



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76309** (13) **C2**

(51) МПК (2006)

C07D 277/04 (2006.01)**C07D 207/04** (2006.01)**C07D 295/18** (2006.01)**A61K 31/395****A61K 31/41****A61P 3/10** (2006.01)**A61P 3/04** (2006.01)**A61P 19/02** (2006.01)**A61P 37/00****A61P 35/00****A61P 25/00****A61P 17/00**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ІНГІБІТОРИ ДПІВ НА ОСНОВІ ГЛЮТАМІНІЛУ

1

(21) 20040907210

(22) 27.06.2002

(24) 17.07.2006

(86) РСТ/ЕР02/07124, 27.06.2002

(31) 60/360,909

(32) 28.02.2002

(33) US

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Демут Ганс-Ульріх, DE, Гоффманн Торстен, DE, Гайзер Ульріх, DE

(73) ПРОЗІДІОН ЛІМІТЕД, GB

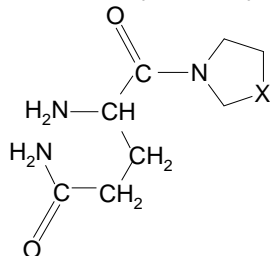
(56) WO, 99/61431, A1, 1999

XP001007983, Demuth, H.-D. ET AL, Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, Vol.320, P. 23-27

DD, 295 075, A5, 1991

WO, 95/15309, A1, 1995

(57) 1. Сполука формули:

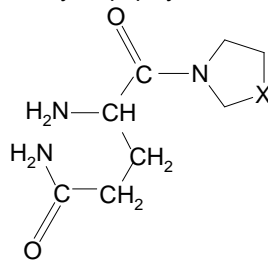
де $X=CH_2$ або S, або її сіль приєднання.

2. Сполука за п. 1, де адитивну сіль вибирають з групи, в яку залучено солі гідрохлоридної, гідробромідної, перхлоратної, сульфатної, нітратної, фосфатної, оцтової, пропіонової, гліколевої, молочної, бурштинової, малеїнової, фумарової, яблуч-

2

ної, винної, лимонної, бензойної, мигдалевої, метансульфонової, гідроксіетансульфонової, бензолсульфонової, щавлевої, памової, 2-нафталінсульфонової, п-толуолсульфонової, циклогексансульфамової, саліцилової, сахаринової та трифлуороцтової кислот.

3. Сполука за п. 1 або п. 2, яка є адитивною сіллю сполуки формули:



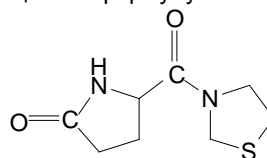
де $X=CH_2$ або S; а адитивну сіль вибирають з групи, в яку залучено солі гідрохлоридної, гідробромідної, перхлоратної, нітратної, пропіонової, гліколевої, молочної, малеїнової, яблучної, лимонної, бензойної, мигдалевої, метансульфонової, гідроксіетансульфонової, бензолсульфонової, щавлевої, памової, 2-нафталінсульфонової, п-толуолсульфонової, циклогексансульфамової, саліцилової, сахаринової та трифлуороцтової кислот.

4. Сполука за п. 3, вибрана з глутамінілтіазолідину гідрохлориду та глутамінілпіролідину гідрохлориду.

5. Сполука за п. 4, яка є глутамінілтіазолідину гідрохлоридом.

(13) **C2**(11) **76309**(19) **UA**

6. Сполука за п. 4, яка є глутамінілпіролідину гідрохлоридом.
7. Сполука за будь-яким одним з попередніх пунктів, яку застосовують для отримання медикаменту для інгібування активності дипептидилпептидази IV або подібних до дипептидилпептидази IV ферментів для попередження або лікування хвороб або станів, асоційованих з дипептидилпептидазою IV або подібними до дипептидилпептидази IV ферментами.
8. Сполука за п. 7 для зниження підвищених рівнів глюкози у крові у ссавців, які є результатом вживання їжі.
9. Сполука за пп. 7 або 8 для попередження або лікування незалежного від інсуліну цукрового діабету, артриту, ожиріння, імунних та аутоімунних розладів, алотрансплантації, раку, неврональних розладів та хвороб шкіри.
10. Сполука за п. 9 для попередження або лікування незалежного від інсуліну цукрового діабету.
11. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний носій та/або розріджувач і сполуку за будь-яким одним з попередніх пунктів.
12. Спосіб інгібування активності дипептидилпептидази IV або подібних до дипептидилпептидази IV ферментів для попередження або лікування хвороб або станів, асоційованих з дипептидилпептидазою IV або подібними до дипептидилпептидази IV ферментами, спосіб полягає у застосуванні до ссавця, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки або фармацевтичної композиції за одним з пп. 1-11.
13. Спосіб за п. 12 для застосування при зниженні рівнів глюкози у крові у ссавців, які є результатом вживання їжі.
14. Спосіб за пп. 12 або 13 для застосування при попередженні або лікуванні хвороб або станів, вибраних з групи, що складається з незалежного від інсуліну діабету, цукрового діабету, артриту, ожиріння, імунних та аутоімунних розладів, алотрансплантації, раку, неврональних розладів та хвороб шкіри.
15. Спосіб за п. 14 для застосування при попередженні або лікуванні незалежного від інсуліну цукрового діабету.
16. Продукт розкладання сполуки за пп. 1, 3 або 5, що має формулу



Представлений винахід стосується інгібування дипептидил-пептидази IV, а більш конкретно, стосується глутамініл-піролідину та глутамініл-тіазолідину, фармацевтичних композицій, що містять вказані сполуки, та застосування вказаних сполук при інгібуванні активності дипептидилпептидази IV та ферментів типу дипептидилпептидази IV.

Дипептидил-пептидаза IV (DPIV) є серин-протеазою, яка відщеплює N-термінальні дипептиди від пептидного ланцюга, що містить, переважно, проліновий залишок у передостанній позиції. Хоча біологічну роль DPIV у системах ссавців не встановлено повністю, можна вважати, вона грає важливу роль у нейропептидному метаболізмі, активації Т-клітин, приєднанні ракових клітин до ендотелію та вході ВІЛ у лімфоїдні клітини.

Подібно, виявлено, що DPIV є відповідною для інактивування глюкагон-подібного пептиду-1 (GLP-1) та залежного від глюкози інсулінотропного пептиду, також відомого як шлунково-інгібіторний пептид (GIP). Оскільки GLP-1 є головним стимулятором панкреатичної секреції інсуліну та має прямий корисний вплив на регуляцію глюкози, у WO 97/40832 та US 6303661 інгібування активності DPIV та DPIV-подібних ферментів показане як притягальний підхід, наприклад, для лікування незалежного від інсуліну цукрового діабету (NIDDM). Згідно з аспектом представленого винаходу запропоновано нові інгібітори DPIV, які є ефективними, наприклад, у лікуванні станів, опосередкованих інгібуванням DPIV та DPIV-подібних ферментів, фармацевтичні композиції, наприклад, корисні при інгібуванні DPIV та DPIV-подібних фе-

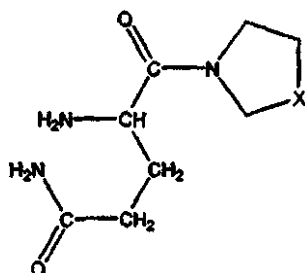
рментів, та спосіб інгібування вказаної активності ферментів. Згідно з другим аспектом винаходу запропоновано спосіб лікування, зокрема, спосіб лікування цукрового діабету, особливо незалежного від інсуліну діабету (NIDDM) або діабету типу 2 та станів, асоційованих з цукровим діабетом та композиції для застосування у такий спосіб.

Дипептидил-пептидаза IV (DPIV) є пост-проліновою (у меншому ступені пост-аланіновою, пост-сериновою або пост-гліциновою) відщеплюючою серин протеазою, знайденою у різних тканинах тіла, включаючи нирки, печінку та кишечник.

Відомо, що інгібітори DPIV можуть бути корисними для лікування порушеної толерантності до глюкози та цукрового діабету [Міжнародна патентна заявка, номер публікації WO 99/61431, Pederson RA et al, Diabetes. 1998 Aug; 47(8): 1253-8 та Pauly RP et al, Metabolism 1999 Mar; 48(3):385-9]. Зокрема, WO 99/61431 розкриває інгібітори DPIV, що містять амінокислотний залишок та групу тіазолідину або піролідину, та їх солі, особливо L-трео-ізолейцил-тіазолідин, L-ало-ізолейцил-тіазолідин, L-трео-ізолейцил-піролідин, L-алоізолейцил-тіазолідин, L-ало-ізолейцил-піролідин, та їх солі.

