

Настоящее изобретение относится к антагонисту рецептора ангиотензина II, телмисартану, в частности к его применению для лечения людей, у которых диагностирован диабет или существует подозрение на предиабетическое состояние, для предупреждения диабета или для лечения метаболического синдрома и инсулинорезистентности у пациентов с нормальным кровяным давлением.

Сахарный диабет типа 2 является проявлением двух патофизиологических явлений, а именно: сниженной секреции инсулина бета-клетками (базофильными инсулоцитами) поджелудочной железы и резистентности органов-мишеней, которыми являются печень, скелетная мускулатура и жировая ткань, к инсулину. Обычно имеет место комплексное расстройство с проявлением обеих этих составляющих. Такое заболевание диагностируют как гипергликемию натощак, т.е. при этом заболевании концентрация сахара в крови после голодания в течение 10-12 ч превышает предельное значение, равное 125 мг глюкозы на 1 дл плазмы. Целенаправленное лечение явного диабета типа 2 возможно соединениями из класса тиазолидиндионов (глитазонов). Эти соединения улучшают степень утилизации циркулирующего в системе кровообращения инсулина и таким путем приводят к снижению уровня сахара в крови (получили поэтому название "сенситизаторы к инсулину"). Одновременно с этим через механизмы обратной связи снижается повышенный уровень инсулина и тем самым уменьшается нагрузка на поджелудочную железу. Сенситизаторы к инсулину, такие как троглитазон, росиглитазон или пиоглитазон, проявляют подобное действие за счет связывания с определенными ядерными рецепторами, называемыми PPAR γ (от англ. "Peroxisomal Proliferator Activated Receptor", рецептор, активируемый пероксисомальным пролифератором). Они действуют как регуляторы транскрипции целого ряда генов, имеющих важное значение для глюкозного и липидного обмена. Благодаря наличию подобной функции у лигандов рецептора PPAR γ , таких как простагландины или синтетические тиазолидиндионы (глитазоны), они могут способствовать лечению диабета типа 2. Один из основных механизмов снижения уровня глюкозы лигандами рецептора PPAR γ заключается в индукции дифференцировки адипоцитов. Вызываемые лигандами рецептора PPAR γ интенсификация дифференцировки адипоцитов и перестроение жировой ткани приводят к перенаправлению, соответственно, перераспределению свободных жирных кислот из скелетной мускулатуры в жировую ткань и за счет этого повышают глюкозный обмен в мышцах.

Поскольку к моменту постановки диагноза, например, у каждого второго страдающего диабетом типа 2 пациента имеются признаки коронарного сердечного заболевания, возрастает тенденция усматривать возможные причины диабета в сложном нарушении обмена веществ, на наличие которого может указывать целый ряд факторов риска, таких как нарушенная толерантность к глюкозе, повышенный уровень сахара в крови натощак, инсулинорезистентность, повышенное кровяное давление, дислипидемия или ожирение туловища. Преобладание инсулинорезистентности наиболее выражено у пациентов с гипертриглицеридемией и низким уровнем холестерина, входящего в состав липопротеинов высокой плотности (ЛВП). В этом случае говорят о предиабете типа 2, метаболическом синдроме, синдроме X или синдроме инсулинорезистентности. В первой фазе сниженная реакция органов-мишеней на инсулин обуславливает увеличение секреции инсулина поджелудочной железой для поддержания уровня сахара в крови в нормальных пределах. После нескольких лет избыточной, соответственно, возрастающей выработки инсулина наступает момент, в который бета-клетки поджелудочной железы становятся не способны к дальнейшему увеличению секреции ими инсулина. На этом начинается фаза нарушенной толерантности к глюкозе. В этой фазе организм становится более не способен достаточно быстро реагировать на пиковые уровни глюкозы. В конечном итоге при длительном сохранении высокого уровня сахара в крови натощак проявляется диабет.

В ВО 95/06410 описано применение антагонистов рецептора ангиотензина II для лечения хронических воспалительных заболеваний, включая системные аутоиммунные заболевания. При этом в качестве одного из нескольких примеров системных аутоиммунных заболеваний упоминается диабет. Отнесенный к аутоиммунным заболеваниям сахарный диабет типа 1 встречается преимущественно у молодых людей в возрасте до 30 лет, при этом при соответствующей генетической предрасположенности под влиянием различных факторов развивается инсулит с последующим разрушением В-клеток, в результате чего поджелудочная железа становится способна вырабатывать инсулин лишь в существенно меньших количествах или даже полностью перестает вырабатывать его. Сахарный диабет типа 2 не рассматривается как аутоиммунное заболевание.

Антагонисты рецептора ангиотензина II используются для лечения артериальной гипертонии, а также связанных с ней вторичных поражений конечных органов сердечно-сосудистой системы. В специальной литературе такие антагонисты обычно классифицируются как метаболически нейтральные. Об улучшении чувствительности к инсулину, наблюдавшемся при моделировании на животных, которым в качестве действующего вещества вводили ирбесартан, сообщалось в статье Henriksen и др. (Hypertension 38, 2001, с. 884-890).

В основу настоящего изобретения была положена задача предложить лекарственные средства, которые были бы пригодны и для лечения явного диабета типа 2 и для лечения первых симптомов комплексного нарушения обмена веществ на предиабетической стадии и тем самым для предупреждения сахарного диабета типа 2.

Согласно настоящему изобретению неожиданно было установлено, что некоторые немногие антагонисты рецептора ангиотензина II и их соли наряду с известным понижающим кровяное давление (гипотензивным) действием способны также повышать в клеточной системе степень экспрессии генов, о транскрипции которых известно, что она регулируется рецептором PPAR γ . Обнаружение подобного свойства открывает новые терапевтические возможности в лечении и предупреждении диабета типа 2, метаболического синдрома и инсулинорезистентности. Для обеспечения сравнимых условий этот эффект согласно настоящему изобретению можно обнаружить и количественно оценить с помощью линии стабильно трансформированных клеток (см. пример 2). При этом речь идет о CHO-клетках (клетках яичника китайского хомячка), полученных в результате трансформации двумя генетическими конструкциями. Первая из этих конструкций кодирует ген люциферазы из *Photinus pyralis* (de Wet J.R., *Mol. Cell Biol.* 7, 1987, с. 725) под контролем искусственного промотора с пятикратным повтором связывающего участка дрожжевого Gal4 (см. последовательность в банке генов под номером AF058756). Вторая конструкция кодирует слитый белок, состоящий из лигандсвязывающего домена фактора транскрипции человеческого рецептора PPAR γ 2 (см. последовательность в банке генов под номером U79012) и из ДНК-связывающего домена дрожжевого GAL4 (аминокислоты 1-147; Sadowski I., *Nucleic Acids Res.* 17, 1989, с. 7539).

Об используемых в качестве антидиабетических средств тиазолидиндионах (например, росиглитазоне) известно, что они индуцируют транскрипцию регулируемых рецептором PPAR γ генов, связываясь с рецептором PPAR γ и активируя его. Количественной оценкой подобного действия в принятой согласно настоящему изобретению тест-системе может служить индуцированная люциферазная активность в линии трансформированных клеток. При применении антагонистов рецептора ангиотензина II та же самая индукция люциферазной активности происходит вопреки ожиданиям не в результате связывания действующего вещества с рецептором PPAR γ . В случае действующего вещества телмисартана подобная индукция выражена наиболее ярко. Связывание, например, телмисартана с рецептором PPAR γ не удалось выявить ни в одной из различных тест-систем. Поэтому предполагается, что повышение аффинности кофакторных белков к рецептору PPAR γ под воздействием антагонистов рецептора ангиотензина II, таких как телмисартан, приводит к пополнению кофакторных белков даже при отсутствии высокоаффинных искусственных лигандов рецептора PPAR γ . Этим обусловлена последующая, опосредуемая такими кофакторами активация транскрипции генов, в регуляции которых участвует рецептор PPAR γ . Поскольку тем самым индукция этих генов ответственна за антидиабетическое действие тиазолидиндионов, можно исходить из того, что в результате индукции тех же самых генов антагонистами рецептора ангиотензина II, такими как телмисартан, будет проявляться сравнимое антидиабетическое действие. В соответствии с этим подобные действующие вещества пригодны не только для лечения повышенного кровяного давления, но и для лечения и предупреждения сахарного диабета типа 2.

