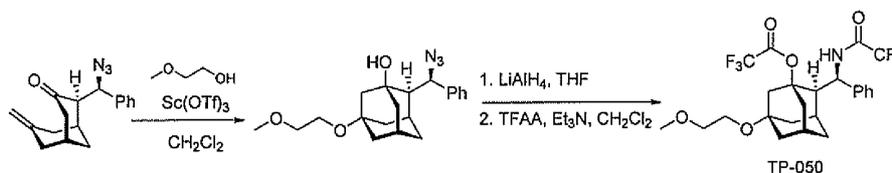
^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 156,1 (кв., 37,1 Гц), 140,7, 129,4, 128,5, 127,5, 115,9 (кв., 288 Гц), 77,2, 54,3, 53,0, 50,5, 48,5, 41,4, 39,6, 39,4, 33,2, 30,6, 29,6;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3566, 3291, 2919, 1698, 1183;

MS (EI): m/z 353 (M^+), 151 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{NO}_2$ (M^+) 353,1603, найдено 353,1604.

Пример 7.



Химическая формула 11

К раствору (1S,2R,5R)-2-(R-азидо(фенил)метил)-7-метиленибицикло[3.3.1.]нонан-3-она (57,4 мг, 0,204 ммоль) в дихлорметане (2 мл) последовательно добавляли 2-метоксиэтанол (78 мл, 1,0 ммоль) и трифторметансульфонат скандия (5,0 мг, 0,01 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение двух дней добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO_4 и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=1:2 до 1:1) с получением (1S,2R,3S,5S,7S)-2-((R)-азидо(фенил)метил)-5-(2-метоксиэтокси)адамantan-1-ола (41,2 мг, 56%) в виде бесцветного масла.

К раствору полученного азидного соединения (39,6 мг, 0,111 ммоль) в THF (1 мл) добавляли LiAlH_4 (8,0 мг, 0,21 ммоль) при охлаждении льдом. Температуру реакционного раствора постепенно повышали до комнатной температуры и реакционный раствор перемешивали в течение 1 ч. Реакционный раствор охлаждали льдом и затем добавляли LiAlH_4 (8,0 мг, 0,21 ммоль). После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 1 ч к реакционному раствору добавляли водный раствор аммиака при охлаждении льдом. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка). Фильтрат сушили над Na_2SO_4 и растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (1 мл), затем добавляли триэтиламин (77 мл, 0,56 ммоль) и безводную трифторуксусную кислоту (TFAA, 47 мл, 0,33 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 5 ч добавляли насыщенный водный раствор NaHCO_3 при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над MgSO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=1:4 до 1:2) с получением TP-050 (31,6 мг, 54%) в виде бесцветного масла.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +72,1$ ($c=0,965$, CHCl_3);

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): δ 7,34-7,23 (м, 5H), 6,33 (шир.д, $J=9,9$ Гц, 1H), 5,44 (дд, $J=10,9, 9,9$ Гц, 1H), 3,59-3,56 (м, 2H), 3,51-3,48 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 3,17 (шир.д, $J=10,9$ Гц, 1H), 2,65 (шир.д, $J=10,6$ Гц, 1H), 2,43-2,37 (м, 3H), 1,95-1,81 (м, 7H), 1,38 (шир.д, $J=11,6$ Гц, 1H);

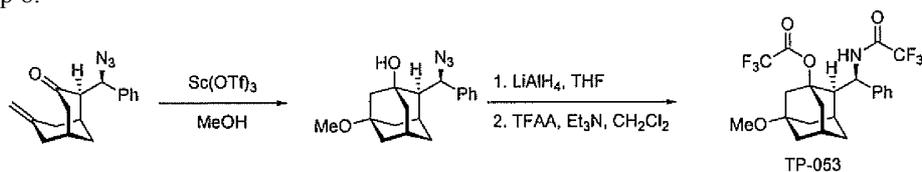
^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3): δ 156,1 (кв., $J=37,4$ Гц), 154,9 (кв., $J=42,1$ Гц), 139,4, 129,1, 128,5, 127,2, 115,8 (кв., $J=288,1$ Гц), 113,4 (кв., $J=287,3$ Гц), 87,6, 73,7, 72,3, 60,2, 59,1, 53,5, 48,5, 45,0, 41,1, 39,9, 36,3, 30,5, 29,2;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3303, 2936, 1775, 1698, 1554, 1221, 1172;

MS (EI): m/z 523 (M^+), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $C_{24}H_{27}F_6NO_5$ (M^+) 523,1793, найдено 523,1797.

Пример 8.



Химическая формула 12

К раствору (1S,2R,5R)-2-(R-азидо(фенил)метил)-7-метиленбицикло[3.3.1]нонан-3-она (238 мг, 0,848 ммоль) в метаноле (8,5 мл) добавляли трифторметансульфонат скандия (20 мг, 0,04 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 18 ч к реакционному раствору добавляли насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали этилацетатом. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над $MgSO_4$ и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=1:4 до 1:2) с получением (1S,2R,3S,5S,7S)-2-((R)-азидо(фенил)метил)-5-метоксиадамтан-1-ола (225 мг, 85%) в виде бесцветного масла.

К раствору полученного азидного соединения (225 мг, 0,716 ммоль) в THF (4 мл) добавляли $LiAlH_4$ (41 мг, 1,1 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания в течение 1 ч при этой же температуре к реакционному раствору добавляли водный раствор аммиака. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка) и растворитель отгоняли при пониженном давлении. К остатку добавляли дихлорметан (4 мл) и добавляли при охлаждении льдом триэтиламин (497 мл, 3,86 ммоль) и безводную трифторуксусную кислоту (TFAA, 299 мл, 2,15 ммоль). После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 40 ч добавляли насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над $MgSO_4$ и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=1:8 до 1:2) с получением TP-053 (262 мг, 75%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_D^{14} +97,2$ ($c=0,179$, $CHCl_3$);

1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 7,33 (м, 5H), 6,35 (шир.д, $J=9$, 9 Гц, 1H), 5,45 (дд, $J=10,6$, 9,9 Гц, 1H), 3,25 (с, 3H), 3,17 (шир.д, $J=10,6$ Гц, 1H), 2,61 (br d $J=10,6$ Гц, 1H), 2,45-2,37 (м, 3H), 1,97-1,73 (м, 7H), 1,39 (шир.д, $J=13,5$ Гц, 1H);

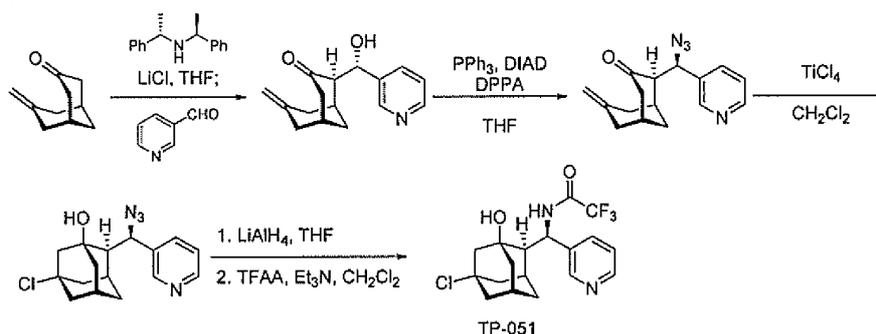
^{13}C -ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$): δ 156,0 (кв., $J=37,4$ Гц), 155,0 (кв., $J=41,8$ Гц), 139,4, 129,1, 128,6, 127,1, 115,8 (кв., 288,1 Гц), 113,4 (кв., 287,0 Гц), 87,7, 75,5, 53,5, 48,7, 48,6, 44,5, 40,8, 39,5, 36,3, 33,3, 30,4, 29,3;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3299, 2941, 1776, 1697, 1221, 1172;

MS (EI): m/z 479 (M^+), 202 (100%);

HRMS (EI): рассчитано для $C_{22}H_{23}F_6NO_4$ (M^+) 479,1531, найдено 479,1486.

Пример 9.



Химическая формула 13

К раствору бис((S)-1-фенилэтил)амин (2,5 мл, 11 ммоль) и хлорида лития (850 мг, 20 ммоль) в THF (25 мл) добавляли по каплям раствор н-бутиллития в гексане (1,56 М, 7,1 мл, 11 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при этой же температуре в течение 30 мин реакционный раствор охлаждали до $-78^\circ C$. К реакционной смеси добавляли раствор 7-метиленбицикло[3.3.1]нонан-3-она (1,52 г, 10 ммоль) в THF (15 мл) через канюлю. После перемешивания реакционного раствора в течение 30 мин добавляли раствор никотинальдегида (1,1 мл, 12 ммоль) в THF (10 мл) через канюлю. После перемешивания реакционного раствора в течение 40 мин к реакционному раствору последовательно добавляли уксусную кислоту и насыщенный водный раствор хлорида аммония. Реакционный раствор экстрагировали этилацетатом. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над K_2CO_3 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали

колоночной хроматографии на силикагеле (гексан-ацетон=3:2 до 1:2) с получением (1S,2R,5R)-2-((S)-гидрокси(пиридин-3-ил)метил)-7-метиленибицикло[3.3.1]нонан-3-она (2,7 г, 81%) в виде белого твердого вещества. Это вещество перекристаллизовывали из этилацетата с получением бесцветны кристаллов (99% эи).

К раствору полученного спирта (258 мг, 1,0 ммоль), дифенилфосфатазида (DPPA, 237 мл, 1,1 ммоль) и трифенилфосфина (239 мг, 1,1 ммоль) в THF (5 мл) добавляли диизопропилазодикарбоксилат (DIAD, 214 мл, 1,1 ммоль) при охлаждении льдом. Температуру реакционного раствора постепенно повышали до комнатной температуры. После перемешивания реакционного раствора в течение 5 ч растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=4:1 до 2:1) с получением (1S,2R,5R)-2-((R)-азидо(пиридин-3-ил)метил)-7-метиленибицикло[3.3.1]нонан-3-она (187 мг, 66%) в виде бесцветного масла.

К раствору полученного азидного соединения (187 мг, 0,66 ммоль) в дихлорметане (7 мл) добавляли $TiCl_4$ (300 мл, 0,27 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора при комнатной температуре в течение 3 ч добавляли насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали диэтиловым эфиром. Полученный органический слой промывали насыщенным соевым раствором и сушили над $MgSO_4$. Растворитель отгоняли при пониженном давлении и полученное твердое вещество промывали холодным диэтиловым эфиром с получением (1S,2R,3S,5S,7S)-2-((R)-азидо(пиридин-3-ил)метил)-5-хлорадамантан-1-ола (98,5 мг, 92%).

К раствору полученного соединения (75,4 мг, 0,257 ммоль) в THF (2 мл) добавляли $LiAlH_4$ (23 мг, 0,61 ммоль) при охлаждении льдом. После перемешивания реакционного раствора в течение 1 ч при этой же температуре к реакционному раствору добавляли водный раствор аммиака при охлаждении льдом. Реакционный раствор фильтровали через Целит (зарегистрированная торговая марка) и растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле ($CHCl_3$:метанол=1:0 до 4:1) с получением неочищенного амина.

К полученному неочищенному амину добавляли дихлорметан (2 мл) и затем добавляли при охлаждении льдом триэтиламин (17,8 мл, 1,28 ммоль) и безводную трифторуксусную кислоту (TFAA, 107 мг, 0,76 ммоль). Температуру реакционного раствора повышали до комнатной температуры. После перемешивания реакционного раствора в течение 4 часов добавляли насыщенный водный раствор $NaHCO_3$ при охлаждении льдом. Реакционный раствор экстрагировали дихлорметаном. Полученный органический слой сушили над Na_2SO_4 . Растворитель отгоняли при пониженном давлении. Остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (гексан:этилацетат=2:1 до 1:4) с получением TP-051 (48,8 мг, 49%) в виде белого твердого вещества.

$[\alpha]_D^{20} = +53,9$ (с=0,379, $CHCl_3$);

1H -ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$): δ 8,57 (д, J=1,0 Гц, 1H), 8,50 (дд, J=4,9, 1,5 Гц, 1H), 7,72 (шир.д, J=7,8 Гц, 1H), 7,41 (шир.д, J=9,8 Гц, 1H), 7,32 (дд, J=7,8, 4,9 Гц, 1H), 5,35 (дд, J=9,8, 9,3 Гц, 1H), 2,40-2,38 (м, 2H), 2,29 (шир.с, 1H), 2,22-1,99 (м, 7H), 1,75 (шир., 1H), 1,68 (шир.д, J=13,7 Гц, 1H), 1,48 (шир.д, J=13,2 Гц, 1H), 1,42 (шир.д, J=13,2 Гц, 1H);

^{13}C -ЯМР (100 МГц, $CDCl_3$): δ 156,4 (кв., J=37,1 Гц), 148,2, 147,7, 138,3, 136,5, 124,0, 115,8 (кв., J=287,8 Гц), 71,9, 66,1, 57,3, 52,6, 51,7, 47,6, 46,3, 38,3, 34,3, 31,6, 28,6;

ИК (без растворителя, cm^{-1}): 3292, 2938, 1700, 1558, 1212, 1184, 1161, 759;

MS (EI): m/z 388 (M^+), 203 (100%);

HRMS (EI) : рассчитано для $C_{18}H_{20}ClF_3N_2O_2$ (M^+) 388,1165, найдено 388,1177.

Пример испытаний 1.

