



УКРАЇНА

(19) UA (11) 76339 (13) C2

(51) МПК (2006)

C07D 401/10 (2006.01)

C07D 239/06 (2006.01)

A61K 31/495

A61P 29/00

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

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

(54) ГЕТЕРОЦИКЛІЧНІ СПОЛУКИ, ЯКІ ІНГІБУЮТЬ АДГЕЗІЮ ЛЕЙКОЦИТУ, ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ІНТЕГРИНОМ □4

1

(21) 20041008397

(22) 27.05.2003

(24) 17.07.2006

(86) PCT/US03/16804, 27.05.2003

(31) 60/383,020

(32) 24.05.2002

(33) US

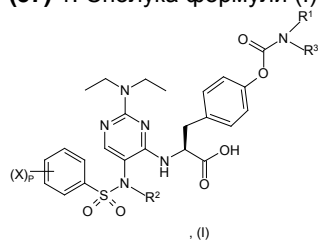
(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Конрадї Андрей В., US, Сємко Крістофер М., US, Ксу Іїнг-Зї , US, Стаппенбек Франк , US, Ступї Брайан П., US, Сміт Джєніфєр , US, Торсетт Юджин Д., US, Плейсс Майкл А., US

(73) ЕЛАН ФАРМАСЬЮТІКАЛЗ, ІНК., US

(56) US 6 492 372

(57) 1. Сполука формули (I):



де кожен X означає незалежно фтор, хлор або бром;

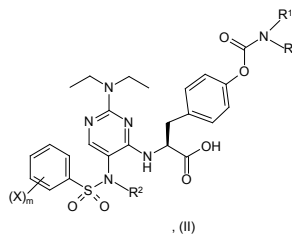
p є цілим числом від 0 до 3;

R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидиніл, піролідиніл, піроліл, 2,5-дигідропірол-1-іл, піперидиніл або 1,2,3,6-тетрагідропіридин-1-іл;R² вибирають із групи, що складається з нижчого алкілу, нижчого алкенілу і нижчого алкіленциклоалкілу;

та її фармацевтично прийнятні солі.

2. Сполука формули (II):

2



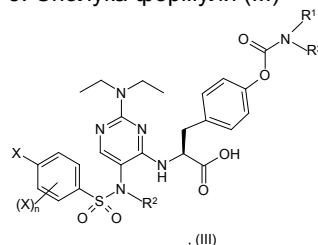
де кожен X є незалежно вибраним із групи, що складається з фтору і хлору;

m є цілим числом, що дорівнює 1 або 2;

R² вибирають із групи, що складається з нижчого алкілу, нижчого алкенілу і нижчого алкіленциклоалкілу;R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та її фармацевтично прийнятні солі.

3. Сполука формули (III)



де кожен X означає незалежно фтор або хлор; n дорівнює нулю або одиниці;

R² являє собою -CH₂-R', де R' вибирають із групи, що складається з водню, метилу або -CH=CH₂;R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

(13) C2

(11) 76339

(19) UA

та її фармацевтично прийнятні солі.

4. Сполука за п.1, де R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу.

5. Сполука за будь-яким із пп.1, 2 або 3, де R^2 являє собою CH_3 .

6. Сполука за п.3, де X являє собою F або Cl і n дорівнює 0.

7. Сполука за п.1, вибрана з групи, що складається із:

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піперидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
та її фармацевтично прийнятні солі.

8. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполуки, вказаної в будь-якому із пп.1-4, 6 або 7.

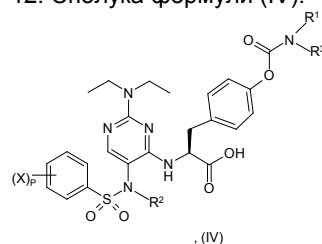
9. Спосіб лікування у пацієнта захворювання, опосередкованого α_4 інтегринами, при якому застосовують фармацевтичну композицію, що містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполуки, вказаної в будь-якому із пп.1-4, 6 або 7.

10. Спосіб за п.9, де захворювання є опосередко-

ваним VLA-4.

11. Спосіб за п.9, де захворювання є запальним захворюванням.

12. Сполука формули (IV):



де кожен X означає незалежно фтор, хлор або бром;

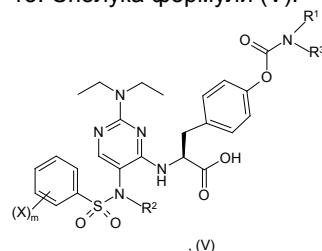
p є цілим числом від 0 до 3;

R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидиніль, піролідиніль, піролід, 2,5-дигідропірол-1-іл, піперидиніль або 1,2,3,6-тетрагідропіридин-1-іл;

R^2 є нижчим алкінілом;

та її фармацевтично прийнятні солі.

13. Сполука формули (V):



де кожен X є незалежно вибраним із групи, що складається з фтору і хлору;

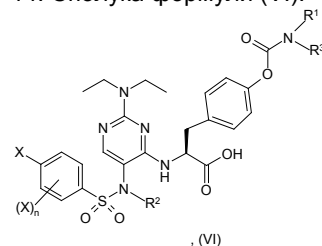
m є цілим числом, що дорівнює 1 або 2;

R^2 є нижчим алкінілом;

R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та її фармацевтично прийнятні солі.

14. Сполука формули (VI):



де кожен X означає незалежно фтор або хлор;

n дорівнює нулю або одиниці;

R^2 є нижчим алкінілом;

R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та її фармацевтично прийнятні солі.

15. Сполука за п.12, де R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу.

16. Сполука за будь-яким із пп.12, 13 або 14, де R^2 є пропаргілом.

17. Сполука за п.15, де X являє собою F або Cl і n дорівнює 0.

18. Сполука за п.12, вибрана з групи, що складається із:

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
 N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
 N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
 N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
 N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-

ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну;
 та її фармацевтично прийнятні солі.

19. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполуки, вказаної в будь-якому із пп.12-15, 17 або 18.

20. Спосіб лікування у пацієнта захворювання, опосередкованого α_4 інтегринами, при якому застосовують фармацевтичну композицію, що містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполуки, вказаної в будь-якому із пп.12-15, 17 або 18.

21. Спосіб за п.20, де захворювання є опосередкованим VLA-4.

22. Спосіб за п.20, де захворювання є запальним захворюванням.

23. Спосіб за п.20, де захворювання є ревматоїдним артритом.

Даний винахід стосується сполук, які інгібують адгезію лейкоцитів і, зокрема, адгезію лейкоцитів, опосередковану α_4 інтегринами, де α_4 інтегрин є переважно VLA-4.

Посилання

Наступні публікації, патенти і патентні заявки наводяться у даній заявці у вигляді надрядкових номерів посилання:

¹ Hemler and Takada, European Patent Application Publication No.330,506, опублікована 30 серпня 1989р.

² Elices, et al., Cell, 60:577-584 (1990)

³ Springer, Nature, 346:425-434 (1990)

⁴ Osborne, Cell, 62:3-6 (1990)

⁵ Vedder, et al., Surgery, 106:509 (1989)

⁶ Pretolani, et al., J. Exp. Med., 180:795 (1994)

⁷ Abraham, et al., J. Clin. Invest., 93:776 (1994)

⁸ Mulligan, et al., J. Immunology, 150:2407 (1993)

⁹ Cybulsky, et al., Science, 251:788 (1991)

¹⁰ Li, et al., Arterioscler. Thromb., 13:197 (1993)

¹¹ Sasseville, et al., Am. J. Path., 144:27 (1994)

¹² Yang, et al., Proc. Nat. Acad. Science (USA), 90:10494 (1993)

¹³ Burkly, et al., Diabetes, 43:529 (1994)

¹⁴ Baron, et al., J. Clin. Invest., 93:1700 (1994)

¹⁵ Hamann, et al., J. Immunology, 152:3283 (1994)

¹⁶ Yednock, et al., Nature, 356:63 (1992)

¹⁷ Baron, et al., J. Exp. Med., 177:57 (1993)

¹⁸ van Dinther-Janssen, et al., J. Immunology, 147:4207 (1991)

¹⁹ van Dinther-Janssen, et al., Annals. Rheumatic Dis., 52:672 (1993)

²⁰ Elices, et al., J. Clin. Invest., 93:405 (1994)

²¹ Postigo, et al., J. Clin. Invest., 89:1445 (1991)

²² Paul, et al., Transpl. Proceed., 25:813 (1993)

²³ Okarhara, et al., Can. Res., 54:3233 (1994)

²⁴ Paavonen, et al., Int. J. Can., 58:298 (1994)

²⁵ Schadendorf, et al., J. Path., 170:429 (1993)

²⁶ Bao, et al., Diff, 52:239 (1993)

²⁷ Lauri, et al., British J. Cancer, 68:862 (1993)

²⁸ Kawaguchi, et al., Japanese J. Cancer Res., 83:1304 (1992)

²⁹ Konradi, et al., PCT/US00/01686, зареєстрована 21 січня 2000р.

Всі вищенаведені публікації включені тут за допомогою посилання у своїй повноті, у тій же мірі як яби кожна окрема публікація була спеціально та окремо вказана, щоб бути включеною за допомогою посилання у своїй повноті.

VLA-4 (який також називають $\alpha_4\beta_1$ інтегрином і CD49d/CD29), вперше ідентифікований Hemler і Takada,¹ є членом сімейства β інтегрінів-рецепторів клітинної поверхні, кожен з яких включає в себе дві субодиниці, α ланцюг і β ланцюг. VLA-4 містить α_4 ланцюг і β_1 ланцюг. Існує принаймні дев'ять β_1 інтегрінів, кожен з яких має однаковий β_1 ланцюг і відрізняється за α ланцюгом. Усі ці дев'ять рецепторів зв'язують різні компоненти різноманітних молекул клітинного матриксу, таких як фібронектин, ламінін і колаген. VLA-4, наприклад, зв'язується з фібронектином. VLA-4 також зв'язує нематриксні молекули, які експресуються ендотеліальними та іншими клітинами. Ці нематриксні молекули включають VCAM-1, який експресується на цитокінактивованих ендотеліальних клітинах пупкової вени людини в культурі. Окремі епітопи VLA-4 відповідають за активність зв'язування фібронектину і VCAM-1, і було показано, що кожна активність інгібується незалежно.

Міжклітинна адгезія, опосередкована VLA-4 та іншими рецепторами клітинної поверхні, пов'язана з рядом запальних реакцій. На ділянці ушкодження або іншого запального подразника активовані ендотеліальні клітини судин експресують молекули, які є адгезивними для лейкоцитів. Механізм адгезії лейкоцитів з ендотеліальними клітинами включає, частково, розпізнавання і зв'язування рецепторів клітинної поверхні лейкоцитів з відповідними молекулами клітинної поверхні на ендотеліальних клітинах. Один раз зв'язавшись, лейкоцити мігрують крізь стінку кровоносної судини, щоб потрапити на ушкоджену ділянку і вивільнити хімічні медіатори для боротьби з інфекцією. Для огляду адгезивних рецепторів імунної системи дивіться, наприклад,

Springer³ і Osborn.⁴

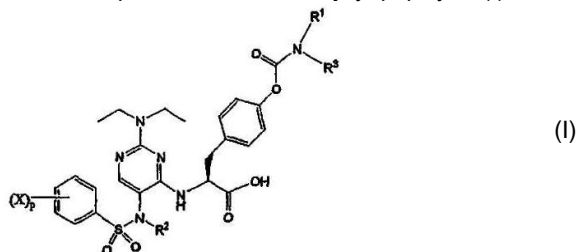
Запальні порушення функції головного мозку, такі як експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, розсіяний склероз і менінгіт є прикладами розладів центральної нервової системи, в яких механізм адгезії ендотелію/лейкоцитів призводить до руйнування в іншій здоровій тканині мозку. Велика кількість лейкоцитів мігрує крізь гематоенцефалічний бар'єр у осіб з цими запальними захворюваннями. Лейкоцити вивільняють токсичні медіатори, які спричиняють численні пошкодження тканин, що призводить до погіршення нервової провідності і паралічу.

В інших системах органів також трапляються пошкодження тканин через механізм адгезії, що призводить до міграції або активації лейкоцитів. Наприклад, було показано, що початкове ураження після ішемії міокарду серцевої тканини може бути далі ускладнене проникненням лейкоцитів до ушкодженої тканини, що спричиняє ще подальше ураження (Vedder et al.).⁵ Інші запальні або терапевтичні стани, опосередковані механізмом адгезії, включають, як приклад, астму,⁶⁻⁸ хворобу Альцгеймера, атеросклероз,⁹⁻¹⁰ СНІД-асоційовану деменцію,¹¹ діабет¹²⁻¹⁴ (включаючи гострий ювенільний діабет), запальні захворювання кишечника¹⁵ (включаючи виразковий коліт і хворобу Крона), розсіяний склероз,¹⁶⁻¹⁷ ревматоїдний артрит,¹⁸⁻²¹ трансплантацію тканин,²² метастази новоутворення,²³⁻²⁸ менінгіт, енцефаліт, інсульт та інші мозкові травми, нефрит, ретиніт, atopічний дерматит, псоріаз, ішемію міокарда і гостре, опосередковане лейкоцитами, ураження легень, таке як те, що має місце при синдромі дихальної недостатності у дорослих.

