



УКРАЇНА

(19) UA (11) 80711 (13) C2  
(51) МПК (2006)  
A61K 31/4439 (2006.01)  
A61P 17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

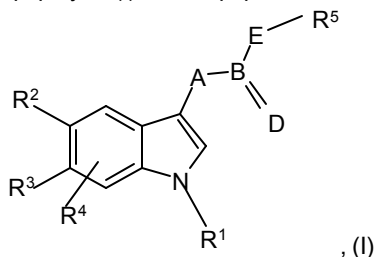
ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

### (54) СПОСІБ ЛОКАЛЬНОГО ЛІКУВАННЯ ШКІРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

(21) a200500163  
(22) 10.07.2003  
(24) 25.10.2007  
(86) РСТ/ЕР03/07514, 10.07.2003  
(31) 60/395,221  
(32) 11.07.2002  
(33) US  
(72) РУНДФЕЛЬДТ КРІС, КІЦМАН МАНФРЕД,  
ГОПМАН ЙОАХІМ, БЕУМЕР ВОЛЬФГАНГ, КУСС  
ХІЛЬДЕГАРД, ГЬОФГЕН НОРБЕРТ  
(73) ЕЛЬБІОН АГ  
(56) EHINGER A.M. ET AL: "Studies with AWD  
12281 in the skin of sensitized mice" NAUNYN-  
SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF  
PHARMACOLOGY, vol. 363, no. 4 Supplement,  
2001, p. R85  
BAEUMER WOLFGANG ET AL: "Effects of the  
phosphodiesterase 4 inhibitors SB 207499 and AWD  
12-281 on the inflammatory reaction in a model of  
allergic dermatitis." EUROPEAN JOURNAL OF  
PHARMACOLOGY, NETHERLANDS 20 JUN 2002,  
vol. 446, no. 1-3, 2002, p. 195-200  
US, 6 251 923, B1, 2001  
(57) 1. Спосіб лікування запальних та/або  
алергічних шкірних захворювань, який включає  
місцеве застосування, після алергічної провокації,  
до пацієнта, який потребує такого лікування,  
терапевтично ефективної кількості сполуки  
формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі:



де  
R<sup>1</sup> є

(i) -C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої  
будови або моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-  
алкеніл,  
факультативно заміщений однією або кількома  
групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-  
алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-  
C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl,

2

-Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -  
S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -  
SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -  
(CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або  
трициклічними насиченими або моно- або  
поліненасиченими карбоциклами, що мають у  
циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними  
насиченими або моно- або поліненасиченими  
гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-  
6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається  
перевага, є атомами N, O або S, причому згадані  
C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні  
замісники можуть бути факультативно заміщені  
однією або кількома групами R<sup>4</sup>,  
(ii) моно-, бі- або трициклічний насичений або  
моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в  
циклі 3-14 членів, або моно-, бі- або трициклічний  
насичений або моно- або поліненасичений  
гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6  
гетероатомів, які за варіантом, якому віддається  
перевага, є атомами N, O або S, або карбо- або  
гетероциклічний моно- або поліненасичений  
спіроцикл, що має в циклі 3-10 членів, причому  
гетероциклічні системи містять 1-6 гетероатомів,  
які за варіантом, якому віддається перевага, є  
атомами N, O або S,  
факультативно заміщений однією або кількома  
групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-  
алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-  
C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl,  
-Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -  
S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -  
SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -  
(CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або  
трициклічними насиченими або моно- або  
поліненасиченими карбоциклами, що мають у  
циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними  
насиченими або моно- або поліненасиченими  
гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-  
6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається  
перевага, є атомами N, O або S, причому згадані  
C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні  
замісники можуть бути факультативно заміщені  
однією або кількома групами R<sup>4</sup>,  
R<sup>5</sup> є  
моно-, бі- або трициклічний насичений або моно-  
або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-

(13) C2

(11) 80711

(19) UA

14 членів, або моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, або карбо- або гетероциклічний моно- або поліненасичений спіроцикл, що має в циклі 3-10 членів, причому гетероциклічні системи містять 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S,

факультативно заміщений однією або кількома групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), - (CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими карбоциклами, що мають у циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, причому згадані C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні замісники можуть бути факультативно заміщені однією або кількома групами R<sup>4</sup>,

за умови, що R<sup>5</sup> містить щонайменше один замісник, вибраний з групи, до якої входять -F, -Cl, -Br, -I;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> є атоми водню або -OH, причому щонайменше один із цих двох замісників має бути -OH;

R<sup>4</sup> є

-H, -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, -(CS)R<sup>6</sup>, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, причому кожний арил або алкіл може бути заміщений однією або кількома групами -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

R<sup>6</sup> є

-H, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил,

-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої будови, моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкеніл нормальної або розгалуженої будови,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S;

A – зв'язок або

-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>(CH=CH)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>, -(CHOZ)<sub>m</sub>, -(C=O)-, -(C=S)-, -(C=N-Z)-, -O-, -S-, -NZ-,

де m, p=0-3 та n=0-2, i

Z є

-H або

-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої будови,

моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкеніл нормальної або розгалуженої будови, моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S; B – атом вуглецю або сірки, або група -(S=O)-; D – атом кисню або сірки, CH<sub>2</sub> або N-Z, причому, якщо B – атом вуглецю, то D – O, S або CH<sub>2</sub>;

E – зв'язок або -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>, -O-, -S-, -(N-Z)-, де m та Z мають подані вище значення.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що R<sup>5</sup> вибраний з моноциклічних насичених або моно- або поліненасичених карбоциклів та гетероциклів, які мають щонайменше один галогеновий замісник.

3. Спосіб за п. 2, який відрізняється тим, що R<sup>5</sup> вибраний з моноциклічних ароматичних карбоциклів та гетероциклів, які мають щонайменше один галогеновий замісник.

4. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що R<sup>5</sup> – піридиновий цикл, який має щонайменше один галогеновий замісник.

5. Спосіб за п. 3, який відрізняється тим, що R<sup>5</sup> – фенільний цикл, який має щонайменше один галогеновий замісник.

6. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що R<sup>1</sup> вибраний з C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкілів, які є факультативно заміщеними.

7. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що R<sup>1</sup> вибраний з моноциклічних насичених або моно- або поліненасичених карбоциклів або гетероциклів, які є факультативно заміщеними.

8. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що R<sup>2</sup> є OH, а R<sup>3</sup> є H.

9. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що A вибраний з груп -(C=O)- та -(CHON)-.

10. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що B є атом C.

11. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що D є атом O.

12. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що E є група -(N-H)-.

13. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що сполукою (I) є N-(3,5-дихлор-4-піридиніл)-2-[1-(4-фторбензил)-5-гідроксі-1H-індол-3-іл]-2-оксоацетамід.

14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який відрізняється тим, що згаданим алергічним захворюванням є алергічний дерматит.

15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-14, який відрізняється тим, що згадану сполуку застосовують на ділянці шкіри, ураженій захворюванням.

16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, який відрізняється тим, що згадану сполуку застосовують через проміжок часу до 48 год. після алергічної провокації.

17. Спосіб за будь-яким із пп. 1-16, який відрізняється тим, що згадану сполуку (I)

застосовують спільно із щонайменше одним іншим фармацевтичним агентом.

18. Спосіб за п. 17, який відрізняється тим, що згаданим іншим фармацевтичним агентом є

лікарський засіб, який стимулює продукування cAMP.

19. Спосіб за п. 18, який відрізняється тим, що згаданим іншим фармацевтичним агентом є кортикостероїд.

Цей винахід стосується способу лікування запальних та/або алергічних шкірних захворювань, який включає місцеве застосування заміщеного гідроксіндолу.

