



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93062 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
C07D 239/46 (2006.01)
C07D 239/47 (2006.01)
A61K 31/505

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

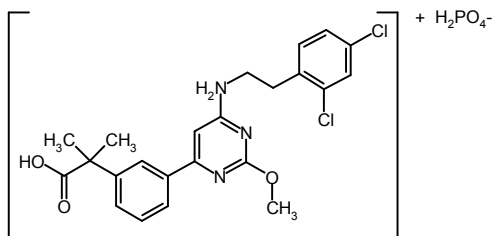
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПЕРВИННА КИСЛА ФОСФАТНА СІЛЬ АНТАГОНІСТА РЕЦЕПТОРА ПРОСТАГЛАНДИНУ D2

1

2

- (21) a200806196
(22) 12.10.2006
(24) 10.01.2011
(86) PCT/US2006/039901, 12.10.2006
(31) 60/726,290
(32) 13.10.2005
(33) US
(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.
(72) ЛАНДЖЕВІН БЕВЕРЛІ, US, ОРТОН ЕДВАРД,
US, ШЕРЕР ДАНІЕЛЬ, US
(73) АВЕНТІС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ІНК., US
(56) WO 2006044732 A
WO 03049739 A
WO 2005005394 A
(57) 1. Сполука формули (III)



. (III)

2. Сполука за п. 1 в кристалічній формі.
3. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично ефективну кількість сполуки за п. 1 в складі з фармацевтично прийнятним носієм.
4. Спосіб лікування алергічного захворювання, системного мастоцитозу, порушення, що супроводжується системною активацією мастоцитів, анафілактичного шоку, бронхоконстрикції, бронхіту, кропивниці, екземи, захворювання, що супроводжується свербінням, захворювання, яке виникає як вторинне захворювання в результаті стану, що супроводжується свербінням, запалення, хронічних обструктивних захворювань легенів, ішемічного реперфузійного пошкодження, розладу мозкового кровообігу, хронічного ревматоїдного артриту, плевриту або неспецифічного виразкового коліту у пацієнта, потребуючого подібного лікування, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.
5. Спосіб за п. 4, в якому захворюванням, яке виникає як вторинне захворювання в результаті ста-

ну, що супроводжується свербінням, є катаракта, відшаровування сітківки, запалення, інфекція або порушення сну.

6. Спосіб лікування алергічного риніту, алергічного кон'юнктивіту, atopічного дерматиту, бронхіальної астми, харчової алергії, системного мастоцитозу, порушення, що супроводжується системною активацією мастоцитів, анафілактичного шоку, бронхоконстрикції, бронхіту, кропивниці, екземи, запалення, хронічних обструктивних захворювань легенів, ішемічного реперфузійного пошкодження, розладу мозкового кровообігу, хронічного ревматоїдного артриту, плевриту або неспецифічного виразкового коліту у пацієнта, потребуючого подібного лікування, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

7. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого алергічним захворюванням, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

8. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого бронхіальною астмою, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

9. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого алергічним ринітом, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

10. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого алергічним дерматитом, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

11. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого алергічним кон'юнктивітом, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

12. Спосіб лікування пацієнта, страждаючого хронічним обструктивним захворюванням легенів, який включає введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки за п. 1.

13. Фармацевтична композиція, яка містить фармацевтично ефективну кількість сполуки за п. 1 і сполуку, яка вибрана з групи, що включає антигістамін, антагоніст лейкотриєну, бета-агоніст, інгібі-

(13) C2

(11) 93062

(19) UA

тор PDE4, антагоніст TP і антагоніст CrTh2, в складі з фармацевтично прийнятним носієм.

14. Фармацевтична композиція за п. 13, в якій антигістаміном є фексофенадин, дезлоратадин, лоратадин або цетиризин, антагоністом лейкотриєну

є монтелукаст або зафіруласт, бета-агоністом є альбутерол, сальбутерол або тербуталін, інгібітором PDE4 є рофлуміласт або ціломіласт, антагоністом TP є раматробран і антагоністом CrTh2 є раматробран.

Серійне виробництво фармацевтичних композицій ставить множину задач перед хіміками і технологами. У той час коли багато задач пов'язані з обробкою великої кількості реагентів і керуванням хімічними реакціями, які протікають у великих об'ємах, одна з головних задач пов'язана з природою найактивнішого кінцевого продукту. Продукт повинен не тільки бути отриманий з високим виходом, бути стабільним і таким, що легко виділяється, але і володіти властивостями, які б підходили для тих типів фармацевтичних препаратів, в яких передбачається його використання. Стабільність активного інгредієнта фармацевтичного препарату повинна бути забезпечена на кожній із стадій виробничого процесу, включаючи синтез, виділення, зберігання, готування лікарського засобу і лікарської форми. На кожну з цих стадій може впливати стан зовнішнього середовища (температура і вологість).

Для готування фармацевтичних композицій повинні використовуватися фармацевтично активні речовини дуже високої чистоти, які також повинні володіти достатньою хімічною стабільністю, щоб забезпечити надійне довгострокове зберігання препарату в різних умовах. Це абсолютно необхідно для того, щоб запобігти утворенню небажаних продуктів розпаду в фармацевтичних композиціях, оскільки ці продукти можуть бути потенційно токсичними або приводити до зниження активності композиції.

Основною задачею серійного виробництва фармацевтичних композицій є збереження поліморфної стабільності активної речовини в процесі її обробки, з метою забезпечення збереження робочих параметрів і якості лікарського препарату. В залежності від характеристик стабільності фармацевтичної сполуки останній може зазнати змін в процесі виробництва і/або зберігання, що може викликати порушення якості і технології готування лікарського препарату. Такі зміни можуть негативно позначитися на відтворюваності виробничого процесу і, таким чином, привести до створення препаративних форм, які, можливо, не будуть задовольняти суворі вимоги до високої якості, які пред'являються відповідними органами контролю технологій готування лікарських засобів. Спираючись на вищесказане, можна зробити висновок, що, як мінімум, вибір фармацевтичної сполуки з поліпшеними характеристиками фізичної стабільності може забезпечити ряд переваг такої форми в порівнянні з іншими, менш стабільними формами.

Даний винахід фармакологічно активного антагоніста рецептора простагландину D2 належить до первинного кислого фосфату (солі), який має найбільш переважні фізичні властивості. Сполука

використовується як антагоніст DP для лікування пацієнта, схильного до патологічних (захворювань) станів, опосередкованих PGD2, включаючи, але не обмежуючись, алергічне захворювання (наприклад, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, атопічний дерматит, бронхіальна астма і харчова алергія), системний мастоцитоз, порушення, що супроводжуються системною активацією мастоцитів, анафілактичний шок, бронхоконстрикцію, бронхіт, кропивницю, екзему, захворювання, що супроводжуються свербінням (наприклад, атопічний дерматит і кропивниця), захворювання (наприклад катаракта, відшаровування сітківки, запалення, інфекція і порушення сну), які виникають як вторинні захворювання в результаті стану, що супроводжується свербінням (наприклад, розчісування і розтирання), запалення, хронічні обструктивні захворювання легенів, ішемічне реперфузійне ушкодження, розлад мозкового кровообігу, хронічний ревматоїдний артрит, плеврит, неспецифічний виразковий коліт і подібні захворювання.

Показано, що локальна стимуляція алергеном пацієнта з алергічним ринітом, бронхіальною астмою, алергічним кон'юнктивітом і атопічним дерматитом приводить до швидкого зростання рівня простагландину D2 (PGD2) в назальній і бронхіальній змивній рідині, слюзах і шкірній порожнинній рідині. PGD2 може чинити різну запальну дію, наприклад підвищувати проникність судин в кон'юнктиві і шкірі, підвищувати опір дихальних шляхів носа, звуужування дихальних шляхів і проникнення еозинофілів в кон'юнктиву і трахеї.

PGD2-основний циклооксигеназний продукт арахідонової кислоти, який виробляється мастоцитами при імунологічному стимулюванні [Lewis, R. A., Soter N. A., Diamond P. T., Austen K. F., Oates J. A., Roberts L. J. II, Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE, J. Immunol 129, 1627-1631, 1982]. Активовані мастоцити, одне з головних джерел PGD2, відіграють одну з ключових ролей у виникненні алергічної реакції при таких захворюваннях, як астма, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, алергічний дерматит і інші захворювання [Brightling C. E., Bradding P., Pavord I. D., Wardlaw A. J., New Insights into the role of the mast cell in asthma, Clin. Exp. Allergy 33, 550-556, 2003].