Заміщені амінопіримідини, як клас, були розкриті як інгібітори зв'язування VLA-4 з VCAM-1 і, відповідно, вони виявляють протизапальні властивості.²⁹ Поряд з тим, що ці сполуки мають антагоністичні властивості щодо такого зв'язування, підвищена біодоступність таких сполук могла б посилити їхню ефективність.

Даний винахід спрямований на виявлення того, що певні N-[2-N',N'-діетиламіно-5-аміносультонілфенілпіримідин-4-іл]-p-карбомілокси-фенілаланінові сполуки мають несподівано високу біодоступність, як визначено за допомогою величини їхньої площі під кривою "концентрація-час", у порівнянні з іншими заміщеними амінопіримідиновими сполуками, розкритими раніше.

В одному з аспектів своєї композиції, даний винахід спрямований на сполуку формули (I):



де кожен X означає незалежно фтор, хлор або бром;

p є цілим числом від 0 до 3;

R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони

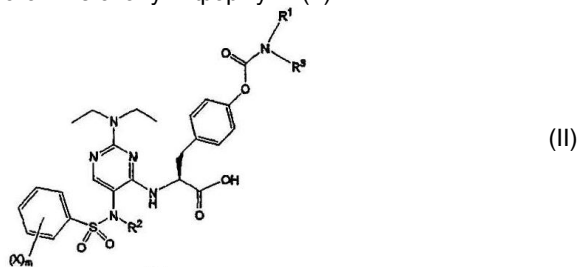
зв'язані, утворюють азетидиніл, піролідиніл, піроліл, 2,5-дигідропірол-1-іл, піперидиніл або 1,2,3,6-тетрагідропіридин-1-іл;

R² вибирають із групи, що складається з нижчого алкілу, нижчого алкенілу і нижчого алкіленциклоалкілу;

та її фармацевтично прийнятні солі.

У переважному втіленні, R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу.

У переважному втіленні, даний винахід представляє сполуки формули (II):



де кожен X є незалежно вибраним із групи, що складається з фтору і хлору;

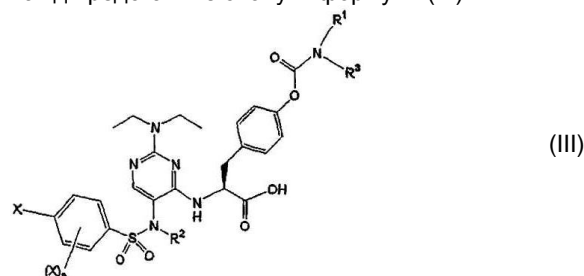
m є цілим числом, що дорівнює 1 або 2;

R² вибирають із групи, що складається з нижчого алкілу, нижчого алкенілу і нижчого алкіленциклоалкілу;

R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

В особливо переважному втіленні, даний винахід представляє сполуки формули (III):



де кожен X означає незалежно фтор або хлор;

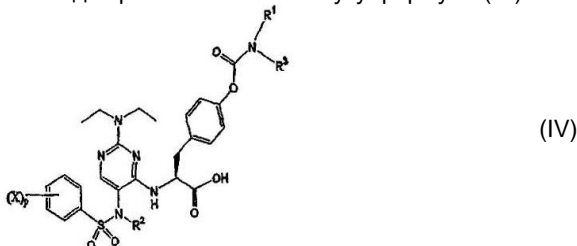
n дорівнює нулю або одиниці;

R² являє собою -CH₂-R', де R' вибирають із групи, що складається з водню, метилу або -CH=CH₂;

R¹ і R³ разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

В іншому з аспектів своєї композиції, даний винахід спрямований на сполуку формули (IV):



де кожен X означає незалежно фтор, хлор або бром;

r є цілим числом від 0 до 3;

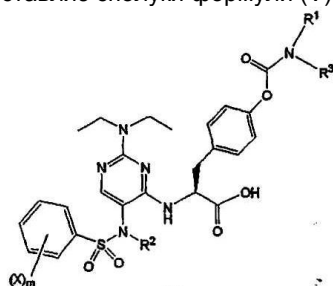
R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидиніл, піролідиніл, піролін, 2,5-дигідропірол-1-іл, піперидиніл або 1,2,3,6-тетрагідропіридин-1-іл;

R^2 є нижчим алкінілом;

та її фармацевтично прийнятні солі.

У переважному втіленні, R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу, і R^2 є пропар гілом.

У переважному втіленні, даний винахід представляє сполуки формули (V):



(V)

де кожен X є незалежно вибраним із групи, що складається з фтору і хлору;

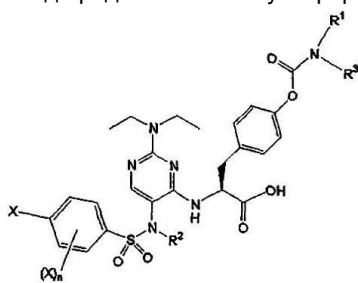
m є цілим числом, що дорівнює 1 або 2;

R^2 є нижчим алкінілом;

R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

В особливо переважному втіленні, даний винахід представляє сполуки формули (VI):



(VI)

де кожен X означає незалежно фтор або хлор;

n дорівнює нулю або одиниці;

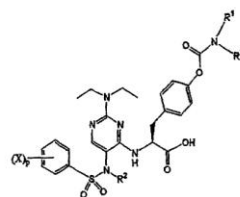
R^2 є нижчим алкінілом;

R^1 і R^3 разом з атомом азоту, з яким вони зв'язані, утворюють азетидинільну, піролідинільну або піперидинільну групу;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

N-[2- R^1 , R^3 -діетиламіно-5-аміносультонілфенілпіримідин-4-іл]-/?-карбомілокси-фенілаланінові сполуки в межах даного винаходу включають ті, що визначені у таблиці I, як показано нижче:

Таблиця I



R^1 і R^3	R^2		Номер сполуки
піролідиніл	етил	4-фторфеніл	2
піролідиніл	метил	4-фторфеніл	3
піролідиніл	метил	4-хлорфеніл	4
піролідиніл	етил	4-хлорфеніл	1
піперидиніл	метил	4-фторфеніл	5
азетидиніл	етил	4-фторфеніл	7
азетидиніл	метил	4-фторфеніл	8
азетидиніл	метил	4-хлорфеніл	9
азетидиніл	етил	4-хлорфеніл	10
піперидиніл	етил	4-фторфеніл	6
азетидиніл	етил	2,4-дифторфеніл	14
піролідиніл	метил	2,4-дифторфеніл	11
піролідиніл	етил	2,4-дифторфеніл	12
азетидиніл	метил	2,4-дифторфеніл	13
піролідиніл	пропаргіл	4-фторфеніл	15
піролідиніл	пропаргіл	2,4-дифторфеніл	16
азетидиніл	пропаргіл	2,4-дифторфеніл	17
азетидиніл	пропаргіл	4-фторфеніл	18
піролідиніл	пропаргіл	4-хлорфеніл	19

Окремі сполуки в межах даного винаходу включають наступні сполуки. Як використано нижче, ці сполуки названі, виходячи з похідних фенілаланіну, але, альтернативно, ці сполуки могли б бути названі, виходячи з похідних N-[2- R^1 , R^3 -діетиламіно-5-аміносультонілфенілпіримідин-4-іл]-р-карбомілоксифенілаланіну або похідних 2-{2-діетиламіно-5-[(бензолсультоніл)метиламіно]піримідин-4-іламіно}-р-карбомілоксифенілпропіонової кислоти.

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-хлорфенілсультоніл)- R^1 -етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-фторфенілсультоніл)- R^1 -етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-фторфенілсультоніл)- R^1 -метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-хлорфенілсультоніл)- R^1 -метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-фторфенілсультоніл)- R^1 -метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піперидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-фторфенілсультоніл)- R^1 -етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піперидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-фторфенілсультоніл)- R^1 -етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[R^1 , R^3 -діетиламіно]-5-[R^2 -(4-

фторфенілсульфоніл)-N"-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(4-хлорфенілсульфоніл)-N"-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(4-хлорфенілсульфоніл)-N"-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(4-фторфенілсульфоніл)-N"-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N"-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(4-фторфенілсульфоніл)-N"-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N"-(4-хлорфенілсульфоніл)-N"-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланін;

та їхні фармацевтично прийнятні солі.

В іншому аспекті даний винахід представляє фармацевтичні композиції, що включають в себе фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполук, визначених тут.

В одному з аспектів свого способу даний винахід спрямований на спосіб лікування у пацієнта захворювання, опосередкованого, принаймні частково, α_4 інтегринами, переважно VLA-4, спосіб, який включає застосування фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій і терапевтично ефективну кількість сполуки за даним винаходом.

Сполуки і фармацевтичні композиції за даним винаходом є корисними для лікування патологічних станів, опосередкованих, принаймні частково, α_4 інтегринами, переважно VLA-4, або адгезією лейкоцитів. Такі патологічні стани включають, як приклад, астму, хворобу Альцгеймера, атеросклероз, СНІД-асоційовану деменцію, діабет (включаючи гострий ювенільний діабет), запальні

захворювання кишечника (включаючи виразковий коліт і хворобу Крона), розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, трансплантацію тканин, метастази новоутворення, менінгіт, енцефаліт, інсульт та інші мозкові травми, нефрит, ретиніт, atopічний дерматит, псоріаз, ішемію міокарда і гостре, опосередковане лейкоцитами, ураження легень, таке як те, що має місце при синдромі дихальної недостатності у дорослих.

Інші патологічні стани включають, але не обмежуються ними, запальні стани, такі як вузлувата еритема, алергічний кон'юнктивіт, невриит зорового нерва, увеїт, алергічний риніт, анкілозівний спондилоартрит, псоріатичний артрит, васкуліт, синдром Рейтера, системний червоний вовчак, системний прогресуючий склероз, поліміозит, дерматоміозит, гранулематоз Вегнера, аортит, саркоїдоз, лімфоцитопенія, скроневий артеріт, перикардит, міокардит, застійна серцева недостатність, нодозний поліартеріт, синдроми гіперчутливості, алергія, синдроми гіпереозинофілії, гранулематозний алергічний ангіїт, хронічне обструктивне захворювання легень, гіперчутливий пневмоніт, хронічний активний гепатит, інтерстиціальний цистит, аутоімунна ендокринна недостатність, біліарний первинний цироз печінки, аутоімунна апластична анемія, хронічний персистентний гепатит і тиреоїдит.

У переважному втіленні, патологічний стан є запальним захворюванням.

Як визначено вище, даний винахід стосується сполук, які інгібують адгезію лейкоцитів і, зокрема, адгезію лейкоцитів, опосередковану, принаймні частково, α_4 інтегринами, переважно VLA-4. Однак, перед описом даного винаходу в додаткових подробицях, спочатку будуть визначені наступні терміни.

Визначення

Якщо не вказано інше, наступні терміни, використані у патентному описі і пунктах формули винаходу, мають значення, наведені нижче:

Як вжито тут, термін "нижчий алкіл" стосується моновалентних алкільних груп, що мають від 1 до 5 атомів вуглецю, включаючи алкільні групи з прямим і розгалуженим ланцюгом. Цей термін проілюстрований такими групами, як метил, етил, ізопропіл, н-пропіл, н-бутил, ізобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил та подібні до них.

Термін "нижчий алкілен" стосується двовалентних алкіленових груп, що мають від 1 до 4 атомів вуглецю, включаючи алкіленові групи з прямим і розгалуженим ланцюгом. Цей термін проілюстрований такими групами, як метилен, етилен, н-пропілен, ізопропілен ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ і $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$) та подібні до них.

Термін "нижчий алкеніл" стосується алкенільної групи, що має переважно від 2 до 6 атомів вуглецю, і має принаймні 1 ділянку і переважно лише 1 ділянку алкенільної ненасиченості (тобто $>\text{C}=\text{C}<$). Цей термін проілюстрований такими групами, як аліл, етеніл, пропеніл, бутеніл та подібні до них.

Термін "нижчий алкініл" стосується алкінільної групи, що має переважно від 2 до 6 атомів вуглецю, і має принаймні 1 ділянку і переважно лише 1 ділянку алкінільної ненасиченості (тобто,

-C≡C-). Цей термін проілюстрований такими групами, як ацетил (-O≡CH), пропаргіл (-CH₂-C≡CH), 3-бутиніл (-CH₂CH₂C≡CH) та подібні до них.