Ізоферменти фосфодіестерази (PDE) беруть участь у регулюванні каскадів передачі клітинних сигналів шляхом модулювання рівнів циклічних нуклеотидів. На цей час ідентифіковано 11 ізоферментів PDE (Гіємбич (Giembycz), 2000). Ці ізоферменти відрізняються один від одного розподілом по клітинах та біохімічними функціями. У лейкоцитах пацієнтів, хворих на atopічний дерматит, зокрема, у дітей, виявлено високу активність PDE4 (Батлер (Butler) та ін., 1983; Купер (Cooper) та ін., 1985). PDE4 є основним ізоферментом у запальних клітинах, наприклад, у моноцитах та макрофагах, що продукуються моноцитами (Гантнер (Gantner) та ін., 1997), в еозинофілах (Дент (Dent) та ін., 1994) та в лімфоцитах В (Купер та ін., 1985). Інгібітори PDE4 виявляють дуже сильну протизапальну дію за рахунок підвищення внутрішньоклітинного рівня циклічного аденозинмонофосфату (cAMP). Внаслідок інгібування розкладу cAMP інгібітори PDE4 модулюють внутрішньоклітинні функції (наприклад, послаблення продукування пероксидів) та транскрипцію генів (наприклад, інгібування синтезу та/або вивільнення запальних цитокінів) (Гіємбич, 2000; Кусе (Kuss) та ін., 2002). Оскільки PDE4 експресується також кератиноцитами, то ці клітини можуть бути додатковою потенційною фармакологічною мішенню для боротьби із запальними захворюваннями шкіри при застосуванні інгібіторів PDE4 (Чухор (Chujor) та ін., 1998).

Гідроксіндоли, їх застосування як інгібіторів PDE4 та способи їх одержання розкрито [у WO99/55696]. Ці сполуки можна застосовувати при розладах, пов'язаних із діяльністю еозинофілів, зокрема, при запальних захворюваннях дихальних шляхів, наприклад, при бронхіальній астмі, алергічному риніті, алергічному кон'юнктивіті, атонічному дерматиті, екземі, алергічному васкуліті, запаленнях та проліферативних шкірних захворюваннях, наприклад, при псоріазі або кератозі. Можливими лікарськими формами таких сполук є композиції для перорального, парентерального, внутрішньовенного, черезшкірного, місцевого, інгаляційного або назального застосування. Особлива перевага віддається сполучі AWD 12-281.

Інгібітор PDE4 AWD 12-281 (N-(3,5-дихлор-4-піридиніл)-2-[1-(4-фторбензил)-5-гідрокси-1H-індол-3-іл]-2-оксоацетамід) був успішно випробуваний на моделі алергічного бронхостенозу. Він значно послаблював

бронхоспазматичну дію алергену в пасивно сенсibilізованих дихальних шляхах людини (Шмідт (Schmidt) та ін., 2000). AWD 12-281 інгібував вивільнення в стимульованих антигеном клітинах із носових поліпів людини посередників запалення, наприклад, GM-CSF (фактора стимуляції колоній гранулоцитів-макрофагів), TNF $\alpha$  ( $\alpha$ -фактора некрозу пухлин) та гістаміну (Кусе та ін., 2002). Крім того, AWD 12-281 інгібував дегрануляцію еозинофілів людини *in vitro* (Езеамюзі (Ezeamuzie), 2001). *In vivo* AWD 12-281 значно знижував нагромадження еозинофілів у рідині після бронхоальвеолярного промивання на пізній фазі реакції дихальних шляхів на антиген у сенсibilізованих пацієнтів виду Brown Norway. Продemonстровано також інгiбувальний вплив AWD 12-281 на iндуковану ліпополісахаридами (LPS) легенеvu нейтрофілію у свiйських свиней (Кусе та ін., 2002).

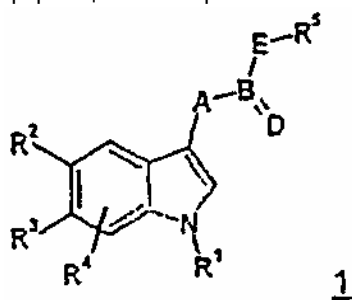
Іншим інгібітором PDE4 є ціломіласт, який на цей час оцінено як засіб для лікування астми (Грісуолд (Griswold) та ін., 1998; Гіємбич, 2000) та хронічного обструктивного легеневого захворювання. Зокрема, фаза II та фаза III клінічних випробувань, що стосувалися хронічного обструктивного легеневого захворювання, посвідчили клінічно значуще покращення функції легенів (Гіємбич, 2001; Дайк та Монтана (Duke & Montana), 2002).

Для стимуляції імунологічного запалення було застосовано раніше розроблене (Егінджер (Ehinger) та ін., 2000) випробування на набрякання вуха у мишей (MEST) на мишах, сенсibilізованих до толуюл-2,4-діізоціанату (TDI) способом Гада (Gad) та ін., 1986). Дірмен (Deaman) та ін., 1996) показали, що сенсibilізація шкіри TDI спричиняє продукування цитокіну тину Th2 у мишей лінії BALB/c. Активовані клітини лімфовузлів тварин, оброблених TDI, продукують істотні кількості штерлейкінів 4 та 10, але лише низькі рівні  $\gamma$ -інтерферону. Залежно від режиму сенсibilізації, контактний алерген TDI викликає IgE-незалежний (при короткочасній дії) або IgE-залежний (при тривалій дії) алергічний дерматит (Шеєренс (Scheerens) та ін., 1999). Високі значення IgE досягалися лише при довготривалій сенсibilізації. В одному з досліджень сенсibilізацію здійснювали протягом 120 днів.

Було проведено дослідження з метою одержання інформації про ефективність різних інгібіторів PDE4 стосовно до терапевтичного впливу на алергічні та/або запальні реакції. Для одержання більш повної характеристики iндукованого TDI набрякання вуха, визначалися цитокіни інтерлейкін (IL) 4, IL-6 та MIP-2 в тканинах оброблених вух мишей.

Було з'ясовано, що місцеве застосування AWD 12-281 як терапевтичне втручання після провокації TDI спричинило значне інгібування набрякання вуха. Навпаки, інгібітор PDE4 ціломіласт (SB207499), застосований як сполука порівняння, такого ефекту не викликав. Цей результат свідчить, що локально застосовувані гідроксиди, наприклад, AWD 12-281, є ефективними засобами профілактики та лікування алергічних або запальних шкірних захворювань.

Таким чином, цей винахід стосується способу лікування шкірних захворювань, який включає місцеве застосування до пацієнта, котрий потребує такого лікування, терапевтично ефективних кількостей сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі:



де  
R<sup>1</sup> є

(i) -C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої будови або моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкеніл,

факультативно заміщений однією або кількома групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -(CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими карбоциклами, що мають у циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, причому згадані C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні замісники можуть бути факультативно заміщені однією або кількома групами R<sup>4</sup>,

(ii) моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів, або моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, або карбо- або гетероциклічний моно- або поліненасичений спіроцикл, що має в циклі 3-10 членів, причому гетероциклічні системи містять 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S,

факультативно заміщений однією або кількома групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, причому кожний арил або алкіл може бути заміщений однією або кількома групами -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -(CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими карбоциклами, що мають у циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, причому згадані C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні замісники можуть бути факультативно заміщені однією або кількома групами R<sup>4</sup>,

R<sup>5</sup> є

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів, або моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, або карбо- або гетероциклічний моно- або поліненасичений спіроцикл, що має в циклі 3-10 членів, причому гетероциклічні системи містять 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S,

факультативно заміщений однією або кількома групами -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, -OSO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -OSO<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -(CS)R<sup>6</sup>, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими карбоциклами, що мають у циклі 3-14 членів, моно-, бі- або трициклічними насиченими або моно- або поліненасиченими гетероциклами, що мають у циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S, причому згадані C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арили та карбоциклічні і гетероциклічні замісники можуть бути факультативно заміщені однією або кількома групами R<sup>4</sup>,

за умови, що R<sup>5</sup> містить щонайменше один замісник, вибраний з групи, до якої входять -F, -Cl, -Br, -I;

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> є атоми водню або -OH, причому щонайменше один із цих двох замісників має бути -OH;

R<sup>4</sup> є

-H, -OH, -SH, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -COOH, -(CO)R<sup>6</sup>, -(CS)R<sup>6</sup>, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, причому кожний арил або алкіл може бути заміщений однією або кількома групами -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

