



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77574

(13) C2

(51) МПК (2006)

C21D 9/56

C21D 1/76

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

## (54) СПОСІБ ТЕРМІЧНОЇ ОБРОБКИ МЕТАЛЕВОЇ СТРІЧКИ

1

(21) а200502426

(22) 11.09.2003

(24) 15.12.2006

(86) РСТ/ВЕ2003/000149, 11.09.2003

(31) 2002/0539

(32) 13.09.2002

(33) ВЕ

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Рейк Жан-Марк, ВЕ, Крутзен Жан-Пьер, ВЕ,

Досонь Едгард, ВЕ, Ренард Мішель, ВЕ

(73) ДРЕВЕ ІНТЕРНАСЬОНАЛЬ С.А., ВЕ

(56) JP 7233420 A, 05.09.1995

JP 2002003953 A, 09.01.2002

EP 0379104 A1, 25.07.1990

US 4966632 A, 30.10.1990

US 5137586 A, 11.08.1992

(57) 1. Спосіб термічної обробки металевої стрічки всередині камери термічної обробки, яка має у свій внутрішній порожнинний тиск, що перевищує атмосферний тиск, який включає:

- пропускання стрічки через принаймні одну зону нагрівання в камері,
- проходження стрічки через принаймні одну зону охолодження в камері,
- встановлення першої атмосфери захисного газу, що має у своєму складі азот і перший вміст водню і/або гелію в камері, крім принаймні, однієї зони охолодження, в якій створена друга атмосфера захисного газу, що має у своєму складі азот і другий вміст водню і/або гелію, що перевищує згаданий перший вміст, який відрізняється тим, що
- принаймні разово вводять азот в камеру,
- принаймні разово закачують захисний газ, що має у своєму складі третій вміст водню і/або гелію, що перевищує згаданий другий вміст цих газів, у згадану принаймні одну зону охолодження, що має згадану другу газову атмосферу,
- проводять газообмін між принаймні одною зоною камери, що представляє згадану першу захисну газову атмосферу, і згаданою принаймні одною зоною охолодження, що представляє згадану другу газову атмосферу,
- контролюють витрати вказаного принаймні одного введення і вказаного принаймні одного закачування залежно від газового обміну між зонами тиску в камері та рівнів вмісту водню і/або гелію, що

2

подаються у згадані першу та другу атмосфери захисного газу.

2. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що захисний газ, що містить згадану третю концентрацію водню і/або гелію, являє собою газоподібний водень або газоподібний гелій.

3. Спосіб за п.1, який відрізняється тим, що захисний газ, що містить зазначену третю концентрацію водню, являє собою газ, який містить водень і азот і надходить безпосередньо з деякого промислового способу без етапу попереднього змішування.

4. Спосіб за п.3, який відрізняється тим, що захисний газ, що містить водень і азот, являє собою газ, одержуваний у результаті крекінгу аміаку.

5. Спосіб за будь-яким з пп.1-4, який відрізняється тим, що він включає згадане принаймні одне введення азоту в камеру лише за межами згаданої принаймні однієї зони охолодження, що представляє згадану другу газову атмосферу.

6. Спосіб за будь-яким з пп.1-4, який відрізняється тим, що азот, який разово вводять у камеру, вводять за межами згаданої принаймні однієї зони охолодження, яка представляє згадану другу газову атмосферу, і в самій цій зоні охолодження.

7. Спосіб за будь-яким з пп.1-6, який відрізняється тим, що згадана перша газова атмосфера має вміст водню і/або гелію на рівні від 3% до 5% по об'єму.

8. Спосіб за будь-яким з пп.1-7, який відрізняється тим, що згадана друга газова атмосфера має вміст водню і/або гелію на рівні від 5% до 25% по об'єму.

9. Спосіб за будь-яким з пп.1-8, який відрізняється тим, що тиск у камері складає від 1 до 3 мбар.

10. Спосіб за будь-яким з пп.1-9, який відрізняється тим, що він включає у згаданий принаймні одній зоні охолодження, що представляє згадану другу газову атмосферу, усмоктування захисного газу в контур рециркуляції, його охолодження і наступне повернення цього газу в область цієї принаймні однієї зони охолодження зі згаданого контуру.

11. Спосіб за будь-яким з пп.1-10, який відрізняється тим, що повні витрати газу створення атмосфери, що закачують і вводять, мають величину в діапазоні від 400Нм<sup>3</sup>/годину до 1000Нм<sup>3</sup>/годину, а

(13) C2

(11) 77574

(19) UA

також тим, що витрати газу, що рециркулює, в 1000-5000 разів перевищує витрати газу створення атмосфери, що закачують і вводять.

12. Спосіб за будь-яким з пп.1-11, який **відрізняється** тим, що за допомогою вищезгаданого конт-

ролю витрат цей спосіб включає у згаданий принаймні одній зоні охолодження, що представляє згадану другу газову атмосферу, підтримання тиску, що перевищує тиск у решті камери печі, що розташовується за межами цієї зони охолодження.

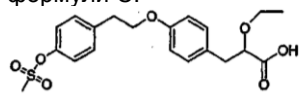
Винахід стосується певних нових похідних (2S)-3-(4-{2-[аміно]-2-оксоетокси}феніл)-2-етоксипропанової кислоти, способів отримання таких сполук, їх використання у лікуванні клінічних станів, включаючи ліпідні розлади (дисліпідемії), пов'язані або ні з резистентністю до інсуліну і іншими проявами метаболічного синдрому, способів їх терапевтичного використання і фармацевтичних композицій, що їх містять.

Метаболічним синдромом, що охоплює цукровий діабет типу 2, називають прояви, що включають резистентність до інсуліну із супроводжуваними гіперінсулінемією, можливо, цукровим діабетом типу 2, артеріальною гіпертензією, центральним (вісцеральним ожирінням), дисліпідемією, що спостерігається як порушення рівнів ліпопротеїну і характеризується підвищеними концентраціями ЛДНГ (ліпопротеїни дуже низької густини), частинок низької густини (ЧНГ) і зниженням концентрації ліпопротеїну високої густини і зниженням фібринолізу.

Сучасні епідеміологічні дослідження показали, що особам з резистентністю до інсуліну властивий високий ризик серцево-судинної захворюваності і смерті, зокрема, виникнення інфаркту міокарду і інсульту. Стани, пов'язані з атеросклерозом, викликаним цукровим діабетом типу 2, спричиняють до 80% всіх смертей.

У клінічній медицині усвідомлюють необхідність підвищувати чутливість до інсуліну у пацієнтів з метаболічним синдромом і цим коригувати дисліпідемію, яку вважають причиною прискореного прогресування атеросклерозу. Однак, зараз це не є загальноприйнятим діагнозом з добре визначеними фармакотерапевтичними показаннями.