Термін "нижчий циклоалкіл" стосується циклічних алкільних груп, що мають від 3 до 6 атомів вуглецю і мають одне циклічне кільце, включаючи, як приклад, циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил.

Термін "нижчий алкіленциклоалкіл" стосується групи, що складається з нижчого алкілену-нижчого циклоалкілу, як визначено в цьому описі. Такі групи проілюстровані метиленциклопропілом (-CH₂-циклопропілом), етиленциклопропілом та подібними до них.

"Фармацевтично прийнятний носій" означає носій, який є корисним у приготуванні фармацевтичної композиції, що є в цілому безпечною, нетоксичною, і не є небажаною ні біологічно, ні іншим чином, і включає носій, що є прийнятним для використання у ветеринарії, так само як для фармацевтичного використання у людини. Термін "фармацевтично прийнятний носій", як вжито у цьому патентному описі і пунктах формули винаходу, включає як один, так і більше ніж один такий носій.

"Лікування" або "терапія" захворювання включає:

(1) запобігання захворюванню, тобто спричинення того, щоб клінічні симптоми захворювання не розвивалися у ссавця, який може піддаватися впливу або бути схильним до захворювання, але досі ще не зазнав або не виявив симптомів захворювання,

(2) перешкоджання захворюванню, тобто купірування або зменшення розвитку захворювання або його клінічних симптомів, або

(3) позбавлення від захворювання, тобто спричинення регресу захворювання або його клінічних симптомів.

"Терапевтично ефективна кількість" означає кількість сполуки, яка, при введенні ссавцеві для лікування захворювання, є достатньою для здійснення такого лікування захворювання. "Терапевтично ефективна кількість" буде змінюватися в залежності від сполуки, захворювання і його тяжкості, і віку, ваги і т.п. ссавця, якого мають лікувати.

"Фармацевтично прийнятна сіль" стосується фармацевтично прийнятних солей сполуки формули I, солей, які одержують із різноманітних органічних і неорганічних протиіонів, добре відомих фахівцям у даній галузі, і включають, лише як приклад, натрій, калій, кальцій, магній, амоній, тетраалкіламоній та подібні до них; і, коли молекула містить основну функціональну групу, солі органічних або неорганічних кислот, такі як гідрохлорид, гідробромід, тартрат, мезилат, ацетат, малеат, оксалат та подібні до них.

Інтегрини є великим сімейством гомологічних трансмембранних лінкерних білків, які є основними рецепторами на клітинах тварин для зв'язування більшості білків позаклітинного матриксу, таких як колаген, фібронектин і ламінін. Інтегрини є гетеродимерами, що містять α ланцюг і β ланцюг. На даний час було ідентифіковано двадцять різних інтегринових гетеродимерів, що склада-

ються з 9 різних α субодиниць і 14 різних β субодиниць. Термін "α₄ інтегрини" стосується класу гетеродимерних, фермент-зв'язаних рецепторів на клітинній поверхні, які містять α₄ субодиницю, спарену з будь-якою з β субодиниць. VLA-4 є прикладом α₄ інтегрину, і є гетеродимером α₄ і β₁ субодиниць, і його також називають α₄β₁ інтегрином.

Приготування сполуки

Сполуки за даним винаходом можуть бути приготовані з легкодоступних вихідних матеріалів, використовуючи способи і методики, викладені у прикладах нижче. Ці способи і методики окреслюють у загальних рисах протоколи специфічних реакцій для приготування N-[2-N',N'-діетиламіно-5-аміносультфонілфеніл-піримідин-4-іл]-р-карбомілокси-фенілаланінових сполук. Сполуки в межах даного винаходу, не проілюстровані у цих прикладах і способах, легко готуються шляхом відповідного заміщення вихідних матеріалів, які є або наявними у продажу, або добре відомими у даній галузі.

Інші методики та умови реакцій для приготування сполук за даним винаходом описані в прикладах, викладених нижче. Крім того, інші методики для приготування сполук, корисних в деяких аспектах даного винаходу, розкриті [у патенті США 6 492 372, виданому 10 грудня 2002р.]; розкриття якого включене тут за допомогою посилання у своїй повноті.

Фармацевтичні композиції

При використанні як лікарські препарати, сполуки за даним винаходом звичайно застосовують у формі фармацевтичних композицій. Ці композиції можуть бути введені різними шляхами, включаючи пероральний, ректальний, черешкірний, підшкірний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий та інтраназальний. Ці сполуки є ефективними як при ін'єкційному, так і при пероральному надходженні. Такі композиції готують у спосіб, добре відомий у фармацевтичній галузі, і вони містять принаймні одну активну сполуку.

Даний винахід також включає фармацевтичні композиції, які містять, як активний інгредієнт, одну або більшу кількість сполук вищезгаданої формули I, поєднаних із фармацевтично прийнятними носіями. При виготовленні композицій за даним винаходом активний інгредієнт звичайно змішують із наповнювачем, розводять наповнювачем або вміщують у такий носій, який може бути у формі капсули, саше, паперового або іншого упакування. Застосовуваний наповнювач типово є наповнювачем, придатним для введення людям або іншим ссавцям. Коли наповнювач слугує як розріджувач, він може бути твердою, напівтвердою або рідкою речовиною, яка діє як розчинник, носій або середовище для активного інгредієнта. Таким чином, ці композиції можуть бути у формі таблеток, пігулок, порошків, пастилок, саше, еліксирів, суспензій, емульсій, розчинів, сиропів, аерозолів (як тверда речовина або в рідкому середовищі), мазей, що містять, наприклад, до 10% за масою активної сполуки, м'яких і твердих желатинових капсул, супозиторіїв, стерильних розчинів для ін'єкцій і стерильно упакованих порошків.

У приготуванні лікарської форми може бути необхідним подрібнити активну сполуку, щоб забезпечити відповідний розмір частинок перед поєднанням з іншими інгредієнтами. Якщо активна сполука є в основному нерозчинною, її звичайно подрібнюють до частинок розміром менше ніж 200 мешів. Якщо активна сполука є в основному водорозчинною, розмір частинок звичайно регулюють шляхом подрібнення, щоб забезпечити суттєво однорідний розподіл у суміші, наприклад, приблизно 40 мешів.

Деякі приклади придатних наповнювачів включають лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбіт, маніт, крохмаль, аравійську камедь, фосфат кальцію, альгінати, трагакант, желатин, силікат кальцію, мікрокристалічну целюлозу, полівінілпіролідон, целюлозу, воду, сироп і метилцелюлозу. Ці суміші можуть додатково включати: мастильні речовини, такі як тальк, стеарат магнію і мінеральне масло; змочувальні речовини; емульгуювальні і суспендувальні речовини; консервувальні речовини, такі як метил- і пропілгідроксибензоати; підсолоджувальні речовини; і ароматизуючі та смакові речовини. Композиції за даним винаходом можуть бути виготовлені за допомогою застосовуваних методик, відомих у даній галузі, з тим, щоб забезпечити швидке, тривале або уповільнене вивільнення активного інгредієнта після введення пацієнту.

Ці композиції переважно створюють у дозований лікарській формі, кожна доза містить від приблизно 5 до приблизно 100мг, у більшості випадків від приблизно 10 до приблизно 30мг, активного інгредієнта. Термін "дозовані лікарські форми" стосується фізично окремих одиниць, застосованих як одиничні дози для людини або інших ссавців, кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активної речовини, розраховану таким чином, щоб викликати бажаний терапевтичний ефект, у поєднанні з придатним фармацевтичним наповнювачем.

Активна сполука є ефективною у широкому діапазоні доз і звичайно застосовується у фармацевтично ефективній кількості. Однак має бути зрозумілим, що кількість сполуки, застосовувана фактично, буде визначатися лікарем у світлі доречних обставин, включаючи стан, який лікують, вибраний шлях введення, реальну застосовувану сполуку, вік, масу тіла та реакцію окремого пацієнта, тяжкість симптомів пацієнта, і тому подібне.

Для приготування твердих композицій, таких як таблетки, основний активний інгредієнт змішують із фармацевтичним наповнювачем, щоб сформувати тверду попередню композицію, що містить гомогенну суміш сполуки за даним винаходом. Коли посилаються на ці попередні композиції як на гомогенні, мають на увазі, що активний інгредієнт рівномірно диспергований по всій композиції, так що ця композиція може бути легко підрозділена на однаково ефективні одиниці дозованих лікарських форм, такі як таблетки, пігулки і капсули. Цю тверду попередню суміш потім підрозділяють на одиниці дозованих лікарських форм описаного вище типу, що містять від, на-

приклад, 0,1 до приблизно 500мг активного інгредієнта за даним винаходом.

Таблетки або пігулки за даним винаходом можуть бути вкриті оболонкою або іншим чином вміщені в оболонку, щоб забезпечити лікарську форму, яка дає перевагу тривалій дії. Наприклад, таблетка або пігулка може містити внутрішній і зовнішній компоненти дози, останній у формі оболонки над першим. Ці два компоненти можуть бути розділені розчинним у кишечнику шаром, який допомагає протистояти руйнуванню у шлунку і дозволяє внутрішньому компоненту неушкоджено проходити у дванадцятипалу кишку або мати уповільнене вивільнення. Для таких розчинних у кишечнику шарів або покриттів можуть бути використані різноманітні матеріали, які включають ряд полімерних кислот і сумішей полімерних кислот із такими матеріалами як шелак, цетиловий спирт і ацетат целюлози.

Рідкі форми, в які нові композиції за даним винаходом можуть бути включені для застосування перорально або ін'єкційно, включають водні розчини, відповідно ароматизовані сиропи, водні або масляні суспензії та ароматизовані емульсії з харчовими оліями, такими як бавовняна олія, кунжутна олія, кокосова олія або арахісова олія, а також еліксири і подібні фармацевтичні наповнювачі.

Композиції для інгаляції та інсуфляції включають розчини і суспензії у фармацевтично прийнятних водних або органічних розчинниках, або їхніх сумішах, і порошки. Рідкі або тверді композиції можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні наповнювачі, як описано вище. Ці композиції застосовують переважно перорально або назально респіраторно для місцевої або системної дії. Композиції у переважно фармацевтично прийнятних розчинниках можуть бути розпилені за допомогою інертних газів. Розпилювані розчини можна вдихати безпосередньо з пристрою для розпилювання або пристрій для розпилювання може бути приєднаний до маски або дихального апарату з переривчастим позитивним тиском. Композиції у вигляді розчину, суспензії або порошку можуть бути застосовані, переважно перорально або назально, з пристроїв, які подають лікарську форму належним чином.

Наступні приклади приготування лікарських форм ілюструють фармацевтичні композиції за даним винаходом.

Приклад 1 приготування лікарської форми

Готують тверді желатинові капсули, що містять такі інгредієнти:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	30,0
Крохмаль	305,0
Магнію стеарат	5,0

Вищенаведені інгредієнти змішують і наповнюють ними тверді желатинові капсули у кількості 340мг.

Приклад 2 приготування лікарської форми

Готують суміш для таблеток, використовуючи інгредієнти, наведені нижче:

Інгредієнт	Кількість (мг/таблетку)
Активний інгредієнт	25,0
Целюлоза, мікрокристалічна	200,0
Колоїдний діоксид кремнію	10,0
Стеаринова кислота	5,0
Компоненти змішують і піддають стисненню для формування таблеток, кожна з яких має масу 240мг.	

Приклад 3 приготування лікарської форми
Готують суху порошкову суміш для інгалято-
ра, яка містить такі компоненти:

Інгредієнт	% за масою
Активний інгредієнт	5
Лактоза	95
Активну суміш змішують із лактозою, і цю су- міш додають до пристрою для інгаляції сухих порошків.	

Приклад 4 приготування лікарської форми
Таблетки, кожна з яких містить 30мг активно-
го інгредієнта, готують як викладено нижче:

Інгредієнт	Кількість (мг/таблетку)
Активний інгредієнт	30,0мг
Крохмаль	45,0мг
Мікрокристалічна целюлоза	35,0мг
Полівінілпіролідон (у вигляді 10% водного розчину)	4,0мг
Натрію карбоксиметил крохмаль	4,5мг
Магнію стеарат	0,5мг
Тальк	1,0мг
Всього	120мг

Активний інгредієнт, крохмаль і целюлозу пропускають крізь сито №20 (США) і ретельно перемішують. Розчин полівінілпіролідону змішу-
ють з одержаним у результаті порошком, який
потім пропускають крізь сито №16 (США). Виго-
товлені таким чином гранули висушують при те-
мпературі від 50° до 60°C і пропускають крізь
сито №16 (США). Натрію карбоксиметил крох-
маль, магнію стеарат і тальк, попередньо пропу-
щені крізь сито №30 (США), потім додають до
гранул, які, після перемішування, піддають стис-
ненню на таблетувальній машині з виготовлен-
ням таблеток, кожна з яких має масу 120мг.