R<sup>6</sup> є

-H, NH<sub>2</sub>, -NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл), -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)<sub>2</sub>, -NH(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -N(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил)<sub>2</sub>, -N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -NHCOR<sup>6</sup>, -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -O(CO)R<sup>6</sup>, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -SOR<sup>6</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, причому кожний арил або алкіл може бути заміщений однією або кількома групами -OH, -F, -Cl, -Br, -I;

алкіл)(C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил), -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -O-C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкіл, -S-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-арил,

-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої будови,

моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкеніл нормальної або розгалуженої будови,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S;

A є зв'язок або

-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-(CH=CH)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, -(CHOZ)<sub>m</sub>-, -(C=O)-, -(C=S)-, -(C=N-Z)-, -O-, -S-, -NZ-,

де m, p=0-3 та n=0-2, i

Z є

-H або

-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкіл нормальної або розгалуженої будови,

моно- або поліненасичений -C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-алкеніл нормальної або розгалуженої будови,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений карбоцикл, що має в циклі 3-14 членів,

моно-, бі- або трициклічний насичений або моно- або поліненасичений гетероцикл, що має в циклі 5-15 членів та 1-6 гетероатомів, які за варіантом, якому віддається перевага, є атомами N, O або S;

B є атом вуглецю або сірки, або група -(S=O)-;

D є атом кисню або сірки, CH<sub>2</sub> або N-Z,

причому, якщо B є атом вуглецю, то D є S або CH<sub>2</sub>;

E є зв'язок або -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -O-, -S-, -(N-Z)-, де m та Z мають подані вище значення.

Крім того, винахід стосується фармацевтично прийнятних солей сполук формули (I).

У сполуках формули (I), яким віддається перевага, R<sup>5</sup> вибраний з моноциклічних насичених або моно- або поліненасичених карбоциклів та гетероциклів, які мають щонайменше один галогеновий замісник, за варіантом, якому віддається більша перевага, - з моноциклічних ароматичних карбоциклів та гетероциклів, які мають щонайменше один галогеновий замісник, наприклад, 2 або 3 таких замісники. Прикладами замісників R<sup>5</sup>, яким віддається особлива перевага, є піридинові або фенільні цикли, які мають щонайменше один галогеновий замісник, наприклад, 3,5-дихлор-4-піридил, 2,6-дихлорфеніл, 2,6-дихлор-4-трифторметилфеніл, 2,6-дихлор-4-трифторметоксифеніл тощо.

R<sup>1</sup> за варіантом, якому віддається перевага, вибраний з C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-алкілів, наприклад, він є C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкіл, факультативно заміщений карбоциклом, наприклад, фенілом. Прикладами замісників R<sup>1</sup>, яким віддається особлива перевага, є етил, пропіл (н-пропіл або ізопропіл), бензил та галогензаміщений бензил, наприклад, 4-фторбензил, 2,6-дифторбензил тощо. Крім того, R<sup>1</sup> може бути вибраний з факультативно заміщених

моноциклічних моно- або поліненасичених карбоциклів та гетероциклів.

R<sup>2</sup> за варіантом, якому віддається перевага, є OH, а R<sup>3</sup> за варіантом, якому віддається перевага, є H. За варіантом, якому віддається перевага, A вибраний з груп -(CΘ)- та -(CHON)-. B за варіантом, якому віддається перевага, є C, D за варіантом, якому віддається перевага, є O, і E за варіантом, якому віддається перевага, є -(N-H)-. Прикладом сполуки (I), якій віддається особлива перевага, є AWD 12-281 (N-(3,5-дихлор-4-піридиніл)-2-[1-(4-фторбензил)-5-гідрокси-1H-індол-3-іл]-2-оксоацетамід) або його фармацевтично прийнятна сіль.

Сполуки за цим винаходом є корисними, зокрема, для лікування запальних та/або алергічних шкірних захворювань, більш конкретно, шкірних захворювань, пов'язаних із патологічно посиленою активністю PDE4, наприклад, алергічних захворювань, наприклад, алергічного дерматиту.

В цілому, сполуки формули (I) або їхні фармацевтично прийнятні солі можна застосовувати при приготуванні лікарських засобів для профілактичного або терапевтичного лікування будь-якого хворобливого стану людей або інших ссавців, спричиненого запальними реакціями шкіри, а також порушеннями проліферації та диференціації клітин шкіри. Сполуки формули (I) можна застосовувати при лікуванні запальних реакцій шкіри, наприклад, склериту, вогнищової склеродермії, бешчових запалень, звичайної пухирчатки, листовидної пухирчатки та пухирчаткоподібних бульб. Ці сполуки також сприятливо впливають на запальні захворювання шкіри (наприклад, плесканий червоний лишай), спричинені активованими T-клітинами або іншими клітинами імунної системи, наприклад, гранулоцитами, стовпчастими клітинами, макрофагами, або вивільненими медіаторами цих імунних клітин, наприклад, цитокінами. Крім того, ці сполуки є активними речовинами при лікуванні проявів аутоімунних захворювань на шкірі, наприклад, дерматоміозиту, червоного вовчаку тощо.

Оскільки ці сполуки здатні підвищувати рівень cAMP, то їх можна застосовувати при лікуванні доброякісних та злоякісних проліферативних шкірних захворювань у людей та інших ссавців. Термін "проліферативні шкірні захворювання" у значенні, вживаному в цьому описі, означає доброякісні та злоякісні проліферативні шкірні захворювання, які характеризуються прискореним поділом клітин в епідермії, дермі або їхніх придатках, пов'язаним із неповною диференціацією тканин. До таких захворювань належать: псоріаз, атопічний дерматит, неспецифічний дерматит, первинний контактний дерматит подразнювального походження, алергічний контактний дерматит, або алергічні розлади, наприклад, атопія, кропивниця, екзема, кератокон'юнктивіт, карциноми базальних та сквамозних клітин шкіри, пластинчастий іхтіоз, епідермолітичний гіперкератоз, простий бульозний епідермоліз, передраковий кератоз, спричинений

сонячним опроміненням, незлоякісний кератоз, вугри та себорейний дерматит, синдром Лайєлла, грануломатозні ураження шкіри у людей та atopічний дерматит, свербіж та короста у свійських та хатніх тварин.

Оскільки згадані сполуки здатні послаблювати запальні реакції, вони є корисними при лікуванні шкірних захворювань, спричинених бактеріальними, вірусними, грибковими або паразитарними інфекціями. Прикладами таких захворювань є мігруюча еритема, туберкульоз шкіри, хвороба Дайма, шкірний лейшманіоз, токсичний епідермічний некроліз, піодерміти, дерматомікози та геморої.

Сполуки формули (I) можна застосовувати також при лікуванні запальних реакцій шкіри, наприклад, склериту, вогнищевої склеродермії, бешихових запалень, звичайної пухирчатки, листовидної пухирчатки та бульозного пемфігоїду.

Оскільки внутрішньоклітинний рівень cAMP впливає на проліферацію клітин шкіри, то сполуки формули (I) сприяють загоєнню ран.

Сполуки формули (I) застосовуються місцевим, наприклад, черезшкірним, шляхом у вигляді лікарських форм, за варіантом, якому віддається перевага, у вигляді суспензій у воді або в маслі, які містять активний інгредієнт та придатні фармацевтично прийнятні носії, розріджувачі та допоміжні речовини.

Як правило, сполуки формули (I) або, в разі потреби, їхні фармацевтично прийнятні солі, можна вживати у вигляді фармацевтичних композицій для місцевого застосування у комбінації зі звичайними наповнювачами для місцевих фармацевтичних композицій. Фармацевтичні композиції для місцевого застосування можуть мати форму, наприклад, мазей, паст, лініментів, крапель, кремів або лосьйонів, імпрегнованих пов'язок, гелів, гелевих стрижнів, спреїв або аерозолів, і можуть містити придатні загальновідомі домішки, наприклад, консерванти, розчинники для сприяння всмоктуванню лікарської речовини та пом'якшувачі у мазях та кремах. Композиції можуть містити звичайні сумісні носії, наприклад, основи мазей або кремів, а також етанол або олеїловий спирт для лосьйонів. Для застосування сполук формули (I) або, в разі потреби, їхніх фармацевтично прийнятних солей, придатними є відомі рецептури кремів, лосьйонів, гелів, гелевих стрижнів, мазей, спреїв або аерозолів. Для лікування шкіри ректальної ділянки або, відповідно, слизової оболонки анального проходу сполуки формули (I) можна застосовувати у формі супозиторіїв.