Багато які впливи PGD2 опосередковуються його дією на рецептор простагландину D (DP)-рецептор, пов'язаний з G-білком, експресований на епітелії і в гладких м'язах.

При астмі респіраторний епітелій вже давно вважається головним джерелом запальних цитокінів і хемокінів, які визначають розвиток захворювання [Holgate S., Lackie P., Wilson S., Roche W.,

Davies D., Bronchial Epithelium as a Key Regulator of Airway Allergen Sensitization and Remodelling in Asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 113-117, 2000]. У експериментальній моделі астми мишей при стимулюванні антигеном відбувається різка активація рецептора DP на епітелії дихальних шляхів [Matsuoka T., Hirata M., Tanaka H., Takahashi Y., Murata T., Kabashima K., Sugimoto Y., Kobayashi T., Ushikubi F., Aze Y., Eguchi N., Urade Y., Yoshida N., Kimura K., Mizoguchi A., Honda Y., Nagai H., Nammiya S., prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma, *Science* 287, 2013-2017, 2000]. У нокаутних мишей з відсутнім рецептором DP помітно знижується гіперреактивність дихальних шляхів і хронічне запалення-дві найважливіших ознаки астми людини [Matsuoka T., Hirata M., Tanaka H., Takahashi Y., Murata T., Kabashima K., Sugimoto Y., Kobayashi T., Ushikubi F., Aze Y., Eguchi N., Urade Y., Yoshida N., Kimura K., Mizoguchi A., Honda Y., Nagai H., Nammiya S., Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma, *Science* 287, 2013-2017, 2000].

Вважається також, що рецептор DP задіяний в алергічному риніті людини, поширеному алергічному захворюванні, яке характеризується такими симптомами, як чихання, свербіж, ринорея і закладеність носа. Місцеве застосування PGD2 в носі спричиняє залежне від дози збільшення закладеності носа [Doyle W. J., Boehm S., Skoner D. P., Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 86 (6 Pt 1), 924-35, 1990].

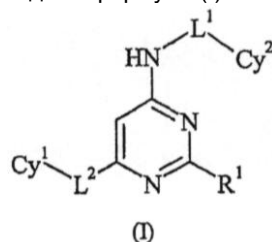
Було показано, що антагоністи рецептора DP знижують запалення дихальних шляхів в експериментальній моделі астми морських свинок [Arimura A., Yasui K., Kishino J., Asanuma F., Hasegawa H., Kakudo S., Ohtani M., Arita H., Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2), 411-9, 2001]. Таким чином, PGD2, мабуть, діє на рецептор DP і відіграє важливу роль у виявленні основних особливостей алергічної астми.

Було показано, що антагоністи DP можуть ефективно послаблювати симптоми алергічного риніту у багатьох видів, зокрема, було показано, що вони можуть пригнічувати індуковану антигенами закладеність носа, найбільш явний симптом алергічного риніту [Jones, T. R., Savoie, C., Robichaud, A., Sturino, C., Scheigetz, J., Lachance, N., Roy, B., Boyd, M., Abraham, W., Studies with a DP receptor antagonist in sheep and guinea pig models of allergic rhinitis, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 167, A218, 2003; i Arimura A., Yasui K., Kishino J., Asanuma F., Hasegawa H., Kakudo S., Ohtani M., Arita H., Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2), 411-9, 2001].

Антагоністи DP також ефективні в експериментальних моделях алергічного кон'юнктивіту і алергічного дерматиту [Arimura A., Yasui K., Kishino J., Asanuma F., Hasegawa H., Kakudo S., Ohtani M., Arita H., Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751, *J.*

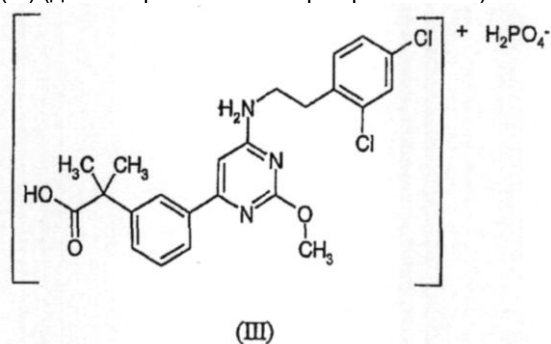
Pharmacol. Exp. Ther. 298 (2), 411-9, 2001; i Torisu K., Kobayashi K., Iwahashi M., Nakai Y., Onoda T., Nagase T., Sugimoto I., Okada Y., Matsumoto R., Nanbu F., Ohuchida S., Nakai H., Toda M., Discovery of a new class of potent, selective, and orally active prostaglandin D₂ receptor antagonists, *Bioorg. & Med. Chem.* 12, 5361-5378, 2004].

У заявці на патент WO 2006044732 (далі «заявка 732»), яка у вигляді посилання на неї включена в дану заявку, розкриває піримідини, що мають корисні фармацевтичні властивості, включаючи, зокрема, здатність зв'язуватися з DP рецептором і регулювати його. У заявці 732 розкривалися піримідини формули (I)



Їх отримання, фармацевтичні композиції, які містять ці сполуки і їх фармацевтичне застосування для лікування патологічних станів, які можна контролювати інгібуванням рецептора простагландину D₂. Крім того, в заявці 732 описана 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонова кислота (далі «вільна форма»). У заявці 732 також наданий загальний опис широкої різноманітності солей, утворених при приєднуванні кислот і основ до сполук, які є предметом даного винаходу, приведені демонстраційні приклади готування хлористоводневих і натрієвих солей, більш конкретно, хлористоводневої і натрієвої солей 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти. Однак, в заявці 732 не була розкрита інформація безпосередньо про сіль первинного кислого фосфату 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти.

Даний винахід належить до первинної кислоти фосфатної солі 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти формули (III) (далі «первинна кислота фосфатна сіль»).



Іншим аспектом даного винаходу є фармацевтична композиція, яка включає фармацевтично

ефективну кількість первинної кислої фосфатної солі.

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб лікування пацієнта, страждаючого порушенням, опосередкованим PGD2, в тому числі, зокрема, алергічним захворюванням (наприклад алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальна астма і харчова алергія), системним мастоцитозом, порушеннями, що супроводжуються системною активацією мастоцитів, анафілактичним шоком, бронхоконстрикцією, бронхітом, кропивницею, екземою, захворюваннями що супроводжуються свербінням (наприклад atopічний дерматит і кропивниця), захворюваннями (наприклад катаракта, відшаровування сітківки, запалення, інфекція і порушення сну), які виникають як вторинні захворювання в результаті стану, що супроводжується свербінням (наприклад розчухування і розтирання), запаленням, хронічними обструктивними захворюваннями легенів, ішемічними реперфузійними пошкодженнями, розладами мозкового кровообігу, хронічним ревматоїдним артритом, плевритом, неспецифічним виразковим колітом і подібними захворюваннями, за допомогою введення пацієнту фармацевтично ефективної кількості первинної кислої солі 2-(3-(6-[2,4-дихлорфеніл]етиламіно)-2-метоксипіримідин-4-іл)феніл)-2-метилпропіонової кислоти.

Більш докладне обговорення даного винаходу і відповідні пояснюючі фігури приводяться нижче.

Фіг.1. Порошкова рентгенограма (ГР) первинного кислого фосфату (солі).

Фіг.2. Таблиця значень міжплощинних відстаней d і відносної інтенсивності піків порошкової рентгенограми, поданої на Фіг.1.

Фіг.3. Термограма первинного кислого фосфату, отримана методами диференціальної скануючої калориметрії і термогравіметричного аналізу (ДСК-ТГА). Дані ТГА показують загальну втрату маси, яка становить приблизно 0,4%, при нагріванні від кімнатної температури до 175°C. Результат ДСК містить інформацію про плавлення кристалічної фази. Розкладання вихідної речовини починається при температурі плавлення.

Фіг.4. ДСК термограма первинного кислого фосфату. З термограми видно, що плавлення речовини починає відбуватися при температурі 219°C.

Фіг.5. Сорбційна ізотерма первинного кислого фосфату, отримана за допомогою аналізатора динамічної сорбції водяної пари (ДСВП), і відповідна таблиця даних для профілю сорбції води. Результати вимірювань показують збільшення ваги зразку під час сорбції (приблизно на 0,9%) при відносній вологості 94% і незначному гістерезисі, можливо зумовленому слабким зв'язком з поверхнею поглинання води.