Наступними прикладами стосовно інгібіторів дипептидил-пептидази IV низької молекулярної маси є агенти, як-то інгібітори похідних тетрагідро-ізохінолін-3-карбоксаміду, N-заміщених 2-ціанопіролів та -піролідинів, N-(N'-заміщений гліцил)-2-ціанопіролідинів, N-(заміщений гліцил)-тіазолідинів, N-(заміщений гліцил)-4-ціанотіазолідинів, боронілу та конденсованих з циклопропілом піролідинів. Інгібітори дипептидил-

пептидази IV описано у US 6011155; US 6107317; US 6110949; US 6124305; US 6172081; WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19834591, WO 97/40832, DE 1961 486 C2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501, WO 99/46272, WO 99/38501, WO 01/68603, WO 01/40180, WO 01/81337, WO 01/81304, WO 01/55105 та WO 02/02560, зміст яких уведено як посилання у їх повноті стосовно інгібіторів, їх отримання та їх застосування. Представлений винахід стосується сполуки формули:



де $X=CH_2$ або S, або її фармацевтично прийнятної, солі.

Такі сполуки та їх відповідні фармацевтично прийнятні адитивні солі, є корисними у лікуванні станів, опосередкованих DPIP або DPIP-подібними ферментами, як-то артрит, ожиріння, імунні та аутоімунні розлади, алотрансплантація, рак, неврологічні розлади та хвороби шкіри.

Згідно з більш кращим втіленням сполуки представленого винаходу посилюють толерантність до глюкози зниженням підвищених рівнів глюкози у крові у реакції на пероральне стимулювання глюкозою, а відтак є корисними у лікуванні незалежного від інсуліну цукрового діабету.

Далі розуміти представлений винахід можна посилаючись на графіки:

Фіг.1 показує активність DPIP у плазмі у сироватці щурів Wistar після перорального та внутрішньосудинного застосування 100 мг/кг маси тіла глутамініл-піролідину;

Фіг.2 показує активність DPIP у плазмі у сироватці щурів Wistar після перорального та внутрішньосудинного застосування 100 мг/кг маси тіла глутамініл-тіазолідину;

Фіг.3 показує залежне від дози зниження рівнів глюкози у крові у діабетичних щурів Zucker після перорального застосування 5мг/кг, 15мг/кг, 50мг/кг маси тіла глутамініл-піролідину та плацебо, відповідно;

Фіг.4 показує залежне від дози зниження рівнів глюкози у крові у діабетичних щурів Zucker після перорального застосування 5мг/кг, 15мг/кг, 50мг/кг маси тіла глутамініл-тіазолідину та плацебо, відповідно;

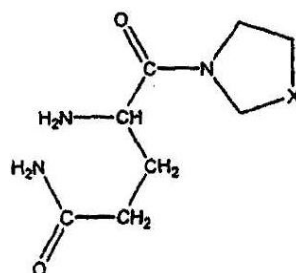
Фіг.5 показує хімічну структуру піроглутамініл-тіазолідину, продукту розкладання, знайденого після перорального застосування глутамініл-тіазолідину до щурів Wistar; а

Фіг.6 показує хроматограму екстракту плазми щурів, отриману після перорального застосування глутамініл-тіазолідину до жирних щурів Zucker. Пік на 2,95 хвилину представляє глутамініл-тіазолідин, а пік на 6,57 хвилину представляє піро-

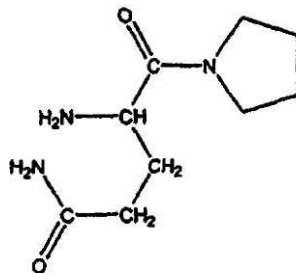
глутамініл-тіазолідин.

Представлений винахід стосується інгібування дипептидил-пептидази IV (DPIP), а більш конкретно, стосується глутамініл-піролідину та глутамініл-тіазолідину, фармацевтичних композицій, що містять вказані сполуки, та застосування вказаних сполук при інгібуванні DPIP та DPIP-подібної активності ферментів. Представлений винахід стосується нових інгібіторів DPIP, які є ефективними, наприклад, у лікуванні станів, опосередкованих інгібування DPIP, фармацевтичних композицій, наприклад, корисних при інгібуванні DPIP та DPIP-подібної активності ферментів та способу інгібування DPIP та DPIP-подібної активності ферментів.

Представлений винахід стосується сполуки формули:



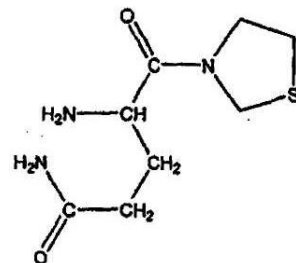
а особливо сполуки формули (I)



(I)

або фармацевтично її прийнятної солі.

Наступною кращою сполукою представленого винаходу є сполука формули II:



(II)

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Сполуки представленого винаходу можна перетворити у адитивні солі, особливо фармацевтично прийнятні кислотні-адитивні солі. Фармацевтично прийнятна сіль загалом має форму, в якій основний бічний ланцюг амінокислоти є протонуваним неорганічною або органічною кислотою.

Органічні або неорганічні кислоти залучають гідрохлоридну, гідробромідну, перхлоратну, сульфатну, нітратну, фосфатну, оцтову, пропіонову, гліколеву, молочну, бурштинову, малеїнову, фумарову, яблучну, винну, лимонну, бензойну, мигдальну, метансульфонову, гідроксіетансульфонову, бензолсульфонову, щавлеву, памову, 2-нафталінсульфонову, п-толуолсульфонову, циклогексансульфамову, саліцилову, сахаринову або трифлуороцтову кислоту. Усі форми фармацевтично прийнятних адитивних солей сполук представленого винаходу включено у рамки цього винаходу.

З огляду на близьку спорідненість між вільними сполуками та сполуками у формі їх солей, коли ж сполуку згадано у цьому контексті, відповідну сіль також мають на увазі, за умови, що це можливе або прийнятне у цих обставинах.

Представлений винахід стосується також проліків сполук цього винаходу. Взагалі, такі проліки повинні бути функціональними похідними сполук, які легко перетворюються *in vivo* у бажану терапевтично активну сполуку. Відтак, у цих випадках, способах лікування представленого винаходу, термін "застосування" стосується лікування різних описаних розладів пролікувальними варіантами одної або більше із заявлених сполук, але які перетворюються у вищезазначені конкретні сполуки *in vivo* після застосування до суб'єкта. Звичайні способи селекції та отримання придатних похідних проліків описано, наприклад, у ["Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard Elsevier, 1985 та патентні заявки DE 19828113, DE 19828114, WO 99/67228 та WO 99/67279 як є повністю наведено тут як посилання].

Коли сполуки згідно з цим винаходом мають принаймні один хіральний центр, вони можуть відповідно існувати як енантіомери. Коли сполуки мають два або більше хіральних центрів, вони можуть також існувати як діастереомери. Треба розуміти, що усі так ізомери та суміші їх охоплено рамками представленого винаходу. Далі, деякі з кристалічних форм сполук можуть існувати як поліморфи та як такі охоплені представленим винаходом. На додаток, деякі сполуки можуть утворювати сольвати з водою (тобто гідрати) або звичайними органічними розчинниками, і такі сольвати також охоплено рамками цього винаходу.

Сполуки, включаючи їх солі, можна також отримувати у формі їх гідратів, або залучають інші розчинники, використані для їх кристалізації.

Як вище зазначено, сполуки представленого винаходу, а особливо сполуки формул I та II, та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей, є корисними при інгібуванні активності DPIV та DPIV-подібного ферменту. Здатність сполук представленого винаходу та відповідних форм їх фармацевтично прийнятних адитивних солей до інгібування активності DPIV та DPIV-подібного ферменту можна показати аналізом активності DPIV для визначення величин K_i *in vitro* та у плазмі людини, як описано у прикладах 4 та 5. Величини K_i сполук представленого винаходу визначають для глутамініл-тіазолідину як $K_i=3,12 \cdot 10^{-7} \text{M} \pm 5,11 \cdot 10^{-10} \text{M}$ та для глутамініл-піролідину як $K_i=1,30 \cdot 10^{-7} \text{M} \pm 8,49 \cdot 10^{-9} \text{M}$ проти DPIV

свинячих нирок. Величини K_i сполук представленого винаходу визначають для глутамініл-тіазолідину як $K_i=4,03 \cdot 10^{-7} \text{M} \pm 2,19 \cdot 10^{-10} \text{M}$ після 5 хвилин $5,13 \cdot 10^{-7} \text{M} \pm 1,26 \cdot 10^{-8} \text{M}$ після 22 годин попереднього інкубування, та для глутамініл-піролідину як $K_i=1,30 \cdot 10^{-7} \text{M} \pm 4,89 \cdot 10^{-8} \text{M}$ після 5 хвилин та $1,36 \cdot 10^{-6} \text{M} \pm 3,21 \cdot 10^{-8} \text{M}$ після 22 годин попереднього інкубування у плазмі людини.