Було виявлено, що S-енантіомер сполуки формули C:



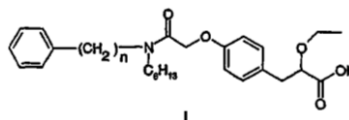
тобто

2-етокси-3-[4-(2-{4-

метансульфонілоксифеніл)етокси]феніл]-пропанова кислота, [описана у Публікації PCT WO 99/62872], є модулятором активованих пероксизомним проліфератором рецепторів [АППР, огляд яких можна знайти у T.M.Willson et al., J Med Chem 2000, Vol 43,527] і має комбіновану агоністичну активність стосовно АППР $\alpha$ /АППР $\gamma$  [Structure, 2001, Vol 9699, P.Cronet et al.]. Ця сполука є ефективною при лікуванні станів, пов'язаних з резистентністю до інсуліну.

Несподівано була винайдена серія сполук, які є потужними модуляторами АППР.

Винахід стосується S-енантіомеру сполуки формули I



у якій n дорівнює 1 або 2, і її фармацевтично прийнятних солей, сольватів, кристалічних форм і проліків.

Термін "проліки" у цьому документі охоплює похідні карбоксильної групи, які у ссавці, зокрема, у людині перетворюються у карбоксильну групу або її сіль або кон'югат. Хоча це не пов'язано з теорією, вважають, що більша частина активності, пов'язаної з проліками, зумовлюється активністю сполуки формули I, в яку перетворюються ці проліки. Проліки можна отримувати звичайними способами, добре відомими фахівцям. Відомими є різні карбокси-проліки, наприклад, див.:

a) Design of prodrugs, ed. by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) і Methods in Enzymology. 42:309-396, ed. by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985);

b) Textbook of Drug Design and Development, ed. by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs", by H. Bundgaard, pp.113-191 (1991);

c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:1-38 (1992);

d) H. Bundgaard, et al., Journal of Pharmac. Sciences, 77:285 (1988); і

e) N. Kakeya, et al., Chem Pharm Bull, 32:692 (1984). Зазначені документи включено посиланням.

Розщеплюванні in vivo естери є лише одним типом проліків вихідної молекули. Гідролізованою in vivo (або розщеплюванню) естерною сполукою формули (I), яка містить карбоксигрупу, є, наприклад, фармацевтично прийнятний естер, який у людині або у тварині гідролізується з утворенням вихідної кислоти. Фармацевтично прийнятні естери для карбоксигрупи включають C<sub>1-6</sub>-алкоксиметилів! естери, наприклад, метоксиметилів!; C<sub>1-6</sub>-алканоліоксиметилів! естери, наприклад, півалоліоксиметилів!; фталідилів! естери; C<sub>3-8</sub>-циклоалкоксикарбонілоксиC<sub>1-6</sub>-алкілові естери, наприклад, 1-циклогексилкарбонілоксіетилів!; 1,3-діоксолен-2-онілметилів! естери, наприклад, 5-метил-1,3-діоксолен-2-онілметилів!; і C<sub>1-6</sub>-алкоксикарбонілоксіетилів! естери, наприклад, 1-метоксикарбонілоксіетилів!; і можуть бути утворені на будь-якій карбоксигрупі у сполуках винаходу.

Сполуки формули I мають активність як мідикаменти. Зокрема, сполуки формули I є потужними агоністами АППР $\alpha$ . Крім того, сполуки формули I є також агоністами АППР $\gamma$ . Термін "агоністи" тут охоплює часткові агоністи.

Окремими сполуками винаходу є:  
(2S)-3-(4-{2-[бензил(гексил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-2-етокси-пропанова кислота; і  
(2S)-2-етокси-3-(4-{2-[гексил(2-фенілетил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)пропанова кислота;

і їх фармацевтично прийнятні солі, сольвати і кристалічні форми.

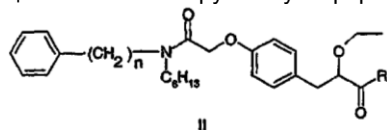
У цьому документі вираз "фармацевтично прийнятні солі" стосується (але без обмеження) солей основ, наприклад, солей лужних металів, солей лужноземельних металів, солей амонію, солей, утворених з основними амінокислотами, і солей, утворених з органічними амінами.

Зрозуміло, що певні сполуки винаходу можуть існувати у сольватованих, наприклад, гідратованих, а також у несольватованих формах. Зрозуміло також, що винахід охоплює всі такі сольватовані форми. Деякі сполуки винаходу можуть існувати як таутомери. Винахід також охоплює всі такі таутомери.

#### Способи отримання

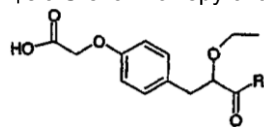
Сполуки винаходу можна отримувати, як це описано нижче. Винахід, однак, не обмежується цими способами. Сполуки можна також отримувати, як це описано для відомих структурно близьких сполук. Реакції можна проводити стандартними способами або так, як це описано у розділі, присвяченому експериментам.

Сполуки формули I можна отримувати реакцією S-енантіомеру сполуки формули II

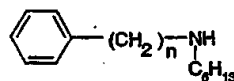


у якій n визначено вище, а R є захисною групою для карбоксильної гідроксигрупи, як це описано у стандартному документі "Protective Groups in Organic Synthesis (Захисні групи у органічному синтезі)", 2nd Edition (1991) by Greene and Wuts, із засобом позбавлення захисту. Захисна група може бути також смолою, наприклад, смолою Ванга або 2-хлортритилхлоридною смолою. Захисні групи можуть бути видалені способами, добре відомими фахівцям. В одній з таких захисних груп R<sup>2</sup> є C<sub>1-6</sub>-алкоксигрупою або арилалкоксигрупою, наприклад, бензилоксигрупою, у якій COR<sup>2</sup> представляє естер. Такі естери можуть бути введені у реакцію із засобом позбавлення захисту, наприклад, гідролізувальним засобом, наприклад, гідроксидом літію у суміші ТГФ і води, при температурі 0-100°C, з одержанням сполуки формули I.

Сполуки формули II можна отримувати реакцією S-енантіомеру сполуки формули III



де R<sup>2</sup> визначено вище, з сполукою формули IV.



IV

де R<sup>1</sup> визначено вище, у інертному розчині, наприклад, ДХМ, у присутності засобу сполучення, наприклад, карбодііміду, наприклад, 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодііміду, і, як варіант, у присутності каталізатору, наприклад, основного каталізатору, наприклад, 4-диметиламінопіридину, при температурі від -25°C до 150°C.

Сполуки формул III і IV можна отримувати способами, описаними у Прикладах або подібними способами, відомими фахівцям.

Сполуки формул II і III можуть бути корисними як інтермедіати при отриманні сполуки формули I, вважаються новими і розглядаються як ще один аспект винаходу. Бажаними є S-енантіомери сполуки формул II і III. Сполуки винаходу можуть бути виділені з реакційних сумішей звичайними способами.