Плазмидный вектор, содержащий κ ДНК Kir6.2 канала, встроенную в него: pcDNA3.1-Kir6.2, получили от Dr. Toru Ishizuka (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University). Плазмидный вектор, pcDNA3.1-Kir6.2, кондиционировали в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору GenElute HP Plasmid Maxiprep Kit (изготовитель Sigma-Aldrich). Культуральный раствор (композиция: DMEM культуральный раствор 450 мл, содержащий 50 мл бычьей сыворотки и 100 единиц пенициллина/стрептомицина) Neuro2A клеток (N2A клетки, National Institute of Biomedical Innovation), культивированных в DMEM культуральном растворе (Gibco), обменивали с Opti-Mem (Gibco) (содержит Липофектамин R2000 (1 мг/1 мл)), содержащим pcDNA3.1-Kir6.2 (1 мг/мл), кондиционированный, как указано выше, и культивировали в течение 5 ч с получением N2A клеток, сверхэкспрессирующих Kir6.2 канал. Снова осуществляли обмен с DMEM культуральным раствором и культивирование осуществляли в течение двух дней. Затем в культуральные растворы (DMEM, Gibco) добавляли мемантин (изготовитель Sigma-Aldrich) и соединение по настоящему изобретению (n=4 на группу) для получения концентрации 10 нМ в расчете на культуральный раствор, и культуральные растворы оставляли выстаиваться в течение 1 ч. Затем сверхэкспрессирующие Kir6.2 канал клетки N2A собирали и к N2A клеткам добавляли SDS буфер для образца с получением суспензии. Суспензию подвергали иммуноблоттингу, используя антифосфорилированное CaMKII антитело (Fukunaga K. et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 22527-22533) в качестве первичного антитела и анти-кроличье IgG антитело (изготовитель SouthernBiotech) в качестве вторичного антитела (другие условия, за исключением того, что указанные выше антитела были такими же,

которые используют в обычном иммуноблоттинге), для исследования активации CaMKII. В результате, в TP-009, TP-010, TP-011, TP-012, TP-014, TP-015, TP-048, TP-049, TP-050, TP-051, TP-052, TP-053 были получены полосы, показывающие реакцию с антителом против фосфорилированного CaMKII. Было подтверждено, что активация CaMKII усиливается. Результаты показаны на фиг. 1. На фиг. 1 результат для случая (контроль: с), где испытываемое соединение не добавляли, считается за 100%. Активация CaMKII в случаях, содержащих мемантин, TP-009, TP-010, TP-011, TP-012, TP-014, TP-015, TP-048, TP-049, TP-050, TP-051, TP-052, TP-053 (соответствуют, 9, 10, 11, 12, 12, 15, 48, 49, 50, 51, 52 и 53 М соответственно), показана на фиг. 1.

Пример испытаний 2.

С использованием Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующих клеток, полученных в примере испытаний 1, ток калия, вытекающий из клеток, измеряли обычным пэтч-кламп методом. Результаты показаны на фиг. 2. АТФ-чувствительный калиевый канал (Kir6.2 канал) был локализован в клеточной мембране нервных клеток. Если канал ингибируется и закрывается, порог мембраны нервной клетки повышается, приводя к состоянию, которое аналогично состоянию, где потенциал действия временно генерируется, в результате ток калия вытекает из клетки наружу, а вместо этого ток кальция втекает в клетку снаружи. Фиг. 2а показывает, что Kir6.2 канал сверхэкспрессируется в N2A клетках (верхняя фиг. показывает окрашенные изображения, полученные методом иммуноблоттинга; тогда как нижняя фиг. количественно выражает интенсивность сигнала полос). Это было подтверждено с применением иммуноблоттинга (использовали такие же условия, как в Примере испытаний 1, за исключением анти-Kir6.2 канал антитела, n=5) с анти-Kir6.2 канал антителом (полученным обычным способом) к Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующим клеткам (полученным описанным выше способом). Никакого изменения не наблюдали в конститутивном генном продукте, т.е. β тубулине (анти- β тубулиновое антитело получали от Sigma-Aldrich, и другие условия такие же, как в детекции Kir6.2). Фиг. 2b (подтвержденные результаты) показывает, что, если Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующим клеткам дают выстояться в электрофизиологическом экспериментальном буфере, содержащем TP-014, для получения концентрации 10 нМ, ток калия, который вытекает наружу, когда мембранный потенциал нервных клеток изменяется в сторону плюса, подавляется (n=5 на группу). Результаты показывают, что TP-014 ингибирует Kir6.2 канал и ингибирует ток калия, вытекающий из клеток.

Пример испытаний 3.

С использованием таких же Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующих клеток, как в примере испытаний 1, количество кальция, которое втекает в клетки снаружи при обработке TP-014, измеряли методом визуализации кальция. Результаты показаны на фиг. 3. Метод визуализации кальция представляет собой измерение количества кальция на основании интенсивности флуоресценции культивированных нервных клеток, которые обрабатывали в культуральном растворе, содержащем кальциевый флуоресцентный краситель (Fura2, изготовитель Dojindo Laboratories) в концентрации 4 мкМ. Визуализацию осуществляли при помощи визуализирующего устройства (LAMBDA10-2, изготовитель SUTTER INSTRUMENT) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к устройству. Фиг. 3а показывает изменение TP-014 концентрация-зависимого количества кальция с течением времени (в течение 4 мин), когда обработку осуществляли при помощи TP-014 (1-100 нМ) и мемантина (100 нМ). Фиг. 3b показывает результаты измерений количества кальция, когда измерение осуществляли через 4 мин после обработки мемантином (100 нМ) и TP-014 (1-100 нМ) (n=5 на группу). TP-014 имеет больший эффект повышения концентрации кальция, чем мемантин. Было подтверждено, что количество кальция в клетках существенно повышается при обработке при помощи TP-014 в результате ингибирования вытекания калия из клеток, подтвержденного в примере испытаний 2.

Пример испытаний 4.

Модельным мышам с болезнью Альцгеймера (APP23 мыши, Sturchler-Pierrat et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 13287-13292) (возраст 12 месяцев) перорально вводили TP-014 (1 мг/кг) раз в день в течение двух месяцев (длительное лечение). В результате был подтвержден значимый эффект улучшения когнитивной функции. Результаты показаны на фиг. 4. Фиг. 4а-4d показывают результаты анализа поведения. фиг. 4а и 4b показывают функцию внимания, анализируемую на WT мышах (C57BL/6J, Japan SLC) и APP23 мышах (n=5 на группу) обычным методом Y-образного лабиринта. В результате было подтверждено, что эффект существенного улучшения функции внимания проявляется при обработке TP-014. Метод Y-образного лабиринта представляет собой метод, позволяющий мышам свободно перемещаться в трех рукавах лабиринта в течение 8 мин. Рукава будут условно обозначены как А, В, С соответственно. Мышь находящаяся в А, будет перемещаться в В или С (рукав). Случай, где мышь перемещается в В и затем перемещается в С, вкратце случай последовательного перемещения А-В-С считается правильным ответом; тогда как случай, где мышь перемещается А-В-А и уклоняется от выбора нового рукава, считается неправильным ответом. Рукава, в которые мышь заходила, регистрировали в хронологическом порядке и подсчитывали сколько раз мышь заходила в каждый из рукавов в течение определенного времени и определяли как "общее количество заходов в рукава". Из них количество случаев правильного ответа (случай, где мышь последовательно выбирает три разные рукава) подсчитывали и определяли как количество альтернирующих поведений ("№ альтернатив"). Отношение "№ альтернатив" к числу, полу-

ченному путем вычитания 2 из "общего количества заходов в рукава", выражают как альтернатию (%) и используют в качестве индекса нормального альтернативного поведения (процент правильных ответов пространственной рабочей памяти).

Мыши отдают предпочтение новому (незнакомому) объекту. Обычные мыши дают правильный ответ в 70% случаев; однако APP2 3 мыши дают правильный ответ лишь в около 50% случаев. На основании этих процентов анализируют функцию внимания (когнитивная функция).

Фиг. 4с показывает результаты запоминания нового (незнакомо) объекта для WT мышей и APP23 мышей (обе группы, $n=5$), которых оценивали обычным методом узнавания нового объекта. Испытание на распознавание новых объектов осуществляли следующим образом. Два идентичных по форме конструктивных элемента помещают в клетку и мышам позволяют играть с ними в течение 10 мин (это называется обучающим испытанием). Через час один из конструктивных элементов заменяют конструктивным элементом другой формы. Поскольку нормальные мыши проявляют интерес к новому объекту, они дольше играют с имеющим другую форму конструктивным элементом. Мыши с болезнью Альцгеймера (модельные) по-видимому имеют нарушение памяти, поскольку они не могут распознать новый объект (конструктивный элемент). Мышам позволяют свободно играть еще 5 мин с двумя конструктивными элементами разными по форме (это называется испытанием сохранения в памяти). В обучающем испытании и испытании сохранения в памяти подсчитывали сколько раз мышь контактировала с каждым из двух объектов. Рассчитывали отношение (%)-количества контактов с имеющим другую форму конструктивным элементом к общему количеству контактов в испытании сохранения в памяти и использовали в качестве индекса дискриминации.

Фиг. 4d показывает результаты запоминания чувства страха, которое анализировали обычным методом условно-рефлекторного замирания ($n=5$ на группу). Метод условно-рефлекторного замирания представляет собой анализ, использующий преимущество предрасположенности мыши к темному месту, а не к светлому месту. День 1: мышь помещают в светлое место. Поскольку мышь любит темное место, мышь заходит в темное место (темный ящик). Когда в это время на мышь воздействуют электрической стимуляцией, мышь удивляется и возвращается в светлое место и никогда не заходит в темное место. День 2: мышь помещают в светлое место (то же самое место, что и в день 1), а затем, заходит ли мышь в темное место или нет, наблюдают в течение 5 мин. Если мышь сразу попадает в темное место, это определяют как уменьшение у мыши памяти чувства страха. "Латентность" означает период времени (секунды), пока мышь, помещенная в светлое место, не зайдет в темное место (темную комнату) в день 2. Поскольку мыши APP23 сразу заходили в темное место, это подтверждало, что память чувства страха снизилась; однако у мышей, получавших TP-014 в течение двух месяцев, был подтвержден эффект улучшения.

Фиг. 4е-4г показывают результаты анализа феномена длительной потенциации (LTP)(служащего как индекс формирования памяти) электрофизиологическим методом. Гиппокамп в головном мозге играет важную роль в запоминании. Гиппокамп разрезали на секции (толщиной 400 микрон). Срезы помещали в искусственную спинномозговую жидкость (126 mM NaCl, 5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 1,3 mM MgSO₄-7H₂O, 1,26 mM KH₂PO₄, 2,4 mM CaCl₂-2H₂O, 10 mM глюкозы), насыщенную 95% O₂/5% CO₂ газом при 34°C в течение 2 ч и восстанавливали. Срезы гиппокампа переносили в измерительную камеру и перфузировали искусственной цереброспинальной жидкостью, содержащей TP-014. Регистрировали активность нервных клеток при применении электрической стимуляции и измеряли возбуждающий постсинаптический потенциал (fEPSP). На основании этого оценивали степень улучшения LTP. Зарегистрированные формы сигналов показаны на фиг. 4е. После этого прилагали электрическую стимуляцию (100 Гц) к гиппокампу, чтобы вызвать выборочное изменение (считается, что память формируется выборочным изменением в гиппокампе). Было подтверждено, что скорость роста нейронального возбуждения снижается у мышей APP23; тогда как скорость улучшается у мышей, получавших длительное лечение TP-014. Показано, что обучение памяти эффективно улучшается за счет улучшения LTP.

Пример испытаний 5.

Гиппокамп мыши APP23 вырезали. К срезам гиппокампа добавляли SDS буфер для образца с получением суспензии, которую подвергали иммуноблоттингу с использованием антител против CaMKII, CaMKIV и ERK (CaMKII: Fukunaga et al., J. Biol. Chem., 1992, 267, 22527-22533, CaMKIV: Kasahara et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 24044-24050, ERK: изготовитель Sigma-Aldrich). Таким образом анализировали фосфорилирование отдельных белков. Результаты показаны на фиг. 5а и 5b. CaMKII, CaMKIV и ERK представляют собой молекулы, которые, как считается, играют важную роль в формировании памяти. В результате было обнаружено, что фосфорилирование CaMKII уменьшается у обычных мышей APP23; тогда как у мышей APP23, получавших длительное лечение TP-014 (условия обработки такие же, как в Примере испытаний 4), фосфорилирование CaMKII ускоряется. На основании этого результата показано, что активация CaMKII имеет важное значение для эффективного улучшения памяти у мышей APP23 при обработке при помощи TP-014.

GluA1 (Ser-831), синапсин I (Ser-603) и CREB (Ser-133) представляют собой молекулы, которые, как известно, активируются, если активируется CaMKII. Эти молекулы анализировали путем иммуноблоттинга срезов гиппокампа, суспендированных в SDS буфере для образцов. Антитела против отдельных мо-

лекул были получены от Millipore. Результаты показаны на фиг. 5c и 5d. Показано, что активация GluA1 (Ser-831) и CREB (Ser-133) индуцируется активацией CaMKII. На фиг. 5a и 5c показаны полосы (изображение), действительно полученные электрофорезом иммуноблотов. Фиг. 5b и 5d показывают результаты анализа, количественно показывающие интенсивности сигналов полос, показанных на фиг. 5a и 5c.

Пример испытаний 6.