Здатність сполук представленого винаходу та відповідних форм їх фармацевтично прийнятних адитивних солей до інгібування DPIV *in vivo* можна показати пероральним або внутрішньосудинним застосуванням до щурів Wistar, як описано у прикладі 9. Сполуки представленого винаходу інгібують активність DPIV *in vivo* після перорального та внутрішньосудинного застосування до щурів Wistar.

DPIV наявна у багатьох органах та тканинах ссавців, наприклад, кишковій щітковій каймі (Gutschmidt S. et al., "In situ" - measurements of protein contents in the brush border region along rat jejunal villi and their correlations with four enzyme activities ("In situ" - виміри вмісту білку у регіоні щіткової кайми вздовж єюнальних ворсинок щура та їх кореляції з активностями чотирьох ферментів). *Histochemistry* 1981, 72 (3), 467-79), зовнішньосекреторному епітеліальних тканинах, гепатоцитах, ниркових каналцях, ендотеліальних тканинах, міофібробластах (Feller A.C. et al., A monoclonal antibody detecting dipeptidylpeptidase IV in human tissue (Визначення дипептидилпептидази IV моноклональних антитіл тканині у людини) *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 1986; 409 (2):263-73), нервових клітинах, латеральних мембранах деяких поверхневих епітеліальних тканин, наприклад, фаллопієвих труб, матки та везикулярної залози, у порожнинній цитоплазмі, наприклад, епітеліальній тканині везикулярної залози, та у клітинах слизової дуоденальної залози (Hartel S. et al., Dipeptidyl peptidase (DPP) IV in rat organs. Comparison of immunohistochemistry and activity histochemistry (Дипептидил-пептидаза (DPP) IV в органах щурів. Порівняння імуногістохімії та гістохімічної активності. *Histochemistry* 1988; 89 (2): 151-61), репродуктивних органах, наприклад, хвості придатку яєчка та ампулі, сім'яних везикулах та їх секретії (Agrawal & Vanha-Perttula, Dipeptidyl peptidases in bovine reproductive organs and secretions (Дипептидил-пептидази у коров'ячих репродуктивних органах та секретії. *Int. J. Androl.* 1986,9 (6): 435-52). У сироватці людини наявні дві молекулярні форми дипептидил-пептидази (Krepela E. et al., Demonstration of two molecular forms of dipeptidyl peptidase IV in normal human serum (Демонстрація двох молекулярних форм дипептидил-пептидази IV у сироватці нормальної людини. *Physiol. Bohemoslov.* 1983, 32 (6): 486-96). Сироваточна форма DPIV високої молекулярної маси експресується на поверхні активованих Т-клітин (Duke-Cohan J.S. et al., Serum high molecular weight dipeptidyl peptidase IV (CD26) is similar to a novel antigen DPPT-L released from activated T cells (Сироваточна дипептидил-пептидаза IV високої молекулярної маси (CD26) є подібною новому антигену DPPT-L, вивільненому з активованих Т-клітин. *J. Immunol.* 1996,156(5): 1714-21).

Сполуки представленого винаходу та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей здатні інгібувати DPIV *in vivo*. Згідно з одним втіленням представленого винаходу усі молекулярні форми, гомологи та епітопи DPIV від усіх тканин та органів ссавців, а також досі невиявлених, охоплено рамками цього винаходу.

Серед рідкісної групи пролін-специфічних протеаз тільки DPIV, як спочатку вважали, є мембрано-зв'язаним ферментом, специфічним стосовно проліну як передостаннього залишку на амінозакінченні поліпептидного ланцюга. Однак, інші молекули, навіть структурно негомологічні з DPIV, але виявляючи відповідну ферментну активність, зараз ідентифіковано. DPIV-подібні ферменти, які ідентифіковано, представляють, наприклад, білок α активації фібробласту, дипептидил-пептидазу IV β , дипептидил-амінопептидазо-подібний білок, N-ацетиловану екс-зчеплену кислотну дипептидазу, пролін-дипептидазу статичних клітин, дипептидил-пептидазу II, атрактин та споріднений з дипептидил-пептидазою IV білок (DPP 8), їх описано в огляді Sedo & Malik (Sedo & Malik, Dipeptidyl peptidase IV-like molecules: homologous proteins or homologous activities? (Подібні дипептидил-пептидази IV молекули: гомологічні білки або гомологічні активності?) *Biochimica et Biophysica Acta* 2001, 36506:1-10).

Наступні DPIV-подібні ферменти розкрито у WO 01/19866, WO 02/04610, WO 02/34900 та WO 02/31134. WO 01/19866 розкриває нову дипептидил-амінопептидазу людини (DPP8) зі структурною та функціональною подібністю з DPIV та активаційним білком фібробласту (FAP). WO 02/04610 розкриває реагенти, які регулюють подібний до дипептидил-пептидази IV фермент людини та реагенти, які приєднуються до подібного до дипептидил-пептидази IV ферменту генного продукту людини. Ці реагенти можуть грати роль у попередженні, поліпшенні, або корекції дисфункцій або хвороб, включаючи, але без обмеження, пухлини та розлади периферійної та центральної нервової системи, включаючи біль та нейродегенеративні розлади. Подібний дипептидил-пептидазі IV фермент з WO 02/04610 добре відомий у рівні техніки. У базі даних Gene Bank цей фермент зареєстровано як KIAA1492 (зареєстровано у лютому 2001, представлено на розгляд 04.04.2000, AB040925). WO 02/34900 розкриває дипептидил-пептидазу9 (DPP9) зі значною гомологією з амінокислотними послідовностями DPIV та DPP8. WO 02/31134 розкриває три DPIV-подібні ферменти, DPRP1, DPRP2 та DPRP3. Аналіз послідовності виявив, що DPRP1 є ідентичним DPP8, як розкрито у WO 01/19866, що DPRP2 є ідентичним DPP9, та що DPRP3 є ідентичним KIM1492, як розкрито у WO 02/04610.

Згідно з другим кращим втіленням представленого винаходу, усі молекулярні форми, гомологи та епітопи білків, що містять ферменти з подібною до DPIV активністю, від усіх тканин та органів ссавців, також тих, які є досі невиявленими, охоплено рамками цього винаходу.

Здатність сполук представленого винаходу та відповідних форм їх фармацевтично прийнятних адитивних солей до інгібування DPIV-подібних

ферментів можна показати аналізом активності ферментів для визначення величин K_i *in vitro*, як описано у прикладі 6. Величини K_i сполук представленого винаходу для свинячої дипептидил-пептидази II визначають як $K_i=8,52 \cdot 10^{-5} \text{M}$ $\pm 6,33 \cdot 10^{-6} \text{M}$ для глутамініл-піролідину і $K_i=0,7 \cdot 10^{-5} \text{M}$ $\pm 3,81 \cdot 10^{-7} \text{M}$ для глутамініл-тіазолідину. Усі сполуки інгібують свинячу дипептидил-пептидазу II.

Згідно з другим втіленням представленого винаходу, сполуки представленого винаходу, та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей мають тільки низьку, або не мають інгібіторної активності стосовно не-DPIV та He-DPIV-подібних пролін-специфічних ферментів. Як описано у прикладі 7, з глутамініл-тіазолідинам та глутамініл-піролідинам не виявлено інгібування дипептидил-пептидази I та пролін-олігопептидази. Стосовно пролідази обидві сполуки показали помітно нижчу ефективність порівняно з DPIV. Величини IK_{50} проти пролідази визначають як $IK_{50}>3 \text{mM}$ для глутамініл-тіазолідину та як $IK_{50}=3,4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ $\pm 5,63 \cdot 10^{-5}$ для глутамініл-піролідину.

З огляду на їх здатність до інгібування активності DPIV та DPIV-подібного ферменту, сполуки представленого винаходу, особливо сполуки формул I та II, та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей корисні у лікуванні станів, опосередкованих вказаною активністю ферментів. Відтак, сполуки, розкриті тут, є корисними у лікуванні станів, як-то незалежного від інсуліну цукрового діабету, артриту, ожиріння, імунних та аутоімунних розладів, алотрансплантації, раку, нервових розладів типу розсіяного склерозу та хвороб шкіри.

Згідно з більш кращим втіленням цього винаходу, сполуки представленого винаходу та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей, посилюють толерантність до глюкози зниженням підвищених рівнів глюкози у крові у реакції на пероральне стимулювання глюкозою, а відтак є корисними у лікуванні незалежного від інсуліну цукрового діабету. Здатність сполук представленого винаходу та відповідних форм їх фармацевтично прийнятних адитивних солей до посилення толерантності до глюкози у реакції на пероральне стимулювання глюкозою, можна вимірювати у діабетичних щурів Zucker. Спосіб описано у прикладах 10 та 11. Пероральне застосування 5мг/кг маси тіла, 15мг/кг та 50мг/кг маси тіла глутамініл-тіазолідину або глутамініл-піролідину призводить до залежного від дози зниження підвищених рівнів глюкози у крові, а відтак до поліпшення толерантності до глюкози у діабетичних щурів Zucker.