Приклад 5 приготування лікарської форми
Капсули, кожна з яких містить 40мг ліків, ви-
готовляють як викладено нижче:

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	40,0мг
Крохмаль	109,0мг
Магнію стеарат	1,0мг
Всього	150,0мг

Активний інгредієнт, крохмаль і магнію стеа-
рат змішують, пропускають крізь сито №20 (США)
і наповнюють сумішшю тверді желатинові капсу-
ли у кількості 150мг.

Приклад 6 приготування лікарської форми
Супозиторії, кожен з яких містить 25мг актив-
ного інгредієнта, виготовляють як викладено ни-
жче:

Інгредієнт	Кількість
Активний інгредієнт	25мг
Гліцериди насичених жирних кислот	2000мг
Активний інгредієнт пропускають крізь сито	

№60 (США) і суспендують у гліцеридах насиче-
них жирних кислот, попередньо розплавлених із
використанням мінімально необхідного нагріван-
ня. Суміш далі виливають у форму для супозито-
рів номінальною місткістю 2,0г і дають змогу
охолонути.

Приклад 7 приготування лікарської форми
Суспензії, кожна з яких містить 50мг ліків на
дозу 5,0мл, виготовляють як викладено нижче:

Інгредієнт	Кількість
Активний інгредієнт	50,0мг
Ксантанова камедь	4,0мг
Натрію карбоксиметил целюлоза (11%)	
Мікрокристалічна целюлоза (89%)	50,0мг
Сахароза	1,75г
Натрію бензоат	10,0мг
Ароматизатор і барвник	q.v.
Очищена вода до	5,0мл

Активний інгредієнт, сахарозу і ксантанову
камедь змішують, пропускають крізь сито №10
(США) і далі перемішують з попередньо пригото-
ваним розчином мікрокристалічної целюлози і
натрію карбоксиметил целюлози у воді. Натрію
бензоат, ароматизатор і барвник розводять не-
великою кількістю води і додають при перемішу-
ванні. Потім додають достатню кількість води для
одержання необхідного об'єму.

Інгредієнт	Кількість (мг/капсулу)
Активний інгредієнт	15,0мг
Крохмаль	407,0мг
Магнію стеарат	3,0мг
Всього	425,0мг

Активний інгредієнт, крохмаль і магнію стеа-
рат змішують, пропускають крізь сито №20 (США)
і наповнюють сумішшю тверді желатинові капсу-
ли у кількості 425мг.

Приклад 9 приготування лікарської форми
Лікарська форма для внутрішньовенного
введення може бути виготовлена як викладено
нижче:

Інгредієнт	КІЛЬКІСТЬ
Активний інгредієнт	250,0мг
Ізотонічний сольовий розчин	1000мл

Приклад 10 приготування лікарської форми
Лікарська форма для зовнішнього застосу-
вання може бути виготовлена як викладено ни-
жче:

Інгредієнт	Кількість
Активний інгредієнт	1-10г
Емульгувальний віск	30г
Вазелінове масло	20г
Білий м'який парафін	до 100г

Білий м'який парафін нагрівають до розплав-
леного стану. Вводять вазелінове масло та ему-
льгувальний віск і перемішують до розчинення.
Додають активний інгредієнт і продовжують пе-
ремішування до його диспергування. Потім суміш
охолоджують до твердого стану.

Ще одна переважна лікарська форма, засто-
совувана у способах за даним винаходом, вико-
ристовує трансдермальні провідні системи ("пла-
стири"). Такі трансдермальні пластири можуть
бути використані для забезпечення постійної або

перервної інфузії сполук за даним винаходом у контрольованих кількостях. Конструкція і використання трансдермальних пластирів для доставки лікарських засобів є добре відомою у даній галузі. [Див., наприклад, патент США 5 023 252, виданий 11 червня 1991], включений сюди за допомогою посилання. Такі пластири можуть бути сконструйовані для безперервної або пульсуючої подачі лікарських засобів або їх подачі за вимогою.

Можуть бути використані методики прямого або непрямого розміщення, коли є бажаним або необхідним введення фармацевтичної композиції у мозок. Прямі методики звичайно включають розташування катетера для доставки лікарських засобів у системі шлуночків, щоб обійти гематоенцефалічний бар'єр. Одна така система доставки, що імплантується, використовується для транспортування біологічних факторів до окремих анатомічних ділянок тіла, [описана у патенті США 5 011 472], який включений сюди за допомогою посилання.

Непрямі методики, які є, як правило, бажанішими, звичайно включають підбір складу композицій, щоб передбачати "маскування" лікарського засобу шляхом перетворення гідрофільних лікарських препаратів на препарати, розчинні у ліпідах. "Маскування" звичайно досягається внаслідок блокування гідроксильних, карбонільних, сульфатних і первинних аміногруп, на лікарському препараті, щоб зробити препарат більш розчинним у ліпідах і доступнішим для транспортування крізь гематоенцефалічний бар'єр. Альтернативно, доставка гідрофільних лікарських препаратів може бути поліпшена за допомогою внутрішньоартеріальної інфузії гіпертонічних розчинів, які можуть тимчасово відкрити гематоенцефалічний бар'єр.

Корисність

Сполуки за даним винаходом інгібують, *in vivo*, адгезію лейкоцитів з ендотеліальними клітинами, опосередковану, принаймні частково, α_4 інтегринами, переважно VLA-4, шляхом конкурентного зв'язування з α_4 інтегринами, переважно VLA-4. Відповідно, сполуки за даним винаходом можуть бути використані у лікуванні захворювань ссавців, опосередкованих, принаймні частково, α_4 інтегринами, переважно VLA-4, або адгезією лейкоцитів. Ці захворювання включають запальні захворювання у ссавців, такі як астма, хвороба Альцгеймера, атеросклероз, СНІД-асоційована деменція, діабет (включаючи гострий ювенільний діабет), запальні захворювання кишечника (включаючи виразковий коліт і хворобу Крона), розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, трансплантація тканин, метастази новоутворення, менінгіт, енцефаліт, інсульт та інші мозкові травми, нефрит, ретиніт, atopічний дерматит, псоріаз, ішемія міокарда і гостре, опосередковане лейкоцитами, ураження легень, таке як те, що має місце при синдромі дихальної недостатності у дорослих.

Кількість, застосовувана у ссавців, буде змінюватися залежно від того, що вводиться, мети введення, такої як профілактика або терапія, стану пацієнта, способу введення і т.п. У терапевтичних застосуваннях композиції вводять пацієнту,

який уже страждає на захворювання, у кількості, достатній для лікування або принаймні часткового припинення симптомів захворювання та його ускладнень. Кількість, достатню для досягнення цього, визначають як "терапевтично ефективну дозу". Кількості, ефективні для такого використання, будуть залежати від патологічного стану, який лікують, так само як від рішення лікаря-куратора, що залежить від таких факторів, як тяжкість запалення, вік, маса тіла та загальний стан пацієнта і т.п.

Композиції, які вводять пацієнту, знаходяться у формі фармацевтичних композицій, описаних вище. Ці композиції можуть бути стерилізовані за допомогою традиційних методик стерилізації, або можуть бути стерильно профільтровані. Одержані у результаті водні розчини можуть бути упаковані для використання як є або ліофілізовані, ліофілізований препарат об'єднують із стерильним водним носієм перед введенням. рН препаратів сполуки типово буде становити від 3 до 11, більш переважно від 5 до 9, і найбільш переважно від 7 до 8. Має бути зрозумілим, що використання деяких із вищезгаданих наповнювачів, носіїв або стабілізаторів буде призводити до утворення фармацевтичних солей.

Терапевтичне дозування сполук за даним винаходом буде змінюватися відповідно до, наприклад, конкретного призначення, для якого проводять лікування, способу введення сполуки, здоров'я і стану пацієнта та рішення лікаря, що призначає препарат. Наприклад, для внутрішньовенного введення доза типово буде знаходитися у діапазоні від приблизно 20мкг до приблизно 500мкг на кілограм маси тіла, переважно від приблизно 100мкг до приблизно 300мкг на кілограм маси тіла. Придатні діапазони дозування для інтраназального введення становлять, як правило, від приблизно 0,1пг до 1мг на кілограм маси тіла. Ефективні дози можуть бути екстрапольовані з кривих залежності "доза-ефект", одержаних у тестових системах *in vitro* або в експериментальних моделях на тваринах.

Наступні синтетичні і біологічні приклади пропонуються для ілюстрації даного винаходу, і жодним чином не повинні бути витлумачені як такі, що обмежують межі застосування та обсяг даного винаходу. Якщо не вказане інше, всі температури наведеш у градусах Цельсія.

Приклади

У нижченаведених прикладах наступні аббревіатури мають такі значення. Якщо аббревіатура не визначена, вона має своє загальноприйняте значення.

AUC = площа під кривою "концентрація-час"

BSA = альбумін бичачої сироватки

EtOAc = етилацетат

EtOH = етанол

Hb = гемоглобін

HBSS = збалансований сольовий розчин Хенкса

Hct = гематокрит, або вимірювання еритроцитної маси, одержаної шляхом центрифугування, в об'ємі проби крові

IgG Fc = домен зв'язування імуноглобуліну

MeOH = метанол

PBS++ = фізіологічний розчин із фосфатним буфером

psi = фунт на квадратний дюйм

q.s. = довести до об'єму

R_t = показник утримування

V_t = загальний об'єм

в.ч. = внутрішньочеревинний

г = грам

ГЕПЕС = 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазин-етансульфонова кислота

год. = година

д = дублет

ДМАП = 4-N,N-диметиламінопіридин етилкарбодіімід гідрохлорид

ЕДТК = етилендіамінтетраоцтова кислота

екв. = еквівалент

кг = кілограм

кімн. т. = кімнатна температура

КСГЕ = кількість середнього гемоглобіну еритроцитів, виражена у відсотках; Hb/Hct

КСЗФ = клітинний сортер із збудженням флуоресценції

л = літр

М = молярний, моль/л

м = мультиплет (коли використовується з даними ЯМР)

маса/об'єм = у відношенні маси до об'єму

мг = міліграм

мг/кг = міліграм на кілограм

мкг = мікрограм

мкл = мікролітр

мкм = мікромметр, мікрон

мл = мілілітр

мм = міліметр

мМ = мілімолярний, ммоль/л

ммоль = мілімоль

н = нормальний; моль еквівалентів/л

нг = нанограм

об/хв. = обертів за хвилину

с = синглет

СГЕ = середній гемоглобін еритроцитів; Hb/еритроцит

СОЕ = середній об'єм еритроцитів; звичайно виражають у кубічних мікрометрах на еритроцит

т = триплет

ТГФ = тетрагідрофуран

ТФА = трифтороцтова кислота, трифторацетат

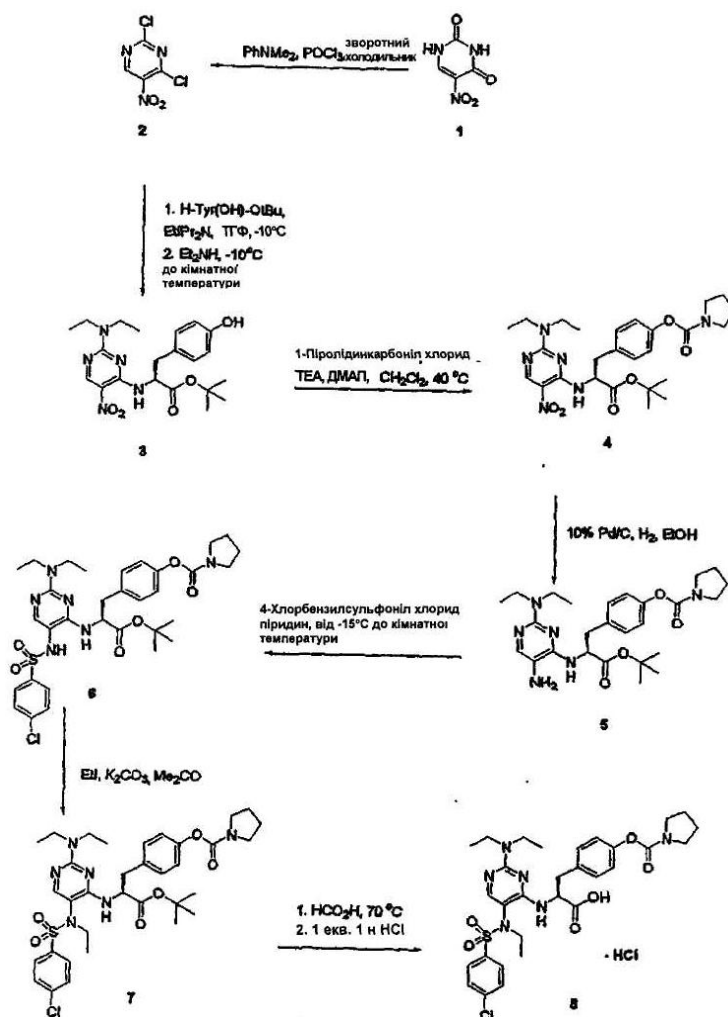
ТШХ = тонкошарова хроматографія

ФІТЦ = флуоресцеїн ізотіоціанат

шд = широкий дублет

шс = широкий синглет

Сполуки за даним винаходом можуть бути приготовані, як проілюстровано на схемі 1 і як описано в нижченаведених способах:



Приклад 1

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етап 1: Приготування 2,4-дихлор-5-нітропіримідину (2).