Такой же эксперимент, который показан на фиг. 4, осуществляли с использованием мышинных моделей нейродегенеративных заболеваний, то есть мышей с удаленной обонятельной луковицей (ОВХ мышей). Результаты показаны на фиг. 6a-6g. Когнитивная дисфункция у ОВХ мышей значительно улучшалась при длительном введении (2 недели) TP-014. Для получения ОВХ мышей использовали DDY мышей мужского пола возраста 10 недель (Nippon SLC, Hamamatsu, Japan). Операцию по удалению обонятельной луковицы проводили под анестезией пентобарбиталом натрия (50 мг/кг, интраперитонеально; Dainippon, Osaka, Japan). Мышь фиксировали на фиксирующем приспособлении для операций на головном мозге и череп над обонятельной луковицей просверливали для получения отверстия диаметром 1 мм. Обонятельную луковицу удаляли всасывающим насосом, чтобы не повредить префронтальную кору. Группу имитации подготавливали, подвергая мышей такой же операции, как в группе ОВХ, за исключением удаления обонятельной луковицы всасыванием.

Пример испытаний 7.

Внутриклеточный механизм когнитивной дисфункции у ОВХ мышей исследовали так же, как на фиг. 5. Результаты показаны на фиг. 7a-7d. Было обнаружено, что активация CaMKII и CaMKIV имеет важное значение в гиппокампе, который играет важную роль в формировании памяти. Кроме того, было подтверждено, что активация GluA1 (Ser-831) и CREB (Ser-133), которые являются расположенными на пути ниже молекулами CaMKII и CaMKIV при активации, также имеет важное значение. Антитела против GluA1 (Ser-831) и CREB (Ser-133) были получены из Millipore. Из результатов, показанных на фиг. 4-7, было обнаружено, что важно ускорить активацию CaMKII и CaMKIV для эффекта улучшения когнитивной функции TP-014. Поскольку когнитивная дисфункция не наблюдается у CaMKIV ген-дефектных мышей, CaMKII играет важную роль в улучшении когнитивных функций.

Пример испытаний 8.

Для подтверждения, что действие TP-014 является Kir6.2-ингибирующим действием, сайт действия TP-014 был идентифицирован с использованием такого же поведенческого эксперимента, как на фиг. 4 (фиг. 8a и 8b: метод Y-лабиринта, фиг. 8c: метод распознавания нового объекта, фиг. 8d: метод условно-рефлекторного замирания, фиг. 8e-8g: оценка улучшения LTP, n=5 на группу) с использованием Kir6.2 канал-дефицитных мышей. Результаты показаны на фиг. 8. Было подтверждено, что когнитивная дисфункция индуцируется у Kir6.2 канал-дефицитных мышей. Результаты показывают, что канал Kir6.2 имеет важное значение для формирования памяти. Было также показано, что нарушение памяти и ослабление LTP у Kir6.2-дефектных мышей не улучшаются при длительном лечении TP-014 (два месяца). Результат показывает, что сайт действия TP-014 представляет собой Kir6.2 канал. Аналитические методы такие же, как в Примерах испытаний 4-7. Следует отметить, что Kir6.2-дефектных мышей получали от Professor Susumu Seino, School of Medicine of Kobe University (Miki T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1998, 95, 10402-10406).

Пример испытаний 9.

Активацию CaMKII исследовали таким же образом, как на фиг. 4-7. Кроме того, исследовали GluA1 (Ser-831), который известен как молекула, активируемая путем активации CaMKII. Срезы гиппокампа суспендировали в SDS буфере для образцов с получением суспензии, которую подвергали иммуноблоттингу. Таким образом анализировали внутриклеточный механизм когнитивной дисфункции у Kir6.2-дефектных мышей. Результаты показаны на фиг. 9 (фиг. 9a: изображения полос, полученных методом иммуноблоттинга, фиг. 9b: результаты количественной оценки интенсивности сигналов полос). В гиппокампе Kir6.2-дефектных мышей активация CaMKII была ускорена. Даже в случае длительного лечения при помощи TP-014 никакого влияния не наблюдалось. Аномалию наблюдали в гомеостазе внутриклеточного и внеклеточного кальция (баланс) при дефекте канала Kir6.2, и фосфорилирование CaMKII ускорялось. Было продемонстрировано, что TP-014 не влияет на активацию CaMKII, что предполагает, что сайтом действия TP-014 является канал Kir6.2

Пример испытаний 10.

Гипотеза, что амилоид- β (A β) является причиной болезни Альцгеймера, по-прежнему остается важной. Агрегация A β , которая происходит у APP23 мышей (возраст 14 месяцев), была подтверждена иммуноокрашиванием. Головной мозг WT (контрольная мышь) и APP23 мышей разрезали на секции толщиной 50 микрон. Срезы окрашивали 6E10 (A β антитело, изготовитель Abscam) и тиофлавином. Результаты (индекс для оценки агрегатов) показаны на фиг. 10. Условия, помимо вышеуказанных, были такими же, как и в обычном методе иммуноокрашивания. Было обнаружено, что агрегация A β ускорялась у APP23 мыши, в частности, много агрегатов наблюдали в коре головного мозга (PFC). Напротив, агрегация практически не наблюдалась в гиппокампе (CA1). Агрегация A β ингибировалась при длительном лечении при помощи TP-014. Результат показывает, что TP-014 обладает ингибиторным эффектом против A β

агрегации.

Пример испытаний 11.

Улучшающий эффект TP-014 на депрессия-подобный симптом проверяли с использованием мышей OBX в качестве мышинной модели депрессии. Результаты показаны на фиг. 11. Мыши OBX были первоначально установлены как мышинная модель депрессии, хотя наблюдалось ухудшение когнитивной функции. Депрессию анализировали методом подвешивания за хвост (а) и методом принудительного плавания (б). Метод подвешивания за хвост - это способ защемления хвоста мыши и подвешивания мыши головой вниз. Если у подвешенной мыши есть депрессия, время неподвижности длительное. Поскольку нормальная мышь двигается, даже если она висит, время неподвижности короткое. В методе принудительного плавания мышь вынуждена плавать в воде в стакане. Мышь с депрессией не плавает и не движется (просто держится на поверхности). Таким образом измеряют время неподвижности. Время неподвижности было долгим у мышей OBX как в методе подвешивания за хвост (а), так и в методе принудительного плавания. Время неподвижности группы длительного введения TP-014 (2 недели, тот же метод введения, который указан выше) улучшалось. На основании результатов было продемонстрировано, что TP-014 обладает эффектом улучшения депрессия-подобного симптома у мышей OBX (n=5 на группу).

Пример испытаний 12.

Время неподвижности у Kir6.1-дефектных мышей (гетеротип, n=5 на группу) измеряли методом подвешивания за хвост (а) и методом принудительного плавания (б) таким же образом, как на фиг. 11. Гетеротипные мыши являются мышами, у которых уровень экспрессии канала Kir6.1 составляет половину (у гомотипных мышей развивается аритмия после рождения, и они умирает) в отличие от гомотипных мышей (полностью дефектных мышей). Результаты показаны на фиг. 12. У Kir6.1-дефектных мышей наблюдали гиперактивированный депрессия-подобный симптом. Результаты показали, что Kir6.1 является важной молекулой для депрессии. Длительное лечение при помощи TP-014 неэффективно. Было подтверждено, что TP-014 имеет эффект улучшения депрессии через ингибирующее Kir6.1 канал действие. Kir6.2 1-дефектных мышей получали от Professor Susumu Seino, School of Medicine of Kobe University (Miki T. et al., Nature Medicine, 2002, 8, 466-472).

Пример испытания 13.

CaMKIV, индуцируемый каналом Kir6.1, анализировали с использованием CaMKIV-дефектных мышей (n=5, на группу *) таким же образом, как на фиг. 12. Результаты показаны на фиг. 13. Наблюдали ускорение развития депрессия-подобного симптома также у CaMKIV-дефектных мышей. На основании этого результата было установлено, что CaMKIV имеет важное значение для механизма развития депрессии. TP-014 не имел никакого эффекта на CaMKIV депрессия-подобный симптом (увеличение времени неподвижности). Было обнаружено, что TP-014 ингибирует Kir6.1 канал и имеет эффект улучшения депрессии посредством активации CaMKIV. CaMKIV-дефектных мышей получали от professor, Hiroyuki Sakagami, Kitasato University School of Medicine (Takao K. et al., PLoS One, 2010, 5, e9460).

Пример испытаний 14.

Гипогликемический эффект TP-014 проверяли путем измерения уровня глюкозы в крови с помощью набора для анализа (изготовитель Technicon International co). Результаты показаны на фиг. 14. Измерения осуществляли в течение 4 недель. В результате длительного лечения при помощи TP-014 (1 мг/кг) в течение 4 недель уровень глюкозы в крови значительно снижался даже по прошествии 3 недель. В качестве контроля использовали толбутамид. Канал Kir6.2 связывается с SUR1 (рецептор мочевины) на клеточной мембране с образованием канала. Механизм действия рассматривается в связи с ингибирующим Kir6.2 канал действием. Толбутамид связывается с SUR1, ингибируя Kir6.2 канал.

Пример испытания 15.

Плазмидный вектор, содержащий кДНК канала Kir6.1, встроенную в него: pcDNA3.1-Kir6.1, был получен от professor Toru Ishizuka of Graduate School of Life Sciences, Tohoku University. Клетки N2A, сверхэкспрессирующие Kir6.1 канал, получали таким же образом, как и в "получении N2A клеток, сверхэкспрессирующих Kir6.2 канал" примера испытаний 1, за исключением того, что использовали вышеуказанную плазмиду.

Активацию CaMKIV анализировали (измеряли) с использованием полученных Kir6.1 канал-экспрессирующих клеток. В качестве метода анализа использовали тот же иммуноблоттинг, что и в Примере испытаний 1. В качестве первичного антитела использовали антитело против фосфорилированного CaMKIV (Kasahara J. et al., J. Biol., 2001, 276, 24044-50). В качестве вторичного антитела использовали анти-кроличье IgG антитело (изготовитель SouthernBiotech).

С использованием полученных Kir6.1 канал-сверхэкспрессирующих клеток ток калия, вытекающий из клеток, измеряли обычным пэтч-кламп методом. Результаты показаны на фиг. 18. АТФ-чувствительный калиевый канал (Kir6.1 канал) был локализован в клеточной мембране нервных клеток. Если канал ингибируется и закрывается, порог мембраны нервной клетки повышается, приводя к состоянию, которое аналогично состоянию, где потенциал действия временно генерируется, в результате ток калия вытекает из клетки наружу, а вместо этого ток кальция втекает в клетку снаружи. Фиг. 18а показывает, что Kir6.1 канал сверхэкспрессируется в N2A клетках (верхняя фигура показывает окрашенные изображения, полу-

ченные методом иммуноблоттинга; тогда как нижняя фигура количественно выражает интенсивность сигнала полос). Это было подтверждено с применением иммуноблоттинга (использовали такие же условия, как в примере испытаний 1, за исключением анти-Kir6.1 канал антитела, n=5) с анти-Kir6.1 канал антителом (полученным обычным способом) к Kir6.1 канал-сверхэкспрессирующим клеткам (полученным описанным выше способом). Никакого изменения не наблюдали в конститутивном геномном продукте, т.е. β тубулине (анти- β тубулиновое антитело получали от Sigma-Aldrich, и другие условия такие же, как в детекции Kir6.1). Фигура показывает, что, если Kir6.2 канал-сверхэкспрессирующим клеткам дают выстояться в электрофизиологическом экспериментальном буфере, содержащем TP-014, для получения концентрации 10 нМ, ток калия, который вытекает наружу, когда мембранный потенциал нервных клеток изменяется в сторону плюса, подавляется (n=5 на группу). Результаты показывают, что TP-014 ингибирует Kir6.1 канал и ингибирует ток калия, вытекающий из клеток.

Пример испытаний 16.

С использованием мышей WT (C57BL/6J, Japan SLC, возраст два месяца), которым вводили кортикостерон (дозу 5 мг/кг вводили один раз в день в течение 2 недель); и Kir6.1-дефектных мышей, которым вводили кортикостерон, в качестве мышшиной модели заболевания с проявлением симптомов беспокойства, осуществляли пять поведенческих испытаний, касающихся поведения, связанного с беспокойством. Следует отметить, что Kir6.1-дефектные мыши были получены от Professor Susumu Seino, School of Medicine of Kobe University (Miki T. et al., Nature Medicine, 2002, 8, 466-472).

WT мышам и Kir6.1-дефектным мышам, которым вводили кортикостерон, TP-014 (1 мг/кг) вводили пероральным путем один раз в день в течение 2 недель (длительное лечение). В результате было подтверждено, что был получен значительный улучшающий эффект ускорения симптомов беспокойства. Результаты показаны на фиг. 19.

На фиг. 19а показаны результаты анализа подверженности каждой группы (n=5 на группу) беспокойству, осуществляемого методом приподнятого крестообразного лабиринта (фиг. 19b). В устройстве, используемом в данном испытании, крестообразное устройство с рукавами обеспечивается в высоком положении, а отдельные рукава либо открыты (видимы), либо закрыты. Мыши, подверженные беспокойству, долгое время остаются в закрытом рукаве; тогда как мыши, устойчивые к беспокойству, остаются в открытом рукаве (видимые). Время удерживания в открытом рукаве указано на вертикальной оси фиг. 19а.

Фиг. 19с показывает результаты испытания свет/темнота (фиг. 19d) (n=5 на группу). Измеряли время до того момента, когда мышь, помещенная в черный ящик (темное место), почувствует стремление к свету и выйдет из ящика на освещенное место. Время до момента, когда мышь выходит (вход в открытое отделение), указано на вертикальной оси фиг. 19с.