Фіг.6. Порошкові рентгенограми первинного кислого фосфату до і після процедури динамічної сорбції водяної пари. Зразок готують, і запис рентгенограми починають протягом 2 хвилин після витягування зразка з аналізатора динамічного поглинання парів води, де він протягом ~12 годин знаходився при нульовій відносній вологості. Отримані дані демонструють незначну зміну інтен-

сивності піків і міжплощинної відстані d в результаті експерименту ДСВП, що означає відсутність будь-яких істотних змін в кристалічній структурі.

Фіг.7. Мікрофотографія первинного кислого фосфату. Поверхню складають, головним чином, частинки витягнутої форми і в формі голок довжиною приблизно 30 мікрон.

Фіг.8. Мікрофотографії первинного кислого фосфату до і після розмелювання і кількісний розподіл частинок за розмірами, який показує, що при подрібненні частинок фізико-хімічні властивості речовини не змінюються. Мікрофотографування після розмелювання речовини дозволяє зробити висновок, що первинний кислий фосфат є тонкоподрібненим. Вимірювання, виконані приблизно в тридцяти різних положеннях при 100-кратному збільшенні, показують, що розміри частинок кристалічної фази не перевищують 10 мікрон. Встановлено, що розподіл за розмірами частинок мікронізованого первинного кислого фосфату одномодальний. Середній розмір частинок $[x(50)]$ становить 2,0 мікрони, 90% всіх частинок мають розмір 4,7 мікрона або менше. Процес мікронізації, таким чином, дозволяє зменшити середній розмір частинок (становив 5,8 мікрон до подрібнення) і розмір 90% частинок (до подрібнення становив ~16 мікрон). Порошкова рентгенограма, тобто (інтенсивність піків, їх положення (міжплощинна відстань d) і ширина) до і після мікронізації первинної кислої фосфатної солі не змінюється.

Фіг.9. Ізотерми сорбції водяної пари первинним кислим фосфатом після мікронізації демонструє відсутність аморфізації.

Фіг.10. Інфрачервоний Фур'є-спектр первинного кислого фосфату і відповідна таблиця ІЧ Фур'є піків.

Фіг.11. Поєднання порошкових рентгенограм для двох зразків натрієвої солі, приготованих різними способами. Зразок 1 готувався перекристалізацією із суміші етанол/етилацетат, зразок 2-перекристалізацією із суміші метанол/етилацетат.

Фіг.12. Поєднання порошкових рентгенограм для двох зразків хлористоводневої солі, приготованих перекристалізацією з ацетону.

Визначення і скорочення

Використовувані вище і у всьому тексті опису винаходу наступні скорочення, якщо не указано інакше, мають наступні значення:

DMSO диметилсульфоксид
cAMP циклічний аденозинмонофосфат
IBMX 3-ізобутил-1-метилксантин
SPA SPA-аналіз (сцинтиляційний аналіз)
АТТС Американська колекція типових культур
МПС мінімальне підтримуюче середовище
FBS ембріональна теляча сироватка
імп/хв кількість імпульсів на хвилину

Використовувані вище і у всьому тексті опису винаходу наступні терміни, якщо не указано інакше, мають наступні значення:

«Лікування» або «терапія» означає запобігання, часткове полегшення або виліковування захворювання. Сполука і препарат даного винаходу корисні при лікуванні порушення, опосередкованого PGD2, в тому числі, зокрема, алергічного захворювання (наприклад алергічний риніт, алергічний

кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальна астма і харчова алергія), системного мастоцитозу, порушень, що супроводжуються системною активацією мастоцитів, анафілактичного шоку, бронхоконстрикції, бронхіту, кропивниці, екземи, захворювань, що супроводжуються свербінням (наприклад atopічний дерматит і кропивниця), захворювань (наприклад катаракта, відшаровування сітківки, запалення, інфекція і порушення сну), які виникають як вторинні захворювання в результаті стану, що супроводжується свербінням (наприклад, розчісування і розтирання), запалення, хронічних обструктивних захворювань легенів, ішемічного реперфузійного пошкодження, розладу мозкового кровообігу, хронічного ревматоїдного артриту, плевриту, неспецифічного виразкового коліту і подібних захворювань, за допомогою введення такому пацієнту фармацевтично ефективної кількості сполуки формули (III).

«Пацієнт» означає людину і інших ссавців.

«Фармацевтично ефективна кількість» означає кількість сполуки, композиції лікарського засобу або іншого активного інгредієнту, яка є ефективною для отримання бажаного терапевтичного ефекту.

Одним конкретним варіантом здійснення даного винаходу є сполука формули (III) в кристалічно-мук вигляді.

Сполука, яка складає предмет даного винаходу, є антагоністом рецептора простагландину D2 і може використовуватися як активна фармакологічна речовина. Відповідно, вона включається в фармацевтичні композиції і використовується для лікування пацієнтів, страждаючих певними медичними порушеннями.

Сполука, яка складає предмет даного винаходу, є антагоністом рецептора простагландину D2 згідно з тестами, описаним в літературі, а також описаним в приведеному нижче розділі про фармакологічні дослідження, результати яких, як вважається, корелюють з фармакологічною дією в організмі людини і інших ссавців. Таким чином, в ще одному варіанті здійснення даного винаходу представлена сполука, яка є предметом даного винаходу і композиції, що містить їх, які можуть використовуватися в лікуванні пацієнтів, страждаючих захворюваннями або схильних до захворювань, які можна полегшити введенням антагоніста PGD2. Наприклад, сполука, яка складає предмет даного винаходу, може використовуватися для лікування різноманітних порушень, опосередкованих PGD2, що включає без обмеження, алергічне захворювання (наприклад, алергічний риніт, алергічний кон'юнктивіт, atopічний дерматит, бронхіальна астма і харчова алергія), системний мастоцитоз, порушення, що супроводжуються системною активацією мастоцитів, анафілактичний шок, бронхоконстрикцію, бронхіт, кропивницю, екзему, захворювання, що супроводжуються свербінням (наприклад, atopічний дерматит і кропивниця), захворювання (наприклад, катаракта, відшаровування сітківки, запалення, інфекція і порушення сну), які виникають як вторинні захворювання в результаті стану, що супроводжується свербінням (наприклад, розчісування і розтирання), запален-

ня, хронічні обструктивні захворювання легенів, ішемічне реперфузійне ушкодження, розлади мозкового кровообігу, хронічний ревматоїдний артрит, плеврит, неспецифічний виразковий коліт і подібні захворювання.

Одним окремим здійсненням терапевтичних методів, які складають предмет даного винаходу, є лікування алергічного риніту.

Ще одним окремим здійсненням терапевтичних методів, які складають предмет даного винаходу, є лікування бронхіальної астми.

Ще одним окремим здійсненням терапевтичних методів, які складають предмет даного винаходу, є лікування ХОЗЛ.

Ще одним окремим здійсненням терапевтичних методів, які складають предмет даного винаходу, є лікування алергічного кон'юнктивіту.

Ще одним окремим здійсненням терапевтичних методів, які складають предмет даного винаходу, є лікування алергічного дерматиту.

Включені в опис посилання на лікування включають як профілактичну терапію, так і лікування встановлених захворювань.

Крім того, сполука, яка складає предмет даного винаходу, може використовуватися для лікування в поєднанні з одним або більше з наступних препаратів:

(i) антигістамінами, такими як фексофенадін, дезлоратадин, лоратадин і цетиризин, для лікування алергічного риніту;

(ii) антагоністами лейкотриєну, такими як монтелукаст і зафіруласт, для лікування алергічного риніту, ХОЗЛ, алергічного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту і т.д. - точну інформацію див. в формулі винаходу WO 01/78697 A2;

(iii) бета-агоністами, такими як альбутерол, сальбутерол і тербуталін, для лікування астми, ХОЗЛ, алергічного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту і т.д.;

(iv) антигістамінами, такими як фексофенадін, лоратадин і цетиризин, для лікування астми, ХОЗЛ, алергічного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту і т.д.;

(v) інгібіторами PDE4 (фосфодієстерази 4), такими як рофлуміласт і циломіласт, для лікування астми, ХОЗЛ, алергічного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту і т.д.; або

(vi) з антагоністами TP (рецептора тромбосану A2) або антагоністами CrTh2 (молекули, гомологічної рецептору хемоатрактанту, експресованої на Th2 клітинках), такими як раматробран (BAY-u3405), для лікування ХОЗЛ, алергічного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту і т.д.

Даний винахід належить також до фармацевтичної композиції, що включає фармацевтично ефективну кількість сполук, які є предметом даного винаходу, в суміші з фармацевтично прийнятним носієм.