Дозування активних сполук може варіювати залежно від віку та маси тіла пацієнта, природи та тяжкості захворювання, що підлягає лікуванню, та аналогічних факторів. Добову дозу можна застосовувати у формі однієї дози або поділяти на дві або більше часткових доз, і вона може бути в межах від 0,01 мг до 5000 мг.

За варіантам здійснення цього винаходу, якому віддається особлива перевага, сполуку наносять на ділянку шкіри, яка вже уражена

захворюванням. Наприклад, сполуку наносять після алергічної провокації, тобто після піддання пацієнта, котрий підлягає лікуванню, дії алергену і за варіантом, якому віддається перевага, після виявлення перших алергічних симптомів. Зокрема, перше застосування сполуки можна здійснювати через проміжок часу до 48 год., за варіантом, якому віддається перевага, до 24 год., після алергічної провокації. Потім застосування продовжують до досягнення бажаного ефекту.

Сполуку формули (I) можна застосовувати як єдиний активний інгредієнт або в комбінації із щонайменше одним іншим фармацевтичним агентом. Наприклад, сполуки формули (I) можна застосовувати спільно з лікарськими засобами, що стимулюють продукування cAMP, наприклад, із симпатоміметичними амінами, наприклад, з ізопреналіном, ізоетарином, салбутамолом, фенілеприном та ефедрином; із похідними ксантину, наприклад, із теofilіном та амінофіліном, та кортикостероїдами, наприклад, преднізолоном, і стимуляторами надниркових залоз, наприклад, АКГГ (адренкортикотропним гормоном). Можна застосовувати комбінацію фармацевтичних засобів, які впливають на імунну систему, наприклад, стероїдів, імунодепресантів (наприклад, такролімусу, сіролімусу, циклоспорину, пімекролімусу), інгібіторів циклооксигенази (наприклад, індометацину, диклофенаку, ібупрофену) або антигістамінів (дифенгідраміну, гідроксизину, лоратадину, цетиризину). Сполуки формули (I) можна застосовувати одночасно з іншими засобами, корисними для лікування шкірних захворювань, наприклад, із ретиноїдами, дитранолом, похідними вітаміну D, алефацептом, даклізумабом, етанерцептом тощо. Лікування шкірних захворювань, спричинених бактеріальними, вірусними, грибковими або паразитарними інфекціями, може бути доповнене застосуванням антибіотиків, наприклад, сульфамідів, еритроміцину та тетрациклінів. Оскільки на диференціацію та проліферацію клітин шкіри впливають протеси, наприклад, хемокіни (IP-10) або цитокіни (наприклад, IL-1 $\beta$ , IL-2), додаткове застосування таких медіаторів або антитіл може виявитися сприятливим при лікуванні шкірних захворювань.

Подані нижче рисунки та приклади більш детально пояснюють винахід.

Фіг.1: Проникнення AWD 12-281 через шкіру, виміряне із застосуванням дифузійної комірки "Franz" та шкіри спини пацієнта. Активність <sup>14</sup>C-AWD 12-281 вимірювали в плазмі протягом 360-хвилинного інкубування. Показано результати двох незалежних експериментів. На поголену шкіру наносили 15мкл (110322970 розпадів/хв.) <sup>14</sup>C-AWD 12-281 (розчиненого у суміші ацетон/ДМСО, 1:1).

Фіг.2: Вплив одноразового місцевого нанесення AWD 12-281, ціломіласту та дифлоразону на вуха мишей, сенсibiliзованих до TDI, за 2 год. до провокації TDI. Стовпчики характеризують ступінь набрякання вуха через 1 год, 5 год. та 24 год. після провокації TDI відносно значень, одержаних до провокації. Ступінь

набрякання вуха у мишей, оброблених TDI (чорні стовпчики) значно зростала у порівнянні до необроблених контрольних тварин (білі стовпчики). AWD 12-281 (1%, вертикально заштриховані стовпчики), а також ціломіласт (3%, стовпчики з перехресною штриховкою) та дифлоразон (0,05%, сірі стовпчики) значно інгібували набрякання у всі моменти вимірювання #. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  у порівнянні до оброблених TDI тварин ( $n=6$  (TDI=12) у кожній групі).

Фіг.3: Вплив одноразового місцевого нанесення AWD 12-281, ціломіласту та дифлоразону на вуха мишей, сенсibilізованих до TDI, через 1год. після провокації TDI (терапевтичне втручання). Стовпчики характеризують ступінь набрякання вуха через 5год. та 24год. після провокації TDI. Через 5год. після провокації значущої різниці між обробленими групами не виявлено. Через 24год. після провокації AWD 12-281 (1%, білі стовпчики), а також дифлоразон (0,05%, сірі стовпчики) значно інгібували набрякання у порівнянні до провокованих TDI тварин. Ціломіласт (3%, стовпчики з перехресною штриховкою) не викликав значного інгібування. \*\* $P < 0,01$  ( $n=6$  (TDI=12) у кожній групі).

Фіг.4: Вплив AWD 12-281 на набрякання вуха у мишей, сенсibilізованих до TDI із застосуванням довготривалої (120 днів) багаторазової обробки для сенсibilізації. Стовпчики характеризують ступінь набрякання вуха через 1год., 5год. та 24год. після провокації TDI. Через 1год. та 5год. після провокації значущої різниці між обробленими групами не виявлено. У порівнянні до провокованих TDI контрольних тварин (білі стовпчики) AWD 12-281 (3%, чорні стовпчики), застосований через 1год. після провокації TDI, спричиняв значне інгібування набрякання через 24год. після провокації. \*\* $P < 0,01$  ( $n=5$  у кожній групі).

Фіг.5: Концентрація інтерлейкіну-4 (A), інтерлейкіну-6 (B) та запального протеїну-2 макрофагів (MIP-2) (C) у гомогенізованих тканинах вуха миші через 24год. після провокації TDI. Проби брали в ході експерименту з місцевим застосуванням (дивись Фіг.2). У провокованих TDI вухах мишей спостерігалось значне зростання вмісту інтерлейкіну-4, інтерлейкіну-6 та запального протеїну-2 макрофагів. AWD 12-281 (1%) викликав незначне (IL-4, MIP-2) або слабке значуще (IL-6) пригнічення такого зростання. Ціломіласт (3%) та дифлоразон (0,05%) спричиняли значне зниження концентрацій усіх медіаторів. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  у порівнянні до оброблених TDI тварин ( $n=6$  (TDI=12) у кожній групі).

Фіг.6: Вплив інгібіторів PDE4 на індуковане TDI набрякання вуха у мишей. Вуха мишей обробляли 0,5% TDI. Через 1год. (сірі стовпчики) групи піддослідних мишей обробляли 3% AWD 12-281, 10% ціломіласту або залишали необробленими (TDI). Через 24год. визначали ступінь набрякання вух (чорні стовпчики). В той час як AWD 12-281 значно зменшував набрякання вуха, ціломіласт не

виявляв значущого інгібувального ефекту ( $P=0,09$ ).

#### Приклад

##### 1. Матеріали та методи

##### 1.1. Методика сенсibilізації

Самок мишей лінії BALB/c одержували з фірми Charles River (Зульцфельд, Німеччина) у віці 8 тижнів (маса тіла 20г). Усі тварини були здоровими. Мишей тримали групами по 6 тварин у клітках при 22°C в режимі чергування 12-годинних періодів освітлення та затемнення. Тварини мали вільний доступ до води та стандартного корму (Altromin, Лаге/Ліппе, Німеччина).