Фиг. 19е показывает результаты испытания методом "закапывания шариков" (фиг. 19f) (n=5 на группу). В клетку для мыши вносили подстилку из древесных стружек и 20 шариков располагали так, чтобы мышь могла их видеть. Мыши позволяли свободно перемещаться в течение 30 мин. Количество шариков, закопанных и спрятанных в подстилке из древесных стружек, подсчитывали. Поскольку мышь не любит светящийся объект, мыши, устойчивые к беспокойству, контактируют со многими шариками. Количество закопанных шариков указано на вертикальной оси фиг. 19е.

Фиг. 19g показывает результаты испытаний методом открытого поля (фиг. 19h) (n=5 на группу). Мышь помещают в квадратный ящик и позволяют перемещаться в течение 30 мин внутри ящика. Обычно мышь, которая испытывает сильное беспокойство, как правило, перемещается по краю ящика; тогда как мышь с сильной устойчивостью к беспокойству часто бегает в центральной части ящика. Такую тенденцию используют в качестве эталона. Время пребывания в центральной части ящика указано на фиг. 19h.

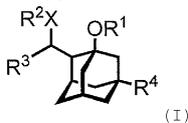
Фиг. 19i показывает результаты испытаний методом условно-рефлекторного замирания (n=5 на группу). Используя то же устройство, что и в методе свет/темнота, мышь помещают в темное место, а затем звук (верхний) генерируют в течение 30 с, после чего осуществляют электрическую стимуляцию в течение 3 с. После звуковой осуществляют электрическую стимуляцию три раза. В этом случае мышь запоминает, что после звука будет подаваться электрическая стимуляция. На следующий день звук продолжается в течение 5 мин. Мышь, если она чувствует страх/беспокойство, не двигается. Измеряется время неподвижности мыши. Время неподвижности указано на вертикальной оси фиг. 19i.

Все вышеуказанные результаты испытаний подтвердили, что длительное введение (2 недели) TP-014 улучшает ускорение симптома, подобного беспокойству. Kir6.1-дефектные мыши, которым вводили кортикостерон, проявляют беспокойство-подобные симптомы; однако при введении TP-014 никакого эффекта улучшения не получали. Результаты подтвердили, что улучшающий эффект соединения по настоящему изобретению на ускорение беспокойство-подобных симптомов проявляется посредством Kir6.1.

Необходимо отметить, что на чертежах в настоящей заявке указания значимой разницы ** или ++ означают $P < 0,01$; тогда как указания значимой разницы + или * означают $P < 0,05$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное формулой (I)



Химическая формула 1

где R¹ представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

R² представляет собой атом водорода или (C₁₋₆алкил) карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена;

X представляет собой O или NR⁵;

R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, 5- или 6-членный гетероарил, содержащий по меньшей мере один гетероатом, выбранный из атома кислорода, атома азота и атома серы, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, или COOR⁶;

R⁴ представляет собой атом водорода, атом галогена, азидо или -OR⁷;

R⁵ представляет собой атом водорода;

R⁶ представляет собой атом водорода или C₁₋₆алкил;

R⁷ представляет собой атом водорода, C₁₋₆алкил или C₁₋₆алкокси-C₁₋₆алкил;

X¹ представляет собой C₁₋₆алкил или атом галогена,

его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, где R⁴ представляет собой атом хлора или азидо.

3. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по п.1 или 2, где R¹ представляет собой трифторацетил.

4. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-3, где R² представляет собой (C₁₋₆алкил)карбонил, необязательно замещенный одним или несколькими атомами галогена.

5. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по п.4, где R² представляет собой трифторацетил.

6. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по любому из пп.1-5, где R³ представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹, или пиридил, необязательно замещенный одним или несколькими заместителями, выбранными из X¹.

7. Соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, выбранное из

(R)-((1R,2S,3R,5R,7S)-5-азидо-1-гидроксиадамтан-2-ил)(фенил)метилацетата;

этил (S)-2-ацетамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)ацетата;

этил (R)-2-ацетамидо-2-((1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)ацетата;

(1R,2S,3R,5R,7R)-5-хлор-2-((S)-2-метокси-2-оксо-1-(2,2,2-трифторацетамидо)этил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетамидо)метил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(S)-2-амино-2-((1R,2S,3R,5R,7S)-1,5-дигидроксиадамтан-2-ил)уксусной кислоты;

N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)(фенил)метил)-2,2,2-трифторацетамидо;

(1S,2R,3S,5R,7S)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетамидо)метил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

(1S,2R,3S,5S,7R)-5-(2-метоксиэтокси)-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетамидо)метил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата;

N-((R)-((1S,2R,3S,5S,7S)-5-хлор-1-гидроксиадамтан-2-ил)(пиридин-3-ил)метил)-2,2,2-трифторацетамидо;

2,2,2-трифтор-N-((R)-((1S,2R,3S,5R,7S)-1-гидроксиадамтан-2-ил)(фенил)метил)ацетамидо;

(1S,2R,3S,5S,7R)-5-метокси-2-((R)-фенил(2,2,2-трифторацетамидо)метил)адамтан-1-ил 2,2,2-трифторацетата; или

энантиомера, диастереомера или фармацевтически приемлемой соли такого соединения.

8. Фармацевтическая композиция, обладающая ингибирующей Kir6.2 канал и Kir6.1 канал K_{ATP} канала активностью, содержащая терапевтически эффективное количество соединения, его энантиомера, его диастереомера или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемые добавки.

9. Применение фармацевтической композиции по п.8 для лечения или профилактики заболевания, связанного с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом K_{ATP} канала.

10. Применение по п.9, где заболевание, связанное с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом K_{ATP} канала, представляет собой когнитивное заболевание или расстройство.

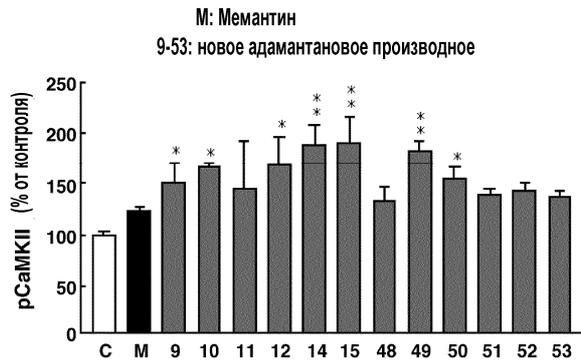
11. Применение по п.10, где когнитивное заболевание или расстройство выбрано из деменции альцгеймеровского типа, цереброваскулярной деменции, деменции с тельцами Леви, фронтотемпоральной деменции, болезни Паркинсона, психического заболевания и нейродегенеративного заболевания.

12. Применение по п.9, где заболевание, связанное с Kir6.1 каналом или Kir6.2 каналом K_{ATP} канала, представляет собой диабет или диабетическое осложнение.

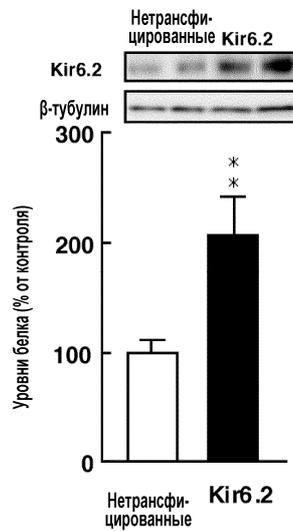
13. Ингибитор Kir6.2 канала K_{ATP} канала, представляющий собой соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-7.

14. Ингибитор Kir6.1 канала K_{ATP} канала, представляющий собой соединение, его энантиомер, его диастереомер или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп.1-7.

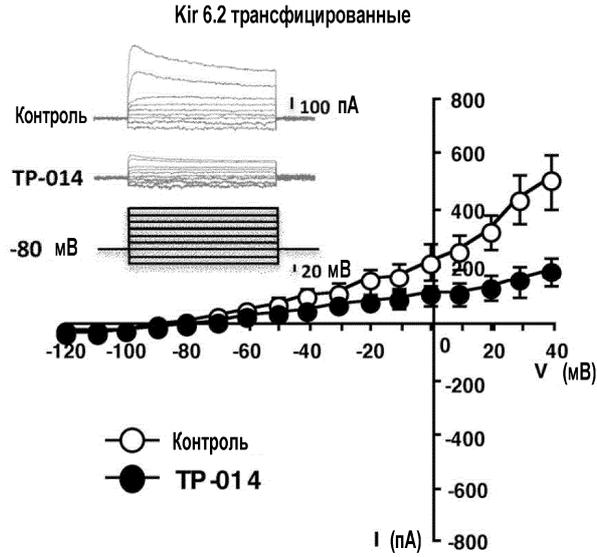
Kir6.2, сверхэкспрессирующийся в Neuro2A клетках