5-Нітроурацил (1) обробляли оксихлоридом фосфору (POCl_3) і N,N-диметиланіліном (PhNMe_2), згідно з методикою Whittaker (J. Chem. Soc. 1951, 1565), з одержанням сполуки 2. Сполука 2 також доступна від City Chemical (West Haven, CT).

Етап 2: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-L-тирози́ну трет-бутилового ефіру (3).

До розчину L-тирози́ну трет-бутилового ефіру (H-Tyr(ON)-OtBu) (30,6г, 0,129моль) у ТГФ (250мл) при -10°C додавали 2,4-дихлор-5-нітропіримідин (25г, 0,129моль), підтримуючи під час додавання температуру нижчою за 5°C . Як тільки це додавання закінчувалося, по краплях додавали N,N-діізопропілетиламін ($\text{Et}_2\text{Pr}_2\text{N}$) (33,7мл, 0,194моль). Після перемішування протягом 1 години при -10°C повільно додавали діетиламін (Et_2NH) (66,73мл, 0,645моль), і далі реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли діетиловим ефіром (500мл) і органічний шар промивали 0,2н лимонною кислотою ($3 \times 150\text{мл}$), водою ($1 \times 150\text{мл}$) і 10% K_2CO_3 ($3 \times 150\text{мл}$). Органічну фазу осушували (Na_2SO_4), фільтрували і концентрували під вакуумом з одержанням залишку жовтого кольору. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (20% EtOAc/гексани на силікагелі) з одержанням 37,39г (67%) сполуки 3 у вигляді піни жовтого кольору. $R_f=0,21$ (25% EtOAc/гексани на силікагелі).

Етап 3: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (4).

До розчину N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-L-тирози́ну трет-бутилового ефіру (37,39г, 0,087моль) у CH_2Cl_2 (150мл) додавали ДМАП (10,59г, 0,087моль). Через 5 хвилин по краплях додавали триетиламін (TEA) (18,19мл, 0,131моль). По краплях додавали 1-піролідинкарбамоїл хлорид (14,42мл, 0,131моль), і реакційну суміш нагрівали зі зворотним холодильником (40°C) протягом ночі. Реакційну суміш концентрували під вакуумом і переносили в EtOAc (300мл). Органічну фазу промивали 0,2н лимонною кислотою ($3 \times 150\text{мл}$), водою ($1 \times 150\text{мл}$), насиченим NaHCO_3 ($3 \times 150\text{мл}$), соляним розчином ($1 \times 150\text{мл}$), осушували (Na_2SO_4), фільтрували і концентрували під вакуумом з одержанням 43,07г (94%) сполуки 4 у вигляді твердої речовини жовтого кольору. $R_f=0,5$ (50% EtOAc/гексани на силікагелі).

Етап 4: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-амінопіримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (5).

Суміш N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-

ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (43,07г, 0,081моль) і 10% Pd/C (4,3г, 10% (за масою) Pd) в EtOH (200мл) струшували під тиском водню 45 psi доти, поки ТШХ (50% EtOAc/гексани на силікагелі) не показала 100% перетворення на продукт (48 годин). Далі реакційну суміш фільтрували крізь шар целіту і концентрували під вакуумом з одержанням 40,29г (100%) сполуки 5 у вигляді піни пурпурового кольору. $R_f=0,11$ (6:1 EtOAc/гексани на силікагелі).

Етап 5: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфеніл-сульфоніл)аміно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (6).

Розчин N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-амінопіримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (40,29г, 0,081моль) у піридині (160мл) охолоджували до -20°C на бані з сухим льодом/ CH_3CN . Суміш перемішували протягом 30 хвилин, і потім повільно додавали 4-хлорбензолсульфоніл хлорид (17,06г, 0,081моль). Реакційну суміш перемішували при температурі від -20°C до -15°C протягом 4 годин і потім давали змогу нагрітися до кімнатної температури протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли EtOAc (400мл), і органічну фазу промивали 0,2н лимонною кислотою ($3 \times 150\text{мл}$), водою ($1 \times 150\text{мл}$), насиченим NaHCO_3 ($3 \times 150\text{мл}$), соляним розчином ($1 \times 150\text{мл}$), осушували (Na_2SO_4), фільтрували і концентрували під вакуумом з одержанням залишку коричневого кольору. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (50% EtOAc/гексани на силікагелі) з одержанням 43,49г (80%) сполуки 6 у вигляді піни жовтого кольору. $R_f=0,35$ (50% EtOAc/гексани на силікагелі).

Етап 6: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфеніл-сульфоніл)-N''-еткламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (7).

До розчину N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)аміно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (42,92г, 0,064моль) в ацетоні (Me_2CO) (600мл) додавали K_2CO_3 (12,75г, 0,096моль), і суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі. Далі повільно додавали йодетан (EtI) (7,73мл, 0,096моль), і реакційну суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Реакційну суміш концентрували під вакуумом, і залишок переносили в EtOAc (300мл). Органічну фазу промивали водою ($2 \times 300\text{мл}$), соляним розчином ($1 \times 100\text{мл}$), осушували (Na_2SO_4), фільтрували і концентрували під вакуумом. Залишок очищали за допомогою флеш-хроматографії (2:1 гексани/EtOAc на силікагелі) з одержанням 37,36г (85%) сполуки 7 у вигляді твердої речовини білого кольору. $R_f=0,53$ (50% EtOAc/гексани на силікагелі).

Етап 7: Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну гідрохлориду (8).

Розчин N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру (36,21г, 0,052моль) у мурашиній кислоті (500мл) нагрівали до 70°C протягом 2 годин і потім концентрували під вакуумом. Залишок знову розчиняли у мурашиній кислоті (500мл) і знову нагрівали при 70°C протягом 2 годин. Об'єм розчину зменшували на 80% і далі його обробляли принаймні 1екв. 1,0 н HCl (52мл, 0,052моль), а потім дистильованою водою (100мл). Одержану в результаті гетерогенну суміш концентрували під вакуумом. Додавали дистильовану воду (100мл), і гетерогенну суміш концентрували під вакуумом. Останні етапи повторювали двічі з одержанням вологого продукту білого кольору. Його висушували, вміщуючи під високий вакуум при 40°C (7 днів), з одержанням 32,8г (93%) сполучи 8 у вигляді вільно текучої твердої речовини білого кольору. $R_f=0,25$ (7/3 MeOH/H₂O+0,1% ТФА, обернена фаза).

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,22 (шс, 1H), 7,82-7,79 (м, 1H), 7,64-7,60 (м, 2H), 7,36-7,33 (м, 1H), 7,22-7,13 (м, 2H), 7,07-6,98 (м, 2H), 4,91-4,90 (м, 1H), 4,80-4,79 (м, 1H), 4,12-4,10 (м, 1H), 3,87-3,75 (м, 1H), 3,55-3,53 (м, 4H), 3,41-3,40 (м, 3H), 3,26-3,19 (м, 2H), 2,03 (шс, 1H), 1,97-1,89 (м, 3H), 1,27-1,15 (м, 6H), 1,10-1,05 (т, 1,5H), 0,97-0,92 (т, 1,5H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 175,8, 175,7, 166,5, 162,7, 162,2, 155,8, 155,7, 155,7, 152,6, 148,1, 147,7, 142,0, 138,5, 136,2, 132,6, 132,3, 131,9, 131,7, 123,7, 111,8, 111,5, 62,3, 57,8,44,9, 38,7, 38,0, 27,4, 26,6, 15,3, 14,9, 14,7, 14,0, 13,9

Приклад 2

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 1. Етап 5 здійснювали, використовуючи 4-фторбензолсульфоніл хлорид замість 4-хлорбензолсульфоніл хлориду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,17 (шс, 1H), 7,90-7,87 (м, 2H), 7,40-7,34 (м, 2H), 7,20-7,16 (м, 1H), 7,08-7,00 (м, 3H), 5,52-5,51 (м, 1H), 4,96-4,93 (м, 2H), 5,78-5,70 (м, 1H), 3,85-3,75 (м, 1H), 3,59-3,53 (м, 4H), 4,47-4,43 (м, 2H), 3,44-3,24 (м, 2H), 2,02-1,94 (м, 3H), 1,24-1,16 (м, 6H), 1,10-1,05 (т, 1,5H), 0,99-0,94 (т, 1,5H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 133,0, 132,9, 132,5, 132,2, 123,7, 123,6, 118,6, 57,1, 44,3, 38,3, 27,3, 26,6, 14,7, 14,1

МС m/z 629,5 (MH⁺)

Приклад 3

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 2. Етап 6 здійснювали, використовуючи диметил сульфат замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,16 (шс, 1H), 7,89-7,88 (м, 1H), 7,39-7,35 (м, 3H), 7,20-7,13 (м, 1H), 7,05-7,00 (м, 2H), 4,85-4,84 (м, 1H), 4,14-4,12 (м, 1H), 3,59-3,54 (м, 5H), 3,45-3,44 (м, 2H), 3,45-3,33 (м, 3H), 3,13-3,12 (м, 1H), 3,02-3,01 (м, 1H), 2,04-1,95 (м, 4H), 1,29-1,18 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 176,5, 169,8, 166,9, 166,4, 156,2, 152,7, 151,8, 150,4, 136,8, 133,3, 133,2, 132,5, 123,7, 118,8, 118,5, 57,8, 57,1, 48,3, 44,5, 41,0, 38,8, 27,5, 26,7, 14,1

МС m/z 615,2 (MH⁺)

Приклад 4

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 1. Етап 6 здійснювали, використовуючи диметил сульфат замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,20 (шс, 1H), 7,83-7,80 (м, 2H), 7,67-7,64 (м, 2H), 7,37-7,34 (м, 1H), 7,21-7,18 (м, 1H), 7,10-7,03 (м, 2H), 4,88-4,87 (м, 1H), 4,13-4,10 (м, 1H), 3,55-3,45 (м, 6H), 3,42-3,40 (м, 2H), 3,24-3,23 (м, 2H), 3,11-3,10 (м, 1H), 3,02-3,01 (м, 1H), 2,04-2,03 (м, 1H), 1,98-1,90 (м, 3H), 1,28-1,18 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 176,0, 166,4, 161,8, 155,9, 155,4, 152,6, 146,5, 142,2, 137,6, 137,4, 136,4, 132,5, 131,9, 123,7, 114,6, 62,4, 58,1, 57,7, 45,0, 40,8, 38,6, 38,3, 27,4, 26,6, 15,3, 13,9

Приклад 5

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піперидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 3. Етап 3 здійснювали, використовуючи 1-піперидинкарбоніл хлорид замість 1-піролідинкарбоніл хлориду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,16 (шс, 1H), 7,90-7,88 (м, 2H), 7,40-7,35 (м, 2H), 7,21-7,20 (м, 1H), 7,14-7,13 (м, 1H), 7,02-7,01 (м, 2H), 5,51 (шс, 1H), 4,83-4,77 (м, 1H), 3,64-3,53 (м, 6H), 3,34-3,33 (м, 2H), 3,20-3,17 (м, 1H), 3,12-3,11 (м, 2H), 3,02-3,01 (м, 1H), 1,68-1,65 (м, 6H), 1,19-1,17 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 185,0, 169,7, 166,3, 152,7, 136,6, 135,0, 133,2, 133,0, 132,5, 131,8, 126,3, 123,6, 121,7, 118,6, 118,3, 57,6, 54,5,46,9,44,3, 39,6, 38,7, 27,6, 25,9,14,0

Приклад 6

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піперидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 2. Етап 3 здійснювали, використовуючи 1-піперидинкарбоніл хлорид замість 1-піролідинкарбоніл хлориду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,17 (шс, 1H), 7,91-7,85 (м, 2H), 7,39-7,31 (м, 3H), 7,20-7,16 (м, 1H), 7,05-6,97 (м, 2H), 4,88-4,69 (м, 2H), 4,71-4,69 (м, 1H), 3,80-3,75 (м, 1H), 3,62-3,39 (м, 6H), 3,34-3,32 (м, 2H), 3,30-3,16 (м, 3H), 1,68-1,65 (м, 4H), 1,23-1,17 (м, 6H), 1,10-1,05 (т, 1,5H), 0,99-0,94 (т, 1,5H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 199,9, 187,6, 183,1, 176,2, 169,7, 166,3, 163,0, 162,7, 153,9, 152,9, 136,5, 133,1, 133,0, 132,7, 132,4, 123,8, 118,8, 118,4, 111,1, 110,6, 102,8, 79,4, 57,3, 55,4, 44,4, 38,9, 38,4, 27,7, 26,1, 15,1, 14,8, 14,3, 14,2

Приклад 7

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-

фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 2. Етап 3 проводили згідно з наступною методикою.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,92-7,86 (м, 2H), 7,41-7,32 (м, 3H), 7,22 (д, 1H), 7,04-6,91 (м, 3H), 4,29-3,98 (м, 4H), 3,88-3,72 (м, 1H), 3,69-3,37 (м, 4H), 2,40-2,24 (м, 2H), 1,28-1,11 (м, 6H), 1,10-1,00 (т, 1,5H), 1,01-0,89 (т, 1,5H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 174,2, 169,7, 166,4, 163,2, 162,8, 157,0, 153,3, 153,2, 152,4, 144,3, 143,8, 136,1, 135,6, 135,5, 133,2, 133,1, 132,5, 132,2, 123,7, 118,9, 118,6, 112,9, 112,6, 57,5, 38,1, 37,7, 17,4, 14,7, 14,5, 13,8, 13,7

МС m/z 615 (MH⁺)

Альтернативне приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру.