На практиці сполуки, які складають предмет даного винаходу, можуть вводитися у вигляді фармацевтично прийнятних лікарських форм людини і іншим ссавцям за допомогою місцевого або системного застосування, в тому числі перорального, інгаляційного, ректального, назального, букального, сублінгвального, вагінального, кишкового, па-

рентерального (в тому числі підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, внутрішньошкірного, інтратекального і епідурального), інтрацистерального і внутрішньочеревинного. Потрібно брати до уваги, що конкретний спосіб введення може мінятися, наприклад, в залежності від фізіологічного стану пацієнта.

«Фармацевтично прийнятними лікарськими формами» називаються лікарські форми сполуки, що складає предмет даного винаходу, які включають, наприклад таблетки, драже, порошки, еліксири, сиропи, рідкі склади, в тому числі суспензії, спреї, інгалянти, таблетки, пігулки, емульсії, розчини, гранули, капсули і супозиторії, також рідкі склади для ін'єкцій, в тому числі ліпосомні препарати. Загальний опис методів і складів можна знайти в останньому виданні Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Особливий аспект даного винаходу передбачає введення сполуки, яка складає предмет даного винаходу, в формі фармацевтичної композиції.

Фармацевтично прийнятні носії включають принаймні один з компонентів, вибраний з групи, яка включає фармацевтично прийнятні носії, розріджувачі, оболонки, ад'юванти, ексципієнти або носії, такі як консерванти, наповнювачі, розпушувачі, змочувальні речовини, емульгатори, стабілізатори емульсій, суспендуєчі речовини, ізотонічні речовини, підсолоджувачі, смакові добавки, ароматизатори, барвники, бактерицидні засоби, протигрибкові засоби, інші терапевтичні речовини, змачувальні речовини, речовини, які сповільнюють або прискорюють всмоктування, і розпилювальні речовини, в залежності від особливостей способу введення і лікарської форми.

Прикладами суспендуєчих речовин є етоксильовані ізостеарилові спирти, поліоксєтиленсорбіт і складний ефір сорбітану, мікрокристалічна целюлоза, метатгидроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар і трагакант або склади цих речовин.

Прикладами бактерицидних і протигрибкових речовин, які запобігають дії мікроорганізмів, є парабени, хлорбутанол, фенол, сорбінова кислота і подібні до них речовини.

Прикладами ізотонічних речовин є цукор, хлорид натрію і подібні до них речовини.

Прикладами речовин, які сповільнюють і подовжують всмоктування, є моностеарат алюмінію і желатин.

Прикладами речовин, які прискорюють і стимулюють абсорбцію, є диметилсульфоксид і його аналоги.

Прикладами розріджувачів, розчинників, носіїв, солюбілізуючих речовин, емульгаторів і стабілізаторів емульсії є вода, хлороформ, сахароза, етанол, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, тетрагідрофурфуріловий спирт, бензилбензоат, полііоли, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, гліцерин, поліетиленгліколі, диметилформамід, Tween® 60, Span® 60, цетостеариловий спирт, мірістиловий спирт, гліцерилмоностеарат і лаурилсульфат натрію, складний ефір сорбітану і жирних кислот, рослинні олії (такі як бавовняна олія, арахісове

масло, оливкова олія, касторова олія і кунжутна олія) і ін'єктовані органічні складні ефіри, такі як етил олеат і подібні до нього, або відповідні склади цих сполук.

Прикладами формоутворювальних наповнювачів є лактоза, молочний цукор, цитрат натрію, карбонат кальцію і дикальційфосфат.

Прикладами розпушувачів є крохмаль, альгінові кислоти і деякі складні силікати.

Прикладами змачувальних речовин є стеарат магнію, лаурилсульфат натрію, тальк, а також поліетиленгліколі з високою молекулярною вагою.

Вибір фармацевтично прийнятного носія, загалом, визначається відповідно до хімічних властивостей активної сполуки, таких як розчинність, спосіб застосування і вказівки, яких необхідно дотримуватись в фармацевтичній практиці.

Фармацевтичні композиції, які складають предмет даного винаходу, придатні для перорального застосування, можуть являти собою окремі одиниці, такі як тверді лікарські форми, такі як капсули, облатки або таблетки, кожна з яких містить певну кількість активного інгредієнту, або такі як порошки або гранули, або рідкі лікарські форми, такі як розчини або суспензії у водному або неводному рідкому середовищі, або рідкі емульсії олій у воді або води в олій. Активний інгредієнт також може мати форму болюсу, електуарію або пасти.

«Тверда лікарська форма» означає лікарську форму сполуки, яка складає предмет даного винаходу, у вигляді твердої речовини, наприклад, капсули, таблетки, пілюлі, порошку, драже або гранул. У таких лікарських формах сполука, яка складає предмет даного винаходу, додана як мінімум в один інертний наповнювач (або носій), що традиційно використовується, наприклад цитрат натрію або дикальційфосфат, або (а) наповнювачі або середовища, такі як, наприклад, крохмаль, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт і кремнієва кислота, (b) зв'язувальні речовини, наприклад, карбоксиметилцелюлоза, альгірати, желатин, полівінілпіролідон, сахароза і аравійська камедь, (c) зволожувальні речовини, такі як, наприклад, гліцерин, (d) розпушувачі, такі як, наприклад, агар-агар, карбонат кальцію, картопляний або маніоковий крохмаль, альгінова кислота, певні складні силікати і карбонат натрію, (e) розчини-уповільнювачі, такі як, наприклад, парафін, (f) прискорювачі абсорбції, такий як, наприклад, четвертинні амонієві сполуки, (g) зволожувальні речовини, такі як, наприклад, цетиловий спирт і гліцеринмоностеарат, (h) адсорбенти, такі як, наприклад, каолін або бентоніт, (i) ковзні речовини, такі як, наприклад, тальк, стеарат кальцію, стеарат магнію, тверді поліетиленгліколі, лаурилсульфат натрію, (j) замутнюючі компоненти, (k) буферні речовини, які відстрочено вивільняють сполуку, що складає предмет даного винаходу, в певній частині кишкового тракту.

Таблетка може бути приготована пресуванням або формуванням і може мати один або декілька допоміжних компонентів. Пресовані таблетки можна отримувати пресуванням у відповідному апараті активного інгредієнту в сипкій формі, такий як порошок або гранули, яка може бути змішана зі зв'язувальною речовиною, ковзною речовиною,

інертним розріджувачем, консервантом, поверхнево-активною або диспергуючою речовиною. Можуть використовуватися такі інертні наповнювачі, як лактоза, цитрат натрію, карбонат кальцію, дикальційфосфат і розпушувачі, такі як крохмаль, альгінові кислоти і певні складні силікати, змішані з ковзними речовинами, такими як стеарат магнію, лаурилсульфат натрію і тальк. Суміш порошкоподібних сполук, змочену інертним рідким розріджувачем, можна формувати на відповідному автоматі для отримання формованих таблеток. Таблетки можуть мати покриття або насічки, а також можуть мати склад, що забезпечує повільне або контрольоване виділення активного інгредієнта, який міститься в них.

Тверді склади також можуть використовуватися як наповнювачі в м'яких і твердих желатинових капсулах з використанням таких інертних наповнювачів, як лактоза або молочний цукор, а також поліетиленгліколі з великою молекулярною вагою і подібних до них речовин.

У разі необхідності, а також для більш ефективного розподілу, сполука може бути мікроінкапсульована в системах повільного або направлено-го вивільнення (або приєднана до таких систем), таких як біосумісні, біорозкладні полімерні матриці (наприклад, співполімер d, 1-лактиду з гліколідом), ліпосоми і мікросфери для підшкірного і внутрішньом'язового ін'єктування методом, який називається підшкірною або внутрішньом'язовою ін'єкцією уповільненого всмоктування, яка забезпечує безперервне повільне вивільнення сполуки або сполук протягом 2 тижнів або довше. Сполуки можуть бути стерилізовані, наприклад фільтрацією через затримуючий бактерії фільтр або додаванням стерилізуючих речовин в формі стерильних твердих складів, які можуть бути розчинені в стерильній воді, або іншому стерильному ін'єктованому середовищі безпосередньо перед застосуванням.

«Рідка лікарська форма» означає форму активної сполуки, яка вводиться пацієнту в рідкій формі, наприклад у вигляді фармацевтично прийнятих емульсій, розчинів, суспензій, сиропів або еліксирів. Крім активної сполуки рідкі лікарські форми можуть містити звичайно застосовувані в даній галузі інертні розріджувачі, такі як розчинники, солюбілізуючі речовини і емульгатори.