Сполуки представленого винаходу, згідно з прикладом 5, стабільні у плазмі людини. Несподівано, та як наступне краще втілення представленого винаходу, сполуки представленого винаходу та відповідні форми їх фармацевтично прийнятних адитивних солей, можуть розкладатися *in vivo* після застосування до ссавця. Здатність сполук представленого винаходу та їх відповідних фармацевтично прийнятних адитивних солей розкладатися *in vivo* можна визначити на моделі щурів Wistar та наступним аналізом РХ/МС. Глутамініл-тіазолідин, як виявлено, розкладається після пе-

рорального застосування до щурів Wistar, до відповідного піроглутамініл-тіазолідину.

Представлений винахід відтак стосується способу лікування стану, опосередкованого модуляцією активності DPIV та DPIV-подібного ферменту у суб'єкту, що цього потребує, спосіб полягає у застосуванні будь-якої сполуки представленого винаходу або її фармацевтичної композиції у кількості та режимі дозування терапевтично ефективних для лікування стан. Крім того, представлений винахід стосується застосування сполук представленого винаходу та їх відповідних фармацевтично прийнятних адитивних солей для отримання медикаменту для попередження або лікування стану, опосередкованого модуляцією активності DPIV у суб'єкту. Сполуку можна застосовувати до пацієнта будь-яким звичайним шляхом застосування, включаючи, але без обмеження, внутрішньовенний, пероральний, підшкірний, внутрішньом'язовий, інтрадермальний та парентеральний.

Згідно з другим втіленням представлений винахід стосується рецептур сполук представленого винаходу та їх відповідних фармацевтично прийнятних адитивних солей у фармацевтичних композиціях.

Термін "суб'єкт", що використано тут, стосується тварини, переважно ссавця, найпереважніше людини, що є об'єктом лікування, спостереження або експерименту.

Термін "терапевтично ефективна кількість", що використано тут, стосується кількості активної сполуки або фармацевтичного агенту, що виявляє біологічну або медичну реакцію у тканинній системі, тварині або людині, яку вивчає дослідник, ветеринар, лікар або інший клініцист, яка залучає полегшення симптомів хвороби або розладу, що лікують.

Як використано тут, термін "композиція" стосується продукту, що містить заявлені сполуки у терапевтично ефективній кількості, а також будь-якого продукту, який походить, безпосередньо або небезпосередньо, від комбінації заявлених сполук.

Для отримання фармацевтичної композиції цього винаходу одну або більше сполук представленого винаходу, особливо сполук формул I або II та відповідних форм їх фармацевтично прийнятних адитивних солей як активний інгредієнт перемішують до однорідності з фармацевтичним носієм звичайними фармацевтичними способами сполучення, носій може мати багато форм залежно від форми бажаного для застосування препарату, наприклад, перорального або парентерального, як-то внутрішньом'язового. В отриманій композиції у пероральній формі дозування може бути застосованим будь-яке зі звичайних фармацевтичних середовищ. Відтак, для рідких пероральних препаратів, як-то, наприклад, суспензії, еліксири та розчини, придатні носії та адитиви можуть переважно залучають воду, гліколи, олії, спирти, ароматизатори, консерванти, барвники тощо; для твердих пероральних препаратів, як-то, наприклад, порошки, капсули, желатинові капсули та таблетки, придатні носії та адитиви залучають крохмалі, цукри, розріджувачі, гранулювальні засоби, лубриканти, зв'язувальні засоби, дезинтегратори тощо, внаслідок легкості їх застосування

таблетки та капсули представляють найпереважніше пероральні одиничні форми дозування, в яких застосовують тверді фармацевтичні носії. За бажанням таблетки можна покривати цукром або ентérosоліюбильним покриттям стандартними способами. Для парентеральних засобів носій звичайно містить стерильну воду, хоча можуть бути залучені інші інгредієнти, наприклад, для поліпшення розчинності або для консервування.

Придатні для ін'єкцій суспензії можна також отримати, в них можна застосовувати прийнятні рідкі носії, суспендувальні засоби тощо. Фармацевтичні композиції міститимуть, на одиницю дозування, наприклад, таблетку, капсулу, порошок, ін'єкцію, повну чайну ложку тощо, кількість активного інгредієнту, необхідну для постачання вищезазначеної ефективної дози. Фармацевтичні композиції міститимуть на одиницю дозування, наприклад, таблетку, капсулу, порошок, ін'єкцію, повну чайну ложку, супозиторій, тощо, приблизно від 0,01мг до 1000мг (переважно приблизно від 5 до 500мг) та можуть застосовуватися при дозуванні приблизно від 0,1 до 300мг/кг маси тіла на добу (переважно 1-50мг/кг на добу). Дозування однак, може змінюватися залежно від потреб пацієнтів, суворості стану, що лікують та сполуки, що застосовують. Можна застосовувати добове застосування або пост-періодичне дозування. Звичайно дозування регулюватиме лікар залежно від особливостей пацієнта, його стану та бажаної терапевтичної дії.

Переважаючі ці композиції мають форми одиниць дозування, як-то таблетки, пілюлі, капсули, порошки, гранули, стерильні парентеральні розчини або суспензії, дозовані аерозольні або рідкі спреї, краплі, ампули, автоін'єкційні пристрої або супозиторії; для перорального, парентерального, інтраназального, сублінгвального або ректального застосування, або для застосування інгаляцією або вдиханням. Альтернативно, композиція може мати форму, придатну для застосування раз на тиждень або раз на місяць; наприклад, нерозчинну сіль активної сполуки, як-то деканоат, можна пристосувати для забезпечення отримання депо для внутрішньом'язових ін'єкцій. Для отримання твердої композиції, як-то таблетки, головний активний інгредієнт перемішують до однорідності з фармацевтичним носієм, наприклад, звичайними таблетувальними інгредієнтами, як-то кукурудзяний крохмаль, лактоза, сахароза, сорбіт, тальк, стеаринова кислота, магній стеарат, дикальцій фосфат або камеді, та інші фармацевтичні розріджувачі, наприклад, вода, для утворення твердої попередньої композиції рецептури, що містить гомогенну суміш сполуки представленого винаходу, або її фармацевтично прийнятною солі. Стосовно цієї попередньої композиції рецептури як гомогенної, мають на увазі, що активний інгредієнт ідеально диспергований рівномірно по композиції так, щоб композицію можна було легко поділити на рівні ефективні форми дозування, як-то таблетки, пілюлі та капсули. Цю тверду попередню композицію рецептури можна тоді поділити на вищеписані типи форми одиниць дозування, що містять приблизно від 0,1 до 1000мг, переважно приблизно від 5 до 500мг активного інгредієнту представ-

леного винаходу.

Таблетки або пілюлі нової композиції можуть переважно бути покритими або інакше сполученими для забезпечення форми дозування, що надає переваги пролонгованої дії, наприклад, таблетка або пілюля можуть містити внутрішній компонент дозування та зовнішній компонент дозування, останній є у формі оболонки поверх попередньої. Два компоненти можуть бути розділені шаром ентeросолюбильного покриття, яке перешкоджає дезинтеграції у шлунку та дозволяє внутрішньому компоненту пройти у дванадцятипалу кишку мати затримане вивільнення. Різні матеріали можна використовувати для таких шарів ентeросолюбильного покриття, такі матеріали залучають ряд полімерних кислот з такими матеріалами як шелак, цетиловий спирт та ацетат целюлози.

Рідкі форми, в яких нові композиції представленого винаходу можуть переважно бути комбінованими для застосування перорально або ін'єкціями залучають водні розчини, належно ароматизовані сиропи, водні або олійні суспензії, та ароматизовані емульсії з істивними оліями, як-то бавовняна олія, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, а також еліксири та подібні фармацевтичні наповнювачі. Придатні диспергувальні або суспендувальні засоби для водних суспензій залучають синтетичні та природні камеді, як-то трагаканту, акації, алгінат, декстран, натрій карбоксиметилцелюлозу, метилцелюлозу, полівінілпіролідон або желатин.

Коли способи отримання сполук згідно з винаходом дають суміш стереоізомерів, ці ізомери можна розділяти звичайними способами, як-то препаративною хроматографією. Сполуки можна отримати у рацемічній формі, або індивідуальні енантіомери можна отримати енантіоспецифічним синтезом або розділенням. Сполуки можна, наприклад, розділяти на їх компонентні енантіомери стандартними способами, як-то утворення діастереомерних пар утворенням солі з оптично активною кислотою, як-то (-)-ді-п-толуоїл-L-винною кислотою та/або (+)-ді-п-толуоїл-L-винною кислотою, з наступною фракційною кристалізацією та регенерацією вільної основи. Сполуки можна також розділяти утворенням діастереомерних естерів або амідів з наступним хроматографічним розділенням та видаленням хірального допоміжнику. Альтернативно, сполуки можна розділяти застосуванням хіральної колонки ВЕРХ.