Після акліматизації протягом 1 тижня шкіру на череві мишей голили та піддавали депіляції препаратом Veet®. Потім ороговілі шари черевної шкіри знімали 10 разів, застосовуючи клейку стрічку. Для активної сенсibilізації на очищену епідерму наносили 100мкл 5% TDI в ацетоні на протязі 4 послідовних днів.

Через 21 день збуджували алергічну реакцію шляхом нанесення 10мкл 0,5% TDI в ацетоні на обидві (внутрішню та зовнішню) поверхні лівого вуха тварин із метою випробування стану сенсibilізації. Перед провокацією та через 24год. після неї вимірювали товщину вуха за допомогою кутиметра (модель 7309, Mitutoyo, Нойсс, Німеччина). Ступінь набрякання розраховували шляхом зіставлення значень, одержаних перед провокацією та через 24год. після неї. Тварин, які мали середню різницю в набряканні менше за 20% через 24год. після провокації у порівнянні до попередньо визначеного індивідуального базового значення (приблизно 230мкм), виключали з експерименту як несенсibilізованих. Інших мишей рівномірно розподіляли по дослідних групах ( $n=6$ ) з урахуванням інтенсивності набрякання, так що кожна група включала тварин із різною інтенсивністю реакції. Тварин залишали у спокої до досягнення майже нормальної товщини вуха через 7 днів. З метою виключення впливу залишкових кількостей алергену на вухах для основного експерименту використовували необроблені праві вуха.

##### 1.2. Місцеве нанесення

Одну групу мишей ( $n=6$ ) залишали без сенсibilізації та без провокації. Другу групу ( $n=12$ ) піддавали локальній провокації шляхом нанесення 20мкл (по 10мкл на внутрішню та зовнішню поверхні) 0,5% TDI в ацетоні на праве вух. За 2год. до провокації TDI третю та четверту групи ( $n=6$  у кожній) обробляли нанесенням 20мкл (по 10мкл на внутрішню та зовнішню поверхні вуха) AWD 12-281 (1%, 200мкг) або ціломіласту (3%, 600мкг; обидві речовини в суміші ацетон/ДМСО 9:1) на праве вух. Дифлоразон (20мкл, 0,05%, 10мкг, в ацетоні) застосовували як позитивний кортикоїдний контроль ( $n=6$ ). Цих мишей умертвляли шляхом відділення голови через 24год. після провокації, і вуха збирали (дивись нижче).

Для моделювання терапевтичних умов три додаткові групи ( $n=6$ ) одержували AWD 12-281 (1%), ціломіласт (3%) або дифлоразон (0,05%) місцевим шляхом через 1год. після провокації TDI,

тобто безпосередньо після вимірювання товщини вуха. Товщину вуха визначали також через 5год. та 24год. після провокації TDI.

Через 5 тижнів після першої провокації тварин, які були "терапевтично" оброблені AWD 12-281 (1%) та ціломіластом (3%), піддавали повторній провокації. Перед провокацією одну групу обробляли AWD 12-281 (3%).

Крім того, був виконаний експеримент для одержання інформації про терапевтичну дію AWD 12-281 у моделі довготривалого впливу TDI. З цією метою 10 мишей обробляли 100мкл 0,5% TDI, наносячи препарат на черевну шкіру протягом 120 днів з 10-денними інтервалами. Через 10 днів після останньої обробки черева TDI мишей піддавали провокації шляхом нанесення на ліве вуха 20мкл 0,5% TDI (по 10мкл на внутрішню та зовнішню поверхню). Через 1год. після провокації 5 мишей обробляли AWD 12-281 (3%), а 5 мишей обробляли носієм. Перед провокацією та через 1 год, 5год. і 24год. після неї вимірювали товщину вуха.

### 1.3. Визначення питокінів

Частина зібраних вух фіксували в 4% формальдегіді для гістологічних досліджень і забарвлювали гематоксиліном-еозином для дослідження на товщину шкіри та накопичення гранулоцитів. Ці параметри вимірювали на 10 ділянках при 40-кратному збільшенні. Залишок тканини одразу після відбирання проб швидко заморожували і зберігали в рідкому азоті. Для визначення біохімічних параметрів вуха мишей гомогенізували у рідкому азоті. Гомогенізати змішували з 200мкл середовища RPMI 1640, додавали до суміші інгібітор протеази Pefablock® (1ммоль) і інтенсивно перемішували проби. Після центрифугування (10000хг, 10хв, 4°C) надосадову рідину збирали і визначали вміст протеїнів у ній. Проби зберігали при -80°C до визначення цитокінів. Вимірювали вміст інтерлейкінів IL-4, IL-6 та MIP-2 методом твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) із застосуванням наявних на ринку комплектів згідно з інструкціями виробників.

### 1.4. Проникнення <sup>14</sup>C-AWD 12-281 через шкіру спини пацюка

Здатність <sup>14</sup>C-AWD 12-281 проходити крізь шкіру спини пацюка випробовували у дифузійній комірі (комірці Франца). Сушу поголену шкіру спини пацюка закріплювали на дифузійній комірі так, щоб ділянка дермальної поверхні діаметром 1,5см контактувала з підігрітим (34°C) буфером (бичачою сироваткою). На поголену шкіру наносили 15мкл (110322970 розпадів/хв.) <sup>14</sup>C-AWD 12-281 (розчиненого у суміші ацетон/ДМСО, 1:1). Проби відбирали через 15хв, 60хв, 120хв, 180хв, 240хв, 300хв та 360хв, і вимірювали радіоактивність за допомогою β-лічильника (Beckman, Мюнхен, Німеччина). Експеримент повторювали двічі.

### 1.5. Реагенти

TDI одержували від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Дайзенгофен, Німеччина). AWD 12-281, <sup>14</sup>C-AWD 12-281 та ціломіласт одержували від фірми AWD (Дрезден, Німеччина). Ацетон, ПЕГ-

200 та ДМСО одержували від фірми Merck (Дармштадт, Німеччина); формальдегід - від фірми Fluka (Дайзенгофен, Німеччина); Miglyol та гідроксietилцелюлозу - від фірми Caesar & Loritz (Гільден, Німеччина), а середовище RPMI 1640 - від фірми Biochrom (Берлін, Німеччина). Комплекти ELISA для визначення цитокінів одержували від фірми R&D Systems (Бісбаден, Німеччина). Pefablock® одержували від фірми Boehringer Mannheim (Німеччина). Крем для депіляції (Veet®) є фірмовим продуктом фірми Reckitt & Colman (Гамбург, Німеччина). Клейку стрічку (TesaFilm®) одержували від фірми Beiersdorf (Гамбург, Німеччина). Вміст протеїнів визначали за допомогою комплексу фірми Biorad® (Мюнхен, Німеччина).

### 1.6. Статистична обробка

Результати подано у вигляді середнього значення та стандартного відхилення (SE). Результати, одержані для різних груп тварин, перевіряли на значущість різниці за допомогою критерію Манна-Уїтні (U-критерій). Оскільки дані для оброблених TDI контрольних мишей зіставлялися з результатами для 3-5 інших груп, у більшості експериментів було застосовано подвоєну кількість оброблених TDI тварин (n=12).

### 2. Результати

#### 2.1. Проникнення <sup>14</sup>C-AWD 12-281 через шкіру спини пацюка

В обох експериментах вимірювали підвищення радіоактивності у буферних розчинах, яке є показником проникнення <sup>14</sup>C-AWD 12-281 через шкіру. Кількість радіоактивності, виміряної через 360хв. після нанесення, становила приблизно 0,22% та 0,08% загальної активності (Фіг.1).

#### 2.2. Місцеве нанесення Набрякання вух мишей

Контрольні миші показали середнє збільшення товщини вуха приблизно на 30%, 20% і 60% відповідно через 1год., 5год. і 24год. після провокації TDI. При місцевому нанесенні за 2год. до провокації TDI AWD 12-281 (1%), ціломіласт (3%) та дифлоразон (0,05%) значно інгібували індуковане TDI набрякання у всі моменти вимірювання (Фіг.2).