Водні суспензії можуть містити емульгатори або речовини, які сприяють утворенню суспензії.

Фармацевтичні композиції, придатні для місцевого застосування, - це склади в формі, яка допускає місцеве введення пацієнту. Склади можуть мати форму мазі місцевого застосування, бальзамів, порошків, спреїв і інгаляторів, гелів (на водній або спиртовій основі), кремів, звичайно використовуваних в даній галузі, або бути включеними в матричну основу для застосування як пластр, що забезпечує контрольоване вивільнення сполуки через шкірний бар'єр. У формі мазі активні інгредієнти можуть використовуватися з парафіновими або водорозчинними основами. У альтернативному варіанті активні інгредієнти можуть мати форму крему з масляно-водною основою. Склади, призначені для місцевого застосування через очі, яв-

ляють собою очні краплі, в яких активний інгредієнт розчинений або суспендований у відповідному носії, як правило, водному розчиннику. Склади, призначені для місцевого застосування через слизову рота, включають лікарські льодяники, які мають в своєму складі активний інгредієнт у смаковій добавці, як правило, сахарозі і камеді або трагаканті; пастилки, які мають в своєму складі активний інгредієнт в інертній основі, такий як желатин і гліцерин, або сахароза і камедь; і склади для полоскання рота, які мають в своєму складі активний інгредієнт у відповідному рідкому носії.

Масляна фаза емульсійних фармацевтичних композицій може бути отримана звичайним способом з відомих інгредієнтів. Ця фаза може мати в своєму складі тільки емульгатор (який також називається емульгуючою речовиною), однак бажано, щоб в неї також входив як мінімум один емульгатор, який містить жир або олію, або емульгатор, який містить і жир, і олію. У конкретному здійсненні винаходу в склад включений гідрофільний емульгатор поряд з ліпофільним емульгатором, який діє як стабілізатор. Емульгатор(и) разом із стабілізатором(ами) або без нього утворюють віск, який емульгується, а разом з олією або жиром утворюють основу мазі, яка емульгується, що є масляною диспергованою фазою кремових складів.

При необхідності водна фаза кремової основи може включати, наприклад, не менше 30% ваг. багатоатомного спирту, тобто спирту з двома або більше гідроксильними групами, наприклад пропіленгліколь, бутан-1,3-діол, маніт, сорбіт, гліцерин або поліетиленгліколь (в тому числі PEG 400) і їх склади. Склади для місцевого застосування можуть, якщо треба, мати в своєму складі сполуку, яка стимулює всмоктування або проникнення активного інгредієнта через шкіру або інші уражені зони.

Вибір відповідних олій або жирів для використання в композиції залежить від властивостей, які необхідно отримати. Так, особливо крем повинен бути нежирним, який не залишає плям і продуктом, що змивається, відповідної консистенції, який не допускає витоків з тюбиків і інших ємностей. Можуть використовуватися лінійні і розгалужені одно- і двоосновні алкільові ефіри, такі як діізопропіліміростат, децилолеат, ізопропілпальмітат, бутилстеарат, 2-етилгексилпальмітат або суміш ефірів з розгалуженим ланцюгом, відомим як Crodamol CAP. Вони можуть використовуватися окремо або в сумішах, в залежності від бажаних властивостей. Як альтернатива можуть використовуватися ліпіди з високою температурою плавлення, такі як білий м'який парафін і/або рідкий парафін і інші мінеральні масла.

Фармацевтичні композиції для ректального або вагінального застосування означають пресформи, які допускають ректальне або вагінальне введення пацієнту, і які містять як мінімум одну сполуку, що складає предмет даного винаходу. Супозиторії являють собою одну з форм таких складів, яку можна отримати змішуванням сполук, що складають предмет даного винаходу, з відповідними не подразнючими інертними середовищами або носіями, наприклад масло-какао, поліети-

ленгліколь або воскова основа супозиторію, які знаходяться в твердому стані при звичайних температурах, але стають рідкими при температурі тіла і тому плавляться при ректальному або вагінальному введенні і вивільняють активний інгредієнт.

Фармацевтичні композиції, які вводяться за допомогою ін'єкції, можуть вводитися внутрішньом'язово, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно і/або підшкірно. Композиції, які складають предмет даного винаходу, готують в рідких розчинах, зокрема, в фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Ханка або розчин Рінгера. Крім того, композиції можуть бути приготовані в твердій формі і розчинені або суспендовані безпосередньо перед застосуванням. Можливі також ліофілізовані форми. Препаративні форми є стерильними і включають емульсії, суспензії, водні і неводні розчини для ін'єкцій, які можуть містити суспендуючі речовини, загусники і антиоксиданти, буфери, бактеріостати і добавки, що роблять склад ізотонічним, і мати правильно підібраний рівень рН, відповідний показнику крові пацієнта, якому буде вводитися препарат.

Фармацевтичними композиціями, які складають предмет даного винаходу, придатними для назального або інгаляційного застосування, є фармацевтичні композиції, форма яких придатна для введення пацієнту назально або інгаляційно. Композиція може містити носій в формі порошку з розміром частинок, наприклад, в діапазоні від 1 до 500 мікрон (в тому числі з розмірами частинок в діапазоні від 20 до 500 мікрон з кроком 5 мікрон, тобто з розмірами 30 мікрон, 35 мікрон і т.д.). До відповідних композицій з рідким носієм для застосування, наприклад як спрею або крапель для носа, належать водні або масляні розчини активного інгредієнта. Композиції, придатні для аерозольного введення, можуть бути отримані відповідно до традиційних методів і вводитися іншими терапевтичними речовинами. Для проведення інгаляційної терапії можуть використовуватися дозуючі інгалятори або будь-які сухі порошкові інгалятори, такі як Eclipse, Spinhaler® або Ultrahaler®, згідно з описом в патентній заявці WO 2004/026380 і в патенті US №5176132.

Фактичне дозування активного інгредієнта(ів) в композиціях, які складають предмет даного винаходу, може варіюватися з метою отримання кількості активного інгредієнта(ів), ефективного для отримання бажаного терапевтичного ефекту для визначеного складу і способу його введення пацієнту. Тому дозування, яке вибирається для кожного пацієнта, залежить від великої кількості чинників, таких як бажаний терапевтичний ефект, спосіб введення, бажана тривалість лікування, етіологія і тяжкість захворювання, стан пацієнта, вага, стать, дієта і вік, тип і активність кожного активного інгредієнта, швидкості абсорбції, метаболізм і/або виділення і інших чинників.

Повна денна доза сполуки, яка складає предмет даного винаходу, що вводиться пацієнту у вигляді однієї або декількох доз, може складати, наприклад, від приблизно 0,001 до приблизно 100мг/кг ваги тіла на день, зокрема від 0,01 до

10мг/кг/день. Наприклад, для дорослого дози, як правило, складають від приблизно 0,01 до приблизно 100, зокрема від приблизно 0,01 до приблизно 10мг/кг ваги тіла на день при інгаляції, від приблизно 0,01 до приблизно 100, зокрема від 0,1 до 70, бажано від 0,5 до 10мг/кг ваги тіла на день при пероральному введенні, і від приблизно 0,01 до приблизно 50, зокрема від 0,01 до 10мг/кг ваги тіла на день при внутрішньовенному введенні. Процентний вміст активного інгредієнта в складі може бути різним, але він повинен входити в таку пропорцію, щоб забезпечувати отримання оптимального дозування. Лікарські форми можуть містити часткові одиниці дози, які дозволяють отримати бажану денну дозу. Очевидно, що можливе практично одночасне введення декількох стандартних доз. Введення доз може бути настільки частим, наскільки необхідно для досягнення бажаного терапевтичного ефекту. Деякі пацієнти можуть швидко реагувати на більші або менші дози, і для них може виявитися адекватною більш слабка підтримуюча доза. Для інших пацієнтів може бути потрібне тривале лікування з інтенсивністю від 1 до 4 доз на день відповідно до фізіологічних потреб кожного пацієнта. Само собою зрозуміло, для інших пацієнтів може знадобитися не більше однієї або двох доз на день.

Стандартні дози складів можуть бути отримані будь-яким з традиційно використовуваних в фармацевтиці методів. Такі методи включають стадію зв'язування фармацевтично активного інгредієнта з носієм, який складається з одного або декількох допоміжних інгредієнтів. Як правило, склади отримують однорідним і тісним зв'язуванням активного інгредієнта з рідкими носіями, або дрібнозернистими твердими носіями, або обома, з подальшим формуванням продукту, якщо це необхідно.