Обнаружение этого нового терапевтического действия у антагонистов рецептора ангиотензина II и их солей означает, что они могут использоваться для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения людей, у которых диагностирован сахарный диабет типа 2 или имеется подозрение на предиабетическое состояние, для предупреждения диабета или для лечения метаболического синдрома и инсулинорезистентности у пациентов с нормальным кровяным давлением. Подобные лекарственные средства пригодны прежде всего для лечения и предупреждения диабета типа 2 и предиабета типа 2. Сюда же относится и лечение и предупреждение метаболического синдрома, синдрома X, соответственно синдрома инсулинорезистентности. При упоминании в описании настоящего изобретения подвергаемых лечению людей речь в первую очередь идет о лечении, соответственно, предупреждении указанных заболеваний у людей, что, однако, не исключает возможности соответствующего применения действующих веществ и их комбинаций и в ветеринарии для лечения млекопитающих.

Сахарный диабет типа 2 проявляется в том, что уровень сахара в крови натощак превышает 125 мг глюкозы на 1 дл плазмы, при этом определение глюкозы в крови является стандартным методом анализа в повседневной медицинской практике. У больного диабетом через 2 ч после приема натощак 75 г глюкозы уровень сахара в крови, определяемый пробой на толерантность к глюкозе, превышает 200 мг глюкозы на 1 дл плазмы. При проведении пробы на толерантность к глюкозе исследуемому после голодания в течение 10-12 ч дают принять перорально 75 г глюкозы и сразу же после приема глюкозы, а также через 1 ч, соответственно 2 ч после приема глюкозы определяют уровень сахара в крови. У здорового человека уровень сахара в крови перед приемом глюкозы должен лежать в пределах от 60 до 110 мг на 1 дл плазмы, через час после приема глюкозы должен быть ниже 200 мг на 1 дл плазмы, а по истечении 2 ч после приема глюкозы должен быть ниже 140 мг на 1 дл плазмы. Содержание же сахара в крови по истечении 2 ч после приема глюкозы на уровне от 140 до 200 мг свидетельствует также о нарушенной толерантности к глюкозе.

Наиболее показательным признаком предиабета (предиабетического состояния) является возможность выявления у пациента инсулинорезистентности. Следует отметить, что превышение потребностью одного человека в инсулине для поддержания его глюкозного гомеостаза в 2-3 раза потребности другого человека в инсулине может не являться прямым указанием на наличие патологического состояния. Наи-

более информативным методом выявления инсулинорезистентности является гиперинсулинемический эугликемический "клэмп"-тест (гиперинсулинемическая эугликемическая нагрузка). Этим методом определяют отношение концентрации инсулина в крови к концентрации глюкозы в крови при комбинированной длительной инфузии инсулина одновременно с глюкозой. Об инсулинорезистентности можно говорить, когда степень поглощения (усвоения) глюкозы лежит ниже 25 процентиля от исследовавшейся фоновой популяции (согласно определению ВОЗ). Несколько менее сложными по сравнению с исследованием "клэмп"-методом являются так называемые минимальные модели, при использовании которых в ходе внутривенной пробы на толерантность к глюкозе через заданные временные интервалы измеряют концентрации инсулина и глюкозы в крови и на основе полученных данных оценивают инсулинорезистентность. Другим методом выявления инсулинорезистентности является математическая модель НО-МА (от англ. "Homeostasis Model Assessment", модельная оценка гомеостаза). В этом случае инсулинорезистентность оценивают по концентрации глюкозы и инсулина в плазме натощак. Однако этот метод не позволяет отличить печеночную инсулинорезистентность от периферической. В повседневной практике все эти методы мало пригодны для оценки инсулинорезистентности. В повседневной клинической практике для оценки инсулинорезистентности обычно используют иные параметры. Предпочтительно в этих целях использовать, например, метод, основанный на определении концентрации триглицеридов в крови пациента, поскольку между повышенным уровнем триглицеридов и наличием инсулинорезистентности существует значимая корреляция.

На практике используют несколько упрощенный подход, в соответствии с которым исходят из того, что об инсулинорезистентности у человека можно говорить при наличии по меньшей мере двух следующих признаков:

- 1) наличие избыточного веса или ожирения,
- 2) наличие повышенного кровяного давления,
- 3) наличие дислипидемии (измененного общего содержания липидов в крови),
- 4) наличие по меньшей мере одного родственника первой степени с диагностированной нарушенной толерантностью к глюкозе или диабетом типа 2.

Об избыточном весе говорят при этом в том случае, когда индекс (или показатель) массы тела (ИМТ), который рассчитывается как отношение измеренной в килограммах массы тела к возведенному в квадрат росту в метрах, составляет от 25 до 30 кг/м². При ожирении ИМТ превышает 30 кг/м².

Из приведенного выше определения инсулинорезистентности со всей очевидностью непосредственно следует, что для его лечения снижающие кровяное давление (гипотензивные) средства пригодны и показаны в том случае, когда у пациента выявлен, в частности, такой признак, как повышенное кровяное давление. Достижимый согласно настоящему изобретению результат состоит, таким образом, в том, что некоторые блокаторы рецептора ангиотензина II, но прежде всего телмисартан, благодаря наличию у них свойства активировать рецептор PPAR γ являются предпочтительными гипотензивными средствами, которые могут использоваться для лечения инсулинорезистентности и в том случае, когда у пациента выявлено не повышенное, а нормальное кровяное давление. Так, в частности, лечение больных диабетом типа 2 телмисартаном может использоваться одновременно для лечения или для поддерживающей терапии дислипидемии. Применение телмисартана в обычных дозировках позволяет при этом существенно снизить содержание в плазме холестерина, входящего в состав липопротеинов высокой плотности (ЛВП), общего холестерина и/или триглицеридов.

Поскольку инсулинорезистентность рассматривается как состояние, вызывающее постепенное повышение кровяного давления, ее лечение телмисартаном несмотря на нормальные показатели кровяного давления у пациента можно считать профилактикой гипертензии.

Аналогичным образом все основания подозревать у человека предиабетическое состояние можно и при наличии условий, указывающих на наличие метаболического синдрома, основным признаком которого является инсулинорезистентность. Согласно директивам АТФ ИНИСЕР (Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) в Journal of the American Medical Association 285, 2001, сс. 2486-2497) о метаболическом синдроме у пациента говорят при наличии по меньшей мере трех следующих признаков:

- 1) наличие ожирения нижней части туловища, когда у мужчин объем (окружность) талии превышает 40 дюймов или 102 см, а у женщин превышает 35 дюймов или 94 см,
- 2) наличие повышенного уровня триглицеридов в крови, составляющего более 150 мг/дл,
- 3) наличие у мужчин пониженного уровня входящего в состав ЛВП холестерина, составляющего менее 40 мг/дл,
- 4) наличие повышенного кровяного давления, когда систолическое давление превышает 130, а диастолическое 85 мм рт.ст.,
- 5) наличие повышенного уровня сахара в крови натощак, составляющего более 110 мг/дл.

Из приведенного выше определения метаболического синдрома со всей очевидностью непосредственно следует, что для его лечения гипотензивные средства пригодны и показаны в том случае, когда у пациента выявлено, в частности, повышенное кровяное давление. Достижимый согласно настоящему изобретению результат состоит, таким образом, в том, что некоторые блокаторы рецептора ангиотензина

II, но прежде всего телмисартан, благодаря наличию у них свойства активировать рецептор PPAR γ являются предпочтительными гипотензивными средствами, которые могут использоваться для лечения инсулинорезистентности и в том случае, когда у пациента не выявлено повышенное кровяное давление. Поскольку метаболический синдром также рассматривается как состояние, вызывающее постепенное повышение кровяного давления, его лечение телмисартаном несмотря на нормальные показатели кровяного давления у пациента равным образом можно считать профилактикой гипертензии.

Все основания подозревать у пациента предиабетическое состояние можно и в том случае, когда уровень сахара в крови натощак превышает максимальное нормальное значение, равное 110 мг глюкозы на 1 дл плазмы, но не превышает релевантного для диабета предельного значения, равного 125 мг глюкозы на 1 дл плазмы. Другим признаком, указывающим на предиабетическое состояние, является нарушенная толерантность к глюкозе, т.е. состояние, при котором при проведении пробы на толерантность к глюкозе ее уровень в крови через 2 ч после приема натощак 75 г глюкозы составляет от 140 до 200 мг на 1 дл плазмы.