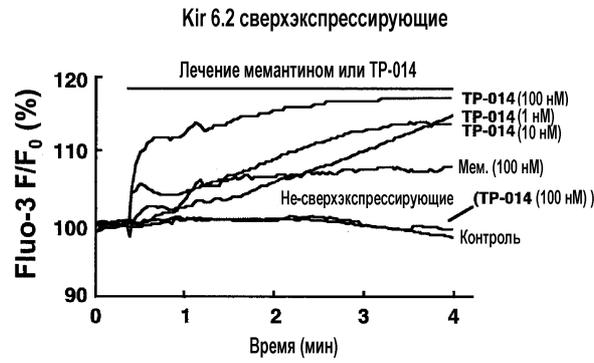
Фиг. 1



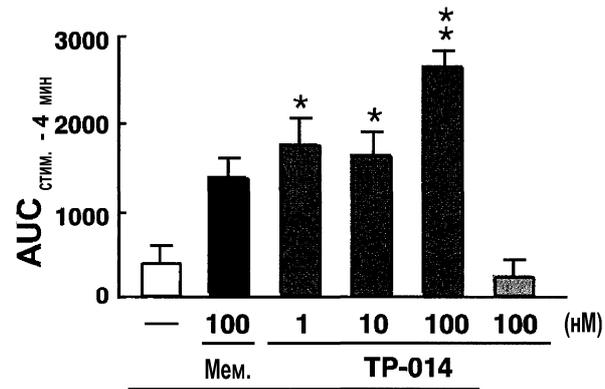
Фиг. 2a



Фиг. 2b

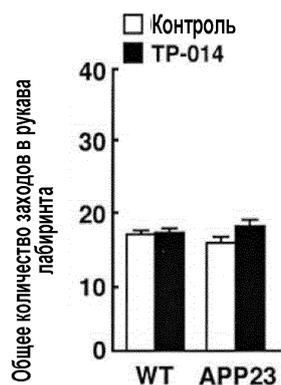


Фиг. 3a

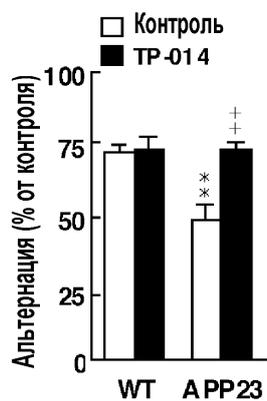


Кіг 6.2 сверхэкспрессирующие

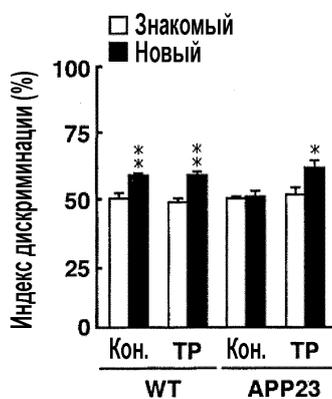
Фиг. 3b



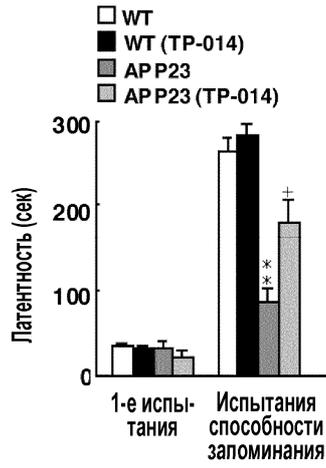
Фиг. 4а



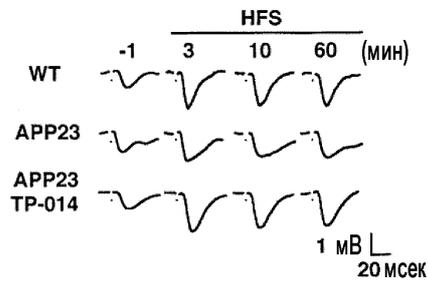
Фиг. 4b



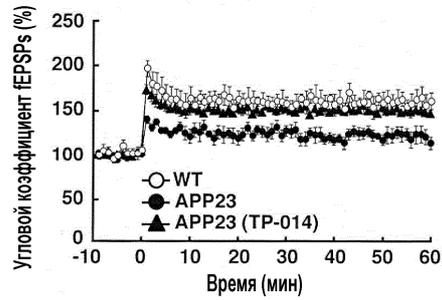
Фиг. 4с



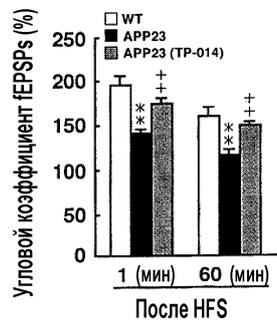
Фиг. 4d



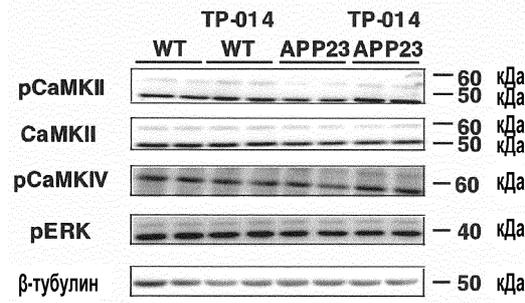
Фиг. 4е



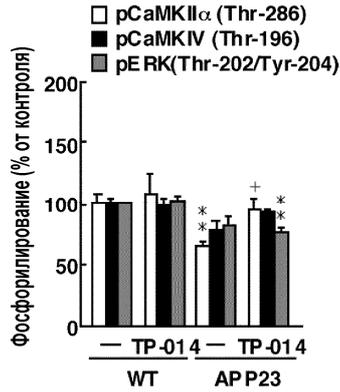
Фиг. 4f



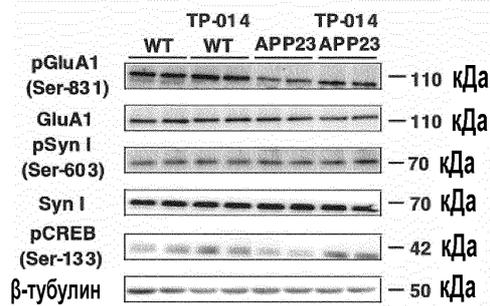
Фиг. 4g



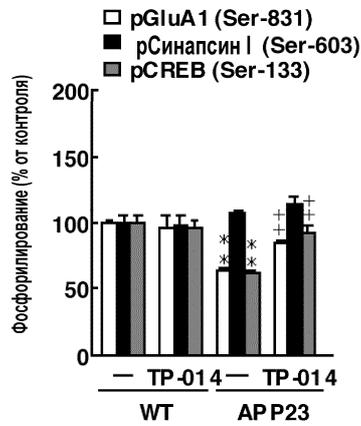
Фиг. 5а



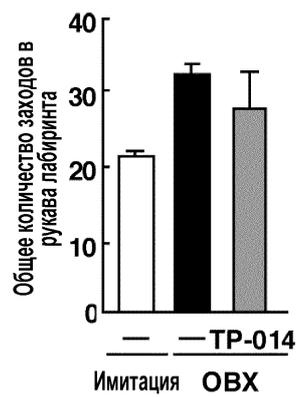
Фиг. 5b



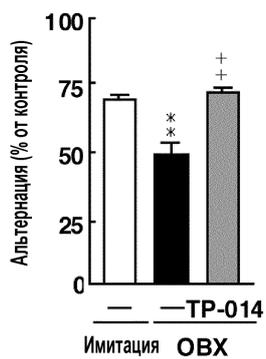
Фиг. 5с



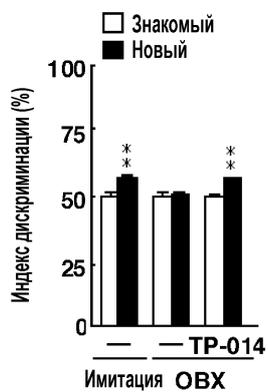
Фиг. 5d



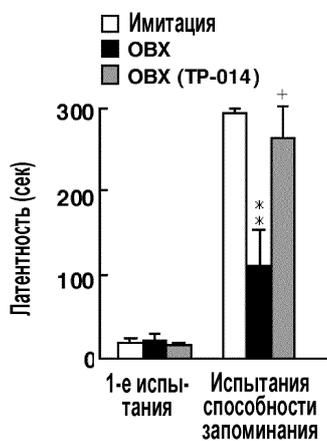
Фиг. 6a



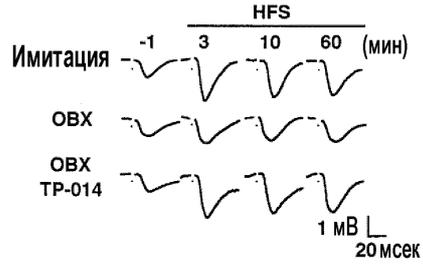
Фиг. 6b



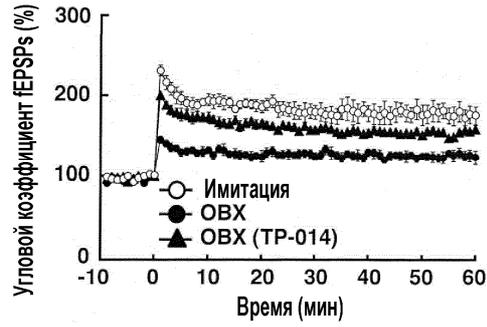
Фиг. 6c



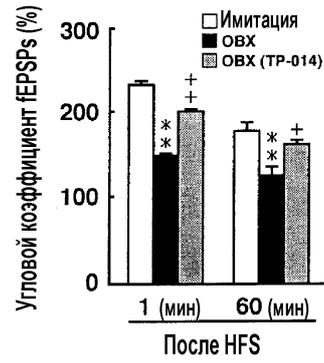
Фиг. 6d



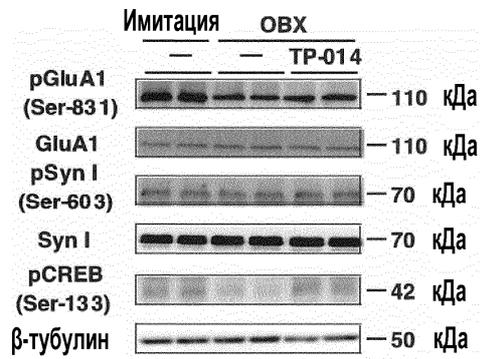
Фиг. 6е



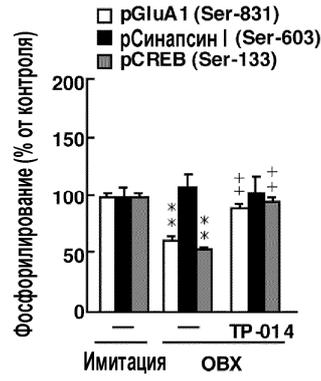
Фиг. 6f



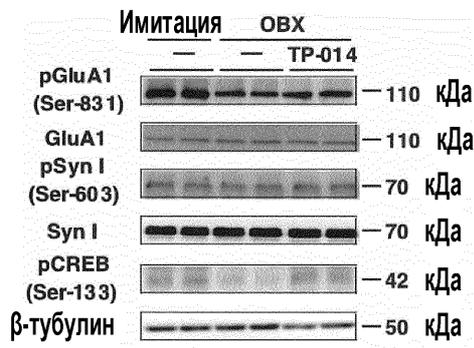
Фиг. 6g



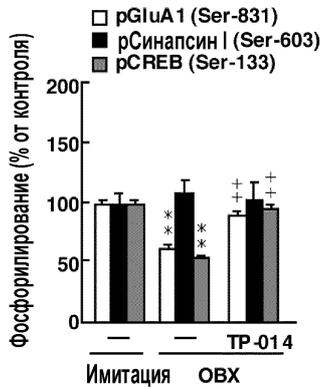
Фиг. 7а



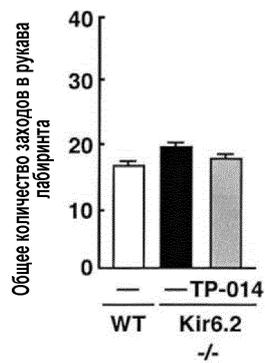
Фиг. 7b



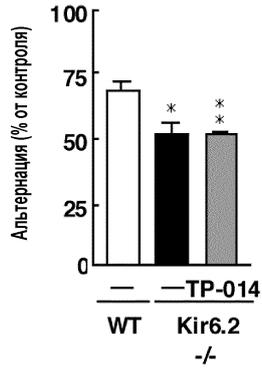
Фиг. 7c



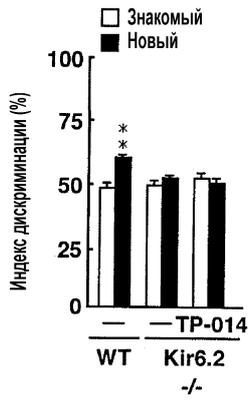
Фиг. 7d



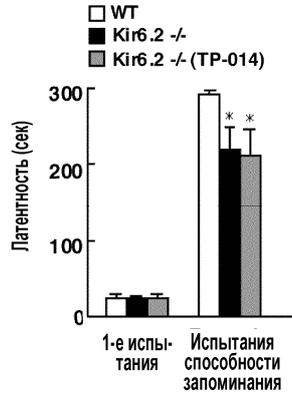
Фиг. 8a



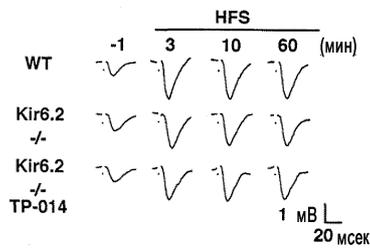
Фиг. 8b



Фиг. 8c

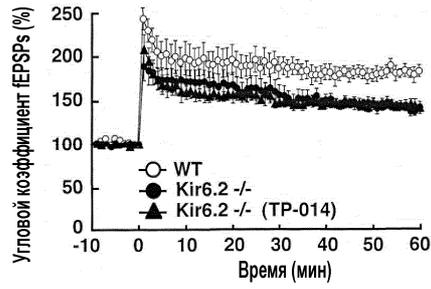


Фиг. 8d

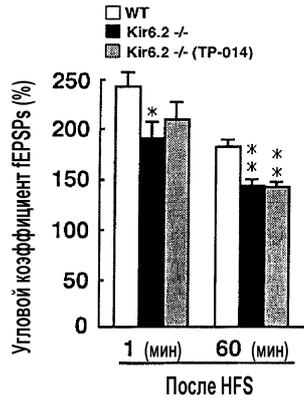


Фиг. 8e

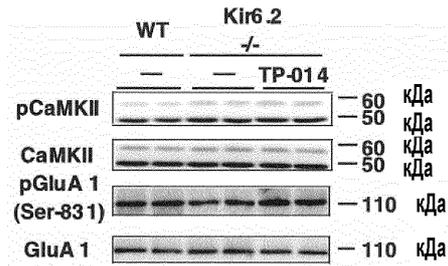
043204



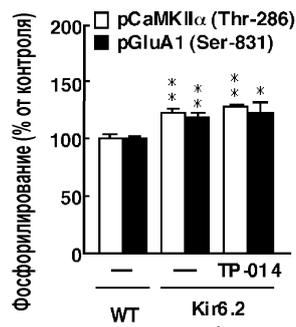
Фиг. 8f



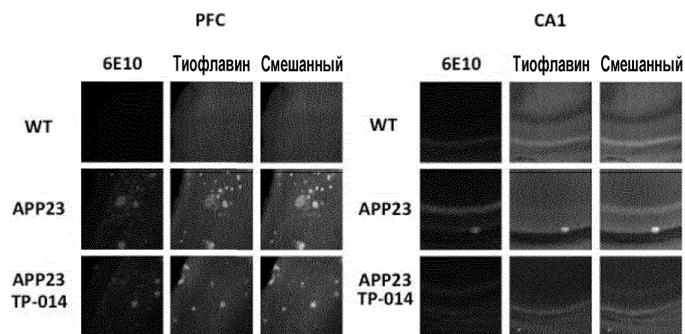
Фиг. 8g



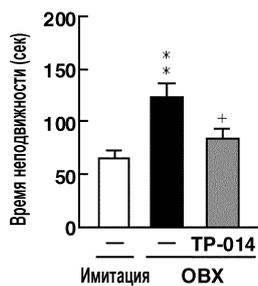
Фиг. 9a



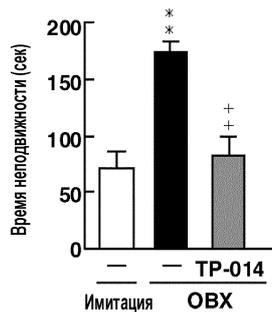
Фиг. 9b



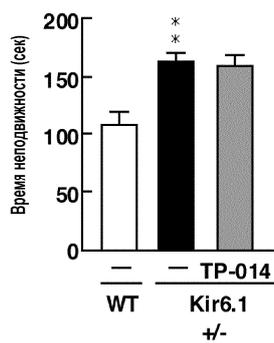
Фиг. 10



Фиг. 11a

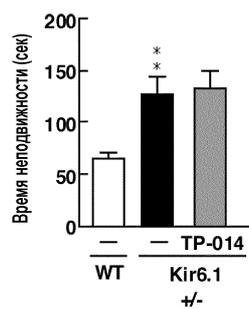


Фиг. 11b

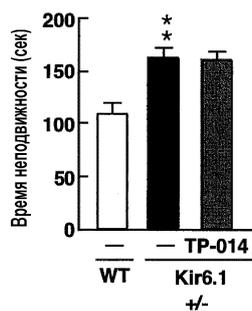


Фиг. 12a

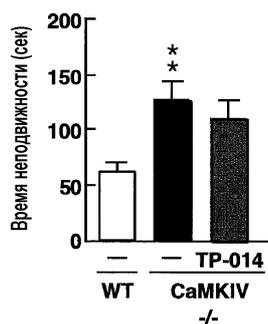
043204



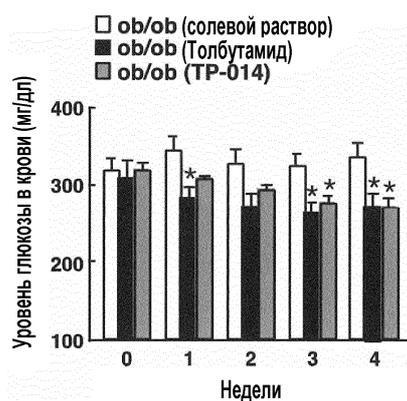
Фиг. 12b



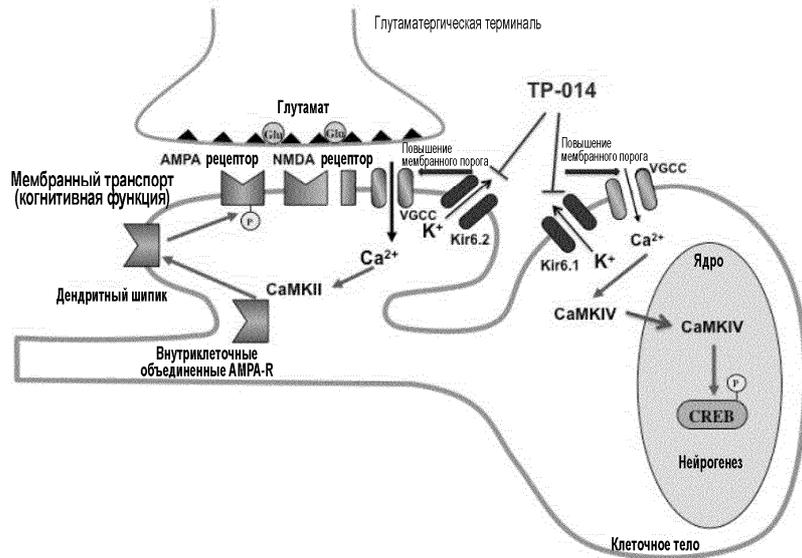
Фиг. 13a



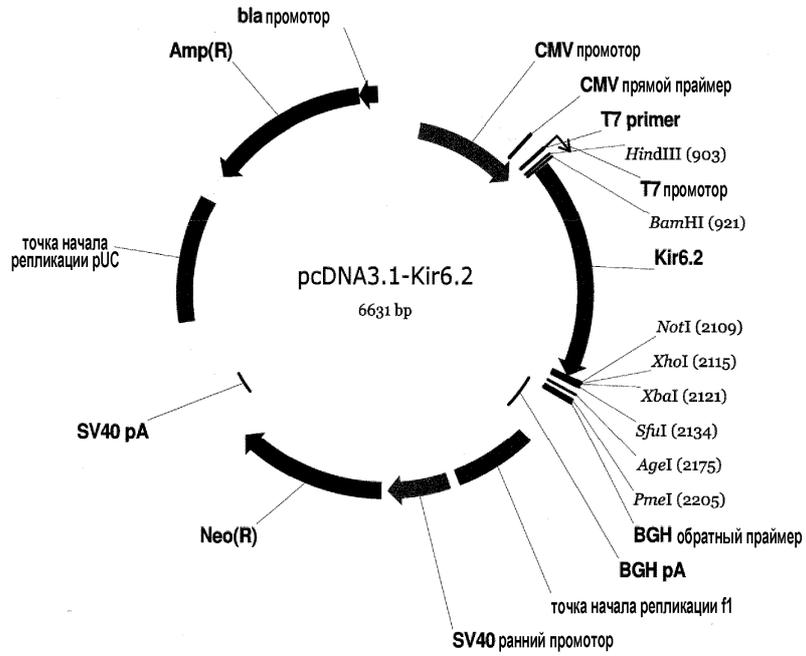
Фиг. 13b



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

1	GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61	CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121	CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
	CMV промотор
181	TTAGGGTTAG GCCTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
	CMV промотор
241	GATTATTGAC TAGTATTAA TAGTAAICAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
	CMV промотор
301	TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
	CMV промотор
361	CCGCCCAATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
	CMV промотор
421	ATTGACGTCA ATGGGTGGAC TATTACGGT AACTGCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
	CMV промотор
481	ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
	CMV промотор
541	ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGACTTTC TACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
	CMV промотор
601	TCGTATTAC CATGGTGATG CGGTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGG TAGCCGTTTG
	CMV промотор
661	ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
	CMV промотор
	CMV прямой праймер
721	AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
	CMV прямой праймер
	CMV промотор
781	GTAGGCGTGT ACGGTGGAG GTCATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
	T7 праймер
	CMV промотор
	T7 промотор
841	CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT
	HindIII BamHI Kir6.2
+2	M L S R K G I I P E
901	TAAGCTTGGT ACCGAGCTCG GATCCGCCAC CATGCTGTCC CGAARGGGCA TTATCCCTGA
	Kir6.2
+2	E E Y V L T R L A E D P T E P R Y R T R E
961	GGAATATGTG CTGACCCGGC TGGCAGAGGA CCCTACAGAG CCCAGGTACC GTACTCGGGA
	Kir6.2
+2	E R R A R F V S K K G N C N V A H K N I R
1021	GAGGAGGGCC CGCTTCGTGT CCAAGAAAGG CAACTGCAAC GTCGCCACA AGAACATCCG
	Kir6.2
+2	R E Q G R F L Q D V F T T L V D L K W P H
1081	AGAGCAGGGC CGCTTCCTGC AAGATGTGTT CACCACGCTG GTGGACCTCA AGTGGCCCA
	Kir6.2
+2	H T L L I F T M S F L C S W L L F A M V W
1141	CACGCTGCTC ATTTTACCA TGTCTTCTT GTGCAGCTGG CTGCTCTTCG CCATGGTCTG
	Kir6.2
+2	W W L I A F A H G D L A P G E G T N V P C
1201	GTGGCTCATC GCCTTTGCC ACGGTGACTT GGCCCCCGGA GAGGGACCA ATGTGCCCTG

Фиг. 17-1

	Kir6.2	
+2	C V T S I H S F S S A F L F S I E V Q V T	