Склади можуть бути в упаковках по одній дозі або по декілька доз, наприклад в запаяних ампулах і пляшечках з еластичними пробками, і можуть зберігатися в ліофілізованому стані, що вимагає тільки додавання стерильного рідкого носія, наприклад води для ін'єкцій, безпосередньо перед застосуванням. Індивідуальні розчини для ін'єкцій і суспензії можуть бути приготовані із стерильних порошоків, гранул або таблеток описаних вище типів.

Сполука, яка складає предмет даного винаходу, може бути проаналізована за допомогою наступних аналітичних методів.

Рідинна хроматографія високого тиску-мас-спектрометрія (РХМС)

Експерименти РХМС для визначення часу втримання (R_T) і відповідної маси іонів проводять з використанням наступного методу. Мас-спектри (МС) записують на мас-спектрометрі Micromass LCT. Метод включає іонізацію позитивним електророзпилюванням і сканування маси m/z від 100 до 1000. Рідинну хроматографію здійснюють за допомогою бінарного насоса і дегазатора Hewlett Packard 1100 Series Binary Pump & Degasser; нерухома фаза: колонка Phenomenex Synergi 2μ Hydro-RP 20×4,0мм, рухома фаза: A=0,1% мурашина кислота (FA) у воді, B=0,1% FA в ацетонітрилі. Вводять об'єм 5мкл за допомогою

системи CTC Analytical PAL. Швидкість потоку елюенту становить 1мл/хв. Градієнт складає від 10% В до 90% В за 3 хвилини і від 90% В до 100% В за 2 хвилини. Допоміжні детектори: У Ф детектор Hewlett Packard 1100 Series, довжина хвилі =220нм, і випарний детектор світлорозсіювання (ELS) Sedere SEDEX 75, температура =46°C, тиск азоту =4бар.

Спектри ядерного магнітного резонансу (ЯМР) ^1H

Спектри ЯМР 300МГц ^1H записують при кімнатній температурі на спектрометрі Varian Mercury (300МГц) з 5мм датчиком ASW. У ЯМР хімічний зсув (δ) виражений в м.ч. відносно тетраетилсилану. Величини хімічного зсуву вказані в мільйонних частках (м.ч.) відносно тетраметилсилану (TMS), як внутрішній стандарт.

Рентгенівська порошкова дифрактометрія (РПД)

РПД вимірювання проводять на дифрактометрі Siemens-Bruker D5000, використовуючи схему фокусування за Брег-Брентано (тета-2-тета). Первинну кислоту фосфатну сіль вміщують на пластину монокристалічного кремнію з поверхнею, орієнтованою по кристаллографічній площині (510). Як джерело рентгенівського випромінювання використовують випромінювання з мідної мішені рентгенівської трубки (45кВ/40мА) на лінії К-альфа міді (1,54056 ангстрем), випромінювання на лінії Cu K-бета відфільтровують за допомогою монохроматора у відбитому пучку. Як детектор використовують скінтіляційний лічильник. Розміри щілин встановлюють наступними: відхиляюча щілина 0,6мм, щілина, яка запобігає розсіюванню 0,6мм, щілина монохроматора 0,1мм, приймальна щілина детектора 0,6мм. Рентгенограми записують в наступних умовах: сканування в інтервалі 2-40 градусів (кут 2-тета) з часом рахунку на одному кроці за 1 секунду, з кроком 0,02 градуси, при нормальних температурі, тиску і відносній вологості.

Аналіз сольватації/гідратації методом термодифференціальної калориметрії

Термічний аналіз проводять з використанням суміщеного ДСК/ТГА аналізатора (диференціальний скануючий калориметр/термогравіметричний аналізатор) TA Instruments Model Q-600 в атмосфері сухого азоту. Калібрування по температурі ТГА аналізатора проводять за індієвим стандартом. Первинну кислоту фосфатну сіль вміщують в алюмінієву кювету (номер 900793.901). Термограми записують при лінійному нагріванні зі швидкістю 10°C на хвилину.

Диференціальна скануюча калориметрія (ДСК) ДСК аналіз виконують за допомогою диференціального скануючого калориметра TA Instruments Model Q-1000 з системою охолодження в атмосфері сухого азоту. Для калібрування ДСК приладу використовують індієвий стандарт. Первинну кислоту фосфатну сіль вміщують в алюмінієву кювету з кришкою, зафіксованою на кюветі холодним зварюванням, на кришці є невеликий отвір, сформований лазером (номера кювети і кришки 900793.901 і 900860.901, відповідно). Термограму ДСК записують при лінійному нагріванні зі швидкістю 10°C на хвилину.

Мікрофотографії

Отримання мікрофотографій проводять за допомогою мікроскопа Olympus BX-41 з перехресною поляризацією. Зразки виготовляють за допомогою диспергування в мінеральному маслі.

Розподіл частинок за розмірами

Розподіл частинок за розмірами вимірюють за допомогою лазерного дифракційного аналізатора розмірів частинок Sympatec HELOS-BF з виміральною лінзою R3, диспергатором сухих порошоків RODOS і на довжині хвилі лазера 632,8нм. Калібрування системи проводять з використанням стандартів карбиду кремнію. Порошок диспергують за допомогою диспергуючого пристрою RODOS для сухих порошоків при вихідному тиску 3,0бар і при максимальному зниженні тиску. Розподіл частинок за розмірами, виходячи з їх об'єму, розраховують за методом Фраунгофера і з допомогою програмного забезпечення Sympatec Windox (Version 4.0).

Динамічна сорбція водяної пари (ДСВП)

Профіль сорбції води визначають за допомогою аналізатора динамічної сорбції водяної пари, модель DVS-1 (SMS Instruments) або SGA-100 (VTI Instruments). Калібрування за відносною вологістю і вагою виконують з використанням відповідних стандартів. Перед проведенням експерименту первинну кислоту фосфатну сіль вміщують в прилад і сушать при відносній вологості $\leq 1\%$ протягом 2,5 годин. Відносну вологість ступінчасто збільшують від приблизно 0 до 95%. Передбачається, що вага зразка на кожній стадії не змінюється, якщо протягом 5 хвилин відносна зміна маси складає менше 0,005% при мінімальному часі встановлення рівноваги 15 хвилин.

Інфрачервона спектроскопія з Фур'є-перетворенням

ІЧ Фур'є-спектри записують за допомогою спектрометра Nicolet Magna-IR Spectrometer 55, зв'язаного з ІЧ-мікроскопом Nicolet Nic-Plan. Досліджувані тверді зразки вміщують на диск KBr. Кожний спектр записують після 32-кратного сканування в діапазоні $4000\text{--}400\text{см}^{-1}$ з розрізненням 4см^{-1} .

Нижче ілюструються спосіб приготування і властивості сполуки, яка складає предмет даного винаходу.

Приклад

Первинна кислота фосфатна сіль 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти

Стадія 1. Розчин 4,6-дихлор-2-метоксипіримідину (0,7г), 2,4-дихлорфенетиламіну (0,82г) і гідрокарбонату натрію (0,88г) в етанолі (25мл) нагрівали при 80°C протягом трьох годин і вливали в 400мл води. Тверду фазу, яка утворилася, відфільтровували і сушили на повітрі, отримавши (6-хлор-2-метоксипіримідин-4-іл)-[2-(2,4-дихлорфеніл)етил]амін.

Стадія 2. До розчину діізопропіламіду літію в складі тетрагідрофуран/н-гептан/етилбензол (1,8М, 17мл) при 0°C по краплях протягом 15 хвилин додавали розчин 2-(3-бромфеніл)пропіонової кислоти (3г, 13,9ммоль) в тетрагідрофурані (5мл). Отриману суміш перемішували протягом 1 години,

після чого по краплях протягом 10 хвилин додавали йодистий метил (4,93г, 34,8ммоль) в тетрагідрофурані (5мл). Реакційну суміш перемішували протягом 15 годин, гасили 2N HCl, концентрували у вакуумі і розріджували діетиловим ефіром (150мл). Шар ефіру промивали 2N HCl і три рази екстрагували 2N NaOH (50мл). Об'єднані шари NaOH окислювали 6N HCl до pH=1 і екстрагували три рази діетиловим ефіром (75мл). Об'єднані органічні шари промивали розсолем, сушили над сульфатом натрію і концентрували з отриманням твердої 2-(3-бромфеніл)-2-метилпропіонової кислоти (3,08г, 91%), яка використовувалася без додаткового очищення. РХ/МС: 243 (М+Н).

