

Цей винахід стосується способів і фармацевтичних композицій, що містять простагландинові агоністи, які є корисними для запобігання розрідження кістки, для відновлення або збільшення кісткової маси, а також для підсилення регенерації кістки, включаючи лікування станів, що полягають в зменшенні кісткової маси та/чи дефектів кісток у хребетних тварин, і зокрема, у ссавців, включаючи людину. Цей винахід особливо стосується способів і фармацевтичних композицій, що містять селективні простагландинові агоністи EP4 рецептора.

Остеопороз - це системне скелетне захворювання, що характеризується зменшенням кісткової маси і пошкодженням кісткової тканини з подальшим збільшенням ламкості кісток і схильності до переломів. В США такий стан спостерігається більше ніж у 25 млн. чол. і є причиною більше 1,3 млн. переломів щороку, включаючи 500 000 переломів хребта, 250 000 переломів тазостегнового суглоба і 240 000 переломів зап'ястя щорічно. Перелом тазостегнового суглоба є найсерйознішим наслідком остеопорозу, 5-20% хворих помирає протягом року і понад 50% залишаються непрацездатними.

Найбільший ризик захворювання на остеопороз загрожує людям похилого віку, і, таким чином, передбачається, що проблема значно зросте із старінням населення. Передбачається, що в світі кількість випадків переломів збільшиться втричі протягом наступних 60 років, і підраховали, що у 2050 році у світі буде 4,5 млн. випадків переломів. Жінки піддаються ризику захворювання на остеопороз частіше ніж чоловіки. У жінок відбувається значна втрата кісткової маси протягом п'яти років після менопаузи. Іншими факторами, що збільшують ризик захворювання, є паління, зловживання алкоголем, сидячий спосіб життя і недостатнє вживання кальцію.

Існує два головних типи фармацевтичної терапії для лікування остеопорозу. Перший полягає у застосуванні анти-резорбтивних сполук для зменшення резорбції кісткової тканини.

Естроген є прикладом анти-резорбтивного агента. Відомо, що естроген зменшує вірогідність переломів. Крім того, Black, et al. в EP 0605193A1 повідомляє, що естроген, особливо при оральному застосуванні, зменшує рівні ЛНГ в плазмі і збільшує рівні корисних ліпопротеїнів високої густоти (ЛВГ). Однак, естроген не відновлює кістки у остеопорозному скелеті до стану кісток молодшої людини. Крім того, довготривала терапія естрогеном спричиняє ряд розладів, включаючи зростання ризику раку матки, внутрішньоматкового раку та можливого раку молочної залози. І це є причиною відмови багатьох жінок у такому лікуванні. Через виникнення значних небажаних ефектів, пов'язаних з терапією естрогеном, виникає необхідність розробки альтернативних способів лікування остеопорозу, які б мали бажані ефекти на рівень ЛНГ в сироватці, але не спричиняли небажаних ефектів.

Другим типом фармацевтичної терапії для лікування остеопорозу є використання анаболічних агентів для прискорення остеогенезу та збільшення кісткової маси. Такі агенти повинні відновлювати стан кісток в остеопорозному хребті.

Деякі простагландинові агоністи розкриті в патентах Великобританії №№ 1478281 і 1479156, а також в патентах США №№ 4175203, 4055596, 4175203, 3987091 і 3991106, які є корисними як, наприклад, ниркові вазодилататори.

У патенті США № 4033996 розкриті 8-аза-9-оксо(і діоксо)-тіа-11,12-секопростагландини, які є корисними як ниркові вазодилататори для запобігання утворення тромбів, для зменшення виділення гормонів росту, а також як регулятори імунної реакції.

У патенті Франції № 897566 розкриті похідні амінокислот для лікування неврологічних, психічних та серцево-судинних захворювань.

J. Org. Слеш. 26; 1961; 1437 розкриває №-ацетил-№бензил-р-амінофенілмеркаптоацетилову кислоту.

У патенті США № 4761430 розкриті сполуки арилбензенсульфонамідів як агенти, що зменшують рівень ліпідів.

У патенті США № 4443477 розкриті сульфонамідифенілкарбонові кислоти як агенти, що зменшують рівень ліпідів.

У патенті США № 3528961 розкриті похідні ε-капролактаму як фарбники.

У патенті США № 3780095 розкриті ацильовані анілінкарбонові кислоти як жовчогінні речовини.

У патенті США № 4243678 розкриті ацилгідрокарбіламіналканові кислоти, які застосовуються при лікуванні виразки шлунку, як інгібітори жировиділення, а також для боротьби із запаленнями шкіри.

У патенті США № 4386031 розкриті М-бензоіл-ш-аніліналканкарбонові кислоти як протиалергічні речовини, інгібітори агрегації тромбоцитів, протизапальні агенти та агенти, що зменшують рівень ліпідів.

Повідомлялося, що внаслідок зменшення кісткової маси крім остеопорозу лише в Америці щорічно виявляють майже 20-25 млн. випадків у жінок і у зростаючої кількості чоловіків вертебральних переломів, а також 250000 випадків переломів тазостегнових суглобів. В останньому випадку спостерігається коефіцієнт смертності 12% протягом перших двох років, 30% пацієнтів потребують догляду няньки після перелому. Оскільки це дуже важливо, "очікується, що зростуть економічні та медичні наслідки одужання завдяки повільному або неповному зростанню кісток на місцях переломів, завдяки старінню населення в цілому.

Естрогени були показані (Bolander et al., 38th Annual Meeting Orthopedic Research Society, 1992) для удосконалення якості лікування апендикулярних переломів. Таким чином, естрогензамішувальна терапія повинна бути ефективною як спосіб лікування переломів. Однак, дотримання хворим режиму і схеми лікування естрогеном є відносно недостатніми через його побічні ефекти, включаючи відновлення менструації, мастодинії, підвищений ризик раку матки, підвищений ризик раку молочної залози, а також супутнє використання прогестинів. Крім того чоловіки не погоджуються на лікування естрогеном. Існує необхідність в терапії, яка була б корисною для пацієнтів, які страждають переломами ослаблених кісток і яка б підвищила дотримання хворим режиму і схеми лікування.

Продемонстрували, що простагландин E2 (PGE2) може відновлювати ослаблені кістки у оваріектомізованого (OVX) паціюка, моделі для постклімактеричного остеопорозу. Ke, H.Z., et al., Bone, 23:249-255, 1998. Однак, спостерігалися серйозні побічні наслідки, пов'язані з PGE2. Jee, W.S.S. and Ma, Y.F., Bone, 21:297-304, 1997.

Хоча існує ряд терапій остеопорозу, виникає необхідність і продовжується пошук в даній галузі стосовно

альтернативних терапій остеопорозу. Крім того, існує необхідність в терапії зростання кісток на місці перелому. Також, існує необхідність в терапії, яка може покращити відновлення росту в скелетних зонах, де існують дефекти, викликані або спричинені, наприклад, пухлинами в кістках. Крім того, існує необхідність в терапії, яка може покращити відновлення росту кісток в скелетних зонах, де потрібна трансплантація кістки.

Цей винахід стосується способів лікування станів, викликаних зменшенням кісткової маси у ссавців, що полягають у призначенні ссавцям селективного антагоніста EP4 рецептора, його проліків або фармацевтично прийнятної солі згаданого селективного агоніста EP4 рецептора або згаданих проліків.

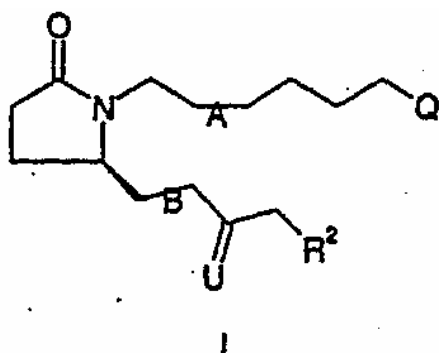
Цей винахід особливо стосується таких способів, коли згаданим станом є остеопороз, крижість, остеопорозний перелом, дефект кісток, дитяче ідіопатичне розрідження кістки, альвеолярне розрідження кістки, мандибулярне розрідження кістки, перелом кістки, остеотомія, розрідження кістки, пов'язане з періодонтитом, або протезне вrostання. У способах цього винаходу, яким віддається перевага, селективний агоніст EP4 рецептора призначається систематично, наприклад, орально, підшкірно, внутрішньом'язово або як аерозоль. В інших способах цього винаходу, яким віддається перевага, агоніст EP4 рецептора призначається для місцевого застосування.

Способи цього винаходу є особливо корисними, коли згаданим станом є крижість..

Способи цього винаходу є особливо корисними, коли згаданим станом є остеопороз.

Способи цього винаходу є також особливо корисними, коли згаданим станом є перелом кістки або остеопорозний перелом.

Селективні агоністи EP4, яким віддається перевага, для використання в способах цього винаходу включають сполуки формули I:



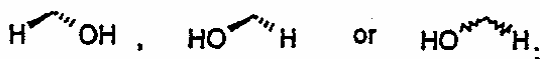
їх проліки і фармацевтично прийнятні солі згаданих композицій або згаданих проліків, де:

Q - це COOR³, CONHR⁴ або тетразол-5-іл;

A - це простий або цис-подвійний зв'язок;

B - це простий або транс-подвійний зв'язок;

U - це



R² - це α-тієніл, феніл, фенокси, однозаміщений феніл і однозаміщений фенокси, згаданими замісниками є хлор, фтор, феніл, метокси, трифторметил або (C₁-C₃)алкіл;

R³ - це водень, (C₁-C₅)алкіл, феніл або p-біфеніл;

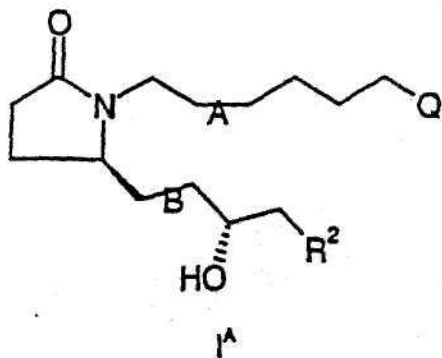
R⁴-це COR⁵ або SO₂R⁵; і

R⁵-це феніл або (C₁-C₅)алкіл.

Групою селективних агоністів EP4 рецептора формули I, яким віддається перевага, для використання в способах цього винаходу є сполуки формули I, в яких Q - це 5-тетразоліл і U - це



які утворюють сполуки, що мають формулу I^A



Сполуками в межах цієї групи, яким віддається особлива перевага, є 5S-(4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідін-2-он; 5S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідін-2-он; 5R-(3S-гідрокси-4-феніл-бут-1-еніл)-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідін-2-он; і 5S-(3R-гідрокси-4-феніл-бутил)-1-[6-(1H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідін-2-он.

Іншою групою селективних агоністів EP4 рецептора формули I, яким віддається перевага, для використання в способах цього винаходу є сполуки формули I, в яких Q - це COOH. Сполуками в межах цієї групи, яким віддається особлива перевага, є 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанова кислота; 7-{2S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанова кислота; 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3H-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанова кислота; 7-{2S-(3R-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанова кислота; і 7-[2R-(3S-гідрокси-4-феніл-бут-1-еніл)-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептанова кислота.

Переважно лікуються жінки після менопаузи і чоловіки віком від 60 років. Також віддається перевага особам, незалежно від віку, у яких спостерігається значне зменшення кісткової маси, тобто в 1,5 рази або більше від рівня кісткової маси молодій людині.

У способах цього винаходу, станами, викликаними зменшенням кісткової маси, є такі стани як, наприклад, остеопороз, дитяче ідіопатичне розрідження кістки, альвеолярне розрідження кістки, мандибулярне розрідження кістки, перелом кістки, остеотомія, розрідження кістки, пов'язане з періодонтитом, або протезне вrostання.

Способи лікування "вторинного остеопорозу" також включаються в межі способів цього винаходу. "Вторинний остеопороз" включає остеопороз, викликаний глюкокортикоїдами, остеопороз, викликаний гіпертиреозом, остеопороз, викликаний іммобілізацією, остеопороз, викликаний гепарином, і остеопороз, викликаний імунодепресією, у хребетних тварин, наприклад, ссавців (включаючи людину). Ці способи полягають у призначенні згаданим хребетним тваринам, наприклад, ссавцям, для лікування "вторинного остеопорозу" кількості селективного простагландинного агоніста EP4 рецептора, його проліків або фармацевтично прийнятної солі згаданого селективного простагландинного агоніста EP4 рецептора або згаданих проліків.

Ще один аспект даного винаходу стосується способів для підсилення приживлюваності кісткового трансплантанта, включаючи вертебральний синостоз, підсилення випрямлення трубчастих кісток, підсилення зростання кісток внаслідок лицьової реконструкції, верхньощелепної реконструкції та/чи нижньощелепної реконструкції у хребетних, наприклад, у ссавців (включаючи людину), що полягає у призначенні згаданим хребетним, наприклад, ссавцям, які перенесли лицьову реконструкцію, верхньощелепну реконструкцію чи нижньощелепну реконструкцію, кількості селективного простагландинного агоніста EP4 рецептора, його проліків або фармацевтично прийнятної солі згаданого селективного простагландинного агоніста EP4 рецептора або згаданих проліків для прискорення зростання кістки. Активні селективні простагландинні агоністи EP4 рецептора цього винаходу можна призначати для місцевого застосування на місце реконструкції кістки або для системного застосування.

Доза, якій віддається перевага, становить 0,001-100 мг/кг/день селективних агоністів EP4 рецептора, їх проліків або фармацевтично прийнятної солі згаданої сполуки або проліків. Особливо віддається перевага дозі, що становить 0,01-10 мг/кг/день селективного агоніста EP4 рецептора, його проліків або фармацевтично прийнятної солі згаданої сполуки або проліків.