До розчину, що перемішується при -15°C, сполуки 3 (24,9г, 0,0578моль) і 4-нітрофеніл хлорформіату (11,7г, 0,0578моль) у CH₂Cl₂ (300мл) додавали триетиламін (24,2мл, 0,173моль), з такою швидкістю, щоб температура реакційної суміші не перевищувала -10°C. Після перемішування протягом 20 хвилин, по краплях додавали азетидин (3,30г, 0,0578моль) і реакційну суміш нагрівали до кімнатної температури та перемішували протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли EtOAc (100мл) і гексанами (100мл), і потім багаторазово екстрагували 10% водним K₂CO₃ доти, поки у водній фазі не зникав жовтий колір (4-нітрофеніл). Органічний шар промивали соляним розчином (75мл), осушували MgSO₄, фільтрували і упарювали з одержанням 28,5г (96%) N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-нітропіримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну трет-бутилового ефіру у вигляді твердої речовини жовтого кольору, яку використовували без очищення. R_f=0,17 (2:5 EtOAc/гексани на силікагелі).

Приклад 8

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно)піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 7. Етап 6 здійснювали, використовуючи диметил сульфат замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,95-7,76 (м, 2H), 7,44-7,11 (м, 4H), 7,01-6,83 (м, 3H), 4,30-3,93 (м, 4H), 3,66-3,41 (м, 4H), 3,14-2,92 (м, 3H), 2,42-2,21 (м, 2H), 1,32-1,01 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 152,3, 136,3, 133,4, 133,2, 132,4, 123,6, 118,8, 118,5, 38,2, 17,4, 13,8

МС m/z 601 (MH⁺)

Приклад 9

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 8. Етап 5 здійснювали, використовуючи 4-хлорбензолсульфоніл хлорид замість 4-фторбензолсульфоніл хлориду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,83 (д, 2H), 7,67 (д, 2H), 7,36-7,18 (м, 2H), 7,06-6,86 (м, 3H), 4,29-3,97 (м,

4H), 3,66-3,34 (м, 5H), 3,15-2,95 (м, 4H), 2,41-2,22 (м, 2H), 1,26-1,06 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 157,2, 153,0, 152,5, 142,9, 142,5, 136,4, 132,5, 132,1, 132,0, 123,8, 57,9, 52,2, 40,7, 38,0, 17,4, 13,6

МС m/z 617 (MH⁺)

Приклад 10

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-етиламіно)піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 7. Етап 5 здійснювали, використовуючи 4-хлорбензолсульфоніл хлорид замість 4-фторбензолсульфоніл хлориду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 7,86-7,76 (м, 2H), 7,70-7,60 (м, 2H), 7,32 (шд, 1H), 7,21 (шд, 1H), 7,03-6,97 (м, 2H), 6,90 (шс, 1H), 4,29-4,00 (м, 4H), 3,89-3,72 (м, 1H), 3,70-3,36 (м, 5H), 3,28-3,10 (м, 2H), 2,42-2,24 (м, 2H), 1,28-1,13 (м, 6H), 1,11-1,02 (т, 1,5H), 1,01-0,90 (т, 1,5H)

МС m/z 631 (MH⁺)

Приклад 11

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 3. Етап 5 здійснювали, використовуючи 2,4-дифторбензолсульфоніл хлорид замість 4-фторбензолсульфоніл хлориду.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,16 (шс, 6H), 1,93 (шс, 4H), 2,50-3,75 (м, 13H), 4,83 (шс, 1H), 6,60-7,40 (м, 7H), 7,60 (шс, 1H), 7,77 (м, 1H), 9,41 (шс, 1H)

Приклад 12

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно)піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 2. Етап 5 здійснювали, використовуючи 2,4-дифторбензолсульфоніл хлорид замість 4-фторбензолсульфоніл хлориду.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 0,91 (т, J=6,9, 1,8H), 1,12 (м, 7,2H), 1,92 (шс, 4H), 2,50-4,00 (м, 13H), 4,78 (м, 0,6H), 4,88 (м, 0,4H), 6,55 (д, J=6,9, 0,4H), 6,77 (д, J=6,3, 0,6H), 6,80-7,38 (м, 6H), 7,51 (с, 0,4H), 7,58 (с, 0,6H), 7,74 (м, 1H), 9,33 (м, 1H)

Приклад 13

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-метиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 11. Етап 3 здійснювали як для прикладу 7.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,14 (т, J=6,6, 6H), 2,32 (м, 2H), 2,50-3,80 (м, 9H), 4,13 (м, 4H), 4,62 (м, 0,6H), 4,81 (м, 0,4H), 5,81 (шд, 0,6H), 5,90 (шд, 0,4H), 6,90-7,40 (м, 7H), 7,77 (м, 1H)

МС m/z 619,2 (MH⁺)

Приклад 14

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-етиламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 12. Етап 3 здійснювали як для прикладу 7.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 0,89 (т, J=6,7, 1,8H), 1,16 (м, 7,2H), 2,28 (м, 2H), 3,00-4,00 (м, 8H), 4,09 (шс, 4H), 4,79 (м, 0,6H), 4,88 (м, 0,4H), 6,80-7,30 (м, 7H), 7,57 (с, 0,4H), 7,62 (с, 0,6H), 7,75 (м, 1H), 11,9 (шс, 1H)

МС m/z 633,2 (MH⁺)

Приклад 15

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 2. Етап 6 здійснювали, використовуючи пропаргіл бромід замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,18 (м, 6H), 1,93 (шс, 4H), 2,37 (с, 1H), 3,00-3,70 (м, 10H), 3,80 (д, J=21,3, 0,6H), 3,98 (д, J=18,3, 0,4H), 4,51 (м, 1H), 4,88 (м, 1H), 6,75-7,35 (м, 7H), 7,58 (с, 0,6H), 7,63 (с, 0,4H), 7,86 (м, 2H), 9,71 (шс, 1H)

Приклад 16

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 11. Етап 6 здійснювали, використовуючи пропаргіл бромід замість диметил сульфату.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,17 (м, 6H), 1,94 (м, 4H), 2,40 (м, 1H), 3,00-3,75 (м, 10H), 3,99 (д, J=18,0, 0,6H), 4,18 (д, J=18,0, 0,4H), 4,50 (м, 1H), 4,90 (м, 1H), 6,75-7,35 (м, 7H), 7,81 (м, 2H), 10,0 (шс, 1H)

Приклад 17

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(2,4-дифторфеніл-сульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 4, 5, 6 і 7 здійснювали як для прикладу 16. Етап 3 здійснювали як для прикладу 7.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,18 (м, 6H), 2,34 (м, 3H), 3,00-3,75 (м, 6H), 3,80-4,25 (м, 5H), 4,47 (м, 1H), 4,89 (м, 1H), 6,75-7,35 (м, 7H), 7,79 (м, 2H), 10,3 (шс, 1H)

МС m/z 643,2 (MH⁺)

Приклад 18

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-фторфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(азетидин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 7. Етап 6 здійснювали, використовуючи пропаргіл бромід замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CDCl₃) δ 1,25 (м, 6H), 2,28 (м, 3H), 3,00-3,75 (м, 6H), 3,80-4,25 (м, 5H), 4,47 (м, 1H), 4,89 (м, 1H), 6,75-7,35 (м, 7H), 7,57 (с, 0,6H), 7,62 (с, 0,4H), 7,79 (м, 2H), 10,6 (шс, 1H)

МС m/z 625,2 (MH⁺)

Приклад 19

Приготування N-(2-[N',N'-діетиламіно]-5-[N''-(4-хлорфенілсульфоніл)-N''-пропаргіламіно]піримідин-4-іл)-4'-(піролідин-1-ілкарбонілокси)-L-фенілаланіну

Етапи 1, 2, 3, 4, 5 і 7 здійснювали як для прикладу 1. Етап 6 здійснювали, використовуючи пропаргіл бромід замість етил йодиду.

¹H ЯМР (CD₃OD) δ 8,13 (с, 1H), 7,86-7,82 (м, 2H), 7,62-7,58 (м, 2H), 7,32-7,28 (м, 2H), 7,19-7,17

(м, 1H), 7,04-6,98 (м, 2H), 4,83-4,5 (м, 2H), 4,12-3,82 (м, 1H), 3,63-3,37 (м, 8H), 3,27-3,08 (м, 2H), 2,72 (шс, 1H), 2,04-1,86 (м, 4H), 1,24-1,07 (м, 6H)

¹³C ЯМР (CD₃OD) δ 177,2, 176,5, 162,7, 156,7, 155,7, 154,5, 153,2, 142,6, 140,3, 137,4, 137,3, 133,1, 132,9, 132,8, 132,7, 132,2, 132,1, 124,3, 111,3, 80,5, 80,3, 77,7, 58,2, 57,7, 44,9, 43,4, 28,1, 27,3, 14,8, 14,7

МС m/z 655 (MH⁺)

Наступні методи можуть бути використані для тестування сполук за даним винаходом.

Приклад А

Аналіз адгезії α⁴β¹ інтегрину: Адгезія клітин Jurkat™ з фібронектином плазми людини

Методика:

На 96-ямкові планшети (планшети Costar 3590 EIA) наносили фібронектин людини (Gibco/BRL, кат. №33016-023) у концентрації 10мкг/мл і залишали на всю ніч при 4°C. Потім планшети блокували розчином альбуміну бичачої сироватки (BSA; 0,3%) у сольовому розчині. Клітини Jurkat™ (які підтримували у логарифмічній фазі росту) мітили Calcein AM відповідно до інструкцій виробника, і суспендували при концентрації 2×10⁶ клітин/мл у суміші ГЕПЕС/сольовий розчин/BSA. Далі клітини витримували з досліджуваними і контрольними сполуками протягом 30 хвилин при кімнатній температурі перед перенесенням до окремих ямок планшета, вкритого фібронектином. Давали можливість статися адгезії протягом 35 хвилин при 37°C. Потім ямки промивали шляхом обережного відсмоктування і внесення пінеткою свіжого сольового розчину. Флуоресценцію, пов'язану з клітинами, що залишаються зчепленими, кількісно визначали, використовуючи флуоресцентний апарат для прочитання планшетів при довжині хвилі збудження 485нм, довжині хвилі емісії 530нм.

Клітинні культури готували, спочатку розділяючи клітин Jurkat™ у стаціонарній фазі 1:10 у перший день, і 1:2 на другий день, щоб виконати аналіз на третій день. Клітини, розділені 1:10 у перший день, були розділені 1:4 на третій день для четвертого дня аналізу.

Аналітичні планшети готували, спочатку готуючи робочий розчин фібронектину людини від Gibco/BRL (кат. №33016-023) у PBS++, з концентрацією 10мкг/мл. Планшет Costar 3590 EIA далі покривали розчином, 50мкл/ямку, на 2 години при кімнатній температурі (вважають, що його також можна залишити на ніч при 4°C). В кінцевому рахунку проводили відсмоктування з планшета, і блокували його буфером ГЕПЕС/сольовий розчин, 100мкл/ямку, протягом 1 години при кімнатній температурі, що супроводжувалося промиванням планшета тричі по 150мкл PBS++.