Протягом будь-якого зі способів отримання сполук представленого винаходу, може бути необхідним та/або бажаним захищати чутливі або реакційні групи на будь-якій з потрібних молекул. Цього можна досягти звичайними захисними групами, як-то описаними у [Protective Groups у Organic Chemistry, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; та T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups у Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 1991, що наведено тут як посилання]. Захисні групи можна видалити на зручному наступному етапі відомими у рівні техніки способами.

Спосіб лікування станів, модульованих дипептидил-пептидазою IV та DPiV-подібними ферментами, описаний у представленому винаході, можна також провадити застосуванням фармацевтичної

композиції, що містить одну або більше вищезазначених сполук та фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтична композиція може містити приблизно між 0,01мг та 1000мг, переважно приблизно 5-500мг сполуки, та може бути складеною у будь-яку форму, придатну для вибраного режиму застосування. Носії залучають необхідні та інертні фармацевтичні ексципієнти, включаючи, але без обмеження, зв'язувальні засоби, суспендувальні засоби, лубриканти, ароматизатори, підсолоджувачі, консерванти, барвники та покриття. Композиції, придатні для перорального застосування, залучають тверді форми, як-то пілюлі, таблетки, капсули (включаючи рецептури негайного вивільнення, хронованого вивільнення та безперервного вивільнення), гранули, та порошки, та рідкі форми, як-то розчини, сиропи, еліксири, емульсії, та суспензії. Форми, корисні для парентерального застосування, залучають стерильні розчини, емульсії та суспензії. Переважно, сполуки представленого винаходу можна застосовувати одиничною добовою дозою, або загальне добове дозування можна застосовувати роздільними дозами два, три або чотири рази на добу. Далі, сполуки представленого винаходу можна застосовувати у інтраназальній формі шляхом місцевого застосування придатного інтраназального наповнювачу, або трансдермальним шляхом з пластирами, що добре відомо фахівцям. Для застосування у формі трансдермальної системи постачання дозування буде скоріше безперервним, а не переривчастим дозуванням і інтенсивність дозування треба відповідно модифікувати для отримання бажаної терапевтичної дії.

Краще для перорального застосування у формі таблеток або капсул, щоб активний компонент ліків був скомбінований з пероральним, нетоксичним фармацевтично прийнятним інертним носієм, як-то етанол, гліцерин, вода тощо. Більш того, коли бажано або необхідно, можна також додавати у суміш придатні зв'язувальні засоби; лубриканти, дезинтегратори та барвники. Придатні зв'язувальні засоби залучають, без обмеження, крохмаль, желатин, природні цукри, як-то глюкоза або беталактоза, кукурудзяні підсолоджувачі, природні та синтетичні камеді, як-то акації, трагаканту, або натрій олеат, натрій стеарат, магній стеарат, натрій бензоат, натрій ацетат, натрій хлорид тощо. Дезинтегратори залучають, без обмеження, крохмаль, метилцелюлозу, агар, бентоніт, ксантанову камедь тощо.

Рідкі форми придатні у ароматизованих суспендувальних чи диспергувальних засобах, як-то синтетичні та природні камеді, наприклад, трагаканту, акації, метил-целюлози тощо. Для парентерального застосування бажаними є стерильні суспензії та розчини. Ізотонічні препарати, які загалом містять придатні консерванти, застосовують, коли бажаним є внутрішньовенне застосування.

Сполуку представленого винаходу можна також застосовувати у формі ліпосомних систем постачання, як-то невеликих одношарових пухирців, великих одношарових пухирців та багатошарових пухирців. Ліпосоми можна створювати з різних фосфоліпідів, як-то холестерин, стеариламін або

фосфатидилхоліні добре відомими у рівні техніки способами.

Сполуки представленого винаходу можна також сполучати з розчинними полімерами як націлювані носії ліків. Такі полімери можуть залучати полівінілпіролідон, кополімер пірану, полігідрокси-пропілметакриламідифенол, полігідроксietiласпартамідифенол, або поліетиленоксидполілізин, заміщений палмітоїльним залишком. Далі, сполуки представленого винаходу можна сполучати з біорозкладними полімерами, корисними у досягненні регульованого вивільнення ліків, наприклад, поліоцтовою кислотою, поліепсилонкапролактоном, полігідроксимасляною кислотою, поліортоестерами, поліацетатами, полідигідропіранами, поліціаноакрилатами та перехресно-зчепленими або амфіпатичними блоккополімерами гідрогелів.

Сполуки цього винаходу можна застосовувати у будь-якій з вищезазначених композицій та згідно з режимами дозування, встановленими у рівні техніки, коли потрібне лікування певних розладів.

Добове дозування продуктів може змінюватися в межах від 0,01 до 1,000мг для дорослої людини на добу. Для перорального застосування композиції переважно запропоновані у формі таблеток, що містять, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 150, 200, 250, 500 та 1000мг активного інгредієнту для симптоматичного дозування для пацієнта, якого лікують. Ефективна кількість ліків звичайно є на рівні дозування приблизно від 0,1мг/кг до 300мг/кг маси тіла на добу. Кращими межами є приблизно від 1 до 50мг/кг маси тіла на добу. Сполуки можна застосовувати у режимі 1-4 рази на добу.

Оптимальне дозування для застосування може легко визначити фахівець, воно залежатиме від конкретної використаної сполуки, режиму застосування, інтенсивності отримання, біо-засвоюваності внаслідок режиму застосування, та перебігу стану хвороби. На додаток, фактори, асоційовані з конкретним пацієнтом, якого лікують, включаючи вік, масу, харчування пацієнта та час застосування, слід загалом враховувати при коректуванні дозування.

Сполуки або композиції представленого винаходу можна брати перед помелом, при помелі або після помелу.

Коли сполуки або композиції представленого винаходу відповідають узяттю до помелу, їх приймають за 1 годину, переважно 30 або навіть 15 або 5 хвилин перед їжею.

Коли сполуки або композиції представленого винаходу відповідають узяттю під час помелу, їх можна вмішувати у порошок або приймати в окремій формі дозування, як вище описано.

Коли сполуки або композиції представленого винаходу відповідають узяттю після помелу їх можна приймати через 5, 15 або 30 хвилин або навіть 1 годину після кінцевого помелу.

Приклади

Приклад 1: Синтез вільної основи глутамінілпіролідину

Ацилювання:

N-Бензил-оксикарбонілглутамін (2,02г, 7,21ммоль) розчиняють у 35мл ТГФ та доводять до -15°C. У цю суміш CAIBE (ізобутилхлорформі-

ат) (0,937мл, 7,21ммоль) та 4-метилморфолін (0,795мл, 7,21ммоль) додають та розчин перемішують протягом 15 хвилин. Утворення змішаного ангідриду перевіряють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після нагрівання до -10°C додають піролідін (0,596мл, 7,21ммоль). Суміш доводять до кімнатної температури та перемішують протягом ночі.

Обробка:

Утворений осад відфільтровують та розчинник випарюють. Утворене масло переносять у етилацетат (20мл) та промивають насиченим розчином натрій гідросульфату, а потім насиченим розчином натрій гідрокарбонату, водою та розсоллом. Органічний шар відділяють, сушать та випарюють. Утворений продукт перевіряють на чистоту ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Вихід: 1,18г, твердий воскоподібний продукт.

Розщеплення:

1,18г утвореної твердої Z-захищеної сполуки розчиняють у 40мл абсолютного етанолу. У розчин додають приблизно 20мг Pd на активованому вугіллі (10%, FLUKA) та суспензію струшують в атмосфері водню протягом 3 годин. Перебіг реакції контролюють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після завершення реакції розчинник видаляють для забезпечення вільної основи. Вихід: 99%. Перевіряють чистоту за допомогою ТШХ: н-бутанол/АсОН/вода/етилацетат: 1/1/1/1, R_f - 0,4. Ідентичність продукту реакції перевіряють ЯМР-аналізом.

Приклад 2: Синтез глутамініл-тіазолідину гідрохлориду

Ацилювання:

N-т-Бутил-оксикарбонілглутамін (2,0г, 8,12ммоль) розчиняють у 5мл ТГФ та доводять до -15°C. У цю суміш додають CAIBE (ізобутилхлорформіат) (1,06мл, 8,12ммоль) та 4-метилморфолін (0,895мл, 8,12ммоль) та розчин перемішують протягом 15 хвилин. Утворення змішаного ангідриду перевіряють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після нагрівання до -10°C додають ще еквівалент 4-метилморфоліну (0,895мл, 8,12ммоль) та тіазолідингідрохлориду (1,02г, 8,12ммоль). Суміш доводять до кімнатної температури та перемішують протягом ночі.

Обробка:

Утворений осад відфільтровують та розчинник випарюють. Утворене масло переносять у хлороформ (20мл) та промивають насиченим розчином натрій гідросульфату, а потім насиченим розчином натрій гідрокарбонату, водою та розсоллом. Органічний шар відділяють, сушать та випарюють. Утворений продукт перевіряють на чистоту ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Вихід: 1,64г, твердий продукт.