Фраза "стан(и), що полягає(ють) у зниженні кісткової маси" стосується стану, коли рівень кісткової маси нижчий норми для такого віку, як визначається в стандартах Всесвітньої Організації Здоров'я "Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis (1994). Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843". До "стану(ів), що полягає(ють) у зменшенні кісткової маси" належать первинний та вторинний остеопороз, як згадано вище. Також до таких станів належать періодонтальні захворювання, альвеолярне розрідження кісток, розрідження кісток внаслідок остеостомії та дитяче ідіопатичне розрідження кісток. Фраза "стан(и), що полягає(ють) у зменшенні кісткової маси" також включає ускладнення остеопорозу, такі як викривлення хребта, зменшення зросту та протезна хірургія.

Фраза "стан(и), що полягають у зменшенні кісткової маси" також стосується хребетних, наприклад, ссавців, які мають значно вищу за середню вірогідність розвитку вищезгаданих захворювань, включаючи остеопороз (наприклад, жінки після менопаузи та чоловіки, віком за 50 років). Здатність збільшення кісткової маси включає прискорення зростання кістки на місці перелому, відновлювальну хірургію за допомогою кісткового трансплантанта, прискорення приживання кісткових трансплантатів, зростання кісток після лицьової реконструкції, верхньощелепної реконструкції чи нижньощелепної реконструкції, вrostання протеза,

вертебральний синостоз або випрямлення трубчастої кістки.

Способи цього винаходу також можуть застосовуватися в зв'язку з ортопедичними пристроями, такими як каркаси для з'єднання хребців, апаратні засоби для з'єднання хребців, пристрої для внутрішньої і зовнішньої фіксації кісток, гвинти і штифти.

Фахівець в даній галузі зрозуміє, що термін "кісткова маса" насправді стосується кісткової маси на одиницю площі, яка іноді (хоча не завжди вірно) означає густину мінералів у кістках.

Термін "лікування", що вживається тут означає запобіжну (наприклад, профілактичну), паліативну і лікувальну дію.

Під "фармацевтично прийнятним" мається на увазі, що носій, зв'язувальна речовина, розріджувач, наповнювач та/чи сіль повинні бути сумісними з іншими інгредієнтами композиції, а також повинні бути нешкідливими для реципієнта.

Термін "проліки" стосується сполуки, що є попередником лікарського засобу, який після застосування виділяє цей лікарський засіб *in vivo* в результаті деяких хімічних або фізіологічних процесів (наприклад, проліки при доведенні до фізіологічного рівня pH або завдяки дії фермента перетворюються на бажану форму лікарського засобу). Типові проліки при розщепленні виділяють бажану сполуку лікарського засобу.

Вираз "фармацевтично прийнятна сіль" стосується нетоксичних аніонних солей, що містять аніони, такі як (але не обмежуються до) хлорид, бромід, йодид, сульфат, бісульфат, фосфат, ацетат, малеат, фумарат, оксалат, лактат, тарtrat, цитрат, глюконат, метансульфонат і 4-толуол-сульфонат. Вираз також стосується нетоксичних катіонних солей, таких як (але не обмежуючись до) натрій, калій, кальцій, магній, амоній або протонований бензатин (N,N'-добензилетилендіамін), холін, етаноламін, діетаноламін, етилендіамін, мегламін (N-метил-глюкамін), бенетамін (N-бензилфенетиламін), піперазин або трометамін (2-аміно-2-гідроксиметил-1,3-пропандіол).

Способи цього винаходу мають результатом остеогенез завдяки зменшеному числу переломів. Даний винахід є значним внеском в дану галузь завдяки забезпеченню способів, що підвищують остеогенез, і мають результатом запобігання, затримку та/чи регресію остеопорозу та пов'язаних захворювань кісток.

Цей винахід також стосується сполук, вибраних з 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти; 5S-(4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідин-2-он); 7-{2S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти; 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти; та 5S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил)-піролідин-2-ону.

Цей винахід також особливо стосується 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти.

Цей винахід також особливо стосується 5S-(4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил-піролідин-2-ону).

Цей винахід також особливо стосується 7-{2S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти.

Цей винахід також особливо стосується 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти.

Цей винахід також особливо стосується 5S-(3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил)-1-(6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил)-піролідин-2-ону.

Інші риси і переваги стануть зрозумілими з опису та формули, які описують винахід,

Будь-який селективний агоніст EP4 рецептора може використовуватися як селективний агоніст EP4 рецептора даного винаходу. Селективні агоністи EP4 - це сполуки, які мають IC50 по відношенню до рецепторів EP1, EP2 і EP3, що, принаймні, в 10 разів більше за IC50 для підвиду EP4 рецептора. Наприклад, 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота - це селективний PGE2 агоніст EP4 рецептора з IC50 зв'язування EP4 рецептора, що дорівнює 16 nM. У всіх інших підвидах рецептора EP, включаючи підвиди рецепторів EP1, EP2 та EP3, IC50 для 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти є більше ніж 3200nM.

Сполуки Формули I можна одержати як показано в патенті США №4177346, який включений сюди шляхом посилання.

Селективні агоністи EP4 рецептора, що використовуються в способах даного винаходу, адаптовані для терапевтичного використання як агенти, що стимулюють остеогенез та збільшення кісткової маси у хребетних, наприклад, у ссавців, включаючи людину. Оскільки остеогенез тісно пов'язаний з розвитком остеопорозу та захворюваннями кісток, агоністи, що використовуються в способах даного винаходу завдяки своїй дії на кістки, запобігають, зупиняють та/чи регресують остеопороз.

Корисність селективних агоністів EP4, що використовуються у способах даного винаходу як лікарські засоби при лікуванні станів, що полягають у зменшенні кісткової маси (наприклад, остеопороз) у хребетних, наприклад, ссавців (зокрема у людей, особливо у жінок), демонструється активністю таких агоністів в загальноприйнятих аналізах, включаючи аналіз зв'язування рецептора, дослідження циклічного АМФ, дослідження *in vivo* та дослідження по зростанню кісток, які описуються нижче. Такі аналізи дозволяють порівняти активність селективних агоністів EP4 між собою та з активністю інших відомих сполук і композицій. Результати таких порівнянь є корисними для визначення рівнів дозування для хребетних, наприклад, для ссавців, включаючи людину, для лікування таких захворювань.

Дослідження *in vivo*

Активність анаболічних кісткових агентів на підсилення остеогенезу та збільшення кісткової маси можна дослідити на здорових пацюках чоловічої і жіночої статі та на пацюках, позбавлених статевих гормонів (орхідектомізовані пацюки чоловічої статі та оваріектомізовані пацюки жіночої статі).

Під час дослідження можна використовувати пацюків чоловічої та жіночої статі різного віку (як, наприклад, віком 3 місяці). Пацюкам, здоровим або кастрованим (оваріектомізованим чи орхідектомізованим), вводили підшкірно або вводили через шлунковий зонд різні дози простагландинових агоністів (1, 3, або 10 мг/кг/день)

протягом 30 днів. У кастрованих пацюків лікування починалося наступного дня після операції (для запобігання розрідження кісток) або в момент появи розрідження кісток (для відновлення кісткової маси). Протягом дослідження всі пацюки мали вільний доступ до води та сухого корму (Teklad Rodent Diet #8064, Harlan Teklad, Madison, WI), що містить 1,46% кальцію, 0,99% фосфору та 4,96 IU/g вітаміну D₃. Усім пацюкам підшкірно вводили по 10мг/кг кальцеїну за дванадцять та два дні перед усипанням. Пацюків усипали. Одержали наступні результати:

Вимірювання мінералів у стегні:

Під час аутопсії у кожного пацюка вилучали праве стегно і сканували його, застосовуючи подвійний абсорбційний рентгеноспектральний аналіз (DXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA) оснащену програмним забезпеченням "Regional High Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування - 5,08 × 1,902см, дозвіл -0,0254 × 0,0127см і швидкість сканування - 7,25мм/с. Аналізували відскановані зображення стегон і визначали ділянку кістки, вміст мінералів у кістці (BMC), і густину мінералів у кістці (BMD) усього стегна (WF), метафізи дистального стегна (DFM), тіло стегнової кістки (FS) та проксимальне стегно (PF).

Гістоморфометричний аналіз великогомілкової кістки:

Під час аутопсії вилучали праву гомілку, звільняли її від м'якушів і розрізали на три частини. Проксимальну великогомілкову кістку та тіло великогомілкової кістки поміщали в 70% етанол, зневоднювали у висококонцентрованому етанолі, обезжирювали в ацетоні, а потім занурювали в метилметакрилат (Eastman Organic Chemicals, Rochester, NY).

Фронтальні секції метафізів проксимальних великогомілкових кісток товщиною 4 і 10мкм розрізали, використовуючи мікротом Reichert-Jung Polycut S. Секції товщиною 4мкм фарбували модифікованою фарбою Masson's Trichrome, в той час як секції товщиною 10мкм залишали нефарбованими. По одній секції товщиною 4 мкм та 10мкм з кожного пацюка використовували для гістоморфометрії губчатої кістки.

Поперечні зрізи тіл великогомілкових кісток товщиною 10мкм розрізали, використовуючи мікротом Reichert-Jung Polycut S. Ці зрізи використовували для гістоморфометричного аналізу кортикальних кісток.

Гістоморфометрія губчатої кістки: Гістоморфометричну систему Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) використовували для статичних і динамічних гістоморфометричних вимірювань вторинного спонгіозу проксимальних великогомілкових метафізів між 1,2 та 3,6мм дистально у відношенні до росту пластинно-епіфізального злиття. Перші 1,2мм тибіальної метафізарної ділянки потрібно пропускали з метою обмеження вимірювання вторинних спонгіозів. Секцію товщиною 4мкм використовували для визначення індексів стосовно об'єму кістки, структури кістки та резорбції кістки, в той час як секції товщиною 10мкм використовували для визначення індексів стосовно остеогенезу та обігу мінералів у кістці.

I) Вимірювання і обчислення стосовно об'єму і структури губчатої кістки: (1) Загальна метафізарна ділянка (TV, мм²): метафізарна ділянка між 1,2 та 3,6 мм дистально у відношенні до росту пластинно-епіфізального злиття. (2) Ділянка губчатої кістки (BV, мм²): загальна ділянка трабекул в межах TV. (3) Периметр губчатої кістки (BS, мм): довжина загального периметру трабекул. (4) Об'єм губчатої кістки (BV/TV, %): $BV / TV \times 100$. (5) Розмір губчатої кістки (TBN, #/мм): $1,199 / 2 \times BS / TV$. (6) Товщина губчатої кістки (TBT, мкм): $(2000 / 1,199) \times (BV / BS)$. (7) Розділення губчатої кістки (TBS, мкм): $(2000 \times 1,199) \times (TV - BV)$.

II) Вимірювання і обчислення стосовно резорбції кістки: (1) Розмір остеокласта (OCN, #): загальний розмір остеокласта в межах загальної метафізарної ділянки. (2) Периметр остеокласта (OCP, мм): довжина периметра губчатої кістки покритої остеокластами. (3) Розмір/мм остеокласта (OCN/мм, #/мм): OCN / BS . (4) Периметр остеокласта в процентному співвідношенні (%OCP, %): $OCP / BS \times 100$.

III) Вимірювання і обчислення стосовно остеогенезу і обігу мінералів у кістці (1) Мічений периметр, що містить один кальцеїн (SLS, мм): загальна довжина трабекулярного периметра міченого однією кальцеїновою міткою. (2) Мічений периметр, що містить два кальцеїни (DLS, мм): загальна довжина трабекулярного периметра, міченого двома кальцеїновими мітками. (3) Зсередини мічена ширина (ILW, мкм): середня відстань між двома кальцеїновими мітками. (4) Периметр мінералізації в процентному співвідношенні (PMS, %): $(SLS/2 + DLS) / BS \times 100$. (5) Значення мінеральної репозиції (MAR, мкм/день): $ILW / \text{Лінійний мічений периметр}$. (6) Швидкість остеогенезу/поверхня (BFR/BS, мкм²/д./мкм): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BS$. (7) Швидкість обігу мінералів у кістці (BTR, %/y): $(SLS/2 + DLS) \times MAR / BV \times 100$.

Гістоморфометрія кортикального шару кістки: Гістоморфометричну систему Bioquant OS/2 (R&M Biometrics, Inc., Nashville, TN) використовували для статичних і динамічних гістоморфометричних вимірювань кортикального шару тіла великогомілкової кістки. Вимірювали загальну ділянку тканини, ділянку мозкової порожнини, періостальний периметр, ендокортикальний периметр, одно-мічений периметр, подвійний мічений периметр, і зсередини мічену товщину на обох періостальній і ендокортикальній поверхнях, і обчислювали ділянку губчатої кістки (ділянка загальної тканини - ділянка мозкової порожнини), ділянку губчатої кістки в процентному співвідношенні (кортикальна ділянка / ділянку загальної тканини × 100), ділянку мозку в процентному співвідношенні (ділянка мозкової порожнини / ділянку загальної тканини × 100), періостальний і ендокортикальний процент міченого периметра $[(\text{одно-мічений периметр}/2 + \text{подвійний мічений периметр}) / \text{загальний периметр} \times 100]$, значення мінеральної репозиції (зсередини мічена ширина/інтервали), та показник остеогенезу [значення мінеральної репозиції × $[(\text{одно-мічений периметр}/2 + \text{подвійний мічений периметр}) / \text{загальний периметр}]$.

Статистичні дані

Статистичні дані обчислювали, використовуючи пакети StatView 4.0 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Аналіз на варіантність (ANOVA), що проводиться за допомогою PLSD Фішера (Stat View, Abacus Concepts Inc., 1918 Bonita Ave, Berkeley, CA 94704-1014) використовували і для порівняння розбіжностей між групами.

Визначення підвищення рівня цАМФ у клітинних лініях 293-S, що стабільно понадекспресують рекомбінантні людські EP₄ рецептори.