Стадія 3. До розчину 2-(3-бромфеніл)-2-метилпропіонової кислоти (2,18ммоль) в безводному ефірі (20мл) по краплях додавали трет-бутил літію (1,7М розчин в пентані, 5,4мл, 9,16ммоль) при -78°C, отриману суміш перемішували протягом 30 хвилин і обробляли трибутилборатом (2,34мл, 8,72ммоль). Реакційному складу давали нагрітися до кімнатної температури, потім його перемішували протягом 15 годин, розріджували ефіром і гасили 1М H₃PO₄. Після перемішування протягом 30 хвилин відділяли шар ефіру і екстрагували три рази 2N NaOH (20мл). Об'єднані екстракти NaOH окислювали 6N HCl до pH=1 і екстрагували три рази діетиловим ефіром (50мл). Об'єднані органічні екстракти промивали розсолем, сушили над сульфатом натрію і концентрували з отриманням 3-(1-карбокси-1-метил етил) фенілборонової кислоти, яка використовувалася без додаткового очищення. МС: 209 (М+Н).

Стадія 4. Розчин (6-хлор-2-метоксипіримідин-4-іл)-[2-(2,4-дихлорфеніл)етил]аміну (0,51ммоль) і 3-(1-карбокси-1-метилетил) фенілборонової кислоти (0,61ммоль) в ацетонітрилі (2,5мл) і водному розчині карбонату натрію (0,4М, 2,5мл) дегазували з продуванням азотом протягом 5 хвилин, після чого до нього додавали тетракіс (трифенілфосфін) паладій (0) (29,5мг, 5% мол.). Реакційну посудину герметизували і нагрівали в мікрохвильовій печі до 130°C протягом 30 хвилин. До реакційного складу додавали 2мл води, потім, використовуючи 2N водний розчин HCl, встановлювали pH, приблизно такий, який дорівнював 7, після цього суміш екстрагували три рази етилацетатом (30мл). Об'єднані екстракти промивали розсолем, сушили над сульфатом натрію і концентрували. Залишок очищували колончастою хроматографією на силікагелі з отриманням твердої 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл) етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти (205мг, 75%). РХ/МС: R_T=2,39 хв, МС: 460 (М+Н); ¹H ЯМР [300МГц, (CD₃)₂SO]: δ 12,38 (1H, c), 7,36-8,00 (7H, m), 6,58 (1H, c), 3,84 (3H, c), 3,58 (2H, m), 2,98 (2H, m), 1,54 (6H, c).

Стадія 5. Фосфорну кислоту (3,21мл, 1,49N водний розчин) додавали до розчину 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти (2,1г, 4,56ммоль) в тетрагідрофурані (45мл), отриману суміш перемішували протягом 10 хвилин. Потім по краплях поступово додавали воду доти, поки суміш не перетворилася в прозорий розчин, після

цього продовжували перемішування протягом 1,5 годин при кімнатній температурі. Суміш концентрували у вакуумі, залишок перекристалізовували із ацетону з отриманням порошку 2-(3-{6-[2-(2,4-дихлорфеніл)етиламіно]-2-метоксипіримідин-4-іл}феніл)-2-метилпропіонової кислоти (2,4г, 94%). РХ/МС: R_T=2,41хв; МС: 462 (М+Н); ¹H ЯМР [300МГц, (CD₃)₂SO]: δ 7,95 (1H, розшир.), 7,8 (1H, розшир.), 7,6 (2H, розшир.), 7,45 (2H, розшир., J=2Гц), 7,35 (2H, c), 6,55 (1H, c), 3,85 (3H, c), 3,55 (2H, розшир.), 2,95 (2H, т, J=2Гц), 1,5 (6H, c).

Фармакологічний аналіз

Інгібіторну дію сполуки, яка складає предмет даного винаходу, оцінюють за допомогою функціонального аналізу на DP людини. Застосовується аналіз цАМФ з використанням лінії клітин людини LS174T, експресуючих ендогенний рецептор DP. Протокол аналогічний описаному раніше (Wright D. H., Ford-Hutchinson A. W., Chadee K., Metters K. M., The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS174T cells, Br. J. Pharmacol. 131 (8): 1537-45 (2000)).

Протокол SPA-аналізу цАМФ в клітинах LS174 T людини

Матеріали

- PGD2 (Cayman Chemical, кат. №12010)
- IBMX (Sigma кат. №5879)
- Система прямого скринінгового SPA-аналізу цАМФ (код Amersham RPA 559)
- 96-ямкові планшети для клітинних культур (Wallac кат. №1450-516)
- Сцинтиляційний лічильник Wallac 1450 Microplate Trilux (PerkinElmer)
- Пристосування для герметизації планшет
- Центрифугувальні пробірки Eppendorf
- Фізрозчин в фосфатному буфері (PBS) Дульбеко (Invitrogen кат. №14040-133)

- Дистильована вода

- Струшувач

- Магнітна мішалка і набір якорів

Підготовка реагентів:

Перед розріджуванням всі реагенти повинні бути доведені до кімнатної температури.

Аналітичний буфер 1X

Переносять вміст пляшки в 500-мл мензурку багаторазовим промиванням дистильованою водою. Доводять повний об'єм до 500мл, додавши дистильовану воду, і ретельно перемішують.

Лізуючий реагент 1 & 2

Розчиняють кожний з лізуючих реагентів 1 і 2 в 200мл аналітичного буфера, відповідно. Залишають на 20 хвилин при кімнатній температурі для розчинення.

Гранули антитілу кролика для SPA-аналізу

Додають в пляшку 30мл лізуючого буфера 2. Обережно струшують пляшку протягом 5 хвилин.

Імунна сироватка

Додають 15мл лізуючого буфера 2 в кожну посудину і обережно перемішують вміст до повного розчинення.

Індикатор (I¹²⁵-цАМФ)

Додають 14мл лізуючого буфера 2 в кожну посудину і обережно перемішують вміст до повного розчинення.

Підготовка імунореагента

1) Додають рівні об'єми індикатора, імунної сироватки і SPA-реагенту антитіл кролика в посудину, прослідкувавши за тим, щоб був приготований достатній об'єм для потрібної кількості ямок (150мкл на ямку).

2) Ретельно перемішують.

3) Необхідно готувати свіжий розчин імунореагенту перед кожним аналізом і не використовувати його повторно.

Стандарт

1) Додають 1мл лізуючого буфера 1 і обережно перемішують вміст до повного розчинення.

2) Кінцевий розчин містить цАМФ в концентрації 512пмоль/мл.

3) Позначають 7 поліпропіленових або полістирольних пробірок «0,2пмоль», «0,4пмоль», «0,8пмоль», «1,6пмоль», «3,2пмоль», «6,4пмоль» і «12,8пмоль».

4) Піпеткою додають 500мкл лізуючого буфера 1 у всі пробірки.

5) У пробірку «12,8пмоль» додають піпеткою 500мкл стандартного складу (512пмоль/мл) і ретельно перемішують. Переносять 500мкл з пробірки «12,8пмоль» в пробірку «6,4пмоль» і ретельно перемішують. Повторюють процедуру розріджування двічі з іншими пробірками.

6) Порції по 50мкл в двох екземплярах з кожного послідовного розріджування і стандарт вихідного розчину дозволяють отримати 8 стандартних рівнів цАМФ в діапазоні від 0,2 до 25,6пмоль.

Буфер розріджування сполуки

Додають 50мкл 1мМ IBMX в 100мл PBS, щоб отримати кінцеву концентрацію 100мкМ, і обробляють ультразвуком при 30°C протягом 20 хвилин.

Підготовка PGD2

Розчиняють 1мг PGD2 (FW, 352,5) в 284мкл DMSO, щоб отримати вихідний розчин 10мМ, і зберігають його при 20°C. Перед кожним аналізом необхідно готувати свіжий розчин. Додають 3мкл 10мМ вихідного розчину в 20мл DMSO, ретельно перемішують і переносять 10мл в 40мл PBS.

Розріджування сполуки

Декілька зразків сполуки, яка складає предмет даного винаходу, тестують в 96-ямковому планшеті. Кожний зразок сполуки займає один ряд 96-ямкового планшета.

Розріджування сполуки проводять в Biomed 2000 (Beckman) за допомогою методу 11 точок 1_цАМФ DP.