Групи тварин, використаних для випробування терапевтичного ефекту AWD 12-281, показали 25-30% набрякання через 1год. після провокації TDI, тобто безпосередньо перед застосуванням лікарської речовини. Після оброблення лікарською речовиною, через 5год. після провокації TDI не спостерігалось значуще подальше набрякання, і різні групи оброблених тварин значуще не відрізнялися одна від одної. Однак через 24год. після провокації AWD 12-281 та дифлоразон значно інгібували індуковане TDI набрякання вуха. Ціломіласт спричиняв певне зменшення набрякання, яке не було значущим (Фіг.3).

В останньому експерименті з довготривалою (120-денною) сенсibiliзацією нанесення TDI на вуха мишей спричиняло збільшення товщини вуха приблизно на 40% через 1год. після провокації. Місцеве нанесення AWD 12-281 (3%) із "терапевтичною" метою через 1год. після провокації спричиняло незначне інгібування через 5год. після провокації. Однак через 24год. після



провокації спостерігалось майже повне зникнення набрякання під впливом AWD 12-281 (Фіг.4).

Гістологічне дослідження

Гістологічне дослідження шкіри вух мишей через 24 год. після провокації TDI посвідчує виразний набряк та приплив запальних клітин (головним чином, гранулоцитів). AWD 12-281, ціломіласт та дифлоразон помітно інгібували ці запальні процеси (Таблиця 1).

Медіатори запалення у шкірі мишей

Концентрація цитокінів у вухах мишей, повторно провокованих через 5 тижнів після першої обробки, в цілому підвищена. Очевидно, це явище обумовлене залишками запальних клітин у шкірі вуха. Тому ці результати (TDI у порівнянні з AWD 12-281 3%) подано у Таблиці 2 окремо.

У шкірі мишей, оброблених TDI, через 24 год. після провокації спостерігалось значне збільшення концентрації IL-4 (Фіг.5а). 1% AWD 12-281 викликав незначний інгібувальний ефект, тоді як 3% AWD 12-281 (Таблиця 2), ціломіласт (3%) та дифлоразон (0,05%) значно інгібували згадане підвищення.

Концентрація IL-6 також значно підвищувалася під впливом TDI через 24 год. після провокації. AWD 12-281 (1%, 3%), ціломіласт (3%) та дифлоразон (0,05%) значно інгібували цю реакцію. AWD 12-281 (3%), ціломіласт та дифлоразон спричиняли порівнянні ефективності інгібування, тоді як AWD 12-281 (1%) давав лише незначний ефект (Фіг.5б, таблиця 2).

Концентрація MIP-2, котрий є функціональним гомологом IL-8 людини, також підвищувалася після провокації TDI. В той час як 1% AWD 12-281 викликав незначне послаблення цього підвищення, 3% AWD 12-281, ціломіласт (3%) та дифлоразон (0,05%) значно інгібували згадане підвищення концентрації MIP-2 (Фіг.5с, Таблиця 2).

### 3. Обговорення

Це дослідження було виконане з метою вивчення впливу інгібіторів PDE4 на індуковане TDI набрякання вух мишей. TDI, нанесений на шкіру, викликає переважно реакцію, опосередковану цитокінами типу Th2, яка виявляється у високих рівнях інтерлейкінів 4 та 10 в активованих клітинах лімфовузлів у тварин, оброблених TDI, при низьких рівнях  $\alpha$ -інтерферону (Дірмен (Deaman) та ін., 1996; Хаясі (Hayashi) та ін., 2001). Наші результати свідчать, що інші цитокіни, наприклад, IL-1 $\beta$ , IL-6 та MIP-2, також беруть участь в алергічній або запальній реакції шкіри на TDI. Підвищення вмісту цитокінів, що сприяють запаленню, супроводжується припливом запальних клітин, наприклад, нейтрофілів та еозинофілів (Таблиця 1) та виразним набряком. Тому набрякання вуха є корисним як функціональний параметр.

Було виконано випробування на проникнення AWD 12-281 через шкіру. В нашому експерименті AWD 12-281 дуже добре поглинався та міг проникати в буферний розчин. Виявлене сумарне поглинання через 6 год. (відповідно 0,08% та 0,22%) перевищує в 10 разів поглинання гідрокортизону, виміряне для людської шкіри у

дифузійних комірках Франца (Гюбер (Hueber) та ін., 1994).

Результати, що стосуються місцевого нанесення інгібіторів PDE4 перед провокацією TDI, підтверджують попередні результати (Егінджер (Ehinger) та ін., 2000). В цьому дослідженні AWD 12-281 застосовувався в меншій дозі з метою врахування різних значень IC<sub>50</sub> стосовно до PDE4. Значення IC<sub>50</sub> AWD 12-281 приблизно в 10 разів нижче, ніж для ціломіласту (Грісволд (Griswold) та ін., 1998; Кусе (Kuss) та ін., 2002).

На відміну від попередніх результатів, в нашому випадку було можливо одержати більш чіткий позитивний контроль шляхом модифікування методики сенсibilізації. Шляхом повторного використання методик сенсibilізації, описаної в цьому дослідженні, виявилось можливим відтворювати та стандартизувати високу інтенсивність реакції на TDI через 24 год. після провокації (результати не показані). Завдяки цій високій інтенсивності реакції у вказаний момент часу нам вдалося детектувати великі кількості цитокінів. З метою наближення до клінічних умов, було вирішено випробувати вплив інгібіторів PDE4 при лікуванні вже викликані алергічної або запальної реакції. Тому інгібітори PDE4 застосовували через 1 год. після провокації TDI, коли початок запальних процесів відображався як середнє набрякання вуха на 30%. AWD 12-281, хоч і застосовуваний у зниженій дозі (1%), значно послаблював запальну реакцію на TDI через 24 год. після провокації. Цей факт було підтверджено дослідженням, при якому визначався вплив довготривалої обробки TDI. Одним з ефектів цієї довготривалої обробки було посилене набрякання вуха через 1 год. після провокації (Фіг.4), яке, можливо, було викликане посиленою реакцією, опосередкованою IgE (Шееренс (Scheerens) та ін., 1999). При застосуванні в підвищеній концентрації (3%) AWD 12-281 майже повністю усував індуковане TDI набрякання в цьому дослідженні з довготривалою сенсibilізацією (Фіг.4). Гістологічне дослідження вух мишей, оброблених AWD 12-281, посвідчило майже повну відсутність запальних клітин та транссудації судин, на відміну від позитивного контролю (дані не показані).

Для визначення медіаторів запалення, відповідальних за індуковане TDI набрякання вуха, були виміряні концентрації цитокінів - інтерлейкінів IL-4, IL-6 та MIP-2 в оброблених вухах мишей.

У гострих пошкодженнях шкіри пацієнтів, що страждають на atopічний дерматит, виявлено надлишкове продукування IL-4 (Ганіфен (Hanifin) та ін., 1996; Шпергель (Spergel) та ін., 1999). Отже, нас цікавив вплив TDI на продукування IL-4 у шкірі мишей. Можливості утворення IL-4 у шкірі обмежені, оскільки кератиноцити та клітини Лангерганса не продукують цей цитокін (Шрідхар (Shreedhar) та ін., 1998; Моріта (Morita) та ін., 2001). Тому цікавим є факт наявності дуже сильного ефекту такого тину в позитивному контролі. Очевидно, джерелом IL-4 у шкірі є тканинні базофільні гранулоцити (Гарвіма (Harvima) та ін., 1994; Дастич (Dastyh) та ін., 1999)

та приплив клітин Th<sub>2</sub> (Шрідхар (Shreedhar) та ін., 1998). Здатність циломіласту інгібувати IL-4 in vivo продемонстровано також на моделі хронічної контактної чутливості, індукованої оксазолоном (Грісуолд (Griswold) та ін., 1998). Недостатній модуляторний ефект AWD 12-281 (1%) обумовлений зниженою дозою, оскільки 3% AWD 12-281 дають 80% зниження концентрації IL-4 (Таблиця 2В).

Описано підвищення концентрації IL-6 під впливом TDI in vitro (Маттолі (Mattoli) та ін., 1991). IL-6 продукується кератиноцитами після запального подразника (Маккензі (McKenzie) та ін., 1990). Інгібування вивільнення IL-6 під впливом інгібіторів PDE4 описано також для макрофагів, стимульованих LPS (Камбаясі (Kambayashi) та ін., 1995).