кДНК, що представляють повні відкриті рамки зчитування для людських EP₄ рецепторів, одержали за

допомогою зворотної ПЛР при використанні олігонуклеотидних праймерів, що базуються на опублікованих послідовностях (1) і РНК від первинних клітин людських легень (EP4), у якості шаблонів. кДНК клонуються в численні області клонування pcDNAS (Invitrogen Corporation, 3985B Sorrento Valley Blvd., San Diego, CA 92121) і використовуються для трансфекції людських клітин 293-S ембріональної нирки шляхом попередньої пресіпітації фосфату кальцію. G418-стійку колонію розмножували та тестували на специфічне $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ зв'язування. Трансфектанти, що демонструють високі рівні специфічного $[^3\text{H}]\text{PGE}_2$ зв'язування далі характеризувалися шляхом аналізу Скетчарда для визначення B_{max} і K_d для PGEs. Лінії, вибрані для пошуку сполуки, мають приблизно 256400 рецепторів на клітину і $K_d = 2,9\text{нМ}$ для PGE_2 (EP₂). Постійне експресування рецептора в парентальних клітинах 293-S є незначним. Клітини залишають в RPMI з додаванням сироватки плода корови (10% кінцевої юлькості) та G418 (700 мкМ/мл кінцевої кількості).

Відповіді цАМФ в лініях 293-S/EP4 визначали шляхом відділення клітин з колби з культурою в 1 мл Ca^{++} і Mg^{++} дефіцитний по PBS буфер за допомогою ретельного подрібнення, додаючи RPMI без вмісту сироватки до кінцевої концентрації 1×10^6 клітин/мл, і додаючи 3-ізобутил-1-метилксантин (IBMX) до кінцевої концентрації 1мМ. Один міліметр клітинної суспензії негайно аліквотували у 2мл мікроцентрифугу з підвищеним ротором та інкубувати протягом 10 хвилин, регенерували при 37°C, 5% CO_2 , відносній вологості 95%. Сполука, яку потрібно протестувати, додавали до клітин у співвідношенні 1:100, щоб кінцева концентрація ДМСО або етанолу становила 1%. Після додавання сполуки негайно закрили трубки, перемішували, перевертаючи двічі, та інкубували при 37°C хвилин і негайно охолоджували на льоду протягом 5 хвилин. Клітковий осад осідав після центрифугування при $1000 \times g$ протягом 5 хвилин, і очищені лізати перемішували у чисті трубки. Концентрацію цАМФ визначали за допомогою комерційно доступного комплексу для радіоімунаналізу цАМФ (NEK-033, DuPont/NEN Research Products, 549 Albany St., Boston, MA 02118), після чого розводили очищені лізати у співвідношенні 1:10 в буфері для радіоімунаналізу цАМФ (що входить до комплексу). Як правило, клітини обробляли 6-8 концентраціями сполуки, яку потрібно тестувати, в логарифмічних розведеннях. Обчислення EC_{50} здійснювали на калькуляторі з використанням аналізу лінійної регресії на лінійній ділянці кривих реакції на дозу.

Посилання:

1. Regan, J.W. Bailey, T.J. Pepperl, D.J. Pierce, K.L. Bogardus, A.M. Donello, J.E. Fairbairn, C.E. Kedzie, K.M. Woodward, D.F. and Gil, D.W. 1994 Cloning of a Novel Human Prostaglandin Receptor with Characteristics of the Pharmacologically Defined EP₂ Subtype. *MoI. Pharmacology* 46:213-220.

Дслідження щодо зв'язування простагландинових E_2 рецепторів

Приготування мембрани: Всі операції проводили при 4°C. Трансфектовані клітини, що експресують простагландинові E_2 рецептори типу 1 (EP₁, рецептори типу 2 (EP₂), типу 3 (EP₃) або типу 4 (EP₄), збирали і суспендували у співвідношенні 2 млн. клітин на мл в буфері А [50 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 10 мМ MgCl_2 , 1мМ EDTA, 1мМ пефаблокового пептида, (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN), 10мкМ фосфорамідонового пептида, (Sigma, St. Louis, MO), 1мкМ пепстатину А пептида, (Sigma, St. Louis, MO), 10мкМ еластатинального пептида, (Sigma, St. Louis, MO), 100мкМ протибольового пептида, (Sigma, St. Louis, MO)]. Клітини руйнували шляхом ультразвукової обробки сонатором Брансона (Model #250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT) двома вибухами по 15 секунд. Нелізовані клітини і залишоквідділяли центрифугуванням при $100 \times g$ протягом 10хв. Потім мембрани збирали шляхом центрифугування при $45,000 \times g$ протягом хвилин. Мембрани, що осіли, ресуспендували до рівня 3-10 мг протеїну на мл буфера А, концентрацію протеїну визначали методом Бредфорда [Bradford, M., *Anal. Biochem.*, 72,248 (1976)]. Ресуспендовані мембрани зберігали у замороженому вигляді при -80°C до використання.

Дослідження зв'язування: Заморожені мембрани, приготовлені як вказано вище, розморожували і розбавляли до 0,5мг/мл (для пацюкового EP₂) або 0,3мг/мл (для пацюкового EP₄) у вищезгаданому буфері А. Заморожені мембрани, приготовлені як вказано вище, розморожували і розбавляли до 0,5мг/мл (для пацюкового EP₂) або 0,3мг/мл (для пацюкового EP₄) у вищезгаданому буфері А. Один об'єм мембран з'єднували з 0,05 об'єму тестованої сполуки або буферу і одним об'ємом 3нМ Н-простагландину E_2 (#TRK 431, Amersham, Arlington Heights, IL) в буфері А. Суміш (205 мкл загального об'єму) інкубували протягом 1 години при 25°C. Потім мембрани, регенерували шляхом фільтрування через скловолоконні фільтри типу GF/C (#1205-401, Wallace, Gaithersburg, MD) з використанням збирального пристрою Томтека (Model Mach 11/96, Tomtec, Orange, CT). Мембрани із зв'язаним ^3H -простагландином E_2 відловлюються фільтром, в той час як буфер і незв'язаний ^3H -простагландин E_2 проходять через фільтр у відході. Потім кожен зразок тричі промивали 3мл 50 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ EDTA. Фільтри просушували у мікрохвильовий печі. Для визначення кількості зв'язування ^3H -простагландину E_2 з мембранами, просушені фільтри поміщали в пластмасові мішки з рідиною для сцинтиляції і обчислювали на Betaplate зчитувачі LKB 1205 (Wallace, Gaithersburg, MD). IC_{50} визначали з концентрації тестованої сполуки, необхідної для витіснення 50% специфічно зв'язаного ^3H -простагландину E_2 .

293S клітини, що експресують пацюкові рецептори EP₂ і EP₄ простатандина E_2 , генерували способами, відомими фахівцям у даній галузі. Як правило, праймери ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), що стосуються кінців 5' та 3' опублікованого рецептора повної довжини готували вищерозкритими способами і використовували в реакціях RT-ПЛР з використанням загальної РНК з нирки пацюка для обох EP₂ та EP₄ рецепторів.

Повну кодуючу послідовність EP₂ рецептора пацюка готували як розкрито в Nemoto et al., *Prostaglandins*, 1997, 54,713-725. Повну кодуючу послідовність EP₄ рецептора пацюка готували як розкрито в Sando et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994,200,1329-1333. Такі рецептори повної довжини використовували для приготування 293S клітин, що експресують EP₂ та EP₄ рецептори.

Повну кодуючу послідовність для EP₁ рецептора готували як розкрито в Funk et al., *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268,26767-26772. Повну кодуючу послідовність для EP₂ рецептора готували як розкрито в Regan et al., *Molecular Pharmacology*, 1994,46,213-220. Повну кодуючу послідовність для EP₃ рецептора готували як розкрито в Regan et al., *British Journal of Pharmacology*, 1994, 112,377-385. Повну кодуючу

послідовність для EP4 рецептора готували як розкрито в Bastien, Journal of Biological Chemistry, 1994, 269,11873-11877. Такі рецептори повної довжини використовували для приготування клітин 293S, що експресують EP₁, EP₂, EP₃ та EP₄ рецептори.

Клітини 293s, що експресують людські EP₁, EP₂, EP₃ або EP₄ простагландинові E₂ рецептори, генерували способами, добре відомими фахівцям у даній галузі. Як правило, праймери ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція), що стосуються кінців 5' та 3' опублікованого рецептора повної довжини готували вищевикористаними способами і використовували в реакціях RT-ПЛР з використанням загальної РНК з нирки людини (для EP₁), легень людини (для EP₂), легень людини (для EP₃) або лімфоцитів людини (для EP₄). Продукти ПЛР клонували за допомогою методу ТА виступаючих кінців у плазміді pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) і ідентичність клонованого рецептора підтверджували розшифровкою послідовності ДНК.

293S клітини (Mayo, Dept. of Biochemistry, Northwestern Univ.) трансфектуються клонованим рецептором у плазміді pcDNA3 шляхом електропорації. Стабільні клітинні лінії, що експресують рецептори, встановлюються наступною селекцією трансфектованих клітин з G418.

Лінії клонованих клітин, що експресують максимальну кількість рецепторів, вибирали, дотримуючись аналізу зв'язування ³H-PGE₂ з використанням немічених PGE₂ в якості конкурента.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРОСТАННЯ КІСТКИ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВІВ НА ЗРОСТАННЯ КІСТКИ ПІСЛЯ СИСТЕМНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Техніка перелому: Пацюків Sprage-Dawley віком 3 місяці анастезували кетаміном. На проксимальній частині правої гомілки або стегна робили розріз довжиною 1 см. Нижче наводиться хірургічна техніка стосовно гомілки. Розріз продовжували до кістки і просвердлювали отвір діаметром 1 мм на 4 мм проксимально до дистальної сторони горбкуватості великогомілкової кістки і на 2 мм медіально до переднього виступу. Інтрамедулярний внутрішньокістковий остеосинтез здійснювали стальним нефарбованим штифтом діаметром 0,8 мм (максимальне навантаження 36,3 N, максимальна жорсткість 61,8 N/мм, тестували за тих же умов, що й кістки). Кістково-мозковий канал не розсвердлювали. Стандартизований закритий перелом робили на 2 мм вище місця сполучення великогомілкової та малоомілкової кісток шляхом триточкового згинання з використанням спеціальних регульованих щипців з тупими затискачами. Для мінімізації пошкодження м'якої тканини, старалися не змістити перелом. Шкіру зшивали елементарною ниткою найлону. Операцію проводили при стерильних умовах. Рентгенівські знімки всіх преломів робили негайно після внутрішньокісткового остеосинтезу, і вилучали пацюків з переломами поза межами спеціальної діафізарної ділянки або із зміщеними штифтами. Тварин, що залишилися, довільно розділяли на наступні фупи з 10-12 тваринами у кожній підгрупі на період для тестування зростання кістки на місці перелому. Перша група одержувала щоденно гіпераліментацію наповнювача (вода: 100% етанол = 95:5) при 1 мл/пацюк, в той час як інші одержували гіпераліментацію 0,01-100 мг/кг/день тестованої сполуки (1 мл/пацюк) на 10, 20, 40 і 80 день.

На 10, 20, 40 і 80 день, 10-12 пацюків з кожної групи анастезували кетаміном і умертвляли шляхом знекровлювання. Великоомілкову і малоомілкову кістки вилучали при розтині і видаляли всю м'яку тканину. Кістки 5-6 пацюків з кожної групи зберігали в 70% етанолі для гістологічного аналізу, а кістки інших 5-6 пацюків з кожної групи зберігали в буферному розчині Рінгера (+4°C, pH 7.4) для рентгенівських знімків та біомеханічних тестувань, що проводилися.

Гістологічний аналіз: Способи гістологічного аналізу пошкодженої кістки (перелом) були раніше опубліковані Моускшдом і Беком (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Коротко, місце перелому розпилювали на 8 мм до кожного боку лінії перелому, поміщеного некальцінованим в метиметакрилат, і розрізали фронтальні ділянки на мікромомі Reichert-Jung Polycut товщиною 8 мкм. Masson-Trichrome забарвлені середньо-фронтальні ділянки (включаючи великогомілкову кістку та малоомілкову кістку) використовували для відображення реакції клітин і тканини на зростання кістки з та без лікування. Ділянки, забарвлені червоною фарбою Sirius, використовували для відображення характеристики структури кісткової мозолі, а також для диференціації перетинчастої ретикулофіброзної кістки і пластинчастої кістки на місці перелому. Проводили наступні вимірювання: (1) щілина перелому - вимірюється як найкоротша відстань між кінцями кортикального шару кістки та в переломі, (2) довжина і діаметр кісткової мозолі, (3) загальна площа кісткової мозолі в об'ємі кістки, (4) кісткова тканина на ділянку тканини в межах ділянки кісткової мозолі, (5) волокниста з'єднувальна тканина в кістковій мозолі і (6) хрящова ділянка в кістковій мозолі.

Біомеханічний аналіз: Способи біомеханічного аналізу були раніше опубліковані Беком і Андреассеном (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. Calcif Tissue Int 45:292-297, 1989). Коротко, рентгенівські знімки всіх переломів робили перед біомеханічним аналізом. Механічні властивості зростання кістки на місці перелому аналізували деструктивною процедурою згинання в трьох або чотирьох точках. Визначали максимальне навантаження, жорсткість, енергію при максимальному навантаженні, зміщення при максимальному навантаженні і максимальне зусилля.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВІВ НА ЗРОСТАННЯ КІСТКИ ПІСЛЯ МІСЦЕВОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Техніка перелому: У дослідженні використовували гончих собак чоловічої та жіночої статі віком біля двох років після анестезії. Поперечні радіальні переломи виконували повільним тривалим згинанням у трьох точках як описав Lenehan et al. (Lenehan, T. M.; Baliigand, M.; Nunamaker, DM; Wood, F.E.: Effects of EHDP on Fracture Healing in Dogs. J Orthop Res 3:499-507; 1985). Провід втягували через місце перелому з метою гарантії повного анатомічного порушення кістки. Після чого наносили простагландинові агоністи на місце перелому шляхом застосування таблеток повільного вивільнення або використання сполук у прийнятному вигляді, як, наприклад, пасто-гелевий розчин або суспензія на 10, 15 або 20 тижнів.