Для фахівця зрозуміло, що для одержання сполуки винаходу в інший, а у деяких випадках більш зручний спосіб, описані вище окремі етапи процесу отримання можуть бути виконані у іншому порядку і/або окремі реакції можуть бути проведені на інших етапах процесу (тобто хімічні перетворення можуть бути проведені з інтермедіатами, відмінними від зазначених вище для цієї реакції).

Вираз "інертний розчинник" стосується розчину, який не реагує з вихідними матеріалами, реагентами, інтермедіатами або продуктами, що може шкідливо вплинути на вихід бажаного продукту.

#### Фармацевтичні препарати

Сполуки винаходу вводять пацієнту перорально, парентерально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або іншим шляхом ін'єкції, букально, ректально, вагінально, трансдермально і/або через ніс, і/або інгаляцією, у формі фармацевтичної композиції, яка містить активний інгредієнт у вигляді вільної кислоти або фармацевтично прийнятної органічної або неорганічної основно-адитивної солі у фармацевтично прийнятній дозованій формі. Композиції можна вводити у змінних дозах залежно від розладу і пацієнта, що одержує лікування.

Придатні денні дози сполуки винаходу при терапевтичному лікуванні людини становлять приблизно 0,0001-100мг/кг маси тіла, бажано 0,001-10мг/кг маси тіла.

Бажаними пероральними формами є, зокрема, таблетки або капсули, які можуть бути виготовлені відомими способами і містять дози активної сполуки у межах від 0,5мг до 500мг, наприклад, 1мг, 3мг, 5мг, 10мг, 25мг, 50мг, 100мг і 250мг.

Подальшим об'єктом винаходу є фармацевтичні композиції, що включають будь-які сполуки винаходу або їх фармацевтично прийнятні похідні, у суміші з фармацевтично прийнятними ад'ювантами, розріджувачами і/або носіями.

#### Фармацевтичні властивості

Сполуки формули (I) можуть бути використані

для профілактики і/або лікування клінічних станів, пов'язаних з природною або набутою зниженою чутливістю до інсуліну (резистентність до інсуліну) і асоційованими метаболічними розладами (відомими також як метаболічний синдром). Ці клінічні стани включають (але без обмеження) загальне ожиріння, абдомінальне ожиріння, артеріальну гіпертензію, гіперінсулінемію, гіперглікемію, діабет типу 2 і дисліпідемію, яка звичайно супроводжує резистентність до інсуліну. Ця дисліпідемія, відома також як атерогенний ліпопротеїновий профіль, характеризується помірним підвищенням рівня неестерифікованих жирних кислот, багатих на тригліцерид часток ліпопротеїну дуже низької густини (ЛДНГ), високими рівнями Аро В, низкими рівнями ліпопротеїну високої густини, пов'язаними з низкими рівнями частинок ароАІ, і високими рівнями Аро В у присутності невеликих компактних частинок ліпопротеїнів низької густини, фенотипу В.

Сполуки винаходу, як вважають, можуть використовуватись для лікування пацієнтів з комбінованими або змішаними гіперліпідеміями або різними рівнями гіпертригліцеридемії і післяобідньої дисліпідемії, і з іншими проявами метаболічного синдрому або без них.

Можна сподіватись, що застосування сполук винаходу знизить серцево-судинну захворюваність і смертність, пов'язані з атеросклерозом, завдяки їх антидисліпідемічним і протизапальним властивостям. Серцево-судинні хворобливі стани включають макроангіопатії різних внутрішніх органів, які є причиною інфаркту міокарду, застійної серцевої недостатності, цереброваскулярної хвороби і периферійної артеріальної недостатності кінцівок. Вважається також, що завдяки підвищенню чутливості до інсуліну сполуками формули I ці сполуки відвернуть або затримують розвиток діабету типу 2 з метаболічного синдрому і діабету вагітності. Отже, можна сподіватись на затримання розвитку довготривалих ускладнень, пов'язаних з хронічною гіперглікемією при цукровому діабеті, наприклад, мікроангіопатій, які викликають ниркові захворювання, пошкодження сітківки і захворювання периферійних судин нижніх кінцівок. Крім того, ці сполуки можуть бути корисними при лікуванні різних станів, не пов'язаних з серцево-судинною системою або з резистентністю до інсуліну, як-то полікістозний яєчниковий синдром, ожиріння, рак і запальні хвороби, включаючи нейродегенеративні розлади, наприклад, помірне порушення розпізнавальної здатності, хворобу Альцгеймера, хворобу Паркінсона і множинний склероз.

Можна сподіватись, що сполуки винаходу можуть бути корисними для контролю рівнів глюкози у пацієнтів, що страждають від діабету типу 2.

Винахід охоплює спосіб лікування і профілактики дисліпідемій, синдрому резистентності до інсуліну і/або метаболічних розладів (згаданих вище), який полягає в введенні сполуки формули I ссавцю (зокрема, людині), що потребує цього.

Винахід охоплює спосіб лікування або профілактики діабету типу 2, який полягає в введенні ефективної кількості сполуки формули I ссавцю

(зокрема, людині), що потребує цього.

Згідно з іншим аспектом, винахід охоплює сполуки формули I як медикамент.

Згідно з подальшим аспектом, винахід охоплює використання сполуки формули I у виготовленні медикаменту для лікування резистентності до інсуліну і/або метаболічних розладів.

Комбінована терапія

Сполуки винаходу можна комбінувати з іншими терапевтичними засобами, корисними для лікування розладів пов'язаних виникненням і перебігом атеросклерозу, наприклад, гіпертензії, гіперліпідемії, дисліпідемії, діабету і ожиріння. Сполуки винаходу можна комбінувати з іншими терапевтичними засобами, які знижують відношення ЧНГ/ЧВГ або з засобами, що викликають зниження рівнів циркуляції ЧНГ-холестеролу. Для пацієнтів з цукровим діабетом сполуки винаходу можна також комбінувати з терапевтичними засобами, призначеними для лікування ускладнень, пов'язаних з мікроангіопатіями.

Сполуки винаходу можна використовувати разом з іншими терапіями для лікування метаболічного синдрому або діабету типу 2 і пов'язаних з ним ускладнень, включаючи бігуанідні ліки, наприклад, метморфін, фенморфін і буформін, інсулін (синтетичні аналоги інсуліну, амілін) і оральні антигіперглікеміки (їх розділяють на регулятори обідньої глюкози і інгібітори альфа-глюкозидази). Прикладами інгібітору альфа-глюкозидази є акарбоза або воглібоза, або мігітол. Прикладом регуляторів обідньої глюкози є репаглінід або натеглінід.