Основания предполагать наличие предиабетического состояния имеются и в том случае, когда концентрация триглицеридов в крови превышает 150 мг/дл. Подобное подозрение усиливается при низком уровне в крови холестерина, входящего в состав ЛВП. У женщин за низкий уровень входящего в состав ЛВП холестерина (ЛВП-холестерина) считается уровень ниже 40 мг на 1 дл плазмы, а у мужчин - ниже 50 мг на 1 дл плазмы. Метод определения уровня триглицеридов и ЛВП-холестерина в крови также относится к стандартным методам анализа в медицине и описан, например, у Thomas L. (ред.) в "Labor und Diagnose", изд-во TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main, 2000. Подозрение на наличие предиабетического состояния дополнительно усиливается в том случае, когда уровень сахара в крови натощак одновременно превышает 110 мг глюкозы на 1 дл плазмы. Если измеренные уровни указанных выше веществ в крови не выходят за предельные значения, то в качестве дополнительного вспомогательного критерия, позволяющего судить о наличии или отсутствии предиабетического состояния, можно использовать отношение объема (окружности) талии к объему (окружности) бедер. Показания к соответствующему лечению имеются в том случае, когда у женщин это отношение превышает 0,8, а у мужчин превышает 1.

Показания к применению антагонистов рецептора ангиотензина II для лечения диабета, соответственно предполагаемого предиабетического состояния, имеются прежде всего при необходимости лечения и гипертензии. О гипертензии говорят в том случае, когда систолическое кровяное давление превышает 140 мм рт.ст., а диастолическое кровяное давление превышает 90 мм рт.ст. Пациенту, уже страдающему явным диабетом, на сегодняшний день рекомендуется снижать систолическое кровяное давление до величины менее 130 мм рт.ст., а диастолическое кровяное давление - до величины менее 80 мм рт.ст. Для снижения кровяного давления до этих значений иногда показано применение антагониста рецептора ангиотензина II в комбинации с диуретиком или антагонистом кальция. Термин "диуретик" охватывает тиазиды, соответственно их аналоги, такие как гидрохлортиазид (HCTZ), клопамид, ксипамид или хлорталидон, антагонисты альдостерона, такие как спиронолактон или эплеренон, а также иные диуретики, которые пригодны для лечения повышенного кровяного давления, такие как фуросемид и пиретанид, и их комбинации с амилоридом и триамтереном.

Настоящее изобретение означает, что людям, которым назначено лечение повышенного кровяного давления, применение антагонистов рецептора ангиотензина II, таких как телмисартан, всегда показано в тех случаях, когда требуется предупредить развитие диабета, соответственно требуется лечение явного диабета.

Идентифицируемую причину повышенного кровяного давления (вторичной гипертензии), которое может быть обусловлено, например, заболеванием почек, удается установить только в 10 процентах всех случаев его проявления. Обычно вторичную гипертензию удается устранить за счет лечения соответствующего заболевания, которым она обусловлена, и тем самым за счет устранения ее причины. Однако почти в 90% всех случаев появления повышенного кровяного давления речь идет о первичной гипертензии, точная причина возникновения которой неизвестна и непосредственное излечение от которой тем самым невозможно. Отрицательные последствия повышенного кровяного давления можно уменьшить за счет изменения образа жизни и правильного лечения. Вероятную причину повышенного кровяного давления скорее всего следует усматривать во взаимосвязи отдельных факторов риска, соответственно в совместном их появлении. По наблюдениям повышенное кровяное давление все чаще встречается при нарушениях жирового обмена и обмена сахара. Подобные нарушения часто остаются незамеченными на начальной стадии их развития, однако их можно выявить по повышенному уровню триглицеридов и глюкозы в крови, а также по пониженному уровню ЛВП-холестерина в крови.

Эти нарушения на несколько более поздней стадии их прогрессирования можно дополнительно распознать по медленно прогрессирующему ожирению. Подобные нарушения можно объяснить возрастающей инсулинорезистентностью. С уменьшением эффективности инсулина возрастает степень нарушения жирового обмена и обмена сахара. В сочетании все эти нарушения в конечном итоге увеличивают вероятность развития сахарного диабета и преждевременного возникновения сердечного или сосудистого заболевания или преждевременной смерти от него.

По оценке примерно у трети взрослого населения, проживающего в тех районах Земли, в которых наблюдается переизбыток продовольствия, повышенное кровяное давление встречается при нарушениях жирового обмена и обмена сахара, причем это число будет только возрастать. В связи с вышеизложенным существует потребность в лекарственных средствах, которые позволяли бы замедлить или даже полностью остановить прогрессирование указанных выше метаболических нарушений на как можно более ранней стадии и применение которых одновременно с этим не влекло бы за собой вредных для здоровья последствий, проявляющихся в повышении кровяного давления.

В соответствии с этим в настоящем изобретении предлагается также лекарственное средство, которое может использоваться не только для лечения гипертонии, но и для лечения явного диабета типа 2, соответственно первых признаков комплексного нарушения обмена веществ, характерного для преддиабетического состояния. Тем самым настоящим изобретением предусмотрено также предупреждение диабета у пациентов, которым назначено соответствующее лечение по поводу повышенного кровяного давления. Поэтому назначение приемлемого антагониста рецептора ангиотензина II, такого как телмисартан, для контроля кровяного давления сразу же при появлении одного из вышеуказанных признаков преддиабетического состояния позволяет замедлить возникновение явного диабета типа 2 или даже воспрепятствовать его возникновению.

Под пригодными для применения в предусмотренных настоящим изобретением целях антагонистами рецептора ангиотензина II подразумеваются соединения, связывание которых с лигандсвязывающим доменом рецептора PPAR γ может быть исключено проведением опытов *in vitro* (см. пример 1), но которые в клетках, т.е. при их добавлении к культуральной среде, содержащей линию стабильно трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток с репортерным геном, активируют экспрессию также стабильно трансфектированного гена люциферазы (см. пример 3).

Таким образом, приемлемые антагонисты рецептора ангиотензина II не связываются *in vitro* с лигандсвязывающим доменом человеческого рецептора PPAR γ , однако приводят к индукции люциферазной активности при добавлении к культуральной среде, содержащей линию стабильно трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток с репортерным геном, которые

- а) экспрессируют слитый белок, состоящий из лигандсвязывающего домена фактора транскрипции человеческого рецептора PPAR γ , а также из ДНК-связывающего домена дрожжевого GAL4, и
- б) содержат ген люциферазы под контролем пятикратно повторяющегося связывающего участка дрожжевого Gal4.

Получение такой линии стабильно трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток, содержащих репортерный ген, описано в примере 2.

Связывание *in vitro* с лигандсвязывающим доменом человеческого рецептора PPAR γ 2 отсутствует в том случае, когда его невозможно обнаружить при анализе методом AlphaScreen (Ullmann E.F. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1994, сс. 5426-5430). Вместо анализа методом AlphaScreen можно также использовать SPA-анализ (Mukherjee R. и др., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 81, 2002, с. 217-225) или ЯМР-исследование (Johnson B.A. и др., J. Mol. Biol. 298, 2000, сс. 187-194). Обычно ни одним из этих методов не удастся обнаружить связывание с рецептором.

Подробный перечень антагонистов рецептора ангиотензина II можно найти на с. 7-18 публикации WO 95/26188. Антагонисты рецептора ангиотензина II описаны, в частности, в EP-A-253310, EP-A-323841, EP-A-324377, EP-A-420237, EP-A-443983, EP-A-459136, EP-A-475206, EP-A-502314, EP-A-504888, EP-A-514198, WO 91/14679, WO 93/20816, US 4355040 и US 4880804. К часто упоминаемым антагонистам рецептора ангиотензина II относятся соединения из класса сартанов, такие как кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, олмесартан, тазосартан, телмисартан или валсартан. Как наиболее предпочтительные для применения в предусмотренных изобретением целях зарекомендовали себя ирбесартан, лосартан и телмисартан. Наилучшие же результаты достигаются при применении телмисартана и его солей. Готовые лекарственные формы содержат такое действующее вещество в количестве, эквивалентных, например, 20-200 мг, предпочтительно 20, 40, 80, 120, 160 или 200 мг этого действующего вещества в форме свободной кислоты. При комбинировании этого действующего вещества с HCTZ или хлорталидоном содержание такого диуретика в лекарственной форме должно составлять, например, от 10 до 50 мг, предпочтительно 50, 25 или 12,5 мг.