Розведення сполуки виконували шляхом приготування серійних розведень сполук у співвідношенні 1:3, як викладено нижче. Від кожного планшета (4 сполуки/планшет) додавали 600мкл до 4 пробірок Bio-Rad Titer tubes у штативі Titer tube. До кожної відповідної пробірки додавали достатню кількість сполуки, щоб одержати концентрацію 2X, використовуючи способи, добре відомі у даній галузі. Використовуючи планшети Falcon Flexiplates, до рядків B-G додавали

100мкл буферу ГЕПЕС/сольовий розчин або людської сироватки. Багатоканальну піпетку, встановлену на 180мкл, використовували з чотирма наконечниками, розташованими на піпетці з однаковими проміжками. Кожен набір з чотирьох пробірок перемішували 5 разів, і 180мкл сполуки 2X переносили до першої колонки розведення кожної сполуки у рядку В, залишаючи рядок А пустим. 180мкл додавали до інших ямок у рядку А. Серійні розведення виконували вниз по планшету, переносячи по 50мкл до наступного розведення і перемішуючи 5 разів, замінюючи наконечники кожного разу після перемішування. Розведення припинили на рядку F. У рядку G сполука була відсутня.

Розчин антитіл 21/6 з концентрацією 20мкг/мл у буфері ГЕПЕС/сольовий розчин або людській сироватці служив позитивним контролем і був відділений у посудині з реагентом, щоб додавати до планшета з суспензією клітин.

Забарвлювання клітин здійснювали, спочатку збираючи клітини Jurkat™ у логарифмічній фазі росту шляхом центрифугування у пробірках місткістю 50мл (1100об/хв. протягом 5 хвилин). Клітини ресуспендували у 50мл PBS++, центрифугували і ресуспендували у 20мл PBS++. Клітини забарвлювали за допомогою додавання 20мкл Calcein AM на 30 хвилин при кімнатній температурі. Об'єм доводили до 50мл буфером ГЕПЕС/сольовий розчин, і клітини підраховували, центрифугували і ресуспендували до 2×10^6 клітин/мл у буфері ГЕПЕС/сольовий розчин або людській сироватці.

Сполуки інкубували, застосовуючи таку методику. До нового гнучкого планшета, до рядків В-Н, додавали 65 мкл забарвлених клітин. Потім 65мкл сполук 2X додавали до відповідних рядків, дотримуючись розташування на планшеті, і тричі перемішували. 65мкл антитіл 2X-21/6 додавали до рядка Н і тричі перемішували. У кінцевому підсумку планшет інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

Адгезію фібронектину вимірювали, використовуючи флуоресцентний апарат для прочитання планшетів при довжині хвилі збудження 485нм, довжині хвилі емісії 530нм, після такої розробленої методики. Після інкубування клітини перемішували тричі, і 100мкл переносили на планшети, вкриті фібронектином, та інкубували при 37°C протягом приблизно 35 хвилин. Кожен планшет промивали, рядок за рядком, обережно вносячи піпеткою при кімнатній температурі 100мкл PBS++ вниз по стінках ямок і повертаючи планшет на 90 градусів для відсмоктування. Цю процедуру повторювали в цілому протягом 3 промивань. Кожну ямку після промивання наповнювали 100мкл, вносячи їх піпеткою вниз по стінці ямки.

Для кожної сполуки розраховували значення IC_{50} , як у присутності людської сироватки, так і за її відсутності. IC_{50} являє собою концентрацію, при якій ріст або активність інгібуються на 50%. Дані представлені у наступних таблицях.

Таблиця 2

Адгезія клітин з фібронектином
плазми людини (без людської сироватки)

Приклад №	IC_{50} (мкг/мл)
1.	0,011
2.	0,001
3.	0,004
4.	0,012
5.	0,00377
6.	0,003
7.	0,001
8.	0,001
9.	0,002
10.	0,00256
11.	0,005293
12.	0,005632
13.	0,001515
14.	0,002146
15.	0,063
16.	0,009
17.	0,00337
18.	0,003663
19.	0,004538

Таблиця 3

Адгезія клітин з фібронектином
плазми людини (містить людську сироватку)

Приклад №	IC_{50} (мкг/мл)
1.	0,264
2.	0,38
3.	1,062
4.	1,437
5.	0,987
6.	0,451
7.	0,053
8.	0,135
9.	0,128
10.	0,052332
11.	0,305436
12.	0,147085
13.	0,055391
14.	0,03259
15.	1,102
16.	0,371
17.	0,080426
18.	0,3
19.	4,114982

Приклад В

Аналіз насичення *in vitro* для визначення зв'язування сполук-кандидатів з $\alpha_4\beta_1$

Нижченаведене описує аналіз *in vitro* для визначення рівнів у плазмі, необхідних для сполуки, щоб бути активною у моделі експериментального аутоімунного енцефаломієліту ("ЕАЕ"), описаній у наступному прикладі, або в інших моделях *in vivo*.

Клітини Jurkat у логарифмічній фазі росту промивають і ресуспендують у нормальній тваринній плазмі, що містить 20мкг/мл антитіл 15/7 (Yednock, et al., J. Biol. Chem., (1995) 270(48):28740).

Клітини Jurkat розводять у два рази або у зразках нормальної плазми, що містять відомі кількості сполуки-кандидата у різних концентраціях у діапазоні від 66мкмоль/л до 0,01мкмоль/л, використовуючи стандартне 12-точкове серійне розведення для стандартної кривої, або у зразках плазми, одержаної з периферичної крові тварин, яким вводили сполуку-кандидат.

Далі клітини інкубують протягом 30 хвилин

при кімнатній температурі, двічі промивають фізіологічним розчином із фосфатним буфером ("PBS"), що містить 2% бичачої фетальної сироватки і по 1мМ хлориду кальцію та хлориду магнію (середовище для кількісного визначення), для видалення незв'язаних антитіл 15/7.

Потім клітини піддають впливу фікоеритрин-кон'югованих козячих $F(ab')_2$ анти-мишачих IgG Fc (Immunotech, Westbrook, ME), які були адсорбовані для будь-якої неспецифічної перехресної реактивності шляхом спільного інкубування з 5% сироваткою від тварин досліджуваних видів, при співвідношенні 1:200, та інкубують у темному місці при 4°C протягом 30 хвилин.

Клітини промивають двічі середовищем для кількісного визначення і ресуспендують у ньому ж. Потім їх аналізують за допомогою стандартного клітинного сортера із збудженням флуоресценції ("КСЗФ"), як описано у Yednock et al. J. Biol. Chem., 1995, 270:28740.

Дані потім зображають у вигляді графіка залежності флуоресценції від дози, наприклад, у нормальному вигляді "доза-ефект". Рівні доз, які мають результатом верхнє плато кривої, являють собою рівні, необхідні для досягнення ефективності у моделі *in vivo*.

Приклад С

Касетне дозування і аналіз сироватки для визначення біодоступності

Проводили скринінг пероральної біодоступності шляхом дозування шурам касети, тобто суміші 6 сполук в дозувальному розчині. Ця касета включає 5 досліджуваних препаратів і стандартну сполуку, в загальній дозі 10мг/кг. Кожну сполуку/досліджуваний препарат перетворювали на натрієву сіль з еквімолярною кількістю 1н NaOH і розчиняли у воді з концентрацією 2мг/мл. Касету готували, змішуючи однакові об'єми кожного із шести розчинів. Касетний дозувальний розчин добре перемішували і потім його рН доводили до 7,5-9. Дозувальний розчин готували напередодні дослідження і перемішували розтягом ночі при кімнатній температурі.

У цьому скринінгу були використані 6-8-тижневі самці щурів лінії Sprague Dawley (SD) від Charles River Laboratories. Щури знаходилися на карантині принаймні один день і мали постійний доступ до їжі та води. В ніч перед введенням касети щурів утримували без їжі приблизно 16 годин.

Для кожної касети були призначені по чотири щури SD. Одноразову дозу дозувального розчину вводили перорально кожному щуру. Записували об'єм дозування (5мл/кг) і час, і шурам давали їжу через 2 години після дозування.

Проби крові відбирали шляхом пункції серця у такі часові проміжки: 4 години, 8 годин і 12 годин. Безпосередньо перед відбором проб крові щурів анестезували газоподібним CO₂ протягом 10-20 секунд. Після відбору проб через 12 годин після дозування щурів піддавали евтаназії через задушення за допомогою CO₂, супроводжуване зміщенням шийних хребців.

Проби крові зберігали у гепаринізованих мік-

ротейнерних пробірках при зниженій температурі (4°C) до їхньої обробки. Проби крові центрифугували (10000об/хв. протягом 5 хвилин) і проби плазми видаляли та зберігали у морозильній камері при -20°C до проведення аналізу на рівень вмісту препаратів. Рівень вмісту препаратів у плазмі аналізували, використовуючи наступний протокол для прямої преципітації плазми.

Проби плазми, відібрані *in vivo*, готували у 1,5мл 96-лунковому планшеті, додаючи, по порядку, 100мкл досліджуваної плазми і 150мкл метанолу, що супроводжувалося струшуванням протягом 10-12 секунд. Додавали 150мкл внутрішнього стандарту з концентрацією 0,05нг/мкл в ацетонітрилі і струшували протягом 30 секунд.

Проби для калібрувальної кривої готували у 1,5мл 96-лунковому планшеті, додаючи, по порядку, 100мкл контрольної плазми мишей, що супроводжувалося додаванням 150мкл метанолу і струшуванням протягом 10-20 секунд. Додавали 150мкл внутрішнього стандарту з концентрацією 0,05нг/мкл в ацетонітрилі і струшували протягом 30 секунд. У проби вводили 0-200нг (10 концентрацій) сполуки, яка цікавить, у 50% метанолі, щоб одержати діапазон калібрувальної кривої 0,5-2000нг/мл. Проби знову струшували протягом 30 секунд.

Далі проби центрифугували протягом 20-30 хвилин при 3000об/хв. у мікроцентрифугі Еппендорфа, після чого 80-90% надосадової рідини переносили у чистий 96-лунковий планшет. Потім органічний розчинник упарювали до сухого залишку проб (в атмосфері N₂ при 40°C протягом 30-60 хвилин (ZymarkTurbovap)).

Залишок далі розчиняли у 200-600л рухомої фази (50% CH₃OH/0,1% ТФА). Потім запускали метод ВЕРХ/МС/МС, використовуючи потрібний квадрупольний мас спектрометр PE-Sciex API-3000 (серійний номер 0749707) виробництва Perkin-Elmer, автосемплер Series 200 і насос Shimadzu 10A. Збір даних проводили за допомогою PE-Sciex Analyst (v 1.1), і аналіз даних та їх кількісну оцінку виконували з використанням PE-Sciex Analyst (v 1.1). Об'єм проби 5-50мкл вводили в обернено-фазову колонку ThermoHypersil DASH-18 (Keystone, 2,0×20мм, 5мкм, PN: 8823025-701), використовуючи рухому фазу 25% CH₃OH, 0,1% ТФА-100% CH₃OH, 0,1% ТФА. Час аналізу складав приблизно 8 хвилин при швидкості потоку рухомої фази приблизно 300мкл/хв.

Площу під кривою "концентрація-час" (AUC) розраховували з використанням лінійної формули трапецій, від t=0 до часу останнього відбору проби t_x (див. Handbook of Basic Pharmacokinetics, Wolfgang A. Ritschel and Gregory L. Keams, 5th ed, 1999).

$$AUC^{0 \rightarrow t_x} = S((C_n + C_{n+1}/2)) \cdot (t_{n+1} - t_n) [(\mu\text{g}/\text{mL})\text{h}]$$

У випадку зразка касетного дозування, відбір проб через 4, 8 і 12 годин після позасудинного дозування, AUC розраховували з моменту часу t=0 до t=12 годин. Значення AUC^{0→12год.} розраховували для кожної окремої тварини, і середні значення AUC^{0→12год.} наведені у таблиці нижче.

Таблиця 4

Приклад №	AUC
1.	14,798
2.	15,971
3.	22,271
4.	13,829
5.	2,1654
6.	0,5125
7.	0,8979
8.	2,4082
9.	2,0774
10.	2,1113
11.	14,818
12.	4,7816
13.	1,283
14.	0,3566
15.	90,317
16.	23,808
17.	0,8628
18.	4,7528

Приклад D

Моделі астми

Запальні стани, опосередковані $\alpha_4\beta_1$ інтегрини, включають, наприклад, притік еозинофілів, гіперчутливість дихальних шляхів і закупорення, які мають місце при хронічній астмі. Нижченаведене описує експериментальні моделі астми у тварин, які були використані для дослідження ефектів *in vivo* сполук за даним винаходом для застосування у лікуванні астми.