Гістологічний аналіз: Способи гістологічного аналізу пошкодженої кістки (перелом) були раніше опубліковані Петером et al. (Peter, CP.; Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M. T.; Seedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. J. Orthop. Res. 14:74-70, 1996) і Моускшдом і Беком (The Effects of Growth Hormone on Fracture Healing in Rats: A Histological Description. Bone, 14:19-27, 1993). Коротко, після умертвлення, місце перелому розпилювали на 3 см до кожного боку лінії

перелому, поміщеного некальцінованим в метиметакрилат, і розрізали фронтальні секції на мікротомі Reichert-Jung Polycut товщиною 8мкм фронтальних секцій. Masson-Trichrome забарвлені середньо-фронтальні ділянки (включаючи великоомілковою кістку та малоомілковою кістку) використовували для відображення реакції клітин і тканини на зростання кістки з та без лікування. Ділянки, забарвлені червоною фарбою Sirius, використовували для відображення характеристики структури кісткової мозолі, а також для диференціації перетинчастої ретикулофіброзної кістки і пластинчастої кістки на місці перелому. Проводили наступні вимірювання: (1) щілина перелому - вимірюється як найкоротша відстань між кінцями кортикального шару кістки та ав переломі, (2) довжина і діаметр кісткової мозолі, (3) загальна площа кісткової мозолі в об'ємі кістки, (4) кісткова тканина на ділянку тканини в межах ділянки кісткової мозолі, (5) волокниста з'єднувальна тканина в кістковій мозолі і (6) хрящова ділянка в кістковій мозолі.

Біомеханічний аналіз: Способи біомеханічного аналізу були раніше опубліковані Беком і Андреасеном (The Effects of Aging on Fracture Healing in Rats. *Calcif Tissue Int* 45:292-297,1989) і Петером et al. (Peter, C.P.;Cook, W.O.; Nunamaker, D.M.; Provost, M. T.; Seedor, J.G.; Rodan, G.A. Effects of Alendronate On Fracture Healing And Bone Remodeling In Dogs. *J. Orthop. Res.* 14:74-70,1996). Коротко, рентгенівські знімки всіх переломів робили перед біомеханічним аналізом. Механічні властивості зростання кістки на місці перелому аналізували деструктивною процедурою згинання в трьох або чотирьох точках. Визначали максимальне навантаження, жорсткість, енергію при максимальному навантаженні, зміщення при максимальному навантаженні і максимальне зусилля.

Призначали селективні агоністи EP4 рецептора згідно способів даного винаходу можна будь-яким способом систематично та/чи місцево (наприклад, на місце перелому кістки, остеотомії або хірургічної ортопедії). Ці способи включають оральний, парентеральний, інтрадуоденальний способи застосування тощо. Як правило, сполуки даного винаходу застосовують орально, але можливе і парентеральне застосування (наприклад, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, трансдермальне, підшкірне, ректальне або інтрамедулярне), наприклад, коли оральне застосування неприйнятне для пацієнта або коли пацієнт не може ковтнути лікарський засіб.

Способи цього винаходу використовуються для лікування і покращення зростання кістки на місці перелому та остеотомії при місцевому застосуванні (наприклад, на місцях переломів кістки остеотомії) селективних агоністів EP4 рецептора. Селективні агоністи EP4 рецептора цього винаходу застосовуються на місцях перелому кістки або остеотомії, наприклад, або шляхом ін'єкції сполуки в прийнятному розчиннику (наприклад, маслянистий розчинник такий як арахісова олія) на хрящову пухлину, або у випадках відкритого перелому, шляхом місцевого застосування сполуки у прийнятному наповнювачі, носії або розріджувачі, таких як кістковий віск, демінералізований кістковий порошок, полімерний кістковий цемент, кісткові ущільнювачі, тощо. З іншого боку, локально можна застосовувати шляхом нанесення розчину або дисперсії сполуки в прийнятному носії або розчиннику на поверхню або їх введенні в твердий або напівтвердий імплантат, що як правило, використовується в хірургічній ортопедії, як, наприклад, дакронова сітка, гель-піна і кістка Kiel, або протези.

У будь-якому випадку кількість і тривалість застосування сполук, звичайно, буде залежати від об'єкта, що лікується, тяжкості хвороби, способу застосування та оцінки лікаря щодо стану хворого. Таким чином, через індивідуальність організму кожного пацієнта, зазначені тут дози є загальними, і лікар повинен титрувати дози лікарського засобу для досягнення бажаного ефекту при лікуванні (наприклад, збільшення кісткової маси), яку, на думку лікаря, є найбільш прийнятним для пацієнта. При виборі способу лікування лікар повинен брати до уваги ряд факторів, таких як початковий рівень кісткової маси, вік хворого, попередні захворювання, а також наявність інших захворювань (наприклад, серцевосудинні захворювання).

Як правило, використовують таку кількість селективного агоніста EP4 рецептора, що є достатньою для збільшення кісткової маси до рівня, вищого за поріг перелому кістки (це описується в the World Health Organization Study, що вже цитувалося тут).

Сполуки селективного агоніста EP4 рецептора, що використовуються в способах цього винаходу, як правило, призначаються у вигляді фармацевтичних композицій, що містять, принаймні, одну сполуку цього винаходу та фармацевтично прийнятний наповнювач або розчинник. Таким чином, селективний агоніст EP4 рецептора можна призначати індивідуально прийнятними дозами для орального, інтраназального, парентерального, ректального або трансдермального застосування.

Для орального застосування фармацевтичної композиції можна надати вигляду розчину, суспензії, таблеток; пілюль, капсул, порошку тощо. Таблетки, що містять різні наповнювачі, такі як цитрат натрію, карбонат кальцію і фосфат кальцію, виготовляють з додаванням різних дизінтегрантів, таких як крохмаль, переважно картопляний та з тапіоки, і визначені комплексні силікати, разом із зв'язувальними агентами, такими як полівінілпіролідон, сахароза, желатин і акація. Крім того, для приготування таблеток є корисними змащувальні агенти, такі як стеарат магнію, лауриловий сульфат натрію, і тальк. Подібні тверді композиції також застосовуються як наповнювачі у м'яких і твердих желатинових капсулах; матеріали, яким віддається перевага в цьому випадку, є також лактоза або молочний цукор, а також поліетиленгліколі з високою молекулярною масою. Коли для орального застосування необхідні водні суспензії та/чи елексири, композиції цього винаходу можна комбінувати з різними підсолоджувачами, ароматизаторами, фарбниками, емульгуючими агентами та/чи суспендуючими агентами, а також з такими розріджувачами, як вода, етанол, пропіленгліколь, гліцерин та різними їх комбінаціями.

З метою парентерального застосування, розчини можна застосовувати в кунжутовій чи арахісовій олії або у водному пропіленгліколі, а також у стерильних водних розчинах прийнятних розчинних у воді солей. Такі водні розчини можна буферувати, за необхідності, і рідкі розчинники потрібно спершу ізотонувати прийнятною сіллю або глюкозою. Такі водні розчини є особливо прийнятними для внутрішньовенних, внутрішньом'язових, підшкірних та інтраперитонеальних ін'єкцій. В такому випадку, стерильне водне середовище можна легко одержати стандартними способами, відомими фахівцеві в даній галузі.

Для трансдермального застосування (наприклад, місцевого), готуються розчинні стерильні водні або частково водні розчини (як правило, з концентрацією 0,1-5%), подібні до вищезазначених розчинів для

парентерального застосування.

Способи приготування різних фармацевтичних композицій з прийнятною кількістю активного інгредієнта є відомими або зрозумілими з опису для фахівця в даній галузі. Приклади способів приготування фармацевтичних композицій дивіться в Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19th Edition (1995).

Протокол дослідження

Метою даного дослідження є визначення здатності відновлення кісткової маси оваріектомізованих пацюків за допомогою селективних агоністів EP4 рецептора, зокрема 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти.

Пацюків чоловічої статі Sprague-Dawley оваріектомізували (OVX) у віці 3,5 місяці. Через десять місяців після оваріектомізації, пацюкам підшкірно вводили наповнювач або 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанову кислоту (30мг/кг/день) протягом 28 днів. Пацюків розтинали. Під час аутопсії вилучали у кожного пацюка праве стегно і сканували його, застосовуючи подвійний абсорбційний рентгеноспектральний аналіз DEXA, QDR 1000/W, Hologic Inc., Waltham, MA), оснащений програмним забезпеченням "Regional High Resolution Scan" (Hologic Inc., Waltham, MA). Розмір поля сканування - 5,08 × 1,902см, дозвіл - 0,0254 × 0,0127см і швидкість сканування - 7,25мм/с. Аналізували віджкановані зображення стегон. Вміст мінералів у кістці (BMC), густину мінералів у кістці (BMD) усього стегна (WF), метафізи дистального стегна (DFM) і тіло стегнової кістки збільшилося на 20%, і BMD тіла стегнової кістки збільшилося на 18%. У пацюків, яких обробляли 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептановою кислотою, не спостерігалось побічних ефектів типу PGE2.

Результати дослідження і обговорення

Порівняно з OVX пацюками, яких обробляли наповнювачем, у OVX пацюків, яких обробляли 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептановою кислотою, загальний BMC стегна збільшився на 17%, загальний BMD стегна збільшився на 13%, BMC дистального стегна збільшився на 8%, BMD дистального стегна збільшився на 8%, BMC тіла стегнової кістки збільшився на 20%, і BMD тіла стегнової кістки збільшився на 18%. У пацюків, яких обробляли 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептановою кислотою, не спостерігалось побічних ефектів типу PGE2.

Ці дані показують, що 7-{2-(3-гідрокси-4-феніл-бутил)-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота, селективний PGE2 агоніст EP4 рецептора, стимулює остеогенез і відновлення кісток у остеопорозних OVX пацюків.

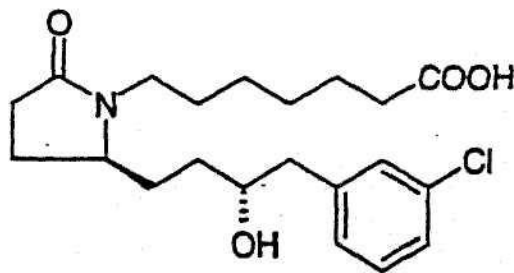
Загальні експериметри

Спектри ЯМР були записані на спектрометрі Varian Unity 400 (Varian Co., Palo Alto, California) при майже 23°C при 400МГц на протонних ядрах. Хімічні зрушення виражали в частинах на мільйон. Максимальні точки позначили наступним чином: с., синглет; д., дублет, т., триплет; к., квартет; м., мультиплет; ш.с.=широкий синглет. Масспектр хімічної іонізації при атмосферному тиску (APCI) одержали на спектрометрі Fisons Platform II. При описуванні інтенсивності іонів, що містять хлорин або бромін, відслідковували очікуване співвідношення інтенсивності (приблизно 3:1 для іонів, що містять ³⁵Cl/³⁷Cl) та 1:1 для ⁷⁹Br/⁸¹Br) і надавали дані стосовно інтенсивності лише нижчої маси.

Хроматографію середнього тиску проводили з використанням очисної системи Biotage (Biotage, Dyax Corporation, Charlottesville, Virginia) над азотним тиском. Флеш-хроматографію проводили або на сілікагелі Baker (40 m) (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.) або на сілікагелі 60 (EM Sciences, Gibbstown, NJ.) в скляній колонці під низьким азотним тиском. Радіальну хроматографію проводили з використанням хроматотрона (модель 7924T, Harrison Research). Препаративну хроматографію проводили з використанням сілікагелю GF Anatech Uniplates (20x20 cm) (Analtech, Inc. Newark, DE). Диметилформамід (ДМФ), тетрагідрофуран (ТГФ) і дишлорметан (CH₂Cl₂), що використовувалися як розчинники реакції були безводними, і надавалися компанією Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin). Термін "концентрований" стосується виділення розчинника при тиску для аспірації води на ротормному випарнику. Аббревіатура "год." означає "години". Термін "ТБАФ" стосується тетрабутиламонієвого фториду. Термін "ДМАП" стосується диметиламінопіридину. Терміни "дишлорметан" і "метиленовий хлорид" є синонімами і використовуються по чергово в описі, а також в Прикладах Приготування.

Приклад 1

7-{2S-[4-(3-Хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота



Стадія А: Етиловий естер 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. До розчину диметилового естеру [3-(3-хлор-феніл)-2-оксо-пропіл]-фосфонової кислоти (2,66г, 9,63ммоль) в ТГФ (35мл) при 0°C додавали порціями NaH (60% ваги в маслі, 426мг, 10,7ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 40 хвилин. Суміш охолоджували до 0°C і додавали розчин етилового естеру 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (з розрахунку 10,6ммоль,

одержаного способом, описаним в Приготуванні 7, але з використанням відмінних кількостей реагентів) в ТГФ, і реакцію перемішували протягом 18 год. Додавали АсОН і суміш розбавляли EtOAc. Органічний розчин промивали послідовно насиченим розчином NaHCO₃ (2х), водою (1х), і соляним розчином (1х). Органічний розчин просували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. Залишок очищали за допомогою хроматографії середнього тиску, використовуючи в якості елюанта 15% ацетон в толуолі для одержання етилового естеру 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (2,26г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,27-7,15 (м., 3H), 7,08 (м., 1H), 6,66 (дд., 1H), 6,20 (д., 1H), 4,17 (м., 1H), 4,11 (к., 2H), 3,82 (с., 2H), 3,55 (м., 1H), 2,72 (м., 1H), 2,46-2,23 (м., 5H), 1,79 (м., 1H), 1,58 (м., 2H), 1,47-1,20 (м., 9H); МС 420,2 (M+1), 418,2 (M-1).