Выявленное согласно настоящему изобретению предпочтительное действие отдельных антагонистов рецептора ангиотензина II наиболее выражено у такого действующего вещества, как телмисартан. При целесообразности или необходимости комбинированного применения блокатора рецептора ангиотензина II и одного или нескольких других терапевтических действующих веществ в качестве блокатора рецептора ангиотензина II предпочтительно использовать телмисартан, поскольку он является единственным действующим веществом, которое объединяет в себе гипотензивное действие с метаболическим действием, например антидиабетическим действием, которое способствует также предупреждению диабета.

По этой причине вышеописанные комбинации действующих веществ, одним из которых является телмисартан, а другим ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы, такой как симвастатин или аторвастатин, позво-

ляют достичь прогресса в терапевтическом лечении сердечно-сосудистых, сердечно-легочных, легочных или почечных заболеваний, но также в терапии дислипидемии, остеопороза или болезни Альцгеймера. Сказанное в равной степени относится и к применению комбинаций действующих веществ, одним из которых является телмисартан, а другим - либо росиглитазон, либо пиоглитазон, либо репаглинид, либо метформин, либо ингибитор DPP4, в терапии диабета. Телмисартан следует отнести к предпочтительным ингибиторам системы ренин-ангиотензин (СРА) и при лечении повышенного кровяного давления ингибиторами СРА в комбинации с антагонистом кальция, таким как амлодипин или нифедипин, или антагонистом альдостерона, таким как спиронолактон или эплеренон. Применение телмисартана в комбинации с антагонистом альдостерона, таким как эплеренон, позволяет добиться значительного прогресса и в лечении, соответственно предупреждении сердечной слабости или инфаркта миокарда.

Телмисартан предпочтительно использовать также в сочетании с ингибиторами агрегации тромбоцитов, такими как клопидрогрель или дипиридамолом, которые во всяком случае дополнительно комбинируют с ацетилсалициловой кислотой (АСК), прежде всего для профилактики апоплексического удара, риск возникновения которого наряду с повышенным кровяным давлением увеличивают также нарушения жирового обмена (дислипидемии) и сахарный диабет. В этих целях дипиридамолом можно использовать в дозе от 50 до 750 мг, предпочтительно от 100 до 500 мг, прежде всего от 200 до 450 мг. АСК можно использовать в дозе от 10 до 200 мг, предпочтительно от 25 до 100 мг, прежде всего от 30 до 75 мг.

Еще одним объектом настоящего изобретения являются в соответствии с этим фармацевтические композиции, содержащие телмисартан или одну из его солей в комбинации с

амлодипином или нифедипином,
эплереноном или спиронолактоном,
симвастатином или аторвастатином,
росиглитазоном, пиоглитазоном, репаглинидом или метформином,
дипиридамолом или клопидрогрелем, в любом случае в сочетании с ацетилсалициловой кислотой,
сульфонилмочевинной,
антагонистом альдостерона,
ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы,
ингибитором DPP4 либо
ингибитором агрегации тромбоцитов,

а также способ получения таких композиций. Такие комбинации действующих веществ, обычно совместно с одним или несколькими вспомогательными веществами, используемыми в технологии приготовления лекарственных средств, такими как маннит, сорбит, ксилит, сахароза, карбонат кальция, фосфат кальция, лактоза, натриевая соль кроскармеллозы (натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сшитой), кросповидон, натрийкрахмалгликолят, гидроксипропилцеллюлоза (с низкой степенью замещения), кукурузный крахмал, поливинилпирролидон, сополимеры винилпирролидона с другими производными винила (коповидоны), гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, крахмал, стеарат магния, стеарилфумарат натрия, тальк, карбоксиметилцеллюлоза, ацетофталаг целлюлозы, поливинилацетат, вода, вода/этанол, вода/глицерин, вода/сорбит, вода/полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, цетилстеариловый спирт или жиросодержащие вещества, например отвержденный жир, либо их соответствующими смесями перерабатывают в обычные галеновые формы, такие как таблетки, драже, капсулы, порошки, суспензии или суппозитории.

Таблетки изготавливают, например, смешением действующего вещества или действующих веществ с одним или несколькими вспомогательными веществами с последующим прессованием полученной смеси. Таблетки могут также состоять из нескольких слоев. В качестве примера вспомогательных веществ, используемых при изготовлении таблеток, можно назвать инертные разбавители, такие как маннит, сорбит, ксилит, сахароза, карбонат кальция, фосфат кальция и лактоза, разрыхлители, такие как натриевая соль кроскармеллозы (натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сшитой), кросповидоны, натрийкрахмалгликолят, гидроксипропилцеллюлоза (с низкой степенью замещения) и кукурузный крахмал, связующие, такие как поливинилпирролидон, сополимеры винилпирролидона с другими производными винила (коповидоны), гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и крахмал, смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеарилфумарат натрия и тальк, средства для обеспечения пролонгированного действия (депо-эффекта), такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, ацетофталаг целлюлозы и поливинилацетат, и допущенные к применению в фармацевтике красители, такие как цветные оксиды железа.

Блокада альдостерона позволяет снизить смертность и заболеваемость среди пациентов с выраженной сердечной слабостью. Результаты исследований, проводившихся с участием перенесших инфаркт миокарда пациентов, которым было назначено лечение ингибиторами АСЕ, антагонистами рецептора ангиотензина, диуретиком или бета-блокатором по поводу симптоматической сердечной слабости и недостаточности левых отделов сердца (левожелудочковой недостаточности), свидетельствуют о том, что дополнительное лечение эплереноном, являющимся избирательным блокатором альдостерона, увеличивает их шансы на выживание и уменьшает вероятность их последующей госпитализации (NEJM 348, 2003, сс. 1309-1321). В группу принимавших в исследованиях пациентов включали также больных диа-

бетом, у которых несмотря на недостаточность левых отделов сердца отсутствовала симптоматическая сердечная слабость, поскольку именно у пациентов этой категории велик риск сердечно-сосудистого события по сравнению с пациентами, страдающими недостаточностью левых отделов сердца и симптоматической сердечной слабостью. Принимая во внимание такое положение вещей, можно утверждать, что с учетом выявленного согласно настоящему изобретению антидиабетического действия у телмисартана, являющегося блокатором рецептора ангиотензина II, его комбинация с эплереноном показана для применения при долечивании инфаркта миокарда прежде всего тем пациентам, которые уже больны диабетом и в любом случае страдают диабетической протеинурией или у которых имеется подозрение на пре-диабетическое состояние. Объектом настоящего изобретения в соответствии с этим являются также лекарственные формы, содержащие комбинацию из обоих действующих веществ, одним из которых является телмисартан, а другим - эплеренон, например, содержащие телмисартан в количестве, эквивалентном 40-320 мг, предпочтительно 80 или 160 мг, и эплеренон в количестве, эквивалентном 20-200 мг, предпочтительно 25 или 50 мг. В предпочтительном варианте такие лекарственные формы представляют собой двухслойные таблетки. Для лечения подобных пациентов, у которых одновременно имеются признаки дислипидемии (например, гипертриглицеридемии или гиперхолестеринемии), комбинация этих действующих веществ часто целесообразно дополнять средством, понижающим уровень липидов в крови, таким как симвастатин или аторвастатин, в обычной для него дозировке, составляющей от 2,5 до 40 мг, предпочтительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или 40 мг. Соответствующая лекарственная форма, содержащая телмисартан, эплеренон и аторвастатин либо симвастатин, может представлять собой, например, трехслойную таблетку. Действующее вещество эплеренон используют преимущественно в микронизированном виде с размером частиц D_{90} в пределах от 25 до 400 мкм (см. WO 00/33847).