Цитокін MIP-2 відіграє вирішальну роль у хемотаксиді нейтрофілів. Провоковане TDI набрякання вуха, виявлене у цьому дослідженні, супроводжується сильним припливом нейтрофілів. Інгібувальний ефект циломіласту, дифлоразону та AWD 12-281 (3%) може бути поясненням послабленого припливу нейтрофілів після оброблення інгібітором PDE4 або глюкокортикоїдом.

Сукупність вищезгаданих результатів свідчить, що AWD 12-281, а також циломіласт здатні інгібувати запальні реакції в моделі алергічного дерматиту. Протизапальний вплив AWD 12-281 надійно виявляється при застосуванні його місцевим способом, при цьому має місце очевидне покращення інгібування під впливом 3% препарату у порівнянні з 1% (Фіг.3 та Фіг.4). Хоча циломіласт (3%) також виявляє інгібувальну дію при введенні пероральним та внутрішньоочеревним шляхами, його інгібувальний ефект є незначним при застосуванні після провокації TDI (Фіг.3). З урахуванням того, що лікування алергічних реакцій має більше клінічне значення, ніж профілактичні заходи, ці дані посвідчують перевагу AWD 12-281 та аналогічних похідних гідроксидолу при лікуванні шкірних захворювань, зокрема, алергічних та запальних реакцій на шкірі.

Гістологічне дослідження припливу клітин у вухах мишей після застосування циломіласту та AWD 12-281.

Проби тканини було взято в експерименті з місцевим застосуванням (див. Фіг. 2).

	необроблені	
	контроль	носій
Кількість гранулоцитів у дермі	-	+++

Таблиця 2А

Набрякання вуха через 24 год. після провокації TDI та середні рівні (±СКВ) IL-4, IL-6 та MIP-2 (пг/400мкг протешу) у гомогенізованих тканинах вух мишей через 24 год. після провокації TDI після обробки AWD 12-281 (3%). \*\*P<0,01

Провокація TDI		
	носій (контроль)	AWD 12-281 (3%)
Набрякання вуха (%)	51±7	12**
IL-4	67±2	12±3**

IL-6	89±5	42±6**
MIP-2	286±39	72±8**

Таблиця 2В

Зіставлення інгібувального ефекту (середнє інгібування (%) індукованого TDI синтезу) AWD 12-281 (3%), циломіласту (3%) та дифлоразону (0,05%)

Цитокін	AWD 12-281 (3%)	циломіласт (3%)	дифлоразон (0,05%)
IL-4	81	74	50
IL-6	52	49	52
MIP-2	75	66	76

#### Посилання:

BUTLER J.M., CHANS.C., STEVENS S.R. & HANIFIN J.M. (1983). Increased leukocyte histamine release with elevated cyclic AMP-phospho-diesterase activity in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 71, 490-497.

COOPER K.D., KANK K., CHAN S.C. & HANIFIN J.M. (1985). Phos-phodiesterase inhibition by Ro 20-1724 reduces hyper-IgE synthesis by atopic dermatitis cells in vitro. J. Invest. Dermatol. 84, 477-482.

DASTYCHJ., WALCZAK-DRZEWIECKAA, WYCZOLKOWSKA J. & METCALFE D.D. (1999). Murine mast cells exposed to mercuric chloride release granule-associated N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and secrete IL-4 and TNF-alpha. J. Allergy Clin. Immunol. 103, 1108-1114.

DEARMAN R.J., BASKETTER D.A. & KIMBER I. (1996). Characterisation of chemical allergens as a function of divergent cytokine secretion profiles induced in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 138, 308-316

DENT G., GIEMBYCZ M.A., EVANS P.M., RABE K.F. & BARNES P.J. (1994). Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: interaction with the beta adrenoreceptor agonist albuterol. J. Pharmacol. Exp. Ther. 271, 1167-1174.

DYKE H.J. & MONTANA J.G. (2002): Update on the therapeutic potential of PDE4 inhibitors. Expert Opin. Investig. Drugs 11, 1-13.

EHINGERA.M., GORR G., HOPPMANN, TELSER E., EHINGER B. & KIETZMANN M. (2000).

Effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor.

RR 7301 in a model of immunological inflammation. Eur. J. Pharmacol. 392, 93-99.

ENKHAJ, & SATO S. (1995). Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1398-1402.

EZEAMUZIE C.I. (2001). Requirement of additional adenylate cyclase activation for the inhibition of human eosinophil degranulation by phosphodiesterase IV inhibitors. Eur. J. Pharmacol. 417, 11-18.

GAD S.C., DUNN B.J., DOBBS D.W., REILLY C & WALSH R.D. (1986). Development and validation of an alternative dermal sensitization test: the mouse ear swelling test (MEST). Toxicol. Appl. Pharmacol. 84, 93-114.

GANTNERR, KUPFERSCHMIDT R., SCHUDT C, WENDELA. & HAT-ZELMANN A. (1997). In vitro

differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumor necrosis factor release by PDE inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 121, 221-231.

GIEMBYCZ M.A. (2000). Phosphodiesterase 4 inhibitors and the treatment of asthma: where are we now and where do we go from here? *Drugs* 59, 193-212.

GIEMBICZ M.A. (2001). Cilomilast: a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 1361-1379.

GRISWOLD D.E., WEBB E.F., BADGER AM., GORYCKI P.D., LEVAN-DOSKIP.A., BARNETTE M.A., GROUS M., CHRISTENSEN S. & TOR-PHYTJ. (1998). SB 207499 (Ariflo), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor, reduces tumor necrosis factor (and interleukin-4 production in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 287, 705-711.

HANIFIN J.M., CHAN S.C., CHENG S.B., TOFTE S.J., HENDERSON W.R., KIRBY D.S. & WEINER E.S. (1996). Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 107, 51-56.

HARVIMA I.T., HORSMANHEIMO L., NAUKKARINEN A. & HORSMAN HEIMO M. (1994). Mast cell proteinase and cytokines in skin inflammation. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 61-67.

HATZELMANN A. & SCHUDT C (2001). Anti-inflammatory and immuno-modulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 297, 267-279.

HAYASHI M., HIGASHI K., KATO H. & KANEKO H. (2001). Assessment of preferential Th1 or Th2 induction by low-molecular-weight compounds using a reverse transkription-polymerase chain reaction method Comparison of two mouse strains, C57BL/6 and Balb/c. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 38-45.

HEER S., KUESTERS S. & SZELENYI I. (1999). In vitro effect of the selective phosphodiesterase 4 inhibitor AWD 12-281 and of glucocorticoids on lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF $\alpha$ -release in diluted and undiluted human blood of healthy volunteers. *N.-S. Archiv Pharmacol.* 359 (Suppl. 3), 327.

HUEBERR, SCHAEFERH. & WEPIERRE J. (1994). Role of trans-epidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: In vitro studies on human skin. *Skin Pharmacol.* 7, 237-244.

KAMBAYASHI T., JAKOB CO., ZHOU D., MAZUREKN., FONG M. & STRASSMANN G. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 155, 4909-4916.

KAROLM.H., TOLLERUD D.J., CAMPBELL T.P., FABBRI L., MAE-STRELLI P., SAETTA M. & MAPP C.E. (1994). Predictive value of airways hyperresponsiveness and circulating IgE for identifying types of responses to toluene diisocyanate inhalation challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149, 611-615.

KONDOS., PASTORES., SHIVJI G.M., MCKENZIE R.C. & SAUDER D.N. (1994).

Characterisation of epidermal cytokine profiles in sensitization and elicitation phases of allergic contact dermatitis as well as irritant contact dermatitis. *Lymphok. Cytok. Res.* 13, 367-375.

KUSSH., HOFGENN., EGERLAND U., HEER S., MARX D., SZELENYI, SCHUPKEA, GASPARIC M., OLBRICH M., HEMPEL R., HARTENHAUER H., KRONE D., BERTHOLD K., KRONBACH T. & RUNDFELDT C (2002). AWD 12-281. *Drug Future* 27, 111-116.