Розщеплення:

640мг утвореної твердої Вос-захищеної сполуки розчиняють у 3,1мл охолодженої льодом HCl у діоксані (12,98М, 20 еквіваленти) та залишають на льоді. Перебіг реакції контролюють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після завершення реакції розчинник видаляють та утворене масло переносять у метанол та випарюють знов. Після цього утворене масло сушать фосфор-V-оксидом та розтирають два рази з діетилетером. Перевіряють чистоту шляхом ВЕРХ. Вихід: 0,265г. Перевіряють чистоту

шляхом ВЕРХ. Ідентичність продукту реакції перевіряють ЯМР-аналізом.

Приклад 3: Синтез глутамініл-піролідину гідрохлориду

Ацилування:

N-т-Бутил-оксикарбонілглутамін (3,0г, 12,18ммоль) розчиняють у 7мл ТГФ та доводять до -15°C . У цю суміш додають CAIBE (ізобутилхлорформіат) (1,6мл, 12,18ммоль) та 4-метилморфолін (1,3мл, 12,18ммоль) та розчин перемішують протягом 15 хвилин. Утворення змішаного ангідриду перевіряють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після нагрівання до -10°C додають 1 еквівалент піролідину (1,0мл, 12,18ммоль). Суміш доводять до кімнатної температури та перемішують протягом ночі.

Обробка:

Утворений осад відфільтровують та розчинник випарюють. Утворене масло переносять у хлороформ (20мл) та промивають насиченим розчином натрій гідросульфату, а потім насиченим розчином натрій гідрокарбонату, водою та розсоллом. Органічний шар відділяють, сушать та випарюють. Утворений продукт перевіряють на чистоту ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Вихід: 2,7г твердий продукт.

Розщеплення:

2,7г утвореного твердого продукту розчиняють у 13,0мл охолодженої льодом HCl у діоксані (12,98М, 20 еквіваленти) та залишають на льоді. Перебіг реакції контролюють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1). Після завершення реакції розчинник видаляють та утворене масло переносять у метанол та випарюють знов. Після цього утворене масло сушать фосфор-V-оксидом та розтирають два рази з діетилетером. Вихід: 980мг. Перевіряють чистоту шляхом ВЕРХ. Ідентичність продукту реакції перевіряють ЯМР-аналізом.

Приклад 4: Визначення K_i

Для визначення K_i глутамініл-піролідину та глутамініл-тіазолідину застосовують дипептидилпептидазу IV зі свинячих нирок зі специфічною активністю проти гліцилпроліл-4-нітроаніліну 37,5U/мг та концентрацію ферменту 1,41мг/мл у стандартному розчині.

Аналіз суміші:

100мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину при концентраціях $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ - $1 \cdot 10^{-7}\text{M}$ (глутамініл-піролідін) та $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ - $1 \cdot 10^{-8}\text{M}$ (глутамініл-тіазолідін) відповідно перемішують з 50мкл гліцилпроліл-4-нітроаніліну у різних концентраціях (0,4мМ, 0,2мМ, 0,1мМ, 0,05мМ) та 100мкл ГЕПЕС (40мМ, pH 7,6; іонна сила = 0,125). Аналізовану суміш попередньо інкубують при 30°C протягом 30 хвилин. Після попереднього інкубування додають 20мкл DPIV (розбавлено 1:600) та вимір розвитку жовтого кольору внаслідок вивільнення 4-нітроаніліну провадять при 30°C та $\lambda=405\text{nm}$ протягом 10 хвилин, застосовуючи планшетний зчитувач (HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Величини K_i розраховують, застосовуючи Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd, UK), що базується на конкурентному інгібуванні DPIV глутамініл-піролідіном або глутамініл-тіазолідіном. Їх визначають для глутамініл-тіазолідину як

$K_i=3,12 \cdot 10^{-7}\text{M} \pm 5,11 \cdot 10^{-10}\text{M}$ та для глутамініл-піролідину як $K_i=1,30 \cdot 10^{-6}\text{M} \pm 8,49 \cdot 10^{-6}\text{M}$.

Приклад 5: Визначення K_i у плазмі людини

Плазма людини має активність стосовно вивільнення N-термінального Хаа-Про.

70мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину у концентраціях $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ - $1 \cdot 10^{-7}\text{M}$ (глутамініл-піролідін) та $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$ - $1 \cdot 10^{-8}\text{M}$ (глутамініл-тіазолідін) відповідно перемішують з 50мкл гліцилпроліл-4-нітроаніліну у різних концентраціях (0,4мМ, 0,2мМ, 0,1мМ, 0,05мМ) та 100мкл ГЕПЕС (40мМ, pH 7,6). Аналізовану суміш попередньо інкубують при 30°C протягом 5 хвилин та 22 годин відповідно. Після попереднього інкубування додають 50мкл плазми людини та вимір розвитку жовтого кольору внаслідок вивільнення 4-нітроаніліну провадять при 30°C та $\lambda=405\text{nm}$ протягом 10 хвилин, застосовуючи планшетний зчитувач (HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Величини K_i розраховують, застосовуючи програмне забезпечення Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd, UK), що базується на конкурентному інгібуванні DPIV глутамініл-піролідіном або глутамініл-тіазолідіном. Їх визначають для глутамініл-тіазолідину як $K_i=4,03 \cdot 10^{-7}\text{M} \pm 2,19 \cdot 10^{-10}\text{M}$ після 5 хвилин, $5,13 \cdot 10^{-7}\text{M} \pm 1,26 \cdot 10^{-8}\text{M}$ після 22 годин попереднього інкубування, та для глутамініл-піролідину як $K_i=1,30 \cdot 10^{-6}\text{M} \pm 4,89 \cdot 10^{-8}\text{M}$ після 5 хвилин та $1,36 \cdot 10^{-6}\text{M} \pm 3,21 \cdot 10^{-8}\text{M}$ після 22 годин попереднього інкубування.

Приклад 6: Інгібування DPIV-подібних ферментів - дипептидил-пептидази II

DP II (3,4,14,2) вивільняє N-термінальні дипептиди з олігопептидів, якщо N-закінчення не протоноване [McDonald, J.K., Ellis, S. & Reilly, T.J., 1966, J. Biol. Chem., 241,1494-1501]. Pro та Ala у P₁-позиції є кращими залишками. Активність ферментів описано як DPIV-подібну активність, але DP II має кислотний pH-оптимум. Фермент, що використано, очищають зі свинячих нирок.

Аналіз:

100мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину у концентраціях $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ - $5 \cdot 10^{-8}\text{M}$ перемішують з 100мкл буферного розчину (40мМ ГЕПЕС, pH 7,6, 0,015% Brij, 1мМ DTT), 50мкл розчину лізилаланіламінометилкумарину (5мМ) та 20мкл свинячої DP II (розбавлено у 250 разів у буферному розчині). Флуоресценцію вимірюють при 30°C при $\lambda_{\text{збудження}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{емісії}}=465\text{nm}$ протягом 25 хвилин, застосовуючи планшетний зчитувач (HTS7000plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Величини K_i розраховують, застосовуючи програмне забезпечення Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd., UK) та визначають як $K_i=8,52 \cdot 10^{-5}\text{M} \pm 6,33 \cdot 10^{-6}\text{M}$ для глутамініл-піролідину та $K_i=1,07 \cdot 10^{-5}\text{M} \pm 3,81 \cdot 10^{-7}\text{M}$ для глутамініл-тіазолідину.

Приклад 7: Перехресно реагуючі ферменти

Глутамініл-піролідін або глутамініл-тіазолідін тестують на їх здатність стосовно перехресного реагування відносно дипептидил-пептидази I, проліл-олігопептидази та пролідази.

Дипептидил-пептидаза I (DP I, катепсин C):

DP I або катепсин C є лізосомальною цистеїн-протеазою, яка відщеплює дипептиди від N-закінчення її субстратів [Gutman, H.R. & Fruton,

J.S., 1948, J. Biol. Chem., 174,851-858]. Її класифікують як цистеїн-протеазу.

Фермент, що використано отримано від Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Для отримання повністю активного ферменту, фермент розбавлено у 1000 разів у буфері MES pH 5,6 (40mM MES, 4mM DTT, 4mM KCl, 2mM EDTA, 0,015% Brij) та попередньо інкубують протягом 30 хвилин при 30°C.