Метформин представляет собой хорошо зарекомендовавшее себя антидиабетическое средство, основной эффект которого проявляется в снижении избыточной выработки глюкозы в печени больного диабетом. При терапевтическом контроле за сахарным диабетом первостепенное значение имеет уровень в крови гемоглобина HbA_{1c}, представляющего собой продукт неферментативного гликозилирования β-цепи гемоглобина. Гемоглобин HbA_{1c}, поскольку его образование в существенной степени зависит от уровня сахара в крови и времени жизни эритроцитов, по типу "памяти", хранящей информацию об уровне сахара в крови, отражает среднее его значение за истекшие 4-6 недель. Страдающие диабетом пациенты, у которых содержание гемоглобина HbA_{1c} в крови за счет интенсифицированной терапии диабета длительно поддерживается на приемлемом уровне (т.е. ниже 6,5% от общего гемоглобина в образце крови), гораздо лучше защищены от диабетической микроангиопатии. У больного диабетом метформин при его индивидуальном применении способен снижать концентрацию гемоглобина HbA_{1c} в среднем на величину порядка 1,0-1,5%. Однако подобного снижения концентрации гемоглобина HbA_{1c} оказывается достаточным не для всех больных диабетом для уменьшения у них уровня гемоглобина HbA_{1c} до требуемых значений, лежащих ниже 6,5%, предпочтительно ниже 6%. Поэтому для усиления действия метформина необходимо принимать дополнительные терапевтические меры.

При создании настоящего изобретения неожиданно было установлено, что телмисартан действует как активатор рецептора PPAR γ . В соответствии с этим телмисартан обладает потенциалом повышать чувствительность жировой, мышечной и печеночной ткани к инсулину и таким путем снижать содержание сахара в крови. Благодаря этому своему свойству телмисартан наиболее пригоден для применения в комбинации с антидиабетическими средствами, такими как метформин или репаглинид (стимулирует высвобождение инсулина из В-клеток поджелудочной железы), поскольку его действие основано на ином принципе и тем самым оптимально усиливает механизм действия этих действующих веществ. Лекарственные формы с комбинацией из репаглинида и телмисартана содержат, например, репаглинид в количестве, эквивалентном 0,25-5 мг, предпочтительно 0,25-2 мг, наиболее предпочтительно 0,5, 1 или 2 мг, и телмисартан в количестве, эквивалентном 40-320 мг, предпочтительно 80 или 160 мг.

Комбинацию из телмисартана и метформина наиболее целесообразно назначать страдающему ожирением больному диабетом типа 2, поскольку, метформин, с одной стороны, в отличие от других принимаемых внутрь антидиабетических средств не приводит к увеличению массы тела, а телмисартан, с другой стороны, снижает инсулинорезистентность, являющуюся важным признаком и причиной повышенного уровня сахара в крови у этой категории больных диабетом типа 2. У большинства страдающих ожирением больных диабетом типа 2, равно как и у людей с преддиабетическим состоянием, выявлено повышенное кровяное давление, которое также относится к критериям метаболического синдрома. Для пациентов этой группы телмисартан является предпочтительным гипотензивным средством, которое благодаря дополнительно выявленным у него свойствам сенситизатора к инсулину, оптимально сочетающимся со свойствами такого хорошо зарекомендовавшего себя антидиабетического средства, как метформин, может равным образом использоваться одновременно с ним для лечения различных проявлений таких заболеваний, как диабет типа 2, преддиабет типа 2 или метаболический синдром, либо инсулинорезистентность. Прием телмисартана в дополнение к метформину позволяет добиться дополнительного снижения концентрации гемоглобина HbA_{1c} на величину порядка 0,25-2%, предпочтительно 0,25-1%, наиболее предпочтительно 0,25-0,5%. Снижение концентрации гемоглобина HbA_{1c} на величину менее

0,25% от общего гемоглобина также вносит эффективный вклад в лечение больного диабетом типа 2, однако в настоящее время снижение концентрации гемоглобина HbA1c на такую величину не поддается надежному измерению. По результатам исследования UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) было установлено, что снижение повышенного кровяного давления столь же эффективно, как и направленная на снижение уровня сахара в крови терапия, для уменьшения опасности возникновения у больных диабетом типа 2 поздних осложнений, таких как нефропатия, невропатия и ретинопатия, а также всех макроваскулярных осложнений. Тем самым предлагаемая комбинация из телмисартана и метформина вносит значительный вклад в уменьшение или даже предотвращение риска возникновения серьезных осложнений при диабете.

Лекарственные формы с комбинацией из метформина и телмисартана содержат, например, метформин в количестве, эквивалентном 450-900 мг, предпочтительно 500 или 850 мг, и телмисартан в количестве, эквивалентном 40-320 мг, предпочтительно 80 или 160 мг. Метформин в виде его гидрохлорида обладает хорошей растворимостью и не создает проблем при его переработке совместно со вспомогательными веществами, такими как связующие и смазывающие вещества, в лекарственные формы. Предпочтительными лекарственными формами являются при этом двухслойные таблетки. Ниже приведены примеры таблеток с предпочтительными количественными соотношениями в них между действующими и вспомогательными веществами.

Таблица 1. Таблетки с содержанием телмисартана 80 мг

	Телмисартан/метформин	
	80/500 мг	80/850 мг
Метформина гидрохлорид (соответствует 500 или 850 мг метформина)	643 мг	1094 мг
Вспомогательные вещества (связующие и смазывающие вещества), не менее	27 мг	46 мг
Телмисартан в виде SD-гранулята (соответствует 80 мг телмисартана)	135 мг	135 мг
Вспомогательные вещества из матрицы таблетки с телмисартаном (сорбит и смазывающее вещество)	345 мг	345 мг
Общая масса таблетки (не менее)	1150 мг	1620 мг

Таблица 2. Таблетки с содержанием телмисартана 160 мг

	Телмисартан/метформин	
	160/500 мг	160/850 мг
Метформина гидрохлорид (соответствует 500 или 850 мг метформина)	643 мг	1094 мг
Вспомогательные вещества (связующие и смазывающие вещества), не менее	27 мг	46 мг
Телмисартан в виде SD-гранулята (соответствует 160 мг телмисартана)	270 мг	270 мг
Вспомогательные вещества из матрицы таблетки с телмисартаном (сорбит и смазывающее вещество)	690 мг	690 мг
Общая масса таблетки (не менее)	1630 мг	2100 мг

Лекарственные формы с комбинацией из репаглинида и телмисартана содержат, например, репаглинид в количестве, эквивалентном 0,25-5 мг, предпочтительно 0,25-2 мг, наиболее предпочтительно 0,5, 1 или 2 мг, и телмисартан в количестве, эквивалентном 40-320 мг, предпочтительно 80 или 160 мг.

Примеры

Пример 1. Телмисартан, лосартан и ирбесартан не связываются *in vitro* с лигандсвязывающим доменом рецептора PPAR γ .

Белок, содержащий лигандсвязывающий домен (ЛСД) человеческого рецептора PPAR γ , получают в виде слитого с GST (глутатион-S-трансфераза) белка в *E.coli* и очищают аффинной хроматографией. С этой целью фрагмент ДНК, кодирующий аминокислоты 205-505 фактора транскрипции человеческого PPAR γ 2 (см. последовательность в банке генов под номером U79012), субклонируют с использованием дополнительно введенных сайтов рестрикции BamH I и Xho I в экспрессирующий вектор pGEX-4T-1 (фирма Amersham) и контролируют последовательность фрагмента ДНК. Экспрессия слитого белка происходит в рекомендованном для векторов pGEX штамме *E.coli* BL21(DE3) после индукции 0,2-миллимолярным ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактопиранозид) в течение 4 ч при 25°C. По окончании индукции бактерии центрифугируют и порциями вымораживают в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) с pH 7,4. После разрушения в устройстве "френч-пресс" растворенный слитый белок GST-PPAR γ -ЛСД очищают с помощью колонки GSTrap (фирма Pharmacia). Элюирование осуществляют добавлением 20-миллимолярного восстановленного глутатиона. Фракции, содержащие слитый белок GST-PPAR γ -ЛСД, обессоливают с помощью обессоливающей колонки HiTrap (фирма Pharmacia) и путем стандартного анализа определяют концентрацию белка.