Згідно з іншим аспектом винаходу, сполуку формули I, або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, сольват такої солі або проліки можна вводити разом з іншим модулятором АППР, включаючи (без обмеження) агоністи АППР $\alpha$  і/або АППР $\gamma$ , або з їх фармацевтично прийнятними солями, сольватами, сольватами таких солей або їх проліками. Фахівцям добре відомі придатні агоністи АППР $\alpha$  і/або АППР $\gamma$ , їх фармацевтично прийнятні солі, сольвати, сольвати таких солей або проліки. Прикладами є сполуки, [описані у WO 01/12187, WO 01/12612, WO 99/62870, WO 99/62872, WO 99/62871, WO 98/57941, WO 01/40170, J Med Chem, 1996,39, 665, Expert Opinion on Therapeutic Patents, 10 (5), 623-634 (зокрема заявка на стор.634) і J Med Chem, 2000, 43, 527], включені посиланням. Зокрема, агоністами АППР $\alpha$  і/або АППР $\gamma$  є MN622/Ragaglitazar, BMS 298585, WY-14643, клофібрат, фенофібрат, безафібрат, гемфіброзил і ципрофібрат; GW 9578, циглітазон, троглітазон, піоглітазон, розиглітазон, еглітазон, проглітазон, BRL-49634, KRP-297, JTT-501, SB 213068, GW 1929, GW 7845, GW 0207, L-796449, L-165041 і GW 2433. Зокрема, агоністами АППР $\alpha$  і/або АППР $\gamma$  є (S)-2-етокси-3-[4-(2-{4-метансульфонілоксифеніл}етокси)-феніл]-пропанова кислота і її фармацевтично прийнятні солі.

Згідно з винаходом, комбіноване лікування можна проводити у сполученні з сульфонілмочевиною, наприклад, глімепіридом, глібенкламідом (глібуридом), гліклазидом, гліпізидом, гліхідоном, хлорпропамідом, толбутамідом, асетогек-

самідом, глікопірамідом, карбутамідом, глібониридом, глізоксеридом, глібутіазолом, глібузолом, глігексамідом, глімідіном, гліпінамідом, фенбутамідом, толциламідом і толазамідом. Бажаною сульфонілмочевиною є глімепірид або глібенкламід (глібурид). Найкращою сульфонілмочевиною є глімепірид. Отже, винахід охоплює застосування сполуки винаходу разом з однією, двома або більше терапіями, зазначених вище. Дозування для інших існуючих терапій для лікування діабету типу 2 і пов'язаних з ним ускладненнями є відомим фахівцям і схвалюється регулюючими органами, наприклад, FDA і можуть бути знайдені у Orange Book від FDA. Перевагою комбінованого лікування є можливість застосовувати менші дози. Винахід охоплює також сполуку винаходу у комбінації з знищуючими холестерол засобами, які включають (без обмеження) інгібітори HMG-CoA-редуктази (редуктази співферменту 3-гідрокси-3-метилглютарилу). Прикладом інгібітору HMG-CoA-редуктази є статин, вибраний з групи, яку складають аторвастатин, бервастатин, церивастатин, дальвастатин, флувастатин, ітавастатин, ловастатин, мевастатин, нікостатин, нівастатин, провастатин і симвастатин, або їх фармацевтично прийнятні солі, зокрема, солі натрію і кальцію, або їх сольвати, або сольвати таких солей. Зокрема, статином є аторвастатин або його фармацевтично прийнятна сіль, сольват, сольват такої солі або відповідні проліки. Бажаним статином є аторвастатинова сіль кальцію, найкращим же статином є сполука (E)-7-[4-(4-флуорфеніл)-6-ізопропіл-2-[метил(метилсульфоніл)-аміно]-піримидин-5-іл](3R,5S)-3,5-дигідроксигепт-6-енойна кислота, [відома також як (E)-7-[4-(4-флуорфеніл)-6-ізопропіл-2-[N-метил-N-(метилсульфоніл)-аміно]-піримидин-5-іл](3R,5S)-3,5-дигідроксигепт-6-енойна кислота] або її фармацевтично прийнятна сіль або сольват, або сольват такої солі. (E)-7-[4-(4-флуорфеніл)-6-ізопропіл-2-[метил(метилсульфоніл)-аміно]-піримидин-5-іл](3R,5S)-3,5-дигідроксигепт-6-енойну кислоту, і її кальцієву і натрієву солі [описано у Європейській заявці EP-A-0521471, і у Bioorganic and Medicinal Chemistry, (1997), 5(2), 437-444]. Останній статин відомий також як розувастатин.

У цій заявці термін "засіб, що знижує рівень холестерину" охоплює також хімічні модифікації інгібіторів HMG-CoA-редуктази, наприклад, естери, проліки і метаболіти, активні або неактивні.

Винахід також охоплює сполуку винаходу у комбінації з інгібітором транспортної системи жовчної кислоти клубової кишки (інгібітор ТЖККК).

Сполуки-інгібітори IBAT були описані; [див., наприклад, WO 93/16055, WO 94/18183, WO 94/18184, WO 96/05188, WO 96/08484, WO 96/16051, WO 97/33882, WO 98/07449, WO 98/03818, WO 98/38182, WO 99/32478, WO 99/35135, WO 98/40375, WO 99/35153, WO 99/64409, WO 99/64410, WO 00/01687, WO 00/47568, WO 00/61568, WO 00/62810, WO 01/68906, DE 19825804, WO 00/38725, WO 00/38726, WO 00/38727, WO 00/38728, WO 00/38729, WO 01/68906, WO 01/66533, WO

02/32428, WO 02/50051, EP 864 582, EP 489423, EP 549967, EP 573848, EP 624593, EP 624594, EP 624595 і EP 624596]. Зміст цих заявок включено посиланням.

Зокрема, класами інгібіторів ТЖККК, придатними для використання згідно з винаходом є бензотієпіні і сполуки, описані у Формулі винаходу, зокрема, у п.1 Формули [WO 00/01687, WO 96/08484 і WO 97/33882], включених посиланням. Іншими придатними класами інгібіторів ТЖККК є 1,2-бензотіазепіні, 1,4-бензотіазепіні і 1,5-бензотіазепіні. Придатними класами інгібіторів ТЖККК є також 1,2,5-бензотіадіазепіні.

Конкретними сполуками-інгібіторами ТЖККК є:

(3R,5R)-3-бутил-3-етил-1,1-діоксид-5-феніл-2,3,4,5-тетрагідро-1,4-бензотіазепін-8-іл β-D-глюкопіранозидуронова кислота (EP 864 582).