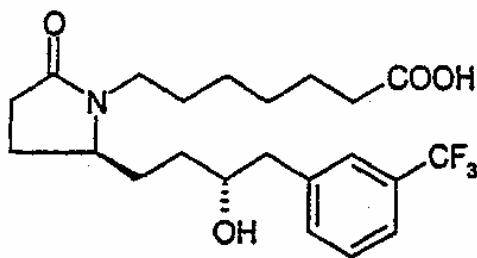
Стадія В: Етиловий естер 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3S-гідрокси-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. До розчину етилового естеру 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (2,1г, 5,0ммоль) в безводному CH₂Cl₂ (200мл) додавали (R)-2-метил-CBS-оксазаборолідин (1М в толуолі, 5мл, 5ммоль) і розчин охолоджували до -45°C. Реакцію перемішували протягом 20 хвилин і додавали катехолборан (1М в ТГФ, 15мл, 15ммоль). Суміш перемішували протягом 18 год. при -45°C. Додавали водний HCl (1N, 100мл) і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 год. Кислотний водний шар відокремлювали і органічний розчин промивали льодяним 1 N NaOH (2х), а потім соляним розчином (1х). Органічний розчин просували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 EtOAc:гексани до 80% EtOAc в гексанах) одержали етиловий естер 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3S-гідрокси-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (800 мг), як суміш у приблизному співвідношенні 6:1 3S:3R спиртових діастереомерів при ¹H-ЯМР. ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,23-7,17 (м., 3H), 7,06 (м., 1H), 5,67 (дд., 1H), 5,46 (дд., 1H), 4,37 (м., 1H), 4,08 (к., 2H), 4,00 (м., 1H), 3,44 (м., 1H), 2,80 (м., 2H), 2,67 (м., 1H), 2,41-2,12 (м., 5H), 1,70-1,20 (м., 13H); МС 422,3 (M+1).

Стадія С: Етиловий естер 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. До розчину етилового естеру 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3S-гідрокси-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (800мг, 1,90ммоль) в EtOH (50мл) додавали 10% паладію на вуглєці (80мг). Суміш гідрували на шейкері Parr при 45 psi протягом 4,5 год. Каталізатор виділяли шляхом фільтрування через Celite® з додаванням EtOH. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до 4:1 EtOAc:гексани) одержали етиловий естер 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (625 мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,27-7,21 (м., 3H), 7,09 (м., 1H), 4,10 (м., 2H), 3,84 (м., 1H), 3,61 (м., 2H), 2,90 (м., 1H), 2,78 (дд., 1H), 2,68 (м., 1H), 2,47-2,25 (м., 4H), 2,12 (м., 1H), 1,92-1,22 (м., 17H); МС 424,3 (M+1).

Стадія D: 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота. До розчину етилового естеру 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (595мг, 1,40ммоль) в EtOH (25мл) додавали 2N NaOH (6мл). Суміш перемішували протягом 24 год. при кімнатній температурі і концентрували у вакуумі до приблизно 3/4 вихідного об'єму. Водний 1 N HCl додавали для одержання рівня pH 2. Водний розчин промивали метиленхлоридом (3х). Комбіновані органічні шари промивали водою, а потім соляним розчином. Органічний розчин просували (MgSO₄), фільтрували і концентрували для одержання сполуки, зазначеної в заголовку Прикладу 1 (500мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,26-7,18 (м., 3H), 7,08 (м., 1H), 3,84 (м., 1H), 3,58 (м., 2H), 2,90 (м., 1H), 2,77 (дд., 1H), 2,68 (м., 1H), 2,43-2,28 (м., 4H), 2,10 (м., 1H), 1,78 (м., 1H), 1,66-1,22 (м., 13H); МС 396,2 (M+1), 394,2 (M-1).

Приклад 2

7-{2S-[3R-Гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота



Стадія А: Етиловий естер 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія А, аніон, одержаний з диметилового естеру [2-оксо-3-(3-трифторметил-феніл)-пропіл]-фосфонової кислоти (4,16г, 13,40ммоль) та NaH (60% в маслі, 590мг, 14,7ммоль) піддавали реакції з етиловим естером 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (з розрахунку 14,74ммоль) протягом 24 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (градієнт розчинника 20% EtOAc в гексанах до EtOAc) одержали етиловий естер 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (4,29г).

¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,52 (д., 1H), 7,44 (м., 2H), 7,37 (д., 1H), 6,67 (дд., 1H), 6,22 (д., 1H), 4,80 (м., 1H), 4,08 (к., 2H), 3,90 (с., 2H), 3,54 (м., 1H), 2,70 (м., 1H), 2,37 (м., 2H), 2,24 (м., 3H), 1,78 (м., 1H), 1,56 (м., 2H), 1,44-1,20 (м., 9H); МС 454,2 (M+1), 452,2 (M-1).

Стадія В: Етиловий естер 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. До розчину етилового естеру 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (1,5г, 3,31ммоль) та (R)-2-метил-CBS-оксазаборолідину (1М в толуолі, 0,5мл, 0,5ммоль) в CH₂Cl₂ (100мл) при -45°C додавали краплями катехолборан (1М в ТГФ, 9,9мл, 9,9ммоль). Розчин перемішували протягом 24 год. при -45°C і додавали 1 N HCl. Суміш перемішували протягом 1 год. при кімнатній температурі і відділяли шари. Водний розчин промивали CH₂Cl₂ (2х) і комбіновані органічні шари промивали послідовно льодяним 0,5N NaOH та соляним розчином (двічі).

Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (50% EtOAc в гексанах до 60% EtOAc в гексанах до 80% EtOAc в гексанах до EtOAc до 5% MeOH в CH_2Cl_2) одержали етиловий естер 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти (1,23г) як суміш у приблизному співвідношенні 5,5:1 3S:3R спиртових діастереомерів при аналізі HPLC. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,51-7,35 (м., 4H), 5,72 (д.д., 1 H), 5,50 (д.д., 1 H), 4,44 (м., 1H), 4,09 (к., 2H), 4,01 (м., 1H), 3,44 (м., 1H), 2,90 (д., 2H), 2,71 (м., 1H), 2,37-2,12 (м., 5H), 1,70-1,21 (м., 13H); MS 456,3 (M+1), 454,3 (M-1).

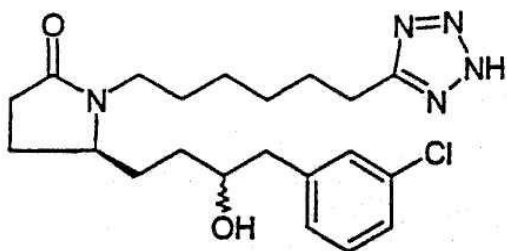
Стадія С: Етиловий естер 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія С, розчин етилового естеру 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти (1,18г, 2,59ммоль) в EtOH (50мл) гідрували в присутності 10% паладію на вугліці (120мг) при 40-45 psi на шейкері Parr протягом 24 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (50% EtOAc в гексанах до EtOAc до 1%, MeOH в CH_2Cl_2 до 3% MeOH в CH_2Cl_2 до 5% MeOH в CH_2Cl_2 до 10% MeOH в CH_2Cl_2) одержали етиловий естер 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти (1,08г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,51-7,39 (м., 4H), 4,09 (к., 2H), 3,86 (м., 1H), 3,60 (м., 2H), 2,89 (м., 2H), 2,76 (м., 1H), 2,33 (м., 4H), 2,11 (м., 1H), 1,80 (м., 1H), 1,68-1,21 (м., 16H).

Стадія D: Етиловий естер 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія D, етиловий естер 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти (1,93г, 4,22ммоль) гідролізували 6N NaOH (26 мл) в EtOH (52 мл) протягом 24 год. В результаті хроматографією середнього тиску (EtOAc до 1% MeOH в CH_2Cl_2 до 3% MeOH в CH_2Cl_2 до 5% MeOH в CH_2Cl_2 до 10% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанову кислоту (1,66 г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,51-7,39 (м., 4H), 3,88 (м., 1H), 3,58 (м., 2H), 2,84 (м., 3H), 2,34 (м., 4H), 2,10 (м., 1H), 1,80 (м., 1H), 1,67-1,26 (м., 13H); MS 430,4 (M+1).

Стадія E: Натрієва сіль 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти. До розчину 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептанової кислоти (1,66г, 3,87ммоль) в EtOH (16мл) додавали NaHCO_3 (325мг, 3,87ммоль) у воді (мл). Суміш перемішували протягом 5 год. і концентрували у вакуумі. Залишок азеотропували CH_2Cl_2 (3x) для одержання натрієвої солі сполуки, зазначеної у заголовку Прикладу 2 (1,698г.). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,48 (м., 4H), 3,80 (м., 1H), 3,69 (м., 1H), 3,52 (м., 1H), 2,94 (м., 1H), 2,81 (м., 2H), 2,32 (м., 2H), 2,13 (м., 3H), 1,81 (м., 1H), 1,69-1,26 (м., 13H); MS 430,3 (M-Na+1), 428,2 (M-Na-1).

Приклад 3

5S-[4-(3-Хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он



Стадія A: 7-{2R-[4-(3-Хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 2, Стадія A, аніон, одержаний з диметилового естеру [3-(3-хлор-феніл)-2-оксо-пропіл]-фосфонової кислоти (3,35г, 12,12ммоль) та NaH, (60% в маслі, 533мг, 13,3ммоль) піддавали реакції з 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрилом (з розрахунку 13,3ммоль) протягом 18год. В результаті хроматографією середнього тиску (20% EtOAc в гексанах до 80% EtOAc в гексанах) одержали 7-{2R-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл (1,52г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,24 (м., 2H), 7,17 (с., 1H), 7,06 (м., 1H), 6,64 (д.д., 1H), 6,20 (д., 1H), 4,15 (м., 1H), 3,80 (с., 2H), 3,50 (м., 1H), 2,72 (м., 1H), 2,46-2,20 (м., 5H), 1,78 (м., 1H), 1,59 (м., 2H), 1,40 (м., 4H), 1,24 (м., 2H).

Стадія B: 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл. Дотримуючись процедури Прикладу 1, Стадія С, 7-{2B-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл (860мг, 2,31ммоль) в MeOH (40мл) гідрогенували в присутності 10% паладію на вугліці (86мг) протягом 1 год. В результаті очищення радіальною хроматографією (гексани до 20% EtOAc в гексанах до 70% EtOAc в гексанах) одержали 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл (730мг).

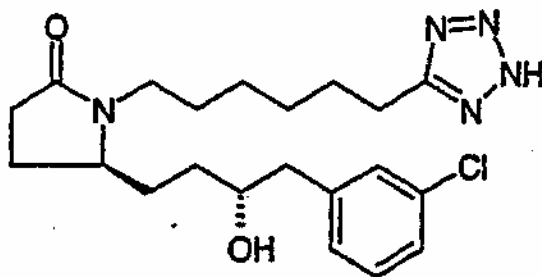
Стадія C: 7-{2S-[4-(3-Хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл. До розчину 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3-оксо-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрилу (730мг, 1,87ммоль) в MeOH (30мл) при 0°C додавали NaBH_4 (35мг, 0,921ммоль). Суміш перемішували при 0°C протягом 45 хвилин і додавали воду. Леткі компоненти виділили у вакуумі і водний розчин, що залишився, розбавляли метиленхлоридом. Органічний розчин промивали водою, а потім соляним розчином, просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани: EtOAc до EtOAc до 3% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітріл (730мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,22 (м., 3H), 7,07 (д., 1H), 3,80 (м., 1H), 3,57 (м., 2H), 2,88 (м., 1H), 2,78 (м., 1H), 2,64 (м., 1H), 2,31 (м., 4H), 2,10 (м., 1H), 1,65-1,22 (м., 14H); MS 377,3 (M+1).

Стадія D: 5S-[4-(3-Хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он. Розчин 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрилу (730мг, 1,94ммоль), триметилсілазиду (0,63мл, 0,475ммоль) і оксид дибутилтину (96мг, 3,87ммоль) в толуолі (30мл) нагрівали із

зворотнім холодильником протягом 18 год. Леткі компоненти виділяли у вакуумі і залишок розводили CH_2Cl_2 . Органічний розчин промивали 1 N HCl, а потім соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. Залишок очищали хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта EtOAc до 2% MeOH в CH_2Cl_2 до 7% MeOH в CH_2Cl_2 для одержання комплексу ТМС. Залишок розбавляли MeOH і додавали 2N HCl, розчин перемішували протягом 40 хвилин. Розчин розбавляли CH_2Cl_2 і органічний шар промивали водою, а потім соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. Залишок очищали хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта EtOAc до 7% MeOH в CH_2Cl_2 для одержання 5S-[4-(3-хлор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он (521мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,23 (м., 3H), 7,09 (д., 1H), 3,85 (м., 1H), 3,66 (м., 1H), 3,53 (м., 1H), 2,96 (м., 3H), 2,81 (м., 1H), 2,70 (м., 1H), 2,44 (м., 2H), 2,18 (м., 1H), 1,88-1,27 (м., 14H); MS 420,2 (M+1), 418,3 (M-1).

Приклад 4

5S-[3R-Гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он



Стадія А: 7-{2-Оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідін-1-іл}-гептаннітрил. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія А, аніон, одержаний з диметилового естеру [2-оксо-3-(3-трифторметил-феніл)-пропіл]-фосфонові кислоти (2,68г, 8,64ммоль) та NaH (60% в маслі, 400мг, 10ммоль) піддавали реакції з 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрилом (з розрахунку 10ммоль) протягом 18 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (30% EtOAc в гексанах до 80% EtOAc в гексанах) одержали 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідін-1-іл}-гептаннітрил (1,2г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,52 (м., 1H), 7,45 (м., 2H), 7,37 (м., 1H), 6,67 (д.д., 1H), 6,23 (д., 1H), 4,18 (м., 1H), 3,90 (с., 2H), 3,53 (м., 1H), 2,73 (м., 1H), 2,45-2,23 (м., 5H), 1,79 (м., 1H), 1,60 (м., 2H), 1,41 (м., 4H), 1,24 (м., 2H); MS 407,2 (M+1), 405,3 (M-1).