1261	CGTCACAAGC ATCCACTCCT TTTCGTCTGC CTCCTTTTC TCCATCGAGG TCCAGGTGAC	
	Kir6.2	
+2	T I G F G G R M V T E E C P L A I L I L I	
1321	CATTGGTTTC GGC GGCGCA TGGTGACAGA GGAATGTCCC CTGGCCATCC TTATTCTGAT	
	Kir6.2	
+2	I V Q N I V G L M I N A I M L G C I F M K	
1381	CGTCAGAAT ATCGTAGGGC TAATGATCAA CGCCATCATG CTGGGTGCA TCTTCATGAA	
	Kir6.2	
+2	K T A Q A H R R A E T L I F S K H A V I T	
1441	AACGGCACAG GCCATCGGC GGGCAGAAAC CCTCATCTTC AGCAAGCATG CCGTATCAC	
	Kir6.2	
+2	T L R H G R L C F M L R V G D L R K S M I	
1501	CCTGGGACAT GGC CGCTGT GCTTCATGCT TCGCGTAGGG GACCTCCGAA AAAGCATGAT	
	Kir6.2	
+2	I I S A T I H M Q V V R K T T S P E G E V	
1561	CATTAGCGCC ACCATTCATA TGCAGGTGGT GCGCAAGACC ACCAGCCCGG AGGGCGAGGT	
	Kir6.2	
+2	V V P L H Q V D I P M E N G V G G N S I F	
1621	TGTGCCTCTC CACCAGTGG ACATCCCATG GGAGAACGGT GTGGGTGTA ACAGCATCTT	
	Kir6.2	
+2	F L V A P L I I Y H V I D S N S P L Y D L	
1681	TCTGGTGGCC CCATCATCA TCTACCACGT CATCGACTCC AACAGCCCGC TCTACGACCT	
	Kir6.2	
+2	L A P S D L H H H Q D L E I I V I L E G V	
1741	GGCTCCTAGT GACCTGCACC ACCACCAGGA CCTGGAGATC ATTGTCACTT TGGAAGGTGT	
	Kir6.2	
+2	V V E T T G I T T Q A R T S Y L A D E I L	
1801	GGTAGAAACC ACAGGCATTA CCACCCAGGC CCGCACCTCC TATCTGGCTG ACGAGATTCT	
	Kir6.2	
+2	L W G Q R F V P I V A E E D G R Y S V D Y	
1861	GTGGGGCAG CGTTTGTCC CCATCGTGGC CGAGGAGGAT GGCCGCTAIT CTGTGGACTA	
	Kir6.2	
+2	Y S K F G N T V K V P T P L C T A R Q L D	
1921	CTCCAAATTC GGAACACCG TAAAGTGCC CACACCCTC TGACAGCCC GCCAGCTTGA	
	Kir6.2	
+2	D E D R S L L D A L T L A S S R G P L R K	
1981	TGAGGACCGC AGCCTGCTGG ATGCCCTGAC CCTCGCCTCG TCGCGAGGGC CCCTGCGCAA	
	Kir6.2	
+2	K R S V A V A K A K P K F S I S P D S L S	
2041	GCGCAGTGTG GCTGTGGCAA AGGCCAAGCC CAAGTTTAGC ATCTCTCCGG ATTCTTGTG	
	Kir6.2	
	NotI XbaI SfuI	
+2	S *	
2101	CTGATAGCGG CCGCTCGAGT STAGAGGGCC STTCGAACAA AAATCATCT CAGAAGAGGA	
	Kir6.2	
	AgeI PmeI BglII pA	
2161	TCTGAATATG CATACCGGTC ATCATCACC A TCACCATTGA GTTTAAACCC GCTGATCAGC	
	Kir6.2	
	BglII обратный праймер	
2221	CTCGACTGTG CCTCTAGTT GCCAGCCATC TGTGTTTGC CCCTCCCGG TGCCTCSTT	
	Kir6.2	
	BglII обратный праймер	

Фиг. 17-2

BGH pA	
2281	GACCCITGGAA GGTGCCACTC CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA
BGH pA	
2341	TTGTCAGAGT AGGTGTCATT CTATTCIGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA
BGH pA	
2401	GGATTGGGAA GACAAATAGCA GGCATGCTGG GATGCGGGTG GGCTCTATGG CTCTGAGGC
точка начала репликации f1	
2461	GAAAGAACC AGCTGGGGCT CTAGGGGGTA TCCCCACGCG CCGTGTAGCG GCGCATTAAG
точка начала репликации f1	
2521	CGCGGCGGGT GTGGTGGTTA CGCGCAGCGT GACCCGTACA CTTGCCAGCG CCGTAGCGCC
точка начала репликации f1	
2581	CGCTCCCTTC GCTTCTTCC CTTCCTTCT CCGCACGTC GCCGGCTTTC CCCGTCAGC
точка начала репликации f1	
2641	TCTAAATCGG GGGCTCCCTT TAGGGTTCGG ATTAGTGCT TTACGGCACC TCGACCCCAA
точка начала репликации f1	
2701	AAAACCTGAT TAGGGTGATG GTTCACGTAG TGGGCCATCG CCGTATAGA CGGTTTTTCG
точка начала репликации f1	
2761	CCCTTTGACG TTGGAGTCCA CGTCTTTAA TAGTGGACTC TTGTCCAAA CTGGACAAC
точка начала репликации f1	
2821	ACTCAACCCT ATCTCGTCT ATCTTTTGA TTTATAAGGG ATTTGCCGA TTTCGGCTA
точка начала репликации f1	
2881	TTGGTAAAA AATGAGCTGA TTAACAAA ATTAACGCG AATTAATTCT GTGGAATGTG
SV40 ранний промотор	
2941	TGTCAGTTAG GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAGCATG
SV40 ранний промотор	
3001	CATCTCAAT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT
SV40 ранний промотор	
3061	ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC CGCCCTAAC TCCGCCATC
SV40 ранний промотор	
3121	CGGCCCTAA CTCGCCAG TTCCGCCAT TCTCCGCC ATGGCTGACT AATTTTTTTT
SV40 ранний промотор	
3181	ATTTATGAG AGGCCGAGGC CGCCTTGC TCTGAGTAT TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC
SV40 ранний промотор	
3241	TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTCGCCGGAG CTTGTATATC CATTTTCGGA
Neo(R)	
3301	TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTIT CGCATGATTG AACAGATGG ATTGCACGCA
Neo(R)	
3361	GGTCTCCG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG ACTGGGCACA ACAGACAATC
Neo(R)	
3421	GGCTGCTCTG ATGCCGCCGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG GGCGCCGGT TCTTTTGTG
Neo(R)	
3481	AAGACCGACC TGTCCGGTGC CTTGAATGAA CTGCAGGACG AGGCAGCGCG GCTATCGTGG
Neo(R)	
3541	CTGGCCACGA CGGCGTTC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG TTGTACTGA AGCGGGAAGG
Neo(R)	
3601	GACTGGCTGC TATTGGGGA AGTGCCGGG CAGGATCTCC TGTATCTCA CCTTGCCTT
Neo(R)	
3661	GCCGAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATCGCGCGC TGCATACGCT TGTCCGGCT
Neo(R)	
3721	ACCTGCCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC GAGCACGTAC TCGGATGGAA