Іншими інгібіторами ТЖККК є:

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-1'-феніл-[N'-(карбоксиметил)-карбамоїл]метил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(карбоксиметил)карбамоїл]-4-гідроксибензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-1'-феніл-1'-[N'-(2-сульфое-тил)карбамоїл]метил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-бутил-3-етил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-1'-феніл-1'-[N'-(2-сульфое-тил)карбамоїл]метил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(2-сульфоетил)карбамоїл]-4-гідроксибензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-бутил-3-етил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(2-сульфоетил)карбамоїл]-4-гідроксибензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-бутил-3-етил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(2-карбоксіетил)-карбамоїл]-бензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(2-карбоксіетил)карбамоїл]-4-гідроксибензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-бутил-3-етил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(5-карбоксипентил)-карбамоїл]бензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3,3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-((R)-α-[N'-(2-карбоксіетил)-карбамоїл]бензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-дибутил-5-феніл-7-метилтіо-8-(N-α-[N'-(2-сульфоетил)карбамоїл]-2-флуорбензил}карбамоїлметокси)-2,3,4,5-тетрагідро-1,5-бензотіазепін;

1,1-діоксо-3-бутил-3-етил-5-феніл-7-метилтіо-



Згідно з ще одним аспектом, в рамки винаходу входить комбіноване лікування, яке полягає в уведенні ефективною кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків, як варіант, разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, з одночасним, послідовним або окремим введенням одного або більше засобів, вибраних з групи, яку складають:

інгібітор БПХЕ (білок переносу холестеринового естеру), наприклад, згаданий і [описаний у документі WO 00/38725 стор.7 ряд.22 - стор.10, ряд.17], включеному посиланням;

антагоніст абсорбції холестеролу, наприклад, ацетидинони, наприклад, SCH 58235 і [описані у документі US 5 767 115], включеному посиланням;

інгібітор БМП (білок мікросомного переносу), наприклад, [описаний у Science, 282, 751-54, 1998], включений посиланням;

похідне нікотинової кислоти, включаючи продукти з уповільненим вивільненням і комбіновані продукти, наприклад, нікотинова кислота (ніацин), ацимпокс і ніцеритрол;

фітостерольна сполука, наприклад, етаноли; пробукол;

сполука проти ожиріння, наприклад, орлістат [EP 129748] і сибутрамін [GB 2 184 122 і US 4 929 629];

антигіпертензивна сполука, наприклад, інгібітор ферменту перетворення ангіотензину (KEA), антагоніст рецептору ангіотензину, андренергічний блокатор, альфа-андренергічний блокатор, бета-андренергічний блокатор, змішаний альфа/бета андренергічний блокатор, андренергічний стимулятор, блокатор каналу кальцію, блокатор AT-1, салуретик, діуретик або судинорозширювальний засіб;

антагоніст або інверсний антагоніст CB1, наприклад, [описаний у WO01/70700 і EP 65635];

антагоніст гормону концентрування меланіну (ГКМ);

інгібітор PDK; або

модулятори ядерних рецепторів, наприклад, LXR, FXR, RXR, і ROR-альфа; або їх фармацевтично прийнятні солі, сольовати, сольовати таких солей або проліки, як варіант, разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, теплокровній тварині, наприклад, людині, що потребує такого терапевтичного лікування.

Інгібітори KEA або їх фармацевтично прийнятні солі, сольовати, сольовати таких солей або проліки, включаючи активні метаболіти, які можна використовувати у комбінації з сполуками формули I, включаючи (без обмеження) такі сполуки: алацеприл, алатриоприл, алтіоприл кальцію, анковенін, беназеприл, беназеприлгідрохлорид, беназеприлат, бензоілкаптоприл, каптоприл, еаптоприл-цистеїн, капттрил-глутатіон, церанаприл, цераноприл, цернаприл, цилізаприл, цилазаприлат, делаприл, делаприл-дикислота, еналаприл, еналаприлат, енаприл, епікаптоприл, фороксимітин, фостеноприл, фосеноприл, фосеноприл натрію, фосиноприл, фосиноприл натрію, фосиноприлат, фосиноприлова кислота, глікоприл, геморфін-4, ідраприл, імідаприл, індолаприл,

індолаприлат, лібензаприл, лізиноприл, ліціумін А, ліціумін В, міксанприл, моекзиприл, моекзиприлат, мовелтиприл, мурацеїн А, мурацеїн В, мурацеїн С, пентоприл, периндоприл, периндоприлат, півалоприл, півоприл, хінаприл, хінаприлгідрохлорид, хінаприлат, раміприл, раміприлат, спіраприл, спіраприлгідрохлорид, спіраприлат, спіроприл, спіроприлгідрохлорид, темокаприл, темокаприлгідрохлорид, тепротид, трандолаприл, трандолаприлат, утабаприл, забіциприл, забіциприлат, зофеноприлі і зофеноприлат. Бажаними інгібіторами KEA згідно з винаходом є раміприл, раміприлат, лізиноприл, еналаприл і еналаприлат. Найкращими інгібіторами KEA є раміприл і раміприлат.

Бажані антагоністи ангіотензину II, їх фармацевтично прийнятні солі, сольовати, сольоват таких солей або проліки, придатні для комбінування з сполуками формули I, включають (але без обмеження) такі сполуки: кандезартан, кандезартанцілексетил, лосартан, вальзартан, ірбезартан, тазозартан, тельмізартан і епрозартан. Більш бажаними антагоністами ангіотензину I або їх фармацевтично прийнятними похідними, згідно з винаходом, є кандезартан і кандезартанцілексетил.

Отже, винахід охоплює також спосіб лікування діабету типу 2 і пов'язаних з ним ускладнень у теплокровній тварині, наприклад, людини, що потребують такого лікування, який полягає в уведенні зазначеній тварині ефективною кількістю сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків з одночасним, послідовним або роздільним застосуванням з ефективною кількістю одної іншої сполуки, описаної у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків.

Винахід охоплює також спосіб лікування гіперліпідемічних станів у теплокровній тварині, наприклад, людини, що потребують такого лікування, який полягає в уведенні зазначеній тварині ефективною кількістю сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків з одночасним, послідовним або роздільним застосуванням з ефективною кількістю іншої сполуки, описаної у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків.

Іншим аспектом винаходу є фармацевтична композиція, яка містить сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, сольват такої солі або проліки, і одну з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм.

Згідно з ще одним аспектом, в рамки винаходу входить комплект, який містить сполуку формули I або фармацевтично прийнятну сіль, сольват, сольват такої солі або проліки, і одну з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольовату, сольовату такої солі або проліків.

Згідно з подальшим аспектом, в рамки винаходу входить комплект, який містить:

а) сполуку формули I або фармацевтично прийнятну сіль, сольват, сольват такої солі або проліки, у першій одиничній дозованій формі;

б) одну з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її проліки у другій одиничній дозованій формі; і

с) контейнерний засіб для зберігання зазначених першої і другої одиничних дозованих форм.