MAESTRELLI P., DI STEFANO A, OCCARI P., TURATO G., MILANIG., PIVROTTOF., MAPP C.E., FABBRI L.M. & SAETTA M. (1995). Cytokines in the airway mucosa of subjects with asthma induced by toluene diisocyanate. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 607-612.

MCKENZIE R.C. & SAUDER D.N. (1990). The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol.* 95 (Suppl.) 105S-107S.

SCHEERENSH., BUCKLEY T.L., MUIS T.L., GARSSSEN J., DORMANS J., NIJKAMP F.P. & VAN LOWEREN H. (1999). Longterm topical exposure to toluene diisocyanate in mice leads to antibody production and in vivo airway hyperresponsiveness three hours after intranasal challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1074-1080.

SCHMIDT D.T., WATSON N., DENT G., RUHLMANN E., BRANSCHIED D., MAGNUSSEN H. & RABE K.F. (2000). The effect of selective and non-selective phosphodiesterase inhibitors on allergen- and leukotriene C4-induced contractions in passively sensitized human airways. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1607-1618.

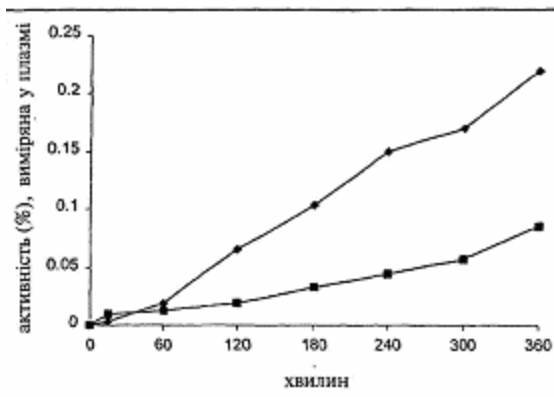
SIKORSKI E.E., GERBERICK G.F., LIMARDI L.C. (1997). Evaluation of cytokine message in the EpiDem in vitro skin model following application of contact allergens and skin irritants. *J. Invest. Dermatol.* 108, 662.

SPERGELJ.M., MIZOGUSCHI E., OETTGEN H., BHAN A.K. & GEHAR.S. (1999). Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of dermatitis. *J. Clin. Invest.* 103, 1103-1111.

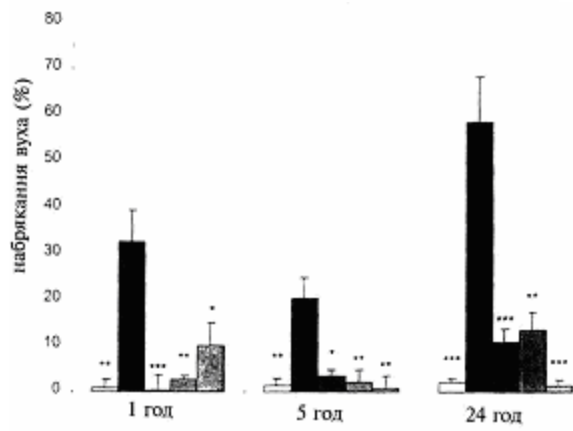
TOFOVICS.P., ZACCHARIA L.C, CARCILLO J.A. & JACKSON E.K. (2000). Inhibition of cytokine release by and cardiac effects of type IV phosphodiesterase inhibition in early, profound endotoxaemia in vivo. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 787-792.

TOMINAGA M., KOHNO S., TANAKA K. & OHATA K. (1985). Studies on toluene diisocyanate (TDI)-induced delayed type hypersensitivity. *Jpn. J. Pharmacol.* 39, 163-171.

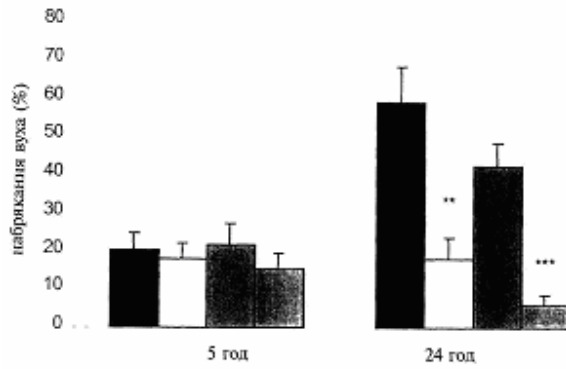
VERGHESE M.W., MCCONNELL R.T., STRICKLAND AB., GOODINGR.C, STIMPSON S.A., YARNALLD.P., TAYLOR J.D. & FURDON PJ. (1995). Differential regulation of human monocyte-derived TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 1313-1320.



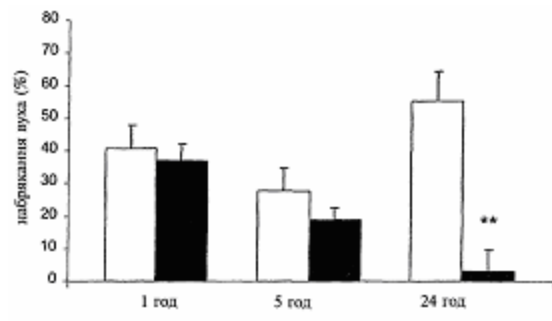
ФІГ. 1



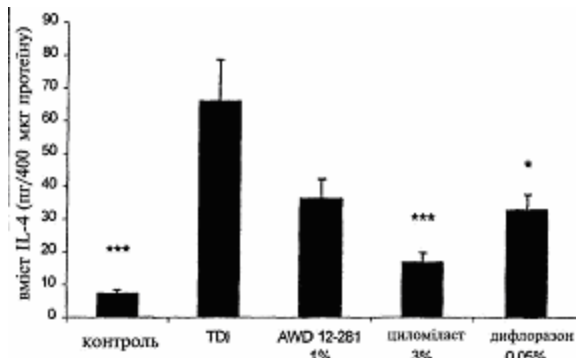
ФІГ. 2



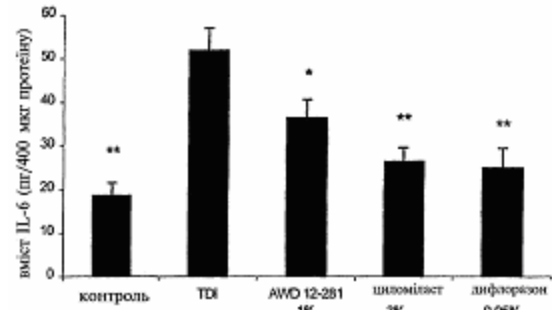
ФІГ. 3



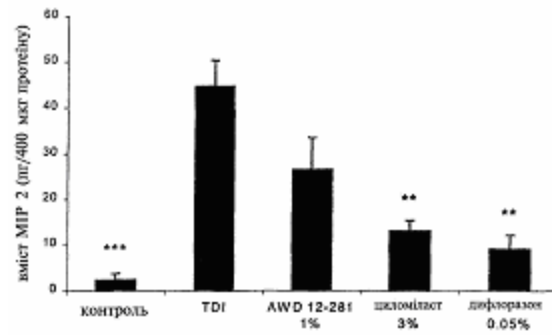
ФІГ. 4



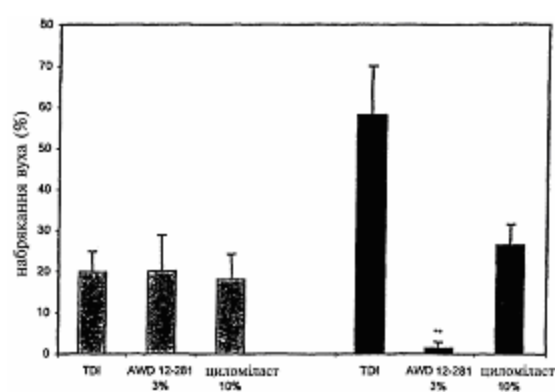
ФІГ. 5a



ФІГ. 5b



ФІГ. 5c



ФІГ. 6