Фиг. 17-3

	Neo(R)					
3781	GCCGGTCTTG	TCGATCAGGA	TGATCTGGAC	GAAGAGCATC	AGGGGCTCGC	GCCAGCCGAA
	Neo(R)					
3841	CTGTTCCGCA	GGCTCAAGGC	GCGCATGCC	GACGGCGAGG	ATCTCGTCGT	GACCCATGGC
	Neo(R)					
3901	GATGCCTGCT	TGCCAATAT	CATGGTGGAA	AATGGCCGCT	TTTCTGGATT	CATCGACTGT
	Neo(R)					
3961	GGCCGGCTGG	GTGTGGCGGA	CCGCTATCAG	GACATAGCGT	TGGCTACCCG	TGATATTGCT
	Neo(R)					
4021	GAAGAGCTTG	GCGGCGAATG	GGCTGACCGC	TTCCTCGTGC	TTTACGGTAT	GCCGCTCCC
	Neo(R)					
4081	GATTCGCAGC	GCATCGCCTT	CTATCGCCTT	CTTGACGAGT	TCTTCTGAGC	GGGACTCTGG
4141	GGTTCCGCAA	ATGACCGACC	AAGCGACGCC	CAACCTGCCA	TCACGAGATT	TCGATTCCAC
4201	CGCCGCCTTC	TATGAAAGGT	TGGCTTCGG	AATCGTTTTC	CGGGACGCCG	GCTGGATGAT
	SV40 pA					
4261	CCTCCAGCGC	GGGGATCTCA	TGCTGGAGTT	CTTCGCCAC	CCCACTTGT	TTATTGCAGC
	SV40 pA					
4321	TTATAATGGT	TACAAATAAA	GCAATAGCAT	CACAAATTC	ACAAATAAAG	CATTTTTTTC
	SV40 pA					
4381	ACTGCATTCT	AGTTGTGGTT	TGTCCAAACT	CATCAATGTA	TCTTATCATG	TCTGTATACC
4441	GTCGACCTCT	AGCTAGAGCT	TGGCGTAATC	ATGGTCATAG	CTGTTCCCTG	TGTGAAATTG
4501	TTATCCGCTC	ACAATTCCAC	ACAACATACG	AGCCGGAAGC	ATAAAGTGTG	AAGCCTGGGG
4561	TGCCTAATGA	GTGAGCTAAC	TCACATTAAT	TGCGTTGCGC	TCACTGCCCG	CTTTCCAGTC
4621	GGGAAACCTG	TCGTGCCAGC	TGCATTAATG	AATCGGCCAA	CGCGCGGGGA	GAGGCGGTTT
4681	GCGTATTGGG	CGCTCTCCG	CTTCTCTCGT	CACAGACTCG	CTGCGCTCGG	TCGTTCCGGT
4741	CGGCGGAGCG	GTATCAGCTC	ACTCAAAGGC	GGTAATACGG	TTATCCACAG	AATCAGGGGA
4801	TAACGCAGGA	AAGAACATGT	GAGCAAAGG	CCAGCAAAGG	GCCAGGAACC	GTA AAAAGGC
	точка начала репликации pUC					
4861	CGCGTTGCTG	GCGTTTTTCC	ATAGGCTCCG	CCCCCCTGAC	GAGCATCACA	AAAATCGAGC
	точка начала репликации pUC					
4921	CTCAAGTCAG	AGGTGGCGAA	ACCCGACAGG	ACTATAAAGA	TACCAGGCGT	TCCCCCTGG
	точка начала репликации pUC					
4981	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC	CTGTTCCGAC	CCTGCGGCTT	ACCGGATACC	TGTCGGCCTT
	точка начала репликации pUC					
5041	TCTCCCTTCG	GGAAGCGTGG	CGCTTCTCA	TAGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCCGT
	точка начала репликации pUC					
5101	GTAGGTCGTT	CGCTCCAAGC	TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC	CCGACCGCTG
	точка начала репликации pUC					
5161	CGCCTTATCC	GGTAACTATC	GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA	AGACAGGACT	TATCGCCACT
	точка начала репликации pUC					
5221	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA	GGATTAGCAG	AGCGAGGTAT	GTAGGCGGTG	CTACAGAGTT
	точка начала репликации pUC					
5281	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT	ACGGCTACAC	TAGAAGAACA	GTATTTGGTA	TCTGCGCTCT
	точка начала репликации pUC					
5341	GCTGAAGCCA	GTTACCTTCG	GAAAAAGAGT	TGTTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCCAC
	точка начала репликации pUC					
5401	CGCTGGTAGC	GGTGGTTTTT	TGTTTGCAA	GCAGCAGATT	ACCGCAGAA	AAAAAGGATC
	точка начала репликации pUC					

Фиг. 17-4

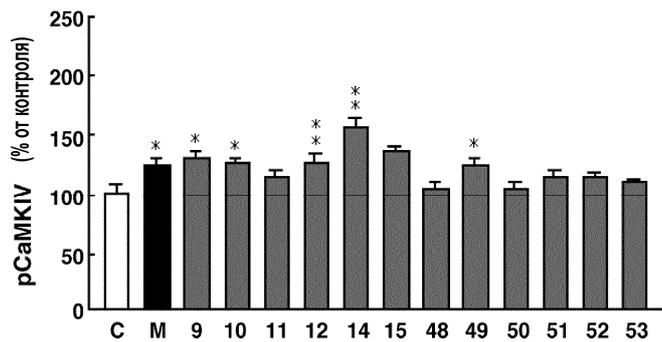
5461	TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAAACG AAAACTCAGC
	точка начала репликации pUC
5521	TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA
5581	AAAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA
	Amp(R)
5641	ATGCTTAATC AGTGAGGCAC STATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTCAI CCATAGTTGC
	Amp(R)
5701	CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC
	Amp(R)
5761	TGCAATGATA CCGCGAGACC CAGGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC
	Amp(R)
5821	AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGTTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAATCTAT
	Amp(R)
5881	TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAAGTAG TTCGCCAGTI AATAGTTTGC GCAACGTTGT
	Amp(R)
5941	TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTCACG CTCGTGCTTI GGTATGGCTT CATTACGCTC
	Amp(R)
6001	CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGTTAG
	Amp(R)
6061	CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTTAT CACTCATGGT
	Amp(R)
6121	TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CAIGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC
	Amp(R)
6181	TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CCGCGACCGA GTTGCTCTTG
	Amp(R)
6241	CCCGGCSTCA ATACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT
	Amp(R)
6301	TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTIGA GATCCAGTTC
	Amp(R)
6361	GATGTAACCC ACTCGTGAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA CCAGCGTTTC
	Amp(R)
6421	TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAGG GGAATAAGGG CGACACGGAA
	Amp(R)
6481	ATGTTGAATA CTCATACTCT TCSTTTTCA ATATTATGA AGCATTATC AGGGTTATTG
	bla промотор
	Amp(R)
6541	TCCTATGAGC GGATACATAT TTGAATGAT TTAGAAAAAT AACCAATAG GGSTCCGGC
	bla промотор
6601	CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT C

Фиг. 17-5

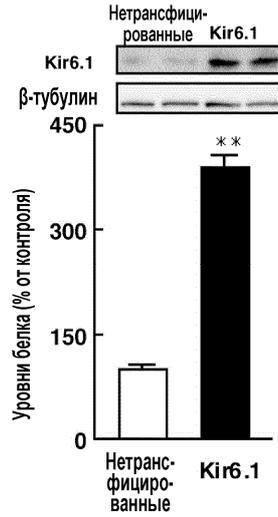
Kir6.1, сверхэкспрессирующийся в Neuro2A клетках

M: Мемантин

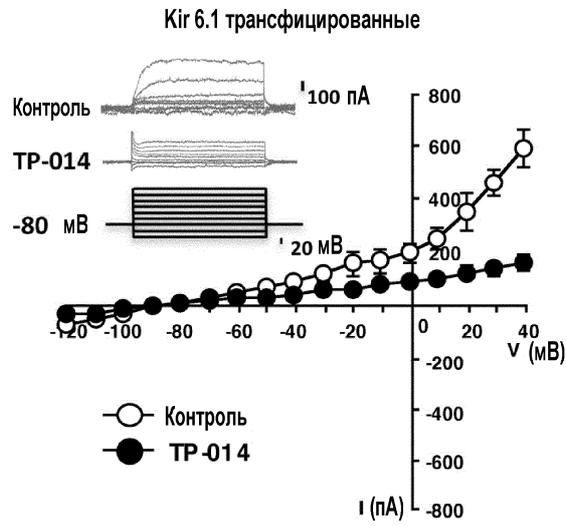
9-53: новое адамантановое производное



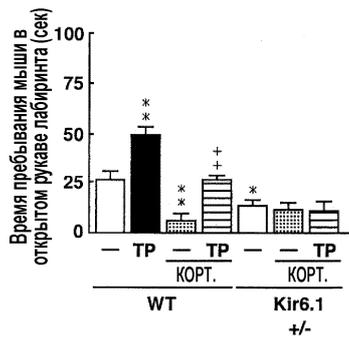
Фиг. 18а



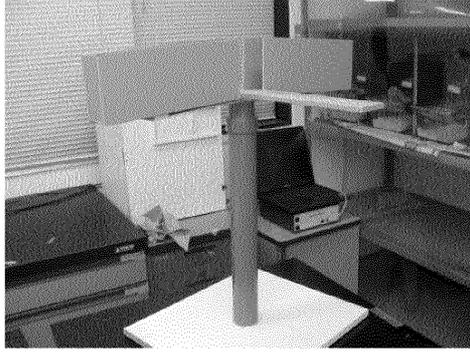
Фиг. 18b



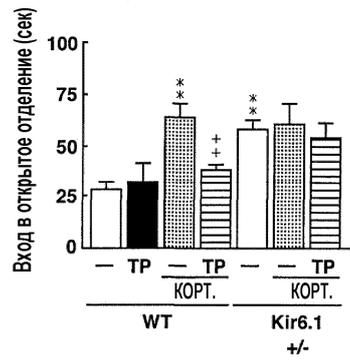
Фиг. 18с



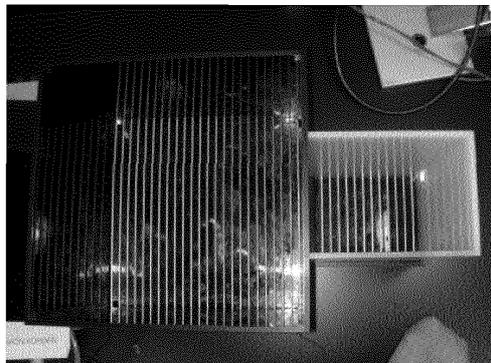
Фиг. 19а



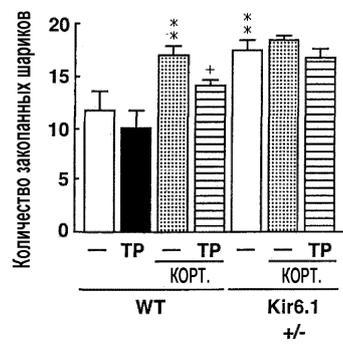
Фиг. 19б



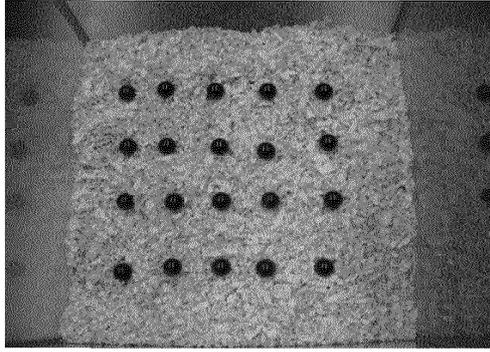
Фиг. 19с



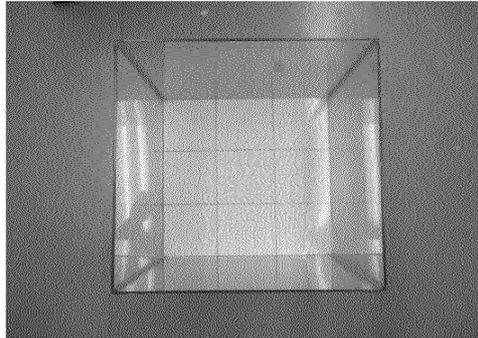
Фиг. 19д



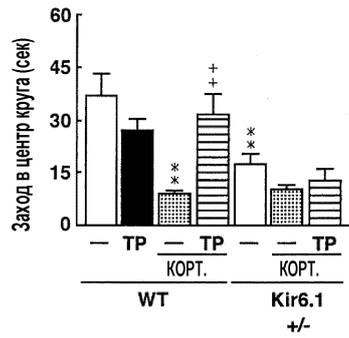
Фиг. 19е



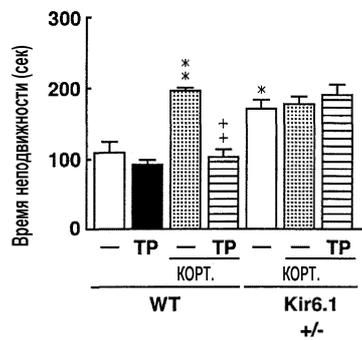
Фиг. 19f



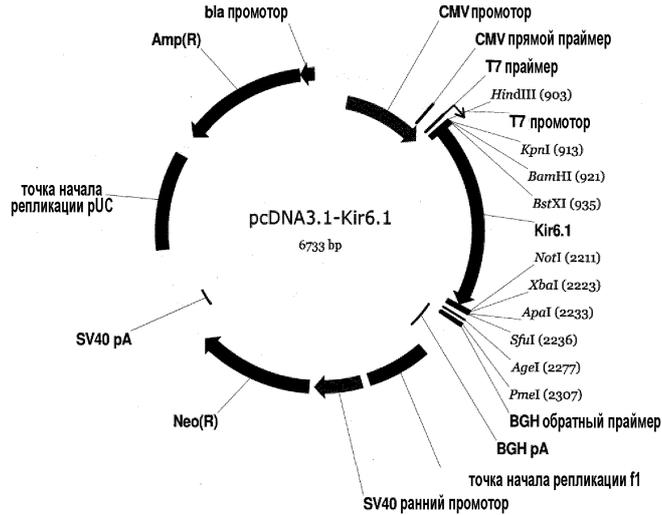
Фиг. 19g



Фиг. 19h



Фиг. 19i



Фиг. 20

1	GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCSCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61	CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGC
121	CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
	CMV промотор
181	TTAGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
	CMV промотор
241	GATTATTGAC TAGTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC AITAGTTTCA AGCCCATATA
	CMV промотор
301	TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
	CMV промотор
361	CCGCCCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTCC
	CMV промотор
421	ATTGACGTC AATGGTGGAC TATTTACGGT AAATGCCCCA CTGGCAGTA CATCAAGTGT
	CMV промотор
481	ATCATATGCC AAGTAGCCCT CATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
	CMV промотор
541	ATGCCAGTA CATGACCTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
	CMV промотор
601	TCGCTATTAC CATGGTGTG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGCGTGGG TAGCGGTTTG
	CMV промотор
661	ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTGGCACC
	CMV прямой праймер
	CMV промотор
721	AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGCGC
	CMV прямой праймер
	CMV промотор
781	GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
	T7 праймер
	CMV промотор
841	CTGCTTACTG GCTTATCGAA AITAAATACG ATCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGT
	Kir6.1
+2M L A R K S I I P E.....
901	TAAGCITGTT ACCGAGCTCG GATCCGCCAC CATGCTGGCC AGGAAGAGCA TCATCCCGGA
	Kir6.1
+2E E Y V L A R I A A E N L R K P R I R D R.....
961	GGAGTATGTG CTGGCCGCA TCGCGGGGA GAACCTGCGC AAACCGCGCA TCCGCGACCG
	Kir6.1
+2R L P K A R F I A K S G A C N L A H K N I.....
1021	CCTCCCAA A GCCCGTTCA TCGCAAGAG CGGAGCCTGC AACCTGGCTC ACAAGACAT
	Kir6.1
+2I R E Q G R F L Q D I F T T L V D L K W R.....
1081	CCGAGAGCAA GGTGCTTCC TGCAGGACAT CTTACCACC TTGGTAGACC TGAAGTGGCG
	Kir6.1
+2R H T L V I F T M S F L C S W L L F A I M.....
1141	TCACAGCTG GTCATCTCA CCATGCTCTT CCTCTGCAGC TGGCTGCTCT TCCTATCAT
	Kir6.1
+2M W W L V A F A H G D I Y A Y M E K G I T.....
1201	GTGGTGGCTG GTGGCCTCG CCCACGGGGA CATCTATGCT TACATGGAGA AAGGCATCAC