Стадія В: 7-{2R-[3S-Гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил. До розчину 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-піролідін-1-іл}-гептаннітрилу (1,14г, 2,81ммоль) та (R)-2-метил-CBS-оксазаборолідину (1M в толуолі, 0,42 мл, 0,42 ммоль) в CH_2Cl_2 (112 мл) при -45°C краплями додавали катехолборан (1M в ТГФ, 8,4мл, 8,4ммоль). Суміш перемішували при -45°C протягом 18год. і додавали 1N HCl. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 40 хвилин і відокремлювали шари. Органічний розчин промивали холодним 1 N NaOH (тричі).

Органічний розчин промивали послідовно 1 N HCl, водою і соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті хроматографії середнього тиску (1:1 гексани: EtOAc до 80% EtOAc в гексанах) одержали 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил (820 мг) як приблизне співвідношення 2,5:1 3S:3R спиртових діастереомерів при ^1H -ЯМР, ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,51:7,38 (м., 4H), 5,72 (д.д., 1H), 5,49 (д.д., 1H), 4,45 (м., 1H), 4,02 (м., 1H), 3,47 (м., 1H), 2,90 (м., 2H), 2,71 (м., 1H), 2,34 (м., 4H), 2,18 (м., 1H), 1,66 (м., 4H), 1,44 (м., 4H), 1,27 (м., 2H); MS 409,2 (M+1).

Стадія С: 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія С, 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил (810мг) в MeOH (40мл) гідрували в присутності 10% паладію на вуглі (100мг) при 50 psi протягом 18 год. на шейкері Parr. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 3% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил (720 мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,44 (м., 4H), 3,84 (м., 1H), 3,58 (м., 2H), 2,88 (м., 2H), 2,73 (м., 1H), 2,32 (м., 4H), 2,11 (м., 1H), 1,78 (м., 1H), 1,65-1,37 (м., 11H), 1,30 (м., 2H); MS 411,2 (M+1).

Стадія D: 5S-[3R-Гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 3, Стадія D, 7-{2S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл}-гептаннітрил (710мг, 1,73ммоль) піддавали реакції з азидотриметилсиланом (399мг, 3,46ммоль) та дибутилтиновим оксидом (43мг, 1,7ммоль) в толуолі (25мл), нагрівали із зворотнім холодильником протягом 18 год. Леткі компоненти вилучали у вакуумі і залишок розводили CH_2Cl_2 . Органічний розчин промивали послідовно 1 N HCl (двічі), водою (1 раз) і соляним розчином (1 раз). Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення залишку хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта EtOAc до 2% MeOH в CH_2Cl_2 до 8% MeOH в CH_2Cl_2 , одержали 5S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он (450мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,44 (м., 4H), 3,87 (м., 1H), 3,65 (м., 1H), 3,50 (м., 1H), 3,01-2,73 (м., 5H), 2,42 (м., 2H), 2,16 (м., 1H), 1,86-1,23 (м., 14H); MS 454,4 (M+1), 452,4 (M-1).

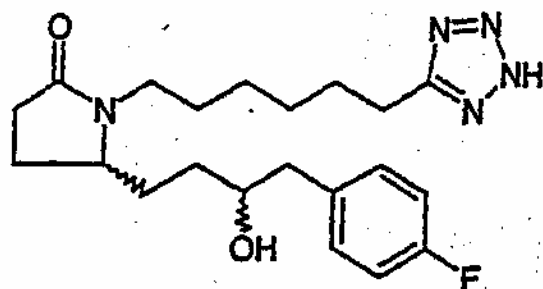
Стадія E: Натрієва сіль 5S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 2, Стадія E, в результаті обробки 5S-[3R-гідрокси-4-(3-трифторметил-феніл)-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он (428мг, 0,944ммоль)

NaHCO₃ (79мг, 0,94ммоль) одержали натрієву сіль (430мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,48 (м., 4H), 3,79 (м., 1H), 3,67 (м., 1H), 3,51 (м., 1H), 2,86 (м., 5H), 2,30 (м., 2H), 2,12 (м., 1H), 1,84-1,27 (м., 14H); МС 454,4 (M-Na+1), 452,4 (M-Na-1).

Приклад 5

5-[4-(4-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідин-2-он

"\



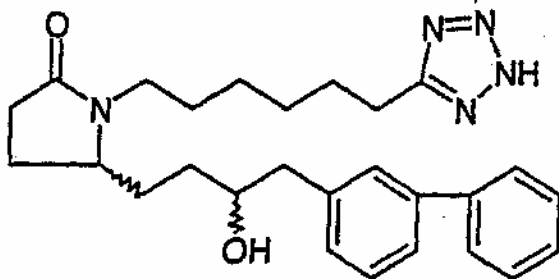
Стадія А: 7-{2-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл. Розчин 5-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-піролідин-2-ону (150мг, 0,41ммоль) в ДМФ (5мл) додавали до NaH (60% ваги в маслі, 16мг, 0,41ммоль) в ДМФ (10мл). Через 1,5 год. додавали 7-бромгептаннітріл (78мг, 0,41ммоль) в ДМФ (5мл) і суміш перемішували протягом 2,5 год. при 90°C. Додавали воду (20 мл) і водний розчин промивали EtOAc (4x15мл). Комбіновані органічні розчини промивали водою (2x15мл), просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення залишку хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc) одержали 7-{2-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (161мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,09 (м., 2H), 6,95 (м., 2H), 3,81 (м., 1H), 3,54 (м., 2H), 2,86 (м., 1H), 2,68 (м., 2H), 2,29 (м., 4H), 2,06 (м., 1H), 1,74-1,23 (м., 13H), 0,85 (а, 9H), 0,04 (м., 3R), 0,19 (м., 3R); М475,1 (M+1).

Стадія В: 7-{2-[4-(4-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл. До розчину 7-{2-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітрілу (158мг, 0,333ммоль) в ТГФ (20мл) при 0°C додавали TBAF (1М в ТГФ, 0,50мл, 0,50ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 3 год. і додавали насичений водний NaHCO₃. Леткі компоненти виділяли у вакуумі. Водний розчин, що залишився, промивали СНСл (4x5мл) і комбіновані органічні розчини просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення залишка хроматографією середнього тиску (1:1 гексани: EtOAc до EtOAc) одержали 7-{2-[4-(4-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (82мг). ¹H-ЯМР (COCl₂) δ 7,15 (м., 2H), 7,00 (м., 2H), 3,77 (м., 1H), 3,58 (м., 2H), 2,89 (м., 1H), 2,79 (м., 1H), 2,64 (м., 1H), 2,34 (м., 4H), 2,12 (м., 1H), 1,68-1,24 (м., 14H); МС 361,2 (M+1).

Стадія С: 5-[4-(4-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідин-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 3, Стадія D, 7-{2-[4-(4-фторо-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (71мг, 0,197ммоль) піддавали реакції з азидотриметилсіланом (45мг, 0,394ммоль) та дибутилтиновим оксидом (5мг, 0,02ммоль) в толуолі (10мл), нагрівали із зворотнім холодильником протягом 16 год. Додавали азидотриметилсілан (200мг) та дибутилтиновий оксид (50мг) і суміш нагрівали із зворотнім холодильником протягом 5 год. Суміш підкислювали 1N HCl до pH=2 (5мл) і водний розчин промивали EtOAc (4x10мл). Комбіновані органічні розчини просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (EtOAc до 39:1 EtOAc:MeOH до 19:1 EtOAc:MeOH) одержали сполуку, зазначену у заголовку Прикладу 5А (39мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,16 (м., 2H), 7,00 (м., 2H), 3,81 (м., 1H), 3,68 (м., 1H), 3,53 (м., 1H), 2,99 (м., 3R), 2,80 (м., 1H), 2,68 (м., 1H), 2,47 (м., 2H), 2,20 (м., 1H), 1,88-1,22 (м., 14H); МС 404,3 (M+1); 402,3 (M-1).

Приклад 6

5-(4-Біфеніл-3-іл-3-гідрокси-бутил)-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідин-2-он



Стадія А: 7{2-[4-Біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 5, Стадія А, аніон, одержаний з 5-[4-біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-піролідин-2-он (239,1мг, 0,564ммоль) та NaHMDS (1М в ТГФ, 0,67мл, 0,67ммоль) алкіпували 7-бромгептаннітрілом (118 мг, 0,620 ммоль) при 70°C протягом 24 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (CH₂Cl₂ до 1 % MeOH в CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂

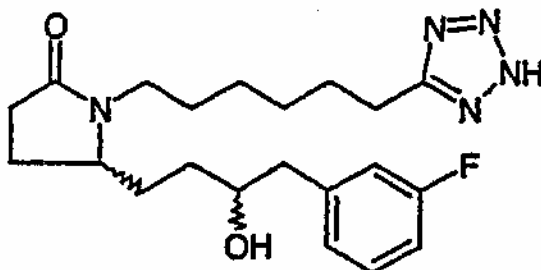
до 4% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 7-[2-[4-біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (187мг). МС 533,3 (M+1).

Стадія В: 7-[2-(4-Біфеніл-3-іл-3-гідрокси-бутил)-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 5, Стадія В, 7-[2-[4-біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (187мг, 0,351ммоль) депротектували TBAF (1М в ТГФ, 0,53мл, 0,53ммоль). Додавали при 0°C і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (CH₂Cl₂ до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 6% MeOH в CH₂Cl₂ до 10% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 7-[2-(4-біфеніл-3-іл-3-гідрокси-бутил)-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (85мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,58 (м., 1H), 7,51-7,33 (м., 4H), 7,21-7,12 (м., 4H), 3,85 (м., 1H), 3,60 (м., 2H), 2,90 (м., 1H), 2,83-2,60 (м., 2H), 2,45-2,30 (м., 4H), 2,14 (м., 1H), 1,73-1,25 (м., 14H).

Стадія С: 5-[4-Біфеніл-3-іл-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 3, Стадія D, 7-[2-(4-біфеніл-3-іл-3-гідрокси-бутил)-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (109мг, 0,260ммоль) піддавали реакції з азидотриметилсіланом (0,69мл, 0,52ммоль) та дибутилтиновим оксидом (11мг, 0,044ммоль) в толуолі (5,3мл) і нагрівали із зворотнім холодильником протягом 72 год. Суміш охолоджували і додавали воду. Суміш підкислювали 1 N HCl до pH=2 і водний розчин промивали 5% MeOH в CH₂Cl₂ (тричі). Комбіновані органічні розчини просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 2% MeOH в CH₂Cl₂ to 4% MeOH in CH₂Cl₂ to 8% MeOH in CH₂Cl₂) одержали сполуку, зазначену у заголовку Прикладу 6 (107мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,57 (м., 1H), 7,51-7,32 (м., 4H), 7,25-7,13 (м., 4H), 3,91 (м., 1H), 3,74-3,50 (м., 2H), 2,96 (м., 3R), 2,77 (м., 1H), 2,50 (м., 2H), 2,22 (м., 1H), 2,07 (м., 1H), 1,90-1,22 (м., 14H); МС 462,2 (M+1), 460,1 (M-1).

Приклад 7

5-[4-(3-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он



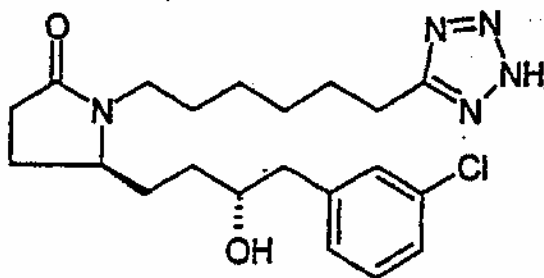
Стадія А: 7-[2-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-Фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 5, Стадія А, аніон, одержаний з 5-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-піролідін-2-ону (250мг, 0,684ммоль) та NaNHDS (1М в ТГФ, 0,80мл, 0,80ммоль) алкілували 7-бромгептаннітрілом (142мг, 0,748ммоль) при 70°C протягом 72 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 5% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 7-[2-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (261,7мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,26 (м., 1H), 6,92 (м., 3R), 3,89 (м., 1H), 3,59 (м., 2H), 2,89 (м., 1H), 2,75 (м., 2H), 2,36 (м., 4H), 2,11 (м., 1H), 1,72-1,26 (м., 13H), 0,89 (с., 9H), 0,09 (s, 6H); МС 475,3 (M+1).

Стадія В: 7-[2-[4-(3-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 5, Стадія В, 7-[2-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (261,7мг, 0,551ммоль) депротектували TBAF (1М в тетрагідрофурані, 0,83мл, 0,83ммоль). Додавали при 0°C і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (CH₂Cl₂ до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 4% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 7-[2-[4-(3-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (141мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,32 (м., 1H), 6,98 (м., 3R), 3,86 (м., 1H), 3,64 (м., 2H), 2,99-2,80 (м., 2H), 2,71 (м., 1H), 2,38 (м., 4H), 2,16 (м., 1H), 1,74-1,29 (м., 14H); МС 361,3 (M+1).

Стадія С: 5-[4-(3-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 6, Стадія С, 7-[2-[4-(3-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідін-1-іл]-гептаннітріл (141,3мг, 0,392ммоль) піддавали реакції з азидотриметилсіланом (0,210мл, 1,57ммоль) та дибутилтиновим оксидом (29мг, 0,116ммоль) в толуолі (8мл) і нагрівали із зворотнім холодильником протягом 72 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 4% MeOH в CH₂Cl₂ до 6% MeOH в CH₂Cl₂) одержали сполуку, зазначену у заголовку Прикладу 5С (101,5мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,26 (м., 1H), 6,94 (м., 3R), 3,87 (м., 1H), 3,70 (м., 1H), 3,52 (м., 1H), 2,98 (м., 3R), 2,78 (м., 2H), 2,48 (м., 2H), 2,20 (м., 1H), 1,89-1,24 (м., 14H); МС 404,2 (M+1), 401,9 (M-1).