Моделі астми у щурів

Дана модель дотримується методик, [описаних Chapman et al, Am J. Resp. Crit. Care Med., 153:4, A219 (1996) і Chapman et al, Am. J. Resp. Crit Care Med 155:4, A881 (1997)], обидві з яких включені сюди за допомогою посилання у своїй повноті. Овальбумін (ОА; 10мг/мл) змішували з гідроксидом алюмінію (10мг/мл) і вводили (внутрішньочеревинно) щурам Brown Norway у 0 день. Ін'єкції ОА, разом з ад'ювантом, повторювали на 7 і 14 день. На 21 день сенсibilізовані тварини були ізольовані у пластикових трубках і протягом 60 хвилин піддавалися впливу аерозолі ОА (10мг/кг) в інгаляційній камері з лише носовою експозицією. Тварин умертвляли через 72 години за допомогою пентобарбіталу (250мг/кг, внутрішньочеревинно). Легені промивали через трахеальну канюлю, використовуючи 3 аліквоти (4мл) розчину Хенкса (HBSS×10, 100мл; ЕДТК 100мМ, 100мл; ГЕПЕС 1М, 25мл; доводять до 1л водою); клітини, що вилучаються, об'єднували і загальний об'єм рідини, що вилучається, доводили до 12мл шляхом додавання розчину Хенкса. Підраховували загальну кількість клітин (лічильник Sysmex microcell counter F-500, TOA Medical Electronics Otd., Японія) готували мазки шляхом розведення вилученої рідини (до приблизно 10^6 клітин/мл) і внесення піпеткою аліквоти (100мкл) у центрифугу (Cytospin, Shandon, Великобританія). Мазки висушували на повітрі, фіксували, використовуючи розчин fast green (міцного зеленого) у метанолі (2мг/мл) протягом 5 секунд і забарвлювали еозином G (5 секунд) і тіазином (5 секунд) (Diff-Quick, Browne Ltd., Великобританія) для того, щоб диференціювати еозинофіли, нейтрофіли, макрофаги і лімфоцити. Загалом було підраховано 500 клітин на мазок, з використанням світлової

мікроскопії при масляній імерсії ($\times 100$). Сполуки за даним винаходом готували в суспензії 0,5% карбоксиметилцелюлози і 2% Tween 80 і вводили перорально щурам, сенсibilізованим до цього алергену, овальбуміну. Сполуки, які інгібували індукване алергеном накопичення лейкоцитів у дихальних шляхах активно сенсibilізованих щурів Brown Norway, розглядалися як активні у даній моделі.

Моделі астми у мишей

Сполуки також оцінювали у моделі гострого легеневого запалення у мишей, дотримуючись методик, [описаних Kung et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 13:360-365, (1995) і Schneider et al., (1999), Am J. Respir. Cell Mol. Biol. 20:448-457, (1999)], кожна з яких включена сюди за допомогою посилання у своїй повноті. 8-12 тижневі самки мишей лінії Black/6 були сенсibilізовані у 1 день за допомогою внутрішньочеревинної ін'єкції 0,2мл суміші овальбумін/галун, що містить 20мкг овальбуміну (Grade 4, Sigma) і 2мг ін'єкційного Alum (Pierce). Повторну ін'єкцію проводили на 14 день. Мишам проводили стимуляцію алергеном на 28 і 29 день з 1% розчином овальбуміну (у 0,9% сольовому розчині), який розпилювали у вигляді аерозолі протягом 20 хвилин. Мишей умертвляли, і проби, одержані при бронхоальвеолярному промиванні (3мл), збирали на 30 день, через 48 годин після першої стимуляції алергеном. Визначали кількість еозинофілів за допомогою клітинного сортера із збудженням флуоресценції (КСЗФ)/методу забарвлення флуоресцеїном ізотіоціанатом (ФІТЦ). Сполуки за даним винаходом готували в суспензії 0,5% карбоксиметилцелюлози і 2% Tween 80 і вводили перорально мишам, сенсibilізованим до цього алергену, овальбуміну. Сполуки, які інгібували індукване алергеном накопичення лейкоцитів у дихальних шляхах активно сенсibilізованих мишей C57BL/6, розглядалися як активні у даній моделі.

Моделі астми в овець

Дана модель дотримується методик, [описаних Abraham et al, J. Clin. Invest. 93:776-787 (1994) і Abraham et al, Am J. Respir Crit Care Med 156:696-703 (1997)], обидві з яких включені сюди за допомогою посилання у своїй повноті. Сполуки за даним винаходом оцінювали при внутрішньовенному (сольовий водний розчин), пероральному (2% Tween 80, 0,5% карбоксиметилцелюлоза) та інгаляційному (аерозоль) введенні вівцям, гіперчутливим до антигену *Ascaris suum*. Сполуки, які зменшують ранній етап індукваної антигеном бронхіальної відповіді і/або блокують пізній етап відповіді дихальних шляхів, наприклад, мають захисну дію проти індукованих антигеном пізніх відповідей і гіперчутливості дихальних шляхів, розглядаються як активні у даній моделі.

Алергізовані вівці, у яких спостерігали розвиток як ранньої, так і пізньої бронхіальної відповіді на вдихуваний антиген *Ascaris suum*, були використані для дослідження впливу сполук-кандидатів на дихальні шляхи. Після місцевої анестезії носових проходів 2% лідокаїном балонний катетер проводили крізь одну ніздрю у нижній

відділ стравоходу. Після цього тваринам крізь іншу ніздрю вводили манжетну ендотрахеальну трубку з гнучким волоконно-оптичним бронхоскопом як зондом.

Плевральний тиск оцінювали згідно з Abraham (1994). Аерозолі (див. склад нижче) генерували, використовуючи наявний медичний аерозольний апарат, що забезпечував утворення аерозолі з середнім аеродинамічним діаметром частинок 3,2мкм, як визначено за допомогою каскадного імпактора Андерсена. Аерозольний апарат був приєднаний до дозиметричної системи, що складається з пневморозподільника з електромагнітним керуванням і джерела стисненого повітря (20psi). Вихід аерозольного апарата був спрямований у пластмасовий трійник, один кінець якого був приєднаний до отвору вдихання клапанного респіратора. Пневморозподільник з електромагнітним керуванням активували протягом 1 секунди на початку дихального циклу респіратора. Аерозолі подавалися із V_t 500мл і швидкістю 20вдихів/хв. Як контроль використовували 0,5% розчин натрію бікарбонату.

Щоб оцінити швидкість реагування бронхів, згідно з Abraham (1994), були генеровані інтегральні криві "концентрація-ефект" для карбохоліну. Була проведена біопсія бронхів до і після початку лікування і через 24 години після антигенної стимуляції. Біопсія бронхів була виконана згідно з Abraham (1994).

Також були проведені дослідження адгезії *in vitro* альвеолярних макрофагів, згідно з Abraham (1994), і розрахований відсоток зчеплених клітин.

Утворення аерозолі

Розчин сполуки-кандидата з концентрацією 30,0мг/мл у 0,5% (маса/об'єм) розчині натрію бікарбонату у сольовому розчині готують, використовуючи наступну методику:

А. Приготування основного розчину 0,5% натрію бікарбонату у сольовому розчині: 100,0мл

Інгредієнт	Грамів/100,0мл	Кінцева концентрація
Натрію бікарбонат	0,5 г	0,5%
Сольовий розчин	до 100,0мл	до 100%

Методика:

1. У мірну колбу місткістю 100мл додають 0,5г натрію бікарбонату.

2. Додають приблизно 90,0мл сольового розчину і диспергують за допомогою ультразвуку до повного розчинення солі.

3. Доводять сольовим розчином загальний об'єм розчину до 100,0мл і ретельно перемішують.

В. Приготування розчину сполуки-кандидата з концентрацією 30,0мг/мл: 10,0мл

Інгредієнт	Грамів/100,0мл	Кінцева концентрація
Сполука-кандидат	0,300 г	30,0мг/мл
Основний розчин 0,5% натрію бікарбонату у сольовому розчині	до 10,0мл	до 100%

Методика:

1. У мірну колбу місткістю 10мл додають

0,300г сполуки-кандидата.

2. Додають приблизно 9,7мл основного розчину 0,5% натрію бікарбонату у сольовому розчині.

3. Диспергують суміш за допомогою ультразвуку до повного розчинення сполуки-кандидата.

4. Доводять основним розчином 0,5% натрію бікарбонату у сольовому розчині загальний об'єм розчину до 10,0мл і ретельно перемішують.

Приклад Е

10-Денне дослідження токсичності на мишах лінії C57B6

10-Денне дослідження з метою оцінки токсичності сполук за даним винаходом було проведено на самках мишей лінії C57B6. Сполуку вводили за допомогою зонда у самок при п'яти рівнях доз, 0 (контроль із введенням наповнювача), 10, 30, 100, 300 і 1000мг/кг, для кожного рівня дози використовували по 5 тварин. Об'єм дози для всіх рівнів складав 10мл/кг. Розчини або суспензії дози готували у 2% Tween 80 у 0,5% карбоксиметилцелюлозі, і нові розчини або суспензії дози готували кожних два-три дні. Прижиттєві спостереження включали визначення маси тіла (1, 2, 3, 5, 7, 8 і 11 дні дослідження), щоденні клінічні спостереження поведінки у клітці (1-2 на добу) і періодичне (1,2 і 9 дні дослідження) спостереження сукупності функціональних показників.

По завершенні дослідження відбирали проби крові шляхом пункції серця для вивчення показників клінічної патології (гематології і клінічної хімії) та рівнів препаратів. Проби крові, оброблені ЕДТК, були проаналізовані на загальну кількість лейкоцитів, загальну кількість еритроцитів, гемоглобін, гематокрит, показники еритроцитів (СОЕ, СГЕ, КСГЕ), тромбоцити і лейкоцитарну формулу (нейтрофіли, лімфоцити, моноцити, еозинофіли і базофіли). Гепаринізовані проби плазми були проаналізовані на вміст аланін трансамінази, аспартат трансамінази, лужної фосфатази, загального білірубину, альбуміну, білка, кальцію, глюкози, азоту сечовини, креатиніну, холестерину і тригліцеридів.

Після відбирання проб крові був проведений розтин тварин і були зважені внутрішні органи (печінка, селезінка, нирки, серце і виличкова залоза). Були відібрані зразки тканин: мозку, слинних залоз, виличкової залози, серця, легень, нирок, надниркових залоз, селезінки, шлунка, дванадцятипалої кишки, клубової кишки, ободової кишки і матки/яєчників, і зафіксовані у формаліні. Тканини, одержані з тварин контрольної групи та тварин із груп з дозуванням 300 і 1000мг/кг, обробляли на предметному склі, забарвлюючи гематоксиліном-еозином, і оцінювали на наявність гістопатологічних уражень.

Зміни маси тіла, абсолютної та відносної маси органів і результати вивчення показників клінічної патології були проаналізовані на статистично достовірну різницю у порівнянні з контролем за допомогою критерію множинного порівняння Дуннета, використовуючи програмне забезпечення Prism. Результати спостереження сукупності функціональних показників були проаналізовані на наявність різниці з використанням критерію Дуннета, точного критерію Фішера, а ефекти тре-

нда дози - за допомогою кореляційного критерію Кокрен-Мантель-Хензель (Cochran-Mantel-Haenszel), використовуючи програмне забезпечення SAS.

При використанні традиційної пероральної лікарської форми сполуки за даним винаходом були б активними у даній моделі.

Приклад F

Ад'ювантний артрит у щурів

Ад'ювантний артрит у щурів є експериментальною моделлю на тваринах, корисною у дослідженні ревматоїдного артриту, який індукують ін'єкцією *M. tuberculosis* в основу хвоста щурів лінії Lewis. Через 10-15 днів після ін'єкції у тварин розвивається тяжкий прогресуючий артрит.

Як правило, сполуки досліджують на їхню здатність впливати на набряк задніх кінцівок і ураження кісток, які є результатом ад'ювантного набряку у щурів. Щоб кількісно оцінити інгібування набряку задніх кінцівок, яке є результатом ад'ювантного артриту, були визначені дві фази запалення: (1) первинне і вторинне запалення

задньої кінцівки, в яку була зроблена ін'єкція, і (2) вторинне запалення задньої кінцівки, в яку не була зроблена ін'єкція, яке звичайно починає розвиватися приблизно через одинадцять днів після індукування запалення у кінцівці, в яку була зроблена ін'єкція. Зменшення запалення останнього типу є показником імуносупресивної активності. Cf. Chang, *Arth. Rheum.*, 20, 1135-1141 (1977).

Використання експериментальної моделі на тваринах ревматоїдного артриту, такої як ад'ювантний артрит, дозволяє вивчати клітинні події, залучені до ранніх стадій захворювання. Експресія CD44 на макрофагах і лімфоцитах підвищується під час ранньої стадії розвитку ад'ювантного артриту, тоді як експресія LFA-1 підвищується на більш пізній стадії розвитку захворювання. Розуміння взаємодії між молекулами адгезії та ендотелієм на найбільш ранніх стадіях ад'ювантного артриту могло б призвести до суттєвих досягнень у методах, застосовуваних при лікуванні ревматоїдного артриту.