Белок, содержащий лигандсвязывающий домен (ЛСД) человеческого рецептора RXR α , получают в

виде белка, слитого с His-меченным белком, в *E.coli* и очищают аффинной хроматографией. С этой целью фрагмент ДНК, кодирующий аминокислоты 220-461 фактора транскрипции человеческого RXR α (см. последовательность в банке генов под номером NM_002957, nt 729-1457), субклонировали с использованием дополнительно введенных сайтов рестрикции BamH I и Not I в экспрессирующий вектор pET28c (фирма Novagen) и контролируют последовательность фрагмента ДНК. Экспрессия слитого белка происходит в рекомендованном для векторов pET штамме *E.coli* BL21(DE3) после индукции 0,2-миллимолярным ИПТГ в течение 4 ч при 25°C. По окончании экспрессии бактерии центрифугируют и порциями вымораживают в ЗФР с pH 7,4. После разрушения в устройстве "френч-пресс" растворенный слитый белок His-RXR α -ЛСД очищают с помощью хелатирующей колонки HiTrap (фирма Pharmacia). Элюирование осуществляют с использованием 500-миллимолярного имидазола. Фракции, содержащие слитый белок His-RXR α -ЛСД, обессоливают с помощью обессоливающей колонки HiTrap (фирма Pharmacia) и путем стандартного анализа определяют концентрацию белка.

а) Анализ методом AlphaScreen

Метод AlphaScreen впервые был описан у Ullmann E.F. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 1994, сс. 5426-5430. В данном примере измерения проводили по методике, описанной у Glickman J.F. и др., J. Biomol. Screen 7, 2002, сс. 3-10. Буфер для анализа состоял из HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота) с pH 7,4 в концентрации 25 мМ, NaCl в концентрации 100 мМ, ДТТ (дитиотреитол) в концентрации 1 мМ, 0,1% твина 20 и 0,1% БСА (бычий сывороточный альбумин). Слитый белок GST-PPAR γ -ЛСД в концентрации 3 нМ, биотинилированный пептид LXXLL кофактора CBP (соответствует пептиду, описанному на с. 218 у Mukherjee R. и др., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 81, 2002, сс. 217-225, с дополнительным N-концевым цистеином) в концентрации 15 нМ и покрытые антителом к GST шарики-акцепторы и покрытые стрептавидином шарики-доноры (фирма Applied Biosystems) в количестве по 10 мкг/мл в течение 4 ч инкубировали при комнатной температуре в общем объеме 12,5 мкл в присутствии тестируемого вещества в различных концентрациях (в ДМСО). Конечная концентрация ДМСО при анализе составляла 1 об.%. В качестве фонового контроля (NSB) служил 1%-ный раствор ДМСО. Измерения проводили в измерительном приборе Packard Fusion.

Концентрация, М	Телмисартан		Росиглитазон	
	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.
NSB	619	21	573	17
$1,00 \times 10^{-8}$			820	18
$3,00 \times 10^{-8}$	642	41	1720	48
$1,00 \times 10^{-7}$	606	10	8704	59
$3,00 \times 10^{-7}$	644	56	27176	1232
$1,00 \times 10^{-6}$	677	14	43233	1083
$3,00 \times 10^{-6}$	720	35	52691	3771
$1,00 \times 10^{-5}$	847	82	56366	4303
$5,00 \times 10^{-5}$	1111	135		

В отличие от росиглитазона, известного из литературы агониста рецептора PPAR γ со связыванием в ЛСД, в присутствии телмисартана, лосартана и ирбесартана, используемых в возрастающих концентрациях (вплоть до 50 мкМ), не происходит непосредственная активация ЛСД рецептора PPAR γ и никакое связанное с этим значительное пополнение пептида LXXLL.

б) SPA-анализ

Описание формата проведения SPA-анализа ("Scintillation Proximity Assay") можно найти у Mukherjee R. и др., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 81, 2002, сс. 217-225. Используемый буфер для анализа состоял из трис с pH 7,5 в концентрации 20 мМ, KCl в концентрации 25 мМ, ДТТ в концентрации 10 мМ и 0,2% тритона X-100. Слитый белок GST-PPAR γ -ЛСД в концентрации 30 нМ, слитый белок His-RXR α -ЛСД в концентрации 30 нМ, антитело к GST (1:600, фирма Amersham Pharmacia), 0,25 мг покрытых протеином А связывающих антитела шариков из поливинилтолуола для SPA-анализа (фирма Amersham Pharmacia) и меченный H-изотопом росиглитазон в концентрации 30 нМ в течение 5 ч инкубировали при комнатной температуре в общем объеме 100 мкл с различными разведениями тестируемых веществ. В качестве фонового контроля (NSB) вместо радиоактивного росиглитазона добавляли немеченный росиглитазон в концентрации 10 мкМ, а в качестве вещества, которому соответствует максимальное значение (B_{max}), вместо тестируемого вещества добавляли используемый растворитель, например ДМСО. По окончании инкубации опытные смеси центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин в центрифуге Hettich Universal 30Rf и анализировали с помощью прибора Packard TopCount NXT.

Концентрация, М	Телмисартан		Ирбесартан		Лосартан	
	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.
NSB	217	9	217	9	217	9
Bmax	911	15	911	15	911	15
$1,00 \times 10^{-7}$	837	49	913	54	915	43
$3,00 \times 10^{-7}$	802	28	810	49	835	11
$1,00 \times 10^{-6}$	818	27	815	51	901	10
$3,00 \times 10^{-6}$	818	20	779	26	814	53
$1,00 \times 10^{-5}$	703	30	723	37	787	46
$3,00 \times 10^{-5}$	691	222	648	40	784	96
$1,00 \times 10^{-4}$	545	18	510	81	611	17

В отличие от непосредственных агонистов рецептора PPAR γ , которые связываются с его ЛСД, даже в присутствии высоких избыточных количеств телмисартана, лосартана или ирбесартана не происходит зависящее от концентрации вытеснение радиоактивного росиглитазона из связывающего "кармана".

в) ЯМР-исследования

В отличие от непосредственного лиганда рецептора PPAR γ , например росиглитазона, при измерении N-TROSY-спектра лигандсвязывающего домена рецептора PPAR γ в присутствии телмисартана это тестируемое вещество не взаимодействует с аминокислотами связывающего "кармана". Аминокислоты связывающего "кармана" имеют в присутствии тестируемых веществ то же местоположение, что и в отсутствие лиганда.

Пример 2. Получение линии стабильно трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток с репортерным геном.

Фрагмент ДНК, кодирующий аминокислоты 205-505 фактора транскрипции человеческого PPAR γ 2 (соответствует нуклеотидам 703-1605 последовательности в банке генов под номером U79012), встраивают с использованием дополнительно введенных сайтов рестрикции BamH I и Hind III в сайт вектора pFA-CMV (фирма Stratagene), представляющий собой сайт множественного клонирования, и проверяют последовательность. Полученная плазмида pFA-CMV/hPPAR γ 2-ЛСД кодирует N-конец лигандсвязывающего домена рецептора PPAR γ в той же рамке считывания, что и рамка считывания ДНК-связывающего домена белка Gal4. Эта плазмида дополнительно кодирует резистентность к неомицину.

Клетки линии CHO-K1 (ATCC CCL-61) совместно трансфектируют плазмидами pFA-CMV/hPPAR γ 2-ЛСД и pFR-Luc (фирма Stratagene). Плазмида pFR-Luc кодирует ген люциферазы под контролем пятикратно повторяющегося связывающего участка дрожжевого Gal4. Трансфекцию осуществляют с использованием липофектамина 2000 согласно инструкции производителя. После трансфекции клетки культивируют в среде Хэма F12, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки, в присутствии G-418 в количестве 0,5 мг/мл. После шестичасового культивирования клетки пассивируют и выдерживают в культуральной среде в течение последующих 10 дней. Полученные резистентные к неомицину колонии собирают под микроскопом, по отдельности переносят в лунки 96-луночных планшетов и культивируют в них. Таким путем получают различные линии трансформированных клеток с содержащимися в них плазмидами (например, клон №10, 11, 13 и т.д.), которые (клетки) оставляют в культуральной среде.

Клетки полученных линий исследуют на предмет индуцибельности гена люциферазы агонистом рецептора PPAR γ , например росиглитазоном, реакция которых на стимуляцию агонистом рецептора PPAR γ проявляется в повышенном люциферазном сигнале.