Приклад 8

5S-[4-(3-Хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідін-2-он



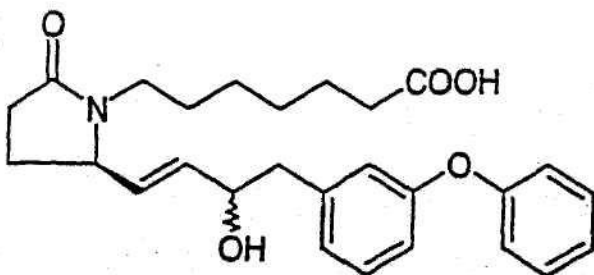
Стадія А: 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-хлор-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл. До розчину 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-хлор-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (1,62г, 4,34ммоль) в CH_2Cl_2 (200мл) при -45°C додавали (R)-2-метил-CBS-оксазаборолідин (1М в толуолі, 1,3мл, 1,3ммоль). Після перемішування протягом 20 хвилин краплями додавали катехолборан (1М в ТГФ, 13мл, 13ммоль). Реакцію перемішували при -45°C протягом 16 год. і додавали 1 N HCl. Суміш нагрівали до кімнатної температури і відділяли шари. Органічний розчин промивали охолодженням 1 N NaOH (тричі). Органічний розчин промивали послідовно 1 N HCl, водою і соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до 20% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-хлор-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (536мг) як суміш 8,2:1 3S:2R спирту при HPLC. ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,24-7,17 (м., 3R), 7,07 (м., 1H), 5,69 (д.д., 1H), 5,46 (д.д., 1H), 4,40 (м., 1H), 4,01 (м., 1H), 3,46 (м., 1H), 2,81 (м., 2H), 2,68 (м., 1H), 2,42-2,28 (м., 4H), 2,20 (м., 1H), 1,73-1,59 (м., 4H), 1,42 (м., 4H), 1,25 (м., 2H); МС 375 (M+1).

Стадія В: 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 4, Стадія С, 7-{2R-[3S-гідрокси-4-(3-хлор-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (536мг) в EtOH (30мл) підрували в присутності 10% паладію на вуглеці (60мг) протягом 3,5год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc до 20% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітріл (440мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,22 (м., 3R), 7,08 (м., 1H), 3,83 (м., 1H), 3,59 (м., 2H), 2,90 (м., 1H), 2,77 (д.д., 1H), 2,66 (д.д., 1H), 2,39-2,29 (м., 4H), 2,11 (м., 1H), 1,78 (м., 1H), 1,68-1,39 (м., 11H), 1,29 (м., 2H); МС 377,2 (M+1).

Стадія С: S-[4-(3-Хлор-феніл-3R-гідрокси-бутил-1)-6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідин-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 3, Стадія D, суміш 7-{2S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептаннітрілу (420мг, 1,114ммоль), триметилсилілазиду (257мг, 2,23ммоль) і дибутилтинового оксиду (56мг) в толуолі (30мл) нагрівали із зворотнім холодильником протягом 16год. Леткі речовини виділяли у вакуумі і залишок розчиняли в MeOH і перемішували з 3N HCl протягом 3год. Реакцію розбавляли водою та CH_2Cl_2 і відділяли шари. Органічні шари промивали водою, а потім соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (EtOAc до 2% MeOH в CH_2Cl_2 до 7% MeOH в CH_2Cl_2) одержали 5S-[4-(3-хлор-феніл)-3R-гідрокси-бутил]-1-[6-(2H-тетразол-5-іл)-гексил]-піролідин-2-он (311мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,22 (м., 3R), 7,08 (м., 1H), 3,86 (м., 1H), 3,66 (м., 1H), 3,52 (м., 1H), 2,96 (м., 3R), 2,82-2,68 (м., 2H), 2,45 (м., 2H), 2,17 (м., 1H), 1,88-1,22 (м., 14H); МС 420,2 (M+1), 418,3 (M-1).

Приклад 9

7-{2R-[3-Гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанова кислота



Стадія А: Етиловий естер 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія А, аніон, одержаний з диметилового естеру [2-оксо-3-(3-фенокси-феніл)-пропіл]-фосфонової кислоти (633мг, 1,98ммоль) та NaH (60% в маслі, 70мг, 1,74ммоль) піддавали реакції з етиловим естером 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (з розрахунку 1,58ммоль) більше 24 год. В результаті хроматографії середнього тиску (EtOAc) одержали етиловий естер 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (215мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,28 (м., 3R), 7,08 (м., 1H), 6,97 (м., 2H), 6,89 (м., 2H), 6,83 (м., 1H), 6,62 (д.д., 1H), 6,19 (д., 1H), 4,13 (м., 1H), 4,08 (к., 2H), 3,79 (с., 2H), 3,51 (м., 1H), 2,68 (м., 1H), 2,35 (м., 2H), 2,24 (м., 3R), 2,24 (м., 3R), 1,75 (м., 1H), 1,54 (м., 2H), 1,43-1,20 (м., 9H).

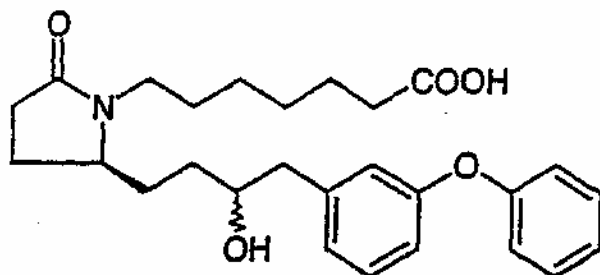
Стадія В: Етиловий естер 7-{2R-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 3, Стадія С, етиловий естер 7-{2-оксо-5R-[3-оксо-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (215мг, 0,451ммоль) піддавали реакції з NaBH_4 (17мг, 0,45ммоль) в EtOH (3мл) при 0°C більше 4 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (EtOAc) одержали етиловий естер 7-{2R-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-

піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (167мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,33 (м., 2H), 7,25 (м., 1H), 7,10 (м., 1H), 6,99 (м., 2H), 6,93 (м., 1H), 6,86 (м., 2H), 5,72 (м., 1H), 5,45 (м., 1H), 4,37 (м., 1H), 4,10 (q, 2H), 3,47 (м., 1H), 2,82 (м., 3R), 2,35 (м., 2H), 2,26 (t, 2H), 2,15(м.,1H), 1,70-1,21 (м., 13H).

Стадія С: 7-{2R-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанова кислота. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія D, етиловий естер 7-{2R-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-5ут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (29мг, 0,060ммоль) гідролізували 2M NaOH в EtOH (4,0мл) при кімнатній температурі більше 24 год. з метою одержання сполуки, зазначеної у заголовку (20мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,33-7,21 (м., 3R), 7,08 (м., 1H), 6,98-6,84 (м., 5H), 5,70 (м., 1H), 5,44 (м., 1H), 4,36 (м., 1H), 4,00 (м., 1H), 3,44 (м.,*1H), 2,85-2,51 (м., 3R), 2,32 (м., 4H), 2,14 (м., 1H), 1,68-1,18 (м., 10H).

Приклад 10

7-{2S-[3-Гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанова кислота



Стадія А: Етиловий естер 7-{2S-[3-гідрокси-4-(3-Фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1. Стадія С, суміш етилового естеру 7-{2R-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бут-1-еніл]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (139мг, 0,290ммоль), MeOH (30мл) та 10% паладію на вуглі (14мг) гідрували на шейкері Рагт при 50 psi протягом 18 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1:1 гексани:EtOAc) одержали етиловий естер 7-{2S-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (86мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,35-7,24 (м., 3R), 7,10 (м., 1H), 6,99 (м., 2H), 6,93 (м., 1H), 6,87 (м., 2H), 4,09 (q, 2H), 3,80 (м., 1H), 3,58 (м., 2H), 2,82 (м., 2H), 2,64 (м., 1H), 2,42-2,24 (м., 4H), 2,10 (м., 1H), 1,77 (м., 1H), 1,66-1,21 (м., 16H).

Стадія В: 7-{2S-[3-Гідрокси-4-(3-Фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанова кислота. Дотримуючись процедури, описаної в Прикладі 1, Стадія D, етиловий естер 7-{2S-[3-гідрокси-4-(3-фенокси-феніл)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (86мг, 1,79ммоль) гідролізували 2N NaOH в MeOH (4мл) більше 18 год. з метою одержання сполуки, зазначеної у заголовку (62мг). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 7,33-7,23 (м., 3R), 7,09 (м., 1H), 6,98 (м., 2H), 6,91 (м., 1H), 6,86 (м., 2H), 3,80 (м., 1H), 3,56 (м., 2H), 2,88 (м., 1H), 2,77 (м., 1H), 2,64 (м., 1H), 2,38-2,28 (м., 4H), 2,09 (м., 1H), 1,77 (м., 1H), 1,64-1,21 (м., 13H).

Приготування 1

7-{2R-Гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітріл

Стадія А: 7-[2R-(трет-Бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітріл. До суміші NaH (60% в маслі, 3,836г, 0,0959ммоль, промитого 25мл ДМФ) в ДМФ (250мл) додавали розчин 5R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-піролідин-2-ону (Tetrahedron: Asymmetry, 1996, 7, 2113) (20,00г, 87,19ммоль) в ДМФ (50мл). Реакцію перемішували при кімнатній температурі протягом 1,5 год. і додавали розчин 7-бромгептаннітрілу (16,574г, 87,19ммоль) в ДМФ (50мл). Реакцію перемішували при 90°C протягом 3 год. Реакцію охолоджували до кімнатної температури і додавали воду (750мл). Водний розчин промивали EtOAc (4x250мл). Комбіновані органічні розчини промивали водою (2x250мл), просували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт. (9:1 гексани:EtOAc до 7:3 гексани:EtOAc до 1:1 гексани:EtOAc) одержали 7-[2R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітріл (22,46 г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 3,69-3,55 (м., 4H), 2,99 (м., 1H), 2,42 (м., 1H), 2,34-2,24 (м., 3R), 2,05 (м., 1H), 1,81 (м., 1H), 1,67-1,42 (м., 6H), 1,31 (м., 2H), 0,86 (s, 9H), 0,03 (s, 6H); МС 339,3 (M+1).

Стадія В: 7-{2R-Гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітріл. Розчин фториду тетрабутиламонію (1M в ТГФ, 100,0мл, 100,0ммоль) обережно додавали до розчину 7-[2R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітрілу (22,39г, 66,13ммоль) в ТГФ (400мл) при 0°C. Реакцію нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом 4 год. Додавали насичений водний NaHCCb (250мл) і у вакуумі виділяли леткі речовини. Водний розчин, що залишився, промивали CHCl_3 (4x200мл). Комбіновані органічні розчини просували (MgSO_4), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (9:1 гексани:EtOAc до 4:1 гексани:EtOAc до 7:3 гексани:EtOAc до 6:4 гексани:EtOAc до 1:1 гексани:EtOAc до 9:1 EtOAc:MeOH) одержали 7-{2R-гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептаннітріл (14,922г). ^1H -ЯМР (CDCl_3) δ 3,78 (д.д., 1H), 3,71-3,58 (м., 3R), 3,00 (м., 1H), 2,46 (м., 1H), 2,36-2,27 (м., 3R), 2,08 (м., 1H), 1,93 (м., 1 H), 1,77 (м., 1 H), 1,68-1,43 (м., 6H), 1,32 (м., 2H); МС 225,1 (M+1).

Приготування 2

Етиловий естер 7-{2R-гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти

Стадія А: Етиловий естер 7-[2R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 1, Стадія А, аніон, одержаний з 5R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-піролідин-2-ону (30,000г, 130,8ммоль) і NaH (60% в маслі, 5,756г, 143,9ммоль) в ДМФ (600мл) піддавали реакції з етил 7-бромгептаноатом (32,559г, 137,3ммоль) протягом 3 год. при 90°C. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт

(9:1 гексани:EtOAc до 4:1 гексани:EtOAc до 7:3 гексани:EtOAc до 6:4 гексани:EtOAc) одержали етиловий естер 7-[2R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (39,46г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 4,10 (к., 2H), 3,62 (м., 4H), 2,95 (м., 1H), 2,42 (м., 1H), 2,27 (м., 3R), 2,04 (м., 1H), 1,81 (м., 1H), 1,65-1,26 (м., 8H), 1,23 (т, 3R), 0,86 (с, 9H), 0,03 (с, 6H); МС 386,2 (М+1).

Стадія В: Етиловий естер 7-(2R-гідроксиіетил-5-оксо-піролідин-1-іл)-гептанової кислоти. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 1, Стадія В, етиловий естер 7-[2R-(трет-бутил-диметил-сіланилоксиметил)-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (39,46г, 102,3ммоль) депротектували TBAF (1М в ТГФ, 154,0мл, 154,0ммоль) з тривалістю реакції 2,5 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (9:1 гексани:EtOAc до 6:4 гексани:EtOAc до 1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 19:1 EtOAc:MeOH) одержали етиловий естер 7-[2R-гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл]-гептанової кислоти (25,41г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 4,10 (к., 2H), 3,77 (д.д., 1H), 3,64 (м., 3R), 2,96 (м., 1H), 2,46 (м, 1H), 2,35-2,25 (м., 3R), 2,08 (м., 1H), 1,93 (м., 1H), 1,71 (м., 1H), 1,63-1,27 (м., 8H), 1,23 (т., 3H); МС 272,2 (М+1).

Приготування 3

Диметилловий естер [2-оксо-3-(3-трифторметил-феніл)-пропіл]-фосфонової кислоти

Стадія А: N-Метокси-N-метил-2-(3-трифторметил-феніл)-ацетамід. До розчину N,O-диметилгідроксиламінового гідрохлориду (1,577г, 16,2ммоль) в ДМФ (25мл) та CH₂Cl₂ (25мл) при 0°C додавали триетиламін (2,25мл). Після перемішування протягом 5 хвилин додавали 3-трифторметилфенілоцтову кислоту (3,0г, 14,7ммоль), НОВТ (3,177г, 23,5ммоль) і DEC (2-диетиламіноетилхлоридгідрохлорид, 3,10г, 16,2ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 18 год. і концентрували у вакуумі. Залишок розбавляли EtOAc і органічний розчин промивали послідовно 1N NaOH (двічі), водою і соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували у вакуумі. В результаті хроматографії середнього тиску (20% EtOAc в гексанах) одержали N-метокси-N-метил-2-(3-трифторметил-феніл)-ацетамін.