Згідно з іншим аспектом, в рамки винаходу входить комплект, який містить:

а) сполуку формули I або її фармацевтично прийнятну сіль, сольват, сольват такої солі або проліки, разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, у першій одиничній дозованій формі;

б) одну з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її проліки у другій одиничній дозованій формі; і

с) контейнерний засіб для зберігання зазначених першої і другої одиничних дозованих форм.

Винахід охоплює також використання сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольватів, сольватів такої солі або проліків, і однієї з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату, сольвату такої солі або проліків, у виготовленні медикаменту, призначеного для лікування метаболічного синдрому або діабету типу 2 і пов'язаних з ним ускладнень у теплокровної тварини, наприклад, людини.

Згідно з іншим аспектом, винахід охоплює використання сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольватів, сольватів такої солі або проліків, і однієї з інших сполук, описаних у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату, сольвату такої солі або проліків, у виготовленні медикаменту, призначеного для лікування гіперліпідемічних станів у теплокровної тварини, наприклад, людини.

Згідно з ще одним аспектом, винахід охоплює комбіноване лікування, яке полягає в введенні ефективної кількості сполуки формули I або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату, сольвату такої солі або проліків, як варіант, разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, з одночасним, послідовним або роздільним застосуванням ефективної кількості іншої сполуки, описаної у цьому розділі, або її фармацевтично прийнятної солі, сольвату, сольвату такої солі або проліків, як варіант, разом з фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, теплокровній тварині, наприклад, людині, що потребує такого лікування.

#### Приклади

Вимірювання  $^1\text{H}$  ЯМР і  $^{13}\text{C}$  ЯМР виконано на спектрометрах Varian Mercury 300 або Varian UNITY plus 400, 500 або 600, на частотах  $^1\text{H}$  300, 400, 500 і 600 МГц, відповідно, і на частотах  $^{13}\text{C}$  75,100,125 і 150 МГц, відповідно. Вимірювання були проведені на дельта-шкалі (δ).

Якщо не визначено інше, хімічні зсуви наведено умлн- $^1$  відносно розчиннику як внутрішнього стандарту.

Абревіатури

ДМСО - диметилсульфоксид

ТГФ - тетрагідрофуран

Pd/C - паладій на вугіллі

ДМАП - диметиламінопіридин

t триплет

s синглет

d дублет

q кватрет

m мультиплет

bs широкий синглет

dm дублет мультиплету

bt широкий триплет

dd дублет дублету

Приклад 1

(2S)-3-(4-{2-[бензил(гексил)аміно]1-2-

оксоетокси]феніл)-2-етоксипропанова кислота

(i) Етил (2S)-3-{4-[2-(бензилокси)-2-оксоетокси]феніл}-2-етоксипропаноат

До розчину етил (2S)-2-етокси-3-(4-гідроксифеніл)пропаноату (23,8г, 100ммоль, отриманого [згідно з WO 99/62872]) у ацетонітрилі (200мл) додають безводний карбонат калію (31,9г, 231ммоль) і потім бензилбромацетат (17,4мл, 110ммоль) і реакційну суміш витримують під зворотним холодильником протягом ночі. Реакційну суміш залишають охолонути до кімнатної температури, нерозчинні солі відфільтровують і розчин концентрують у вакуумі. Залишок вносять у етилацетат (300мл), і органічну фазу промивають водним натрій гідрокарбонатом (3×100мл) і розсоллом (100мл), сушать безводним магній сульфатом і концентрують у вакуумі. Очищення на силікагелі метиленхлоридом як елюентом і збирання чистих фракцій дають 22,4г (58%) жовтого масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 1,16 (t, 3H), 1,22 (t, 3H), 2,93-2,97 (m, 2H), 3,35 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 4,16 (q, 2H), 4,64 (s, 2H), 5,23 (s, 2H), 6,82 (d, 2H), 7,15 (d, 2H), 7,32-7,39 (m, 5H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 14,3, 15,2, 38,6, 60,9, 65,6, 66,3, 67,0, 80,4, 114,6, 128,5, 128,6, 128,7, 130,6, 135,3, 156,7, 169,0, 172,6.

(ii) {4-[(2S)-2,3-діетокси-3-оксопропіл]фенокси}оцтова кислота

До розчину етил (2S)-3-{4-[2-(бензилокси)-2-оксоетокси]феніл}-2-етоксипропаноату (22,33г, 57,8ммоль) у щойно дистильованому ТГФ (290мл) додають Pd/C (10%, 3,1г) і реакційну суміш гідрогенують під атмосферним тиском при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш фільтрують через броунмілерит і фільтрат концентрують у вакуумі, одержуючи 16,6г (97%) світло-жовтого масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 1,15 (t, 3H), 1,21 (t, 3H), 2,93-2,98 (m, 2H), 3,35 (m, 1H), 3,60 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 4,16 (q, 2H), 4,65 (s, 2H), 6,84 (d, 2H), 7,17 (d, 2H), 8,48 (bs, 1H)

$^{13}\text{C}$  ЯМР (100МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 14,3, 15,1, 38,5, 61,0, 65,1, 66,4, 80,3, 114,6, 130,7, 130,9, 156,4, 172,7, 173,7

(iii) Етил (2S)-3-(4-{2-[бензил(гексил)аміно]-2-оксоетокси]феніл}-2-етоксипропаноат

До розчину {4-[(2S)-2,3-діетокси-3-оксопропіл]фенокси}оцтової кислоти (0,110г, 0,37ммоль) у метиленхлориді (3,7мл) додають N-гексилбензиламін (0,079г, 0,41ммоль) і ДМАП

(0,045г, 0,37ммоль) і потім гідрохлорид 1-етил-3-(3-диметил-амінопропіл)карбодііміду (0,071г, 0,37ммоль) і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш розбавляють метиленхлоридом (25мл), і органічну фазу промивають 5%-ю HCl (3×25мл), водним натрій гідрокарбонатом (25мл) і розсоллом (25мл), сушать натрій сульфатом і концентрують у вакуумі. Очищення на пакетній колонці силікагелю (Isolute® SPE Column, 5г Si/25мл) з метанолом (0-1% градієнт) у метиленхлориді як елюентом дає 0,139г (80%) безбарвного масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,81-0,90 (m, 3H), 1,11-1,32 (m, 12H), 1,46-1,62 (m, 2H), 2,88-3,00 (m, 2H), 3,21-3,29 і 3,29-3,40 (2m, 3H, ротамери), 3,59 (m, 1H), 3,95 (m, 1H), 4,10419 (m, 2H), 4,60 і 4,61 (2s, 2H, ротамери), 4,65 і 4,73 (2s, 2H, фікс), 6,77 і 6,87 (2d, 2H, ротамери), 7,07-7,37 (m, 7H).

<sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 13,9, 14,2, 15,1, 22,5, 26,5, 27,1, 28,4, 31,4, 31,5, 38,4, 46,3, 46,5, 48,2, 50,5, 60,7, 66,1, 67,5, 67,8, 80,3, 114,4, 114,5, 126,6, 127,3, 127,6, 128,0, 128,5, 128,8, 130,2, 130,2, 130,4, 130,5, 136,6, 137,2, 156,8, 156,9, 168,0, 168,1, 172,4. (Кількість піків перевищує кількість атомів карбону внаслідок ротамерів)

(iv) (2S)-3-(4-{2-[бензил(гексил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-2-етоксипропанова кислота

До розчину етил (2S)-3-(4-{2-[бензил(гексил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-2-етокси-пропаноату (0,080г, 0,17ммоль) у ТГФ (8,6мл) додають 4,3мл 0,10М розчину LiOH і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш підкислюють 2М HCl і екстрагують етилацетатом (3×25мл). Об'єднану органічну фазу промивають розсоллом (25мл), сушать натрій сульфатом, і концентрують у вакуумі, одержуючи 0,068г (90%) безбарвного масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,80-0,92 (m, 3H), 1,11-1,18 (m, 3H), 1,18-1,33 (m, 6H), 1,46-1,63 (m, 2H), 2,87-3,11 (m, 2H), 3,20-3,30 і 3,32-3,45 (2m, 3H, ротамери), 3,61 (m, 1H), 4,01 (гл, 1H), 4,61 і 4,63 (2s, 2H, ротамери), 4,67 і 4,75 (2s, 2H, ротамери), 6,77 і 6,88 (2d, 2H, ротамери), 7,10-7,40 (m, 7H), 8,79 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,0, 15,1, 22,6, 26,6, 27,1, 28,4, 31,5, 31,5, 31,6, 38,1, 46,5, 46,6, 48,5, 50,7, 66,7, 67,4, 67,7, 79,9, 114,6, 114,7, 126,7, 127,5, 127,8, 128,2, 128,7, 129,0, 130,1, 130,1, 130,6, 130,7, 136,5, 137,0, 156,9, 157,0, 168,5, 168,6, 175,6. (Кількість піків перевищує кількість атомів карбону внаслідок ротамерів)

#### Приклад 2

(2S)-2-етокси-3-(4-{2-[гексил(2-фенілетил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-пропанова кислота

(i) Етил (2S)-2-етокси-3-(4-{2-[гексил(2-фенілетиламіно)-2-оксоетокси}феніл)пропаноат

До розчину {4-[(2S)-2,3-діетокси-3-оксопропіл]фенокси}оцтової кислоти (0,110г, 0,37ммоль) у метиленхлориді (3,7мл) додають N-гексил-2-фенілетиламін (0,080г, 0,39ммоль) і ДМАП (0,045г, 0,37ммоль) і потім 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодіімідгідрохлорид (0,071г, 0,37ммоль), і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Су-

міш розбавляють метиленхлоридом (25мл), і органічну фазу промивають 5%-ю HCl (3×25мл), водним натрій гідрокарбонатом (25мл) і розсоллом (25мл), сушать натрій сульфатом і концентрують у вакуумі. Очищення на пакетній колонці силікагелю (Isolute® SPE Column, 5г Si/25мл) з метанолом (0-1% градієнт) у метиленхлориді як елюентом дає 0,125г (70%) безбарвного масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,82-0,92 (m, 3H), 1,16 (t, 3H), 1,19-1,33 (m, 9H), 1,45-1,65 (m, 2H), 2,82-2,90 (m, 2H), 2,91-2,98 (m, 2H), 3,12-3,21 і 3,29-3,42 (2m, 3H, ротамери), 3,50-3,65 (m, 3H), 3,95 (m, 1H), 4,16 (q, 2H), 4,39 і 4,65 (2s, 2H, ротамери), 6,75 і 6,86 (2d, 2H, ротамери), 7,10-7,34 (m, 7H).

<sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,0, 14,1, 14,3, 15,1, 22,6, 26,5, 26,7, 27,4, 29,0, 31,5, 31,6, 33,9, 35,3, 38,5, 45,9, 48,1, 48,3, 48,9, 60,8, 66,2, 67,5, 80,4, 114,5, 126,4, 126,9, 128,5, 128,9, 130,1, 130,2, 130,5, 130,5, 138,3, 139,2, 156,9, 157,0, 167,6, 167,8, 172,5 (Кількість піків перевищує кількість атомів карбону внаслідок ротамерів).

(ii) (2S)-2-етокси-3-(4-{2-[гексил(2-фенілетил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-пропанова кислота

До розчину етил (2S)-2-етокси-3-(4-{2-[гексил(2-фенілетил)аміно]-2-оксоетокси}феніл)-пропаноату (0,081г, 0,17ммоль) у ТГФ (8,6мл) додають 4,3мл 0,10М розчину LiOH і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш підкислюють 2М HCl і екстрагують етилацетатом (3×25мл). Об'єднану органічну фазу промивають розсоллом (25мл), сушать натрій сульфатом і концентрують у вакуумі, одержуючи 0,073г (96%) безбарвного масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,82-0,93 (m, 3H), 1,15 (t, 3H), 1,20-1,35 (m, 6H), 1,47-1,62 (m, 2H), 2,80-2,99 (m, 3H), 3,00-3,09 (m, 1H), 3,11-3,21 і 3,31-3,44 (2m, 3H, ретейнери), 3,50-3,67 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 4,40 і 4,66 (2s, 2H, ротамери), 6,75 і 6,85 (2d, 2H, ротамери), 7,10-7,35 (m, 7H), 8,86 (bs, 1H).

<sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,0, 14,1, 15,1, 22,6, 22,6, 26,6, 26,7, 27,3, 28,9, 31,5, 31,6, 33,8, 35,2, 38,1, 46,1, 48,3, 48,4, 49,0, 66,7, 67,4, 79,9, 114,6, 126,4, 127,0, 128,6, 128,9, 130,0, 130,1, 130,6, 130,7, 138,2, 139,1, 156,9, 157,0, 168,1, 168,2, 175,6 (Кількість піків перевищує кількість атомів карбону внаслідок ротамерів).

Біологічна активність

Композиції

Сполуки були розчинені у ДМСО для одержання 16М маточних розчинів. Перед аналізом маточні розчини розбавляли ДМСО і середовищами культури.

Загальні хімікати і реагенти

Реагент для люциферазного аналізу був придбаний від Packard, USA. Рестрикційні ферменти - від Boehringer and Vent, полімераза - від New England Biolabs.