Пример 3. Телмисартан, лосартан и ирбесартан активируют рецептор PPAR γ в клетках.

Клетки линии CHO-K1, являющиеся производными трансформированного, клон №11 из примера 2, высевает в 96-луночные плоскодонные планшеты с плотностью 3×10^4 клеток/200 мкл/лунку и культивируют в течение ночи в среде Хэма F12, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки и G-418 в количестве 0,5 мг/мл. Через 24 ч среду заменяют на аналогичную, но без добавленного к ней G-418. Тестируемые вещества растворяют в приемлемом растворителе, например в ДМСО, до концентрации, в 100 раз превышающей требуемую, а затем разводят в предварительно помещенной в культуральный планшет среде, уменьшая концентрацию в 100 раз. Фоновым контролем служит используемый растворитель, например ДМСО, в такой же концентрации. Через 24 ч после добавления тестируемого вещества супернатанты удаляют, а клетки дважды промывают промывочным буфером порциями по 150 мкл (содержащим трицин в концентрации 25 мМ и MgSO $_4$ в концентрации 16,3 мМ, pH 7,8). После промывки к каждой опытной смеси добавляют по 50 мкл промывочного буфера с 150 мкл содержащего люциферазу буфера для анализа (содержащего трицин в концентрации 25 мМ, ЭДТК в концентрации 0,5 мМ, NaTPP в концентрации 0,54 мМ, MgSO $_4$ в концентрации 16,3 мМ, АТФ в концентрации 1,2 мМ, люциферин в концентрации 0,05 мМ, 2-меркаптоэтанол в концентрации 56,8 мМ и 0,1% тритона X-100, pH 7,8). Люминесценцию измеряют с помощью прибора Packard TopCount NXT после пятиминутной выдержки. Люцифе-

разную активность вычисляют интегрированием относительных световых единиц (ОСЕ) по первым десяти секундам после начала измерения.

Концентрация, М	Телмисартан		Ирбесартан		Лосартан		Росиглитазон	
	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.	ММ	станд. отклон.
NSB	466	188	466	188	466	188	741	141
$1,00 \times 10^{-8}$							2761	178
$3,00 \times 10^{-8}$							8256	708
$1,00 \times 10^{-7}$							35265	2947
$3,00 \times 10^{-7}$	760	255	491	70	874	475	86859	6139
$1,00 \times 10^{-6}$	2859	455	657	65	589	70	106252	30018
$3,00 \times 10^{-6}$	24498	2290	1028	342	672	88	143232	14064
$1,00 \times 10^{-5}$	61397	7853	3292	556	709	163	150989	24245
$3,00 \times 10^{-5}$	58790	2055	22133	4202	3271	585		
$1,00 \times 10^{-4}$			29600	6936	11322	1668		

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антагонист рецептора ангиотензина II, телмисартан, вызывает особо сильную активацию метаболических путей с участием PPAR γ в линии трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток с репортерным геном. Активация другими антагонистами рецептора ангиотензина II, такими как лосартан и ирбесартан, происходит лишь при более высоких концентрациях этих тестируемых веществ и проявляется в меньшей степени.

Пример 4. Эксперименты с адипоцитами 3T3-L1 и клетками PC12W.

Мышечные преадипоциты 3T3-L1 культивируют в DMEM-среде (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС). Клетки PC12W культивируют в DMEM-среде с 5% ФТС и 10% лошадиной сыворотки. В обоих случаях каждая среда содержит по 1% пенициллина/стрептомицина. Дифференцировку адипоцитов индуцируют через 2-3 дня после слияния клеток добавлением соответствующего раствора. Такой раствор содержит дексаметазон в концентрации 1 мкмоль/л, 3-изобутил-1-метилксантин в концентрации 0,5 ммоль/л, инсулин в концентрации 1,67 мкмоль/л и 10% ФТС. Для сравнения дифференцировку клеток индуцируют также соответствующим раствором, который дополнительно содержит телмисартан. Через 48 ч (день 2) среду заменяют на DMEM-среду, содержащую 10% ФТС и инсулин в концентрации 1,67 мкмоль/л, соответственно 10% ФТС, инсулин в концентрации 1,67 мкмоль/л и телмисартан. После этого клетки стимулируют еще в течение последующих 48 ч и в завершение анализируют (день 4).

Накопление липидов в адипоцитах 3T3-L1

Клетки промывают 3ФР и фиксируют 3,7%-ным раствором формальдегида в течение 2 мин. После фиксации клетки в течение 1 ч окрашивают при комнатной температуре разбавленным водой в пропорции 3:2 0,5%-ным маточным раствором красителя Oil Red-O в изопропанол. После промывки клетки исследуют под оптическим микроскопом. Телмисартан в концентрации 10 мкмоль/л вызывает повышенное накопление липидов в адипоцитах, которое заметно по более интенсивной окраске красителем Oil Red-O. Отсюда можно сделать вывод о том, что телмисартан способствует дифференцировке адипоцитов 3T3-L1.

Стимуляция экспрессии белка aP2 в клетках 3T3-L1

Для выделения РНК, обратной транскрипции и количественного анализа экспрессии гена использовали систему обнаружения последовательностей ABI 7000 для ПЦР в реальном времени (описана у Janke и др., Diabetes 51, 2002, сс. 1699-707). В качестве эндогенного контроля для ПЦР в реальном времени служат гены "домашнего хозяйства" 18S рРНК и гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы (hprt).

Наблюдаемая индукция зависит от используемой концентрации телмисартана. В клетках 3T3-L1 телмисартан в концентрации 10 мкмоль/л стимулирует 3,1 \pm 0,3-кратную (p<0,01) экспрессию адипозного белка 2 (aP2), представляющего собой липогенный маркерный ген. В сравнении с ним лиганд рецептора PPAR γ пиоглитазон в концентрации 10 мкмоль/л стимулирует 4,5 \pm 1-кратную (p<0,01) экспрессию белка aP2.

Опыты с транскрипцией репортерного гена

С целью исследовать, является ли индукция липогенеза телмисартаном результатом стимуляции активности рецептора PPAR γ , проводят эксперименты по трансфекции с конструкциями из PPRE (PPAR Response Element, ответный элемент рецептора PPAR) и репортерного гена. Временная трансфекция и методика проведения используемых анализов с люциферазой описаны у Kintscher и др., Circ. Res. 91, 2002, сс. 35-44. Адипоциты 3T3-L1 (день 4), соответственно клетки PC12W, трансфектируют липофектаминоном 2000 (фирма Invitrogen) в присутствии 1 мкг (для клеток 3T3-L1), соответственно 50 нг (для клеток PC12W), содержащей репортерный ген конструкции, векторов экспрессии PPAR γ 2 и RXR α , а также в присутствии 10 нг контрольного вектора с репортерным геном люциферазы из Renilla. Под содержащей репортерный ген конструкцией подразумевается конструкция, полученная слиянием ответного элемента PPAR-рецептора (PPRE) из 3 \times ацил-КоА-оксидазы с Тк-люциферазой. Используемые векторы экспрессии

PPAR γ 2 и RXR α соответствуют векторам, описанным у Elbrecht и др., Biochem. Biophys. Res. Com. 224, 1996, сс. 431-437, а также у Joseph и др., J. Biol. Chem. 277(13), 2002, сс. 11019-11025. Контрольный вектор с репортерным геном люциферазы представляет собой плазмиду pRL-CMV (фирма Promega). Через 4 ч среду для трансфекции заменяют на DMEM-среду с 10% ФТС, дополнительно содержащую телмисартан, пиоглитазон или только ДМСО в качестве носителя. Люциферазную активность определяют через 24 ч.

Обработка адипоцитов 3T3-L1 телмисартаном в концентрации 10 мкмоль/л приводит к $3,4 \pm 0,9$ -кратной ($p < 0,05$) индукции транскрипционной активности рецептора PPAR γ по сравнению с $5,2 \pm 1,1$ -кратной индукцией пиоглитазоном в той же концентрации, равной 10 мкмоль/л.