Стадія В: Диметилловий естер [2-оксо-3-(3-трифторметил-феніл)-пропіл]-фосфонової кислоти. До розчину диметил метилрфосфонату (9,4г, 75,8ммоль) в толуолі (80мл) при -78°C обережно додавали n-BuLi (2,5М в гексанах, 28мл, 70ммоль). Суміш перемішували протягом 1 год. і обережно додавали розчин N-метокси-N-метил-2-(3-трифторметил-феніл)-ацетаміду (14,39г) в толуолі (50мл). Суміш перемішували протягом 2,5 год. і додавали AcOH (40мл). Суміш нагрівали до кімнатної температури і додавали воду. Органічний шар промивали водою, а потім соляним розчином. Органічний розчин просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували у вакуумі. В результаті хроматографії середнього тиску (CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂) одержали сполуку, зазначену у заголовку Приготування 3 (9,37г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,52 (м., 1 H), 7,44 (м., 2H), 7,37 (м., 1 H), 3,96 (с., 2H), 3,87 (с., 3R), 3,76 (с., 3R), 3,12 (д., 2H).

Приготування 4

Диметилловий естер [3-(3-хлор-феніл)-2-оксо-пропіл]-фосфонової кислоти

Замістивши відповідні вихідні речовини, дотримуючись процедури, аналогічної процедурі, описаній в Приготуванні 3, приготували сполуку, зазначену у заголовку Приготування 4.

Приготування 5

Диметилловий естер [3-(3-Хлор-феніл)-2-оксо-пропіл]-фосфонової кислоти

До розчину диметилметилфосфонату (17,93г, 144ммоль) в ТГФ (270мл) при -78°C обережно додавали n-BuLi (2,5М, 64,2мл, 160,6ммоль). Суміш перемішували протягом 1 год. і обережно додавали метиловий естер (3-хлор-феніл)-оцтової кислоти (26,93г, 146ммоль). Суміш нагрівали до кімнатної температури і перемішували протягом 24 год. Додавали AcOH (15мл) і у вакуумі вилучали леткі речовини. Залишок розводили CH₂Cl₂ і органічний розчин обережно промивали насиченим водним NaHCO₃ (тричі). Органічний шар промивали (MgSO₄), фільтрували і концентрували у вакуумі. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (20% EtOAc в гексанах до EtOAc) одержали сполуку, зазначену в заголовку (9,28г).

Приготування 6

Тетрагідро-піролізин-3,5-діон

Сполуку, зазначену у заголовку Приготування 6, одержали, дотримуючись процедури, описаної в Патенті США № 4 663 464.

Приготування 7

Етиловий естер 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти

До розчину етилового естеру 7-{2R-гідроксиметил-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти (1,63г, 6,01ммоль) в бензолі (50мл) додавали 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіімідовий гідрохлорид (3,46г, 18,03ммоль) і DMSO (1,5мл, 24,04ммоль). Розчин охолоджували до 0°C і додавали трифторацетат піридинію (1,28 г, 6,61 ммоль). Суміш перемішували при 0°C протягом 15 хвилин, а потім при кімнатній температурі протягом 2 год. Розчин зливали з маслянистого осаду. Осад промивали бензолом (тричі) і комбіновану бензолову промивку концентрували у вакуумі з метою одержання етилового естеру 7-{2R-форміл-5-оксо-піролідин-1-іл}-гептанової кислоти, який використовували без подальшого очищення.

Приготування 8

Метиловий естер 4-(3{2-[4-біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-5-оксо-піролідин-1-іл}-пропіл)-бензойної кислоти

Стадія А: 5-(3-Бром-3-оксо-бутил)-піролідин-2-он. До розчину тетрагідро-піролізин-3,5-діону (5г, 36ммоль) в CH₂Cl₂ (320мл) при 0°C додавали краплями бромід 3-бромбензилмагнію (0.25М в Et₂, 155 мл, 38,8 ммоль). Розчин перемішували при 0°C протягом 2 год. і гасили насиченим водним хлоридом амонію. Додавали 1 N HCl для одержання pH=3. Після нагрівання до кімнатної температури водний розчин екстрагували додаванням CH₂Cl₂ (3х). Комбіновані органічні екстракти просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 5% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-(3-бром-3-оксо-бутил)-піролідин-2-он (7,84г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,41-7,11 (м., 4H), 6,24 (ш.с., 1 H), 3,67 (с., 2H), 3,60 (м., 1H), 2,52 (т., 2H), 2,32 (м., 2H), 2,20

(м., 1H), 1,88-1,60 (м., 3H).

Стадія В: 5-(3-Бром-3-гідрокси-бутил)-піролідін-2-он. До розчину 5-(3-бром-3-оксо-бутил)-піролідін-2-ону (7,84г, 25,3ммоль) в EtOH (130мл) при 0°C додавали NaBH₄ (480мг, 12,6ммоль) і суміш перемішували при 0°C протягом 2,5 год. Реакцію гасили насиченим водним хлоридом амонію. Додавали воду і CH₂Cl₂. Водний шар промивали CH₂Cl₂ (3х) і комбіновані органічні екстракти просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 1 % MeOH в CH₂Cl₂ до 3% MeOH в CH₂Cl₂ до 5% MeOH в CH₂Cl₂ до 8% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-(3-бром-3-гідрокси-бутил)-піролідін-2-он (6,76 г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,36-7,09 (м., 4H), 6,27 (д., 1H), 3,78 (м., 1H), 3,63 (м., 1H), 2,75 (м., 1H), 2,62 (м., 1H), 2,32-2,18 (м., 3H), 1,88 (м., 1H), 1,73-1,42 (м., 5H); МС 312,2, -314,1 (М+).

Стадія С: 5-[3-Бром-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-піролідін-2-он. До розчину 5-(3-бром-3-гідрокси-бутил)-піролідін-2-ону (6,76г, 21,6ммоль) в ДМФ (86мл) додавали трет-бутилдиметилсіліловий хлорид (3,59г, 23,8ммоль), а потім імідазол (2,95г, 43,3ммоль) і DMAP (264мг, 2,16ммоль). Реакцію перемішували протягом 24 годин і гасили насиченим водним хлоридом амонію. Водний розчин промивали EtOAc (3х) і комбіновані органічні екстракти просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (CH₂Cl₂ до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 3% MeOH в CH₂Cl₂ до 5% MeOH в CH₂Cl₂ до 8% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-(3-бром-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил)-піролідін-2-он (7,45г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,30 (м., 2H), 7,12 (м., 1H), 7,04 (м., 1H), 5,71 (м., 1H), 3,81 (м., 1H), 3,56 (м., 1H), 2,66 (м., 2H), 2,32-2,17 (м., 3H), 1,70-1,35 (м., 5H), 0,82 (с., 9H), -0,06 (д., 3H), -0,24 (д., 3H); МС 426,2, 428,2 (М+).

Стадія D: 5-[4-Біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-піролідін-2-он. До розчину 5-[3-бром-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-піролідін-2-ону (750мг, 1,76ммоль) в DME (15мл) додавали фенілборонову кислоту (236мг, 1,93ммоль). Додавали ацетат паладію (26,8мг, 0,088ммоль) і три-о-толілфосфін (39,5мг, 0,176ммоль), а потім розчин Na₂CO₃ (37,3мг, 3,52ммоль) у воді (1,8мл). Реакцію нагрівали із зворотнім холодильником протягом 24 год. Реакцію охолоджували і леткі речовини вилучали у вакуумі. Залишок розбавляли соляним розчином і EtOAc. Водний розчин промивали EtOAc (3х) і комбіновані органічні екстракти просушували (MgSO₄), фільтрували і концентрували. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 3% MeOH в CH₂Cl₂ до 5% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[4-біфеніл-3-іл-3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-бутил]-піролідін-2-он (717,3мг). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,57 (м., 2H), 7,43 (м., 2H), 7,33 (м., 3H), 7,11 (м., 2H), 5,78 (м., 1H), 3,91 (м., 1H), 3,59 (м., 1H), 2,76 (м., 2H), 2,27 (м., 3H), 1,73-1,38 (м., 5H), 0,83 (с., 9H), -0,03 (д., 3H), -0,16 (д., 3H); МС 424,3 (М+1).

Приготування 9

5-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-піролідін-2-он

Стадія А: 5-[4-(3-Фтор-феніл-3-оксо-бутил)-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія А, тетрагідро-піролізин-3,5-діон (2 г, 14 ммоль) піддавали реакції з хлоридом 3-фторбензилмагнію (0,25М в Et₂O, 62мл, 15,5ммоль) більше 2,5 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до 2:1 EtOAc гексани до EtOAc до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 10% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[4-(3-фтор-феніл)-3-оксо-бутил]-піролідін-2-он (2,1730г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,32-7,27 (м., 1H), 7,00-6,90 (м., 3H), 6,12 (ш.с, 1H), 3,69 (с., 2H), 3,59 (м., 1H), 2,52 (т., 2H), 2,30 (м., 2H), 2,19 (м., 1H), 1,75 (м., 2H), 1,65 (м., 1H).

Стадія В: 5-[4-(3-Фтор-феніл-3-гідрокси-бутил)-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія В, 5-[4-(3-фтор-феніл)-3-оксо-бутил]-піролідін-2-он (2,17г, 8,71ммоль) відновлювали NaBH₄ (165мг, 4,35ммоль). В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 3% MeOH в CH₂Cl₂ до 6% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[4-(3-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-піролідін-2-он (2,23г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,27 (м., 1H), 6,94 (м., 3H), 6,38 (м., 1H), 3,82 (м., 1H), 3,66 (м., 1H), 2,79 (м., 1H), 2,67 (м., 1H), 2,33-2,21 (м., 3H), 1,92 (д., J=4,15 Hz, 1H), 1,75-1,40 (м., 5H); МС 252,2 (М+1).

СтадіяС: 5-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія С, 5-[4-(3-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-піролідін-2-он (2,23г, 8,87ммоль) піддавали реакції з трет-бутилдиметилсіліловим хлоридом (1,47г, 9,76ммоль). В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (1:1 гексани:EtOAc до EtOAc до 1% MeOH в CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 4% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(3-фтор-феніл)-бутил]-піролідін-2-он (2,84г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,23 (м., 1H), 6,88 (м., 3H), 5,75 (м., 1H), 3,85 (м., 1H), 3,57 (м., 1H), 2,71 (м., 2H), 2,30 (м., 2H), 2,25 (м., 1H), 1,70-1,38 (м., 5H), 0,84 (с., 9H), 0 (с., 3H), -0,2(с., 3H).

Приготування 10

5-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-піролідін-2-он

Стадія А: 5-[4-(4-Фтор-феніл)-3-оксо-бутил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія А, тетрагідро-піролізин-3,5-діон (1,41г, 10,1ммоль) піддавали реакції з хлоридом 4-фторбензилмагнію (0,25М в Et₂O, 50мл, 12,5ммоль) більше 5 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску (2% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[4-(4-фтор-феніл)-3-оксо-бутил]-піролідін-2-он (2,64г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,18 (м., 2H), 7,03 (м., 2H), 6,34 (м., 1H), 3,70 (с., 2H), 3,62 (м., 1H), 2,54 (т., 2H), 2,34-2,15 (м., 3H), 1,82-1,61 (м., 3H).

Стадія В: 5-[4-(4-Фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-піролідін-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія В, 5-[4-(4-фтор-феніл)-3-оксо-бутил]-піролідін-2-он (2,64г, ммоль) відновлювали NaBH₄ (400мг, ммоль) при кімнатній температурі протягом 1 год. Додатково додавали NaBH₄ (150мг) і реакцію перемішували протягом 20 год. В результаті очищення хроматографією середнього тиску, використовуючи в якості елюанта розчинний градієнт (CH₂Cl₂ до 2% MeOH в CH₂Cl₂ до 4% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[4-(4-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-піролідін-2-он (2,01г). ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,14 (м., 2H), 6,98 (м., 2H), 6,78 (м., 1H),

3,76 (м., 1H), 3,65 (м., 1H), 2,76 (м., 1H), 2,64 (м., 1H), 2,32-2,18 (м., 4H), 1,72-1,47 (м., 5H).

Стадія С: 5-[3-(трет-Бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-піролідин-2-он. Дотримуючись процедури, описаної в Приготуванні 8, Стадія С, 5-[4-(4-фтор-феніл)-3-гідрокси-бутил]-піролідин-2-он (1,95г, 7,79ммоль) піддавали реакції з трет-бутилдиметилсіліловим хлоридом (1,47г, 9,76ммоль). В результаті очищення хроматографією середнього тиску (1% MeOH в CH₂Cl₂) одержали 5-[3-(трет-бутил-диметил-сіланилокси)-4-(4-фтор-феніл)-бутил]-піролідин-2-он. ¹H-ЯМР (CDCl₃) δ 7,12 (м., 2H), 6,97 (м., 2H), 5,75 (м., 1H), 3,83 (м., 1H), 3,60 (м., 1H), 2,71 (м., 2H), 2,36-2,24 (м., 3H), 1,70-1,38 (м., 5H), 0,84 (с., 9H), -0,05 (д., 3H), -0,2 (д., 3H).

Приготування 11

Диметилловий естер [2-оксо-3-(3-фенокси-феніл)-пропіл]-фосфонової кислоти Шляхом заміщення відповідного вихідного матеріалу за способом, описаним для сполуки Приготування 5, одержали сполуку, зазначену у заголовку Приготування 11.