Аналіз:

50мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину при концентраціях $1 \cdot 10^{-5}$ М- $1 \cdot 10^{-7}$ М перемішують з 110мкл суміші буфер-фермент. Аналізовану суміш попередньо інкубують при 30°C протягом 15 хвилин. Після попереднього інкубування 100мкл гістидилсерил-п-нітроаніліну ($2 \cdot 10^{-5}$ М) додають та вимір розвитку жовтого кольору внаслідок вивільнення 4-нітроаніліну провадять при 30°C та $\lambda_{\text{збудження}}=380\text{nm}$, $\lambda_{\text{емісії}}=465\text{nm}$ протягом 10 хвилин, застосовуючи планшетний зчитувач (HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Величини IK_{50} розраховують, застосовуючи програмне забезпечення Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd., UK). Жодного інгібування активності ферменту DP I глутамініл-піролідіном або глутамініл-тіазолідином не знайдено.

Проліл-олігопептидаза (POP)

Проліл-олігопептидаза (EC 3,4,21,26) є ендопроотеазою серинового типу, яка відщеплює пептиди на N-термінальній частині зв'язку Хаа-Pro [Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz J.L. & Kerenyi, T.D., 1971, Science, 173,827-829]. Субстратами є пептиди з молекулярною масою до 3000Да.

Фермент, що використано, є рекомбінантною проліл-олігопептидазою людини. Рекомбінантну експресію провадять у E. coli у стандартних умовах, які описано у рівні техніки.

Аналіз:

100мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину у концентраціях $1 \cdot 10^{-4}$ М- $5 \cdot 10^{-8}$ М перемішують з 100мкл буферного розчину (40mM ГЕ-ПЕС, pH 7,6, 0,015% Brij, 1mM DTT) та 20мкл розчину POP. Аналізовану суміш попередньо інкубують при 30°C протягом 15 хвилин. Після попереднього інкубування 50мкл розчину гліцилпролілпроліл-4-нітроаніліну (0,29mM) додають та вимір розвитку жовтого кольору внаслідок вивільнення 4-нітроаніліну провадять при 30°C та $\lambda=405\text{nm}$ протягом 10 хвилин, застосовуючи планшетний зчитувач (Sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany).

Величини IK_{50} розраховують, застосовуючи програмне забезпечення Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd., UK). Жодного інгібування активності POP глутамініл-піролідіном або глутамініл-тіазолідином не знайдено.

Пролідаза (X-Pro-дипептидаза)

Пролідаза (EC 3,4,13,9) спершу описана Bergmann & Fruton (Bergmann, M. & Fruton, JS, 1937, J. Biol. Chem. 189-202). Пролідаза вивільняє N-термінальну амінокислоту від дипептидів Хаа-Pro та має оптимум pH між 6 та 8.

Пролідазу від свинячих нирок (ICN Biomedics, Eschwege, Germany), розчиняють (1мг/мл) у буфері для аналізу (20mM $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 3mM MnCl_2 ,

pH 7,6). Для отримання повністю активного ферменту розчин інкубують протягом 60 хвилин при кімнатній температурі.

Аналіз:

450мкл глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину у концентраціях $5 \cdot 10^{-3}$ М- $5 \cdot 10^{-7}$ М перемішують з 500мкл буферного розчину (20mM $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pH 7,6) та 250мкл Ile-Pro-OH (0,5mM в аналізованій суміші). Аналізовану суміш попередньо інкубують при 30°C протягом 5 хвилин. Після попереднього інкубування 75мкл. Пролідази (розбавлено 1:10 у буфері для аналізу) додають та вимір провадять при 30°C та $\lambda=220\text{nm}$ протягом 20 хвилин, застосовуючи UV/Vis фотометр, UV1 (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).

Величини IK_{50} розраховують, застосовуючи програмне забезпечення Graphit 4,0,15 (Erithacus Software, Ltd., UK). Їх визначають як $IK_{50}>3\text{mM}$ для глутамініл-тіазолідину та як $IK_{50}=3,4 \cdot 10^{-4} \pm 5,63 \cdot 10^{-5}$ для глутамініл-піролідину.

Приклад 8: Стабільність у плазмі

Для дослідження стабільності глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину у плазмі людини, активність у плазмі визначають у визначений час. Середню активність DPIV у плазмі людини визначають як 43,69U/мл. У робочому розчині плазми розбавляють 0,9% NaCl до фіксованого рівня активності DPIV 25 U/мл.

Плазму та глутамініл-піролідин або глутамініл-тіазолідин у різних концентраціях ($5 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $1,25 \cdot 10^{-5}$ М у плазмі) інкубують при 37°C. У визначений час зразки збирають, застосовуючи піпеточний автомат (Gilson 215, Liquid handler, Gilson) та переносять у мікротитрувальний планшет, що містить $5 \cdot 10^{-5}$ М гліцилпроліламінометилкумарину у 0,9% NaCl + 0,15% Brij на комірку. Після 6 хвилин реакцію зупиняють додаванням ізoleyцилтіазолідину ($5 \cdot 10^{-5}$ М у 0,9% розчині NaCl).

Флуоресценцію вимірюють відносно 0,9% NaCl у плазмі (внутрішній стандарт), застосовуючи планшетний зчитувач (HTS7000plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Напівперіод інгібіторної потужності глутамініл-піролідину або глутамініл-тіазолідину розраховують за залежністю активності ферменту від часу реакції.

Для обох сполуки, не можна було визначити напівперіод. Субстанцію вважають стабільною у плазмі людини більше 22 годин.

Приклад 9: Визначення інгібувальної активності стосовно DPIV глутамініл-піролідину та глутамініл-тіазолідину після перорального та внутрішньосудинного застосування до щурів Wistar.

Тварини

Самці щурів Wistar (Wist(Sho)) з масою тіла між 250 та 350г отримано від Tierzucht Sch&nwalde (Schonwalde, Germany).

Умови утримання

Тварин тримають у клітках поодиноці у звичайних умовах з регульованою температурою ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) при циклі світло/темрява 12/12 годин (світло на 06:00 ранку). Стандартну гранульовану їжу (ssniff® Soest, Germany) та воду з крану, підкислену HCl, дають досхочу.

Вставка катетера у сонну артерію

Після більше одного тижня адаптації в умовах тримання катетери імплантують у сонну артерію

щурів Wistar під загальною анестезією (інтраперитональною ін'єкцією 0,25мл/кг Rompun® [2%], BayerVital, Germany та 0,5мл/кг кетаміну 10, Atarost GmbH & Co., Twistringen, Germany). Тваринам дають одужати протягом тижня. Катетери промивають гепарином-фізіологічним розчином (100IU/мл) три рази на тиждень. У випадку дисфункції катетера, другий катетер вставляють у контралатеральну сонну артерію відповідного щура. Після одного тижня одужання від хірургії цю тварину залучають у дослідження. У випадку дисфункції другого катетера, тварину видаляють з дослідження. Уводять нову тварину та експерименти продовжують у запланованій послідовності, починаючи принаймні через 7 днів після імплантування катетера.

Мета експерименту

До щурів зі збереженою функцією катетера застосовують плацебо (1мл фізіологічного розчин, 0,154моль/л) або 100мг/кг маси тіла глутамініл-піролідину або 100мг/кг маси тіла глутамініл-тіазолідину пероральним та внутрішньосудинним (інтраартеріальним) шляхом.

Після голодування протягом ночі зразки по 100мкл гепаринізованої артеріальної крові збирають на хвилину -30, -5 та 0. Тест-субстанцію розчиняють безпосередньо перед цим у 1,0мл фізіологічного розчину (0,154моль/л) та застосовують на хвилину 0 перорально через зонд (75мм; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) або внутрішньосудинним шляхом. У випадку перорального застосування додатковий об'єм 1мл фізіологічного розчину ін'єктують у артеріальний катетер, у випадку інтраартеріального застосування, катетер негайно промивають 30мкл фізіологічного розчину та додатково 1мл фізіологічного розчину вводять перорально через зонд.

Після застосування плацебо або тест-субстанції зразки артеріальної крові відбирають на хвилину 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 40, 60 та 120 з катетера сонної артерії притомних вільних щурів. Усі зразки крові збирають в охолоджені льодом труби Еппендорфа (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Germany), заповнені 10мкл натрій цитратного буферу (рН 3,0) для виміру активності DPIV у плазмі. Труби Еппендорфа центрифугують негайно (12000об/хил протягом 2 хвилин, Hettich Zentrifuge EBA 12, Tuttlingen; Germany): Фракції плазми зберігають на льоді до аналізу або заморожують при -20°C до аналізу. Усі зразки плазми помічають таким чином:

- Номер коду
- Число тварин
- Дата відбору зразку
- Час відбору зразку

Аналітичні способи

Аналізована суміш для визначення активності DPIV у плазмі складається з 80мкл реагенту та 20мкл зразку плазми. Кінетичний вимір утворення жовтого продукту 4-нітроаніліну з субстрату гліцилпропіл-4-нітроанілін провадять при 390nm протягом 1 хвилини при 30°C після 2 хвилин попереднього інкубування при тій же температурі. Активність DPIV виражено у міліюдиницях/мл.

Статистичні способи

Статистичні оцінки та графіки виконують за

допомогою програмного забезпечення PRISM® 3.02 (GraphPad Software, Inc.). Усі параметри аналізують наочно, включаючи значення та стандартне відхилення.