Фиг. 21-1

		Kir6.1	
+2		T E K S G L E S A V C V T N V R S F T S A	
1261		GGAGAAGAGT GGCCITGGAGT CTGCCCTCTG TGTGACCAAT GTCAGGTCAT TCACTTCTGC	
		Kir6.1	
+2		A F L F S I E V Q V T I G F G G R M M T E	
1321		GTTTCCTTC TCCATCGAGG TTCAAGTGAC CATTGGGTTT GGAGGGAGAA TGATGACTGA	
		Kir6.1	
+2		E E C P L A I T V L I L Q N I V G L I I N	
1381		GGAGTGCCT CTGGCCATCA CGGTTTTGAT TCTGCAGAAC ATTGTGGGTC TGATCATCAA	
		Kir6.1	
+2		N A V M L G C I F M K T A Q A H R R A E T	
1441		CSCGGTCATG TTGGGCTGCA TCTTCATGAA GACGGCCAG GCCCACAGAA GGGCAGAGAC	
		Kir6.1	
+2		T L I F S R H A V I A V R N G K L C F M F	
1501		GCTGATTTTC AGCCGCCAIG CTGTAATTGC GGTCCGTAAT GGCAGCTGT GCTTCATGTT	
		Kir6.1	
+2		F R V G D L R K S M I I S A S V R I Q V V	
1561		CCGGTGGGT GACCTGAGGA AAAGCATGAT CATTAGCGCC TCGGTGGCA TCCAGTGGT	
		Kir6.1	
+2		V K K T T T P E G E V V P I H Q Q D I P V	
1621		CAAGAAAACC ACGACGCCAG AAGGAGAGGT GGTGCCTATT CACCAGCAGG ACATCCCTGT	
		Kir6.1	
+2		V D N P I E S N N I F L V A P L I I C H V	
1681		GGATAATCCC ATCGAGAGCA ATAACATCTT CCTAGTGGCC CCTTGATCA TCTGCCATGT	
		Kir6.1	
+2		V I D K R S P L Y D I S A T D L V N Q D L	
1741		GATTGATAAG CGTAGCCCC TGTACGATAT CTCAGCCACT GACCTIGTCA ACCAAGACCT	
		Kir6.1	
+2		L E V I V I L E G V V E T T G I T T Q A R	
1801		GGAGGTCATA GTGATTCTCG AGGGCGTGGT GAAACCACG GGCATACCA CGCAAGCCGG	
		Kir6.1	
+2		R T S Y I A E E I Q W G H R F V S I V T E	
1861		GACCTCCTAC ATTGCAGAGG AGATCCAGTG GGGACACCGC TTCGTGTCGA TTGTGACTGA	
		Kir6.1	
+2		E E E G V Y S V D Y S K F G N T V R V A A	
1921		GGAGGAGGGA GTGTACTCTG TGGACTATT TAAATTGGT AATACTGTA GAGTGGCGGC	
		Kir6.1	
+2		A P R C S A R E L D E K P S I L I Q T L Q	
1981		GCCAAGATGC AGTGCCTGGG AGCTGGACGA GAAACCTTCC ATCTTGATTC AGACCTCCA	
		Kir6.1	
+2		Q K S E L S H Q N S L R K R N S M R R N N	
2041		AAAGAGTAA CTGTCGCACC AGAATCTCT GAGGAGCGC AACCTATGA GAAGAAACA	
		Kir6.1	
+2		N S M R R S N S I R R N N S S L M V P K V	
2101		CTCCATGAGG AGGAGCAACT CCATCCGGAG GAATAACTCT TCCCTCATGG TGCCCAAGGT	
		Kir6.1	NotI
+2		V Q F M T P E G N Q C P S E S *	
2161		GCAATTCATG ACTCCAGAAG GAAACCAGTG CCCATCAGAA TCATGATAGC GGCCCTCGA	
		Kir6.1	AgeI
		XbaI	AgeI
2221		GTCTAGAGGG CCCTTCGAAC AAAAAATCAT CTCAGAAGAG GATCTGAATA TGCATACCGG	

Фиг. 21-2

	Agel	Pmel	BGH pA
2281	TCATCATCAC	CATCACCATT	GAGTTTAAAC CCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG BGH обратный праймер
	BGH pA		
2341	TTGCCAGCCA	TCTGTTGTTT	GCCCCCTCCC CGTGCCTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC
	BGH pA		
2401	TCCCACCTGC	CTTCCCTAAT	AAAATGAGGA AATGTCATCG CATTGICTGA GTAGGTGTC
	BGH pA		
2461	TTCTATTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG
	BGH pA		
2521	CAGGCATGCT	GGGGATGCCG	TGGGCTCTAT GGCTTCIGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG
	точка начала репликации f1		
2581	CTCTAGGGGG	TATCCCACAG	CGCCCTGTAG CGGCGCATTA AGCGGGGGGG GTGTGGTGGT
	точка начала репликации f1		
2641	TACGCGCAGC	GTGACCCTA	CACTTGCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTCTT
	точка начала репликации f1		
2701	CCCTTCCTTT	CTCGCCACGT	TCGCCGGCTT TCCCCTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC
	точка начала репликации f1		
2761	TTTAGGGTTC	CGATTTAGTG	CTTACGGCA CCTCGACCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA
	точка начала репликации f1		
2821	TGGTTCACGT	AGTGGGCCAT	CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTGA CGTTGGAGTC
	точка начала репликации f1		
2881	CACGTTCTTT	AATAGTGGAC	TCTGTGTCCA AACTGGAACA ACASTCAACC СТАТСТСГГТ
	точка начала репликации f1		
2941	СТАТСТСТТТ	ГАТТТАААГ	GGATTTGCC GATTTCCGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT
	точка начала репликации f1		
3001	ГАТТТАААА	АААТТТААА	CGAATTAATT CTGTGGAATG TGTGTCAGTT AGGGTGTGGA
	SV40 ранний промотор		
3061	AAGTCCCAG	GCTCCCAGC	AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA
	SV40 ранний промотор		
3121	ACCAGGTGTG	GAAAGTCCCC	AGGCTCCCSA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC
	SV40 ранний промотор		
3181	AATTAGTCAG	CAACCATAGT	CCCGCCSCTA ACTCCGCCA TCCCGCCSCT AACTCCGCC
	SV40 ранний промотор		
3241	AGTCCGCC	ATTCTCCGCC	CCATGGCTGA СТААТТТТТТ ТТАТТТАААГ АААААААА
	SV40 ранний промотор		
3301	GCCGCTCTG	CCTCTGAGCT	ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCTAGGC
	SV40 ранний промотор		
3361	TTTTGCAAAA	AGCTCCCGGG	AGCTTGATA TCCATTTTCG GATCTGATCA AGAGACAGGA
	Neo(R)		
3421	TGAGGATCGT	TTCGCATGAT	TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC GCCGCTTGG
	Neo(R)		
3481	GTGGAGAGGC	TATTCGGCTA	TGACTGGGCA CAACAGACAA TCGGCTGCTC TGATGCCGCC
	Neo(R)		
3541	GTGTCCGGC	TGTCAGCGCA	GGGGCGCCCG GTTCTTTTGG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT
	Neo(R)		
3601	GCCCTGAATG	AACTGCAGGA	CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGCGGTT
	Neo(R)		
3661	CCTTGCAG	CTGTGCTCGA	CGTTGTCACT GAAGCGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGGC

Фиг. 21-3

Neo(R)	
3721	GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCATCT CACCTTGCTC CTGCCGAGAA AGTATCCATC
Neo(R)	
3781	ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTTGATCCGG CTACCTGCCC ATFCGACCAC
Neo(R)	
3841	CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTGATCAG
Neo(R)	
3901	GATGATCTGG ACGAAGAGCA TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTCGC CAGGCTCAAG
Neo(R)	
3961	GCGCGCATGC CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCIG CTTGCCGAAT
Neo(R)	
4021	ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGGCT GGGTGTGGCG
Neo(R)	
4081	GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG CTGAAGAGCT TGGCCGGCAA
Neo(R)	
4141	TGGGCTGACC GCTTCCTCGT GCTTACGGT ATCGCCGCTC CCGATTGCA GCGCATCGCC
Neo(R)	
4201	TTCTATCGCC TTCTTGACGA GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTCCGG AAATGACCGA
4261	CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTC ACCGCCGCTT TCTATGAAAG
4321	GTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CEGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGGATCT
SV40 pA	
4381	CATGCTGGAG TTCTTCGCC ACCCCAACCTT GTTATTGCA GCCTATAATG GTTACAATAA
SV40 pA	
4441	AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG
SV40 pA	
4501	TTTGTCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGCTGTATA CCGTCGACCT CTAGTAGAG
4561	CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATTCC
4621	ACACAACATA CGAGCCGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA
4681	ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTCCAG TCGGAAACC TGTGTCGCA
4741	GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGCCGT TGGGTATTG GCGCTCTTC
4801	CGCTTCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTTCGG CTGCGCGAG CGGTATCAGC
4861	TCACTCAAAG GCGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
точка начала репликации pUC	
4921	GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT
точка начала репликации pUC	
4981	CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
точка начала репликации pUC	
5041	AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTCCCCCTT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC
точка начала репликации pUC	
5101	TCCTGTCCG ACCCTGCCGCT ACCCGGATA CTTGTCCGCC TTTCTCCCTT CCGGAAGCGT
точка начала репликации pUC	
5161	GGCGTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTAGTTCC GTGTAGGTCG TCGCTCCAA
точка начала репликации pUC	
5221	GCTGGCTGT GTGCACGAAC CCCCGTTCA GCCCGACCGC TGGCCTTAT CCGGTAACTA
точка начала репликации pUC	
5281	TCGTCTGAG TCCAACCCGG TAAGACCGA CTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA
точка начала репликации pUC	
5341	CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGCCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
точка начала репликации pUC	

Фиг. 21-4

5401	<u>CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGGCCT CTGCTGAAGC CAGTACCTT</u> точка начала репликации pUC
5461	<u>CGGAAAAAGA GTTGGTASCT CTTGATCCGG CAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT</u> точка начала репликации pUC
5521	<u>TTTTTTTGC AAGCAGCAGA TTACGGCGAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT</u> точка начала репликации pUC
5581	<u>CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT</u> точка начала репликации pUC
5641	<u>GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC</u>
5701	<u>AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC</u> Amp(R)
5761	<u>ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA</u> Amp(R)
5821	<u>GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGGAGA</u> Amp(R)
5881	<u>CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG</u> Amp(R)
5941	<u>CAGAAGTGGT CCGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC</u> Amp(R)
6001	<u>TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT</u> Amp(R)
6061	<u>CGTGGTGTCA CGTCTGCTGT TTGGTATGCC TTCATTACG TCCGGTTCCT AACGATCAAG</u> Amp(R)
6121	<u>GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT</u> Amp(R)
6181	<u>CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA</u> Amp(R)
6241	<u>TTCTTACTT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTCTGIG ACTGGTGGT ACTCAACCAA</u> Amp(R)
6301	<u>GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGCGACCC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA</u> Amp(R)
6361	<u>TAATACCGCG CCACATAGCA GAACITTTAA AGTGCTCATC ATTGAAAAAC GTTCTTCGGG</u> Amp(R)
6421	<u>GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC</u> Amp(R)
6481	<u>ACCCAACCTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG</u> Amp(R)
6541	<u>AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGCACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT</u> bla промотор
	Amp(R)
6601	<u>CTTCCTTTT CAATATTAT GAAGCATTG TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT</u> bla промотор
6661	<u>ATTGAAATGT ATTTAGAAA ATAACAAT AGGGGTTCCG CGCACATTC CCCGAAAAGT</u> bla промотор
6721	<u>GCCACCTGAC GTC</u>

Фиг. 21-5