Клетки PC12W представляют собой клетки с дефицитом AT $_1$ -рецептора. PPAR γ 2 и его гетеродимер RXR α сверхэкспрессируются в клетках PC12W, в связи с чем измеряли зависящую от рецептора PPAR γ транскрипцию в присутствии телмисартана, соответственно пиоглитазона в концентрации по 10 мкмоль/л, соответственно в их отсутствие. Поскольку клетки PC12W не экспрессируют рецептор PPAR γ , в отсутствие экзогенного PPAR γ 2/RXR α регуляция активности рецептора PPAR γ не обнаруживается. После же сверхэкспрессии PPAR γ 2/гетеродемира RXR α телмисартан и в клетках PC12W с дефицитом AT $_1$ -рецептора индуцирует $1,9 \pm 0,4$ -кратную ($p < 0,05$) активность рецептора PPAR γ . В сравнении с ним пиоглитазон индуцирует $4,2 \pm 1,4$ -кратную ($p < 0,01$) активность рецептора PPAR γ . Эти результаты подтверждают, что стимуляция активности рецептора PPAR γ телмисартаном не зависит от блокирования AT $_1$ -рецептора.

Полученные данные свидетельствуют также о том, что в плазме крови пациентов, которые принимают телмисартан от повышенного кровяного давления, могут достигаться необходимые для стимуляции активности рецептора PPAR γ концентрации телмисартана. Иными словами, лечение повышенного кровяного давления телмисартаном способно дополнительно улучшить чувствительность к инсулину, что положительно сказывается на уровне сахара в крови.

Пример 5. Примеры композиций (лекарственных форм).

Таблетка 1

Путем непосредственного прессования натриевой соли телмисартана со вспомогательными веществами и стеаратом магния получают таблетки следующего состава:

Компоненты	Количество в мг
натриевая соль телмисартана	41,708
маннит	149,542
микрористаллическая целлюлоза	50,000
натриевая соль кроскармеллозы	5,000
стеарат магния	3,750
Всего	250,000

Таблетка 2

Путем непосредственного прессования натриевой соли телмисартана со вспомогательными веществами и стеаратом магния получают таблетки следующего состава:

Компоненты	Количество в мг
натриевая соль телмисартана	83,417
сорбит	384,083
поливидон K25	25,000
стеарат магния	7,500
Всего	500,000

Таблетка 3

В гравитационном смесителе смешивают гидрохлортиазид, натриевую соль телмисартана, сорбит и красный оксид железа (краситель), полученную смесь просеивают через сито с размером ячеек 0,8 мм и после добавления стеарата магния перерабатывают в гравитационном смесителе в порошкообразную смесь. Затем из этой смеси действующих веществ и вспомогательных веществ в таблетировочном прессе (например, Korsch EK0 или Fette P1200) прессуют таблетки. Таким путем получают таблетки следующего состава, в которых содержащееся в одной таблетке количество натриевой соли телмисартана эквивалентно 80 мг телмисартана в форме свободной кислоты:

Ингредиент	Количество в мг в одной таблетке	%
натриевая соль телмисартана	83,417	13,903
гидрохлортиазид	12,500	2,083
сорбит	494,483	82,414
красный оксид железа	0,600	0,100
стеарат магния	9,000	1,500
Всего	600,000	100,000

Натриевая соль телмисартана таблеток трех партий после перемешивания в течение 30 мин (75 об/мин) растворяется в 900 мл 0,1-молярного фосфатного буфера с pH 7,5 на $92 \pm 1,5\%$, $96 \pm 1,8\%$, соответ-

ственно $100 \pm 1,0\%$. Гидрохлортиазид после перемешивания в течение 30 мин (100 об/мин) растворяется в 900 мл 0,1-молярной HCl на $69 \pm 6,3\%$, $72 \pm 2,1\%$, соответственно $78 \pm 1,8\%$.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антагониста рецептора ангиотензина II, представляющего собой телмисартан или одну из его солей, для получения лекарственного средства, предназначенного для лечения людей, у которых диагностирован сахарный диабет типа 2 или существует подозрение на предиабетическое состояние, для предупреждения диабета или для лечения метаболического синдрома и инсулинорезистентности у пациентов с нормальным кровяным давлением.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень сахара в крови натощак превышает 125 мг глюкозы на 1 дл плазмы.

3. Применение по п.1, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень сахара в крови натощак лежит в пределах от 110 до 125 мг глюкозы на 1 дл плазмы.

4. Применение по п.1, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень сахара в крови, измеренный через 2 ч после приема натощак 75 г глюкозы, превышает 200 мг глюкозы на 1 дл плазмы.

5. Применение по п.1, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень сахара в крови, измеренный через 2 ч после приема натощак 75 г глюкозы, лежит в пределах от 140 до 200 мг глюкозы на 1 дл плазмы.

6. Применение по п.1, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень триглицеридов в крови превышает 150 мг/дл.

7. Применение по п.6, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень липопротеинов высокой плотности в крови не превышает 40 мг на 1 дл плазмы у женщин и 50 мг на 1 дл плазмы у мужчин.

8. Применение по пп.6 и 7, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей уровень сахара в крови натощак превышает 110 мг глюкозы на 1 дл плазмы.

9. Применение по одному из пп.1-8, отличающееся тем, что полученное лекарственное средство может использоваться дополнительно для лечения пациентов, у которых систолическое кровяное давление превышает 140 мм рт.ст., а диастолическое кровяное давление превышает 90 мм рт.ст.

10. Применение по пп.1, 2 и 4, отличающееся тем, что полученное лекарственное средство может использоваться дополнительно для лечения людей, у которых систолическое кровяное давление превышает 130 мм рт.ст., а диастолическое кровяное давление превышает 80 мм рт.ст.

11. Применение по одному из пп.1-10, отличающееся тем, что у подвергаемых лечению людей отношение объема (окружности) талии к объему (окружности) бедер превышает 0,8 у женщин и 1,0 у мужчин.

12. Применение по п.1, отличающееся тем, что антагонист рецептора ангиотензина II обладает свойством после добавления к культуральной среде, содержащей линию стабильно трансформированных кодирующей рецептор PPAR γ последовательностью клеток с репортерным геном, активировать экспрессию стабильно трансфектированного гена люциферазы, не связываясь *in vitro* с лигандсвязывающим доменом рецептора PPAR γ .

13. Применение по п.12, отличающееся тем, что антагонист рецептора ангиотензина II не связывается *in vitro* с лигандсвязывающим доменом человеческого рецептора PPAR γ , но приводит к индукции люциферазной активности при его добавлении к культуральной среде, содержащей линию стабильно трансформированных клеток, которые экспрессируют слитый белок, состоящий из лигандсвязывающего домена фактора транскрипции человеческого рецептора PPAR γ , а также из ДНК-связывающего домена дрожжевого GAL4, и содержат ген люциферазы под контролем пятикратно повторяющегося связывающего участка дрожжевого Gal4.

14. Применение по п.1, отличающееся тем, что лекарственная форма лекарственного средства содержит от 20 до 200 мг телмисартана.

15. Применение по п.1, отличающееся тем, что антагонист рецептора ангиотензина II комбинируют с диуретиком.

16. Применение по п.15, отличающееся тем, что лекарственная форма лекарственного средства содержит от 10 до 50 мг гидрохлортиазида или хлорталидона.

17. Применение по п.1, отличающееся тем, что антагонист рецептора ангиотензина II, представляющий собой телмисартан, применяют в комбинации с

- а) амлодипином или нифедипином,
- б) эплереноном или спиронолактоном,
- в) росиглитазоном, пивоглитазоном, репаглинидом или метформинном,
- г) дипиридамолом,
- д) антагонистом альдостерона,
- е) клопидогрель, в любом случае в сочетании с ацетилсалициловой кислотой,

- ж) ингибитором ГМГ-КоА-редуктазы,
- з) ингибитором DPP4,
- и) сульфонилмочевинной либо
- к) ингибитором агрегации тромбоцитов.

18. Способ лечения людей, у которых диагностирован сахарный диабет типа 2 или существует подозрение на предиабетическое состояние, для предупреждения диабета или лечения метаболического синдрома и инсулинорезистентности у пациентов с нормальным кровяным давлением, отличающийся тем, что в организм вводят лекарственное средство, которое содержит антагонист рецептора ангиотензина II, представляющий собой телмисартан.