Результати

Сполуки глутамініл-піролідин та глутамініл-тіазолідин у дозі 100мг/кг маси тіла відносно плацебо інгібують активність DPIV у плазмі після перорального та внутрішньосудинного застосування (дивись графіки 1 та 2)

Приклад 10: Дослідження підвищення дози у жирних щурів Zucker після перорального застосування глутамініл-піролідину

Тварини

N=30 самців щурів Zucker (fa/fa), середній вік 11 тижнів (5-12 тижнів), середня маса тіла 350г (150-400г), отримано від Charles River (Sulzfeld, Germany). Після постачання їх тримають >12 тижнів, доки майже усі жирні щури Zucker не мали характеристик вираженого цукрового діабету. Групу з N=8 тварини застосовували для тестування трьох підвищуючихся доз глутамініл-піролідину відносно плацебо (фізіологічний розчин).

Умови утримання

Тварин тримають у клітках поодиноці у стандартизованих умовах з регульованою температурою (22±2°C) при циклі світло/темрява 12/12 годин (світло на 06:00 ранку). Стерильну стандартну гранульовану їжу (ssniff® Soest, Germany) та підкислену HCl воду з крана дають досхочу.

Катетеризація сонної артерії

Жирних щурів Zucker віком 24-31 тижнів (у середньому: 25 тижнів), адаптованих до умов утримання, добре готують для дослідження.

Катетери імплантують у сонну артерію жирних щурів Zucker під загальною анестезією (інтраперитональною ін'єкцією 0,25мл/кг Rompun® [2%], BayerVital, Germany та 0,5мл/кг кетаміну 10, Atarost GmbH & Co., Twistringen, Germany). Тваринам дають одужати протягом одного тижня. Катетери промивають гепарином-фізіологічним розчином (100IU/мл) три рази на тиждень.

Експериментальна схема

Плацебо (1мл фізіологічного розчину, 0,154моль/л) або підвищуючісї дози глутамініл-піролідину (5, 15 та 50мг/кг маси тіла) застосовують до групи з N=8 жирних щурів Zucker. 375мг глутамініл-піролідину розчиняють у 1000мкл ДМСО (E. Merck, Darmstadt; Germany [диметилсульфоксид]), 10мл фізіологічного розчину додають та аліквоти по 1мл, кожна містить 34,09мг глутамініл-піролідину, зберігають при -20°C. Для отримання тест-субстанції залежні від дози аліквоти розбавлено фізіологічним розчином.

Після голодування протягом ночі плацебо або тест-субстанцію застосовують до жирних щурів Zucker через зонд перорально (15G, 75мм; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) на - 10 хвилину. Пероральний тест толерантності до глюкози (OGTT) з 2г/кг глюкози (40% розчин, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany) застосовують на ±0 хвилину через другий зонд. Зразки венозної крові з хвостових вен збирають на - 30 хвилину, - 15 хвилину, ±0 хвилину та на хвилини 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 та 120 у скляні капіляри на 20мкл, які поміщають у стандартні труби, заповнені 1мл роз-

чином для виміру глюкози у крові.

Усі зразки крові помічають таким чином:

- Номер коду
- Число тварин
- Дата відбору зразку
- Час відбору зразку

Аналітичні способи

Рівні глюкози вимірюють, застосовуючи спосіб глюкоза-оксидази (Super G Glucose analyzer; Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany).

Статистичні способи

Статистичні оцінки та графіки виконують за допомогою програмного забезпечення PRISM® 3,02 (GraphPad Software, Inc.). Усі параметри аналізують наочно, включаючи значення та стандартне відхилення.

Дія лікування на толерантність до глюкози

Ліковані плацебо діабетичні щури Zucker показали сильно підвищене відхилення глюкози у крові, що вказує на нетолерантність до глюкози як вияв цукрового діабету. Застосування 5мг/кг маси тіла глутамініл-піролідину дає обмежене поліпшення толерантності до глюкози у діабетичних щурів Zucker. Значне зниження підвищених рівнів глюкози у крові та поліпшення толерантності до глюкози досягають після застосування 15мг/кг та 50мг/кг маси тіла глутамініл-піролідину (дивись Фіг.3).

Приклад 11: Дослідження підвищення дози у жирних щурів Zucker після перорального застосування глутамініл-тіазолідину

Тварини

N=30 самців щурів Zucker (fa/fa), середній вік 11 тижнів (5-12 тижнів), середня маса тіла 350г (150-400г), отримано від Charles River (Sulzfeld, Germany). Після постачання їх тримають >12 тижнів, доки майже усі жирні щури Zucker не мали характеристик вираженого цукрового діабету. Групу з N=8 тварини застосовували для тестування трьох підвищуючихся доз глутамініл-тіазолідину відносно плацебо (фізіологічний розчин).

Умови утримання

Тварин тримають у клітках поодиноці у стандартизованих умовах з регульованою температурою (22±2°C) при циклі світло/темрява 12/12 годин (світло на при 06:00 ранку). Стерильну стандартну гранульовану їжу (ssniff® Soest, Germany) та воду з крану, підкислену HCl, дають досхочу.

Катетеризація сонної артерії

Жирних щурів Zucker віком 24-31 тижнів (у середньому: 25 тижнів), адаптованих до умов утримання, добре готують для дослідження.

Катетери імплантують у сонну артерію жирних щурів Zucker під загальною анестезією (інтраперитональною ін'єкцією 0,25мл/кг Rompun® [2%], BayerVital, Germany та 0,5мл/кг кета-міну 10, Atarost GmbH & Co., Twisting, Germany). Тваринам дають одужати протягом одного тижня. Катетери промивають гепарином-фізіологічним розчином (100IU/мл) три рази на тиждень.

Експериментальна схема

Плацебо (1мл фізіологічного розчину, 0,154моль/л) або підвищуючіся дози глутамініл-тіазолідину (5, 15 та 50мг/кг маси тіла) застосовують до групи з N=8 жирних щурів Zucker. Відповідну кількість глутамініл-тіазолідину розчиняють у

1000мкл фізіологічного розчину. Після голодування протягом ночі плацебо або тест-субстанцію застосовують до жирних щурів Zucker через зонд перорально (15G, 75мм; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) на - 10 хвилину. Пероральний тест толерантності до глюкози (OGTT) з 2г/кг глюкоз (40% розчин, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany) застосовують на ±0 хвилину через другий зонд. Зразки венозної крові з хвостових вен збирають на - 30 хвилину, - 15 хвилину, ±0 хвилину та на хвилини 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90 та 120 у скляні капіляри по 20мкл, які поміщають у стандартні труби, заповнені 1 мл розчину для виміру глюкози у крові.

Усі зразки крові помічають таким чином:

- Номер коду
- Число тварин
- Дата відбору зразку
- Час відбору зразку

Аналітичні способи

Рівні глюкози вимірюють, застосовуючи спосіб глюкоза-оксидази (Super G Glucose analyzer; Dr. MQHer Gerätebau, Freital, Germany).

Статистичні способи

Статистичні оцінки та графіки проводять за допомогою програмного забезпечення PRISM® 3,02 (GraphPad Software, Inc.). Усі параметри аналізують наочно, включаючи значення та стандартне відхилення.

Дія лікування на толерантність до глюкози

Ліковані плацебо діабетичні щури Zucker показали сильно підвищене відхилення глюкози у крові, що вказує на нетолерантність до глюкози як вияв цукрового діабету. Застосування 5мг/кг маси тіла, 15мг/кг та 50мг/кг глутамініл-тіазолідину дає залежне від дози зниження підвищених рівнів глюкози у крові та поліпшення толерантності до глюкози у діабетичних щурів Zucker (дивись Фіг.4).

Приклад 12: In vivo інактивація глутамініл-тіазолідину після перорального застосування до щурів Wistar

Тварини/Експериментальна схема

Глутамініл-тіазолідин застосовують до щурів Wistar перорально, як описано у прикладі 9

Аналітичні способи

Після застосування плацебо або глутамініл-тіазолідину, зразки артеріальної крові відбирають на хвилини 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 40, 60 та 120 з катетера сонної артерії притомних вільних щурів для визначення утворення продуктів розкладання глутамініл-тіазолідину.

Для аналізу способів простої твердо-фазної екстракції на патронах C18 використовують для виділення потрібної сполуки з плазми. Екстракти аналізують, застосовуючи обернено-фазову рідинну хроматографію на колонці Lichrospher 60 RP Select B з тандемною мас-спектрометрією у позитивному режимі XIAT. Спосіб з внутрішнім стандартом використовують для кількісного аналізу.

Результати

Після перорального застосування глутамініл-тіазолідину до щурів Wistar виявлено розкладання сполук. Застосовуючи PX/MC, продукт розкладання можна визначити як піроглутамініл-тіазолідин. Дивись графіки 5 та 6.