Клітинні лінії і умови для культур клітин

U2-OS (остеогенна саркома людини) була придбана від ATCC, USA, клітини були розширені і повторно заморожені порціями з проходу 6. Культуру клітин вирощували у модифікованому се-

редовищі Dulbecco's Eagle (DMEM) з 25мМ глюкози, 2мМ глютаміну або 4мМ L-аланін-L-глютаміну, 10% сироватки зародка теляти при 5% CO<sub>2</sub>. Використовували буферований фосфатом розсіл (PBS) без додання кальцію або магнію. Всі реагенти для культури клітин - від Gibco (USA) і 96-коміркові планшети для культур - від Wallach.

Плазмідні констракти для гетерологічної експресії

Була застосована стандартна процедура рекомбінантної ДНК, описана у Ausubel (7). Репортерний вектор люциферази, рGLSUAS (клон складається з 5 копій зв'язуючої послідовності GAM

ДНК,

5'-

CGACGGAGTACTGTCCTCCGAGCT-3') був клонованої у сайти SacI/XhoI рGL3-Promoter (Promega). Фрагмент SacI/XhoI, що несе сайти UAS, був конструкований з використанням гібридизованих олігонуклеотидів, що перекриваються. Вектори експресії базуються на рSG5 (Stratagene). Всі вектори містять фрагмент EcoRI/NheI, який кодує зв'язуючий домен ДНК GAL4 (кодує позиції 1-145 амінокислот з номером входу бази даних P04386) з подальшим злиттям у рамці з фрагментом, що кодує ядерну локалізаційну послідовність від антигену T Polyoma Virus. Ця послідовність конструкована з використанням гібридизованих охолодженням олігонуклеотидів, що перекриваються, і створює клейкі кінці NheI/KpnI (5'-CTAGCGCTCCTAGAAAGAAACGCAAGGTTGGTAC-3'). Зв'язуючі ліганд домени від АППР $\alpha$  людини і миші і АППР $\gamma$  людини і миші були PCR-ампліфіковані як фрагменти KpnI/BamHI і клоновані у рамці у домен, що зв'язує GAL4 ДНК і ядерну локалізаційну послідовність. Послідовність всіх плазмідних констрактів була підтверджена секвенсуванням. Для перехідних трансфекцій були використані такі вектори експресії.

Вектор	Субтип кодованої АППР	Тип послідовності 1
pSGGALhPPa	АППР $\alpha$ людини	S74349, nt 625-1530
pSGGALmPPa	АППР $\alpha$ миші	X57638, nt 668-1573
pSGGALhPPg	АППР $\gamma$ людини	U63415, nt 613-1518
pSGGALmPPg	АППР $\gamma$ миші	U09138, nt 652-1577

<sup>1</sup> нуклеотидні позиції входів бази даних, використані для вираження домену, що зв'язує ліганди.

#### Перехідні транзакції

Заморожені групи клітин з прогону шість були розморожені і розширені до прогону 8 перед трансфекцією. Злиті клітини були трипсинізовані, промиті і гранульовані у центрифугу при 270хg протягом 2хвил. Клітинні гранули були ресуспендовані у холодному БФФР (буферованому фосфатом фізіологічному розчині) до концентрації клітин приблизно 18×10<sup>6</sup>клітин/мл. Після додавання ДНК суспензію інкубували на льоду протягом приблизно 5хвил. перед електропорацією при 230В, 960пкф у Biorad's Gene Pulser™ у 0,5мл зразках. До кожного зразка були додані 50мкг ДНК, включаючи 2,5мкг вектору експресії, 25мкг репортерного вектора і 22,5мкг неспецифічної ДНК (pBluescript, Stratagene).

Після електропорації клітини були розбавлені до концентрації 320'000клітин/мл у DMEM без фенольного червоного, і у 96-коміркових планшетах були посіяні приблизно 25'000клітин/комірку. Для відновлення клітин засіяні планшети були інкубовані при 37°C протягом 3-4год. перед доданням тест-сполуки. У аналізах для АППР $\alpha$  клітинне середовище доповнюють десорбованою зі смоли-вугілля сироваткою зародка теляти (СЗТ), щоб уникнути фонового активування компонентами жирних кислот СЗТ. Цю СЗТ одержували таким чином: на 500мл активованої нагріванням СЗТ додають 10г вугілля і 25г Bio-Rad Analytical Grade Anion Exchange Resin 200-400 mesh і розчин витримують з магнітним перемішуванням при кімнатній температурі протягом ночі. Наступного дня СЗТ центрифугують і повторюють процедуру обробки протягом 4-6 годин. Після другої обробки СЗТ центрифугують і фільтрують через стерильний фільтр, щоб видалити залишки вугілля та смоли.

#### Процедура аналізу

Маточні розчини сполуки у ДМСО розбавляють до належної концентрації у основних планшетах. Сполуки з основних планшетів розбавляють у середовищі культури для отримання розчину тест-сполуки для кінцевих доз.

Після корекції кількості клітинного середовища до 75мкл у кожній комірці додають 50мкл розчину тест-сполуки. Тимчасово трансфіковані клітини піддають дії сполуки протягом приблизно 24год. перед проведенням аналізу виявлення люциферази. Для цього аналізу додають 100мкл аналітичного реагенту до кожного комірки і планшети залишають приблизно на 20хвил. для забезпечення лізису клітин. Після лізису вимірюють активність люциферази лічильником 1420 Multiwell counter, Victor, від Wallach.

#### Еталонні сполуки

Для активування АППР $\gamma$  як людини, так і миші, як еталонну речовину використовували TZD-піоглітазон. Для активування АППР $\alpha$  людини і миші як еталонну речовину використовували 5, 8, 11, 14-ейкозатетраіонову кислот (ЕТІК).

#### Обчислення і аналіз

Для обчислення значень ЕС<sub>50</sub> була побудована крива залежності "концентрація-відгук". Необхідні значення одержували усередненням двох-трьох незалежних вимірювань (після віднімання середнього фонового значення) і репрезентували як процент від максимального активування еталонною сполукою. Значення наносили на графік як функцію логарифма концентрації тест-сполуки. Значення ЕС<sub>50</sub> оцінювали лінійною інтерполяцією між точками даних і обчисленням концентрації, потрібної для одержання 50% максимального активування еталонною сполукою.

Сполуки формули I мають ЕС<sub>50</sub> нижче 0,5мкмоль/л, а бажані сполуки - нижче 0,05мкмоль/л для АППР $\alpha$ . Сполуки формули I є обраною групою сполук, які виявляють більш потужну дію на АППР $\alpha$ , ніж на АППР $\gamma$ . Вважається, що таке співвідношення є важливим, оскільки характеризує фармакологічну активність сполук і їх терапевтичний профіль.

Крім того, сполуки винаходу мають поліпшені

якості щодо метаболізму ліків і фармакокінетики, наприклад, вони виявляють поліпшену метаболічну стабільність *in vitro*, а також сприятливу реак-

цію на дозу *in vivo*. Сполуки також мають багатообіцяючий токсикологічний профіль.