5мкл кожної сполуки з 10мМ планшет стандартних розчинів сполуки переносять в ямки 96-ямкової планшети, як зазначено нижче.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1											
B	2											
C	3											
D	4											
E	5											
F	6											
G	7											
H	Контрольний											

Наповнюють планшет 45мкл DMSO, крім колонки 7, куди додають 28мкл DMSO. Ретельно відміряють піпеткою вміст колонки 1 і переносять 12мкл паралельно в колонку 7. Виконують послідовне розріджування 1:10 від колонки 1 до колонки 6 і від колонки 7 до колонки 11, переносячи від 5мкл до 45мкл DMSO, щоб отримати наступні концентрації:

Перший планшет	Кінцева концентрація
Колонка 12	0
Колонка 11	0,03мкМ
Колонка 10	0,3мкМ
Колонка 9	3мкМ
Колонка 8	0,03мМ
Колонка 7	0,3мМ
Колонка 6	0,01мкМ
Колонка 5	0,1мкМ
Колонка 4	1мкМ
Колонка 3	0,01мМ
Колонка 2	0,1мМ
Колонка 1	1мМ

Додають в новий 96-ямковий планшет 247,5мкл буфера розріджування сполуки. Переносять 2,5мкл послідовно розбавлених сполук з приготованого вище планшета в новий (розріджування 1:100) таким чином:

Перший планшет	Другий планшет	Кінцева концентрація
Колонка 12	Колонка 1	0
Колонка 6	Колонка 2	0,1нМ
Колонка 11	Колонка 3	0,3нМ
Колонка 5	Колонка 4	1нМ
Колонка 10	Колонка 5	3нМ
Колонка 4	Колонка 6	0,01мкМ
Колонка 9	Колонка 7	0,03мкМ
Колонка 3	Колонка 8	0,1мкМ
Колонка 8	Колонка 9	0,3мкМ
Колонка 2	Колонка 10	1мкМ
Колонка 7	Колонка 11	3мкМ
Колонка 1	Колонка 12	10мкМ

Зростання клітин

1. LSI74 T завжди вирощують в MEM (ATCC кат. №30-2003), 10% FBS (ATCC кат. №30-2020) і додаткових 2мМ L-глутаміну, при 37°C і 5% CO₂.

2. Нагрівають 0,05% трипсину і версину (Invitrogen кат. №25300-054) при 37°C на водяній бані.

3. Видаляють середовище для зростання з клітин. Клітини в колбі T165 двічі промивають 4мл трипсину, а потім інкубують при 37°C і 5% CO₂ протягом 3 хвилин.

4. Додають 10мл середовища і піпеткою ретельно відділяють і перераховують клітини.

5. Доводять щільність клітин до $2,25 \times 10^5$ клітин на мл і висівають 200мкл клітин на ямку (45000 клітин на ямку) в 96-ямковому планшеті за 1 день до аналізу.

Порядок проведення аналізу

День 1

Висівають 45000 клітин на ямку в 200мкл середовища в 96-ямкових планшетах. Інкують планшети з клітинами при 37°C, 5% CO₂ і 95% вологості протягом ночі.

День 2

1. Виконують розріджування сполуки.

2. Приготуйте аналітичний буфер, лізуючі буфери 1 і 2, PGD2 і стандарт.

3. Видаляють середовище з клітин відсмоктуванням і додають 100мкл розчину сполуки, слідуючи протоколу цАМФ DP Zymark Sciclone-ALH/FD.

4. Інкують клітини при 37°C, 5% CO₂ і 95% вологості протягом 15 хвилин.

5. Додають 5мкл 300нМ PGD2 (20×15нМ кінцевої концентрації) в кожен ямку за допомогою протоколу Zymark цАМФ DP PGD2 і інкують клітини при 37°C, 5% CO₂ і 95% вологості ще 15 хвилин.

6. Видаляють середовище з клітин відсмоктуванням і додають 50мкл лізуючого буфера 1, слідуючи протоколу Zymark цАМФ DP лізису, і інкують при кімнатній температурі зі струшуванням протягом 30 хвилин.

7. Додають в ямки 150мкл імунореагенту (повний об'єм 200мкл на ямку).

8. Герметизують планшет, струшують протягом 2 хвилин і вміщують в камеру сцинтиляційного лічильника для мікротитрувальних планшет Wallac на 16 годин.

День 3

Рахують кількість [¹²⁵I] цАМФ протягом 2 хвилин в сцинтиляційному лічильнику 1450 Trilux.

Обробка даних

Відкладають стандартну залежність цАМФ від кількості імпульсів на хвилину.

Таблиця 1

Типові дані аналізу для стандарту

цАМФ (пмоль/мл)	Імп/хв		Сер. імп/хв
0,2	5725	5769	5530
0,4	5367	5259	6317
0,8	4695	4796	6507
1,6	4251	4178	6581
3,2	3434	3429	6601
6,4	2758	2716	6711
12,8	2094	2054	6680
25,6	1531	1573	6653

Концентрації цАМФ (пмоль/мл) невідомих зразків обчислюють за стандартною залежністю цАМФ від кількості імпульсів на хвилину. Процент інгібування обчислюють за наступною формулою:

$$\% \text{ інгібування} = \frac{(\text{пмоль за контрольним зразком} - \text{пмоль за зразком}) \times 100}{\text{пмоль за контрольним зразком (тільки клітини + PGD2)}}$$

Результати

Первинна кислота фосфатна сіль дає 50-процентне інгібування в SPA-аналізі цАМФ в Т-клітинах LSI74 людини при концентрації 0,3нМ.

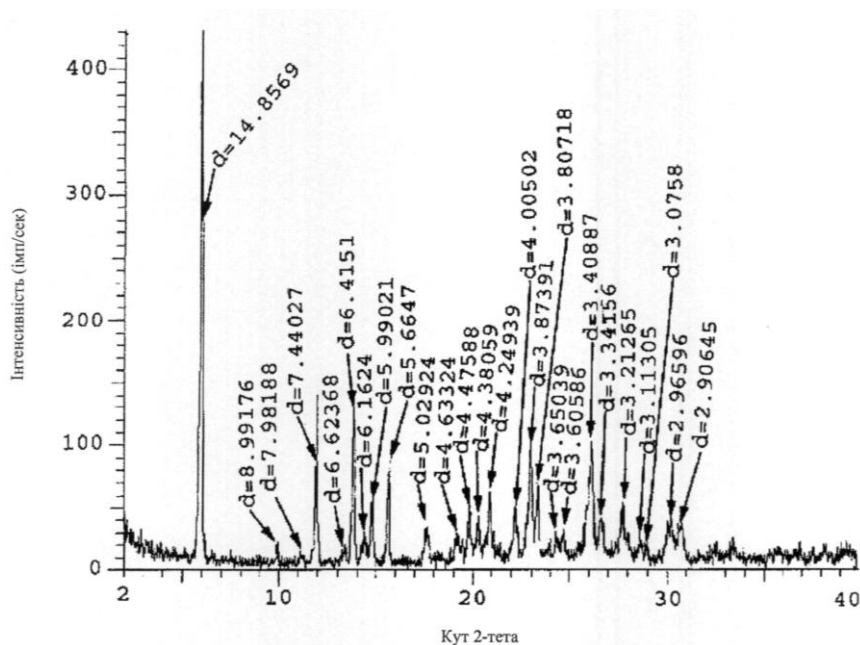
Первинна кислота фосфатна сіль має більш високу розчинність у воді в порівнянні з вільною формою і хлористоводневою сіллю. Нижче приведені розчинності вільної форми, хлористоводневої солі і первинної кислоти фосфатної солі при 25°C в фосфатному буфері (PBS pH7,4, суміш 19% 0,1М розчину первинного кислого фосфату натрію і 81% 0,1М розчину вторинного кислого фосфату натрію) і розчинності вільної форми і первинної кислоти фосфатної солі при 37°C в модельному кишковому соку в умовах голодування («FaSSIF», готують методом, описаним в роботі Dressman J. B., Amidon G. L., Reppas C. and Shah V. P., Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms, Pharmaceutical Research: 1998, Vol.15, №1, 11-22).

	Розчинність (фосфатний буфер PBS pH7,4, 25°C, мкг/мл)	Розчинність в середовищі FaSSIF (37°C, мкг/мл)
Вільна форма	<1	14
Хлористоводнева сіль	5	
Первинна кислота фосфатна сіль	15	266

Виявилося, що первинна кислота фосфатна сіль володіє рядом корисних властивостей, які можуть знайти застосування при серійному виробництві і приготуванні лікарських засобів. По-перше, первинна кислота фосфатна сіль має високий ступінь кристалічності. На порошковій рентгенограмі первинної кислоти фосфатної солі, поданій на Фіг.1, піки мають середню інтенсивність і розрідження. Відсутність гало на середній ділянці значень 2-тета свідчить про відсутність або малий вміст аморфної фази. Крім цього, мікрофотографії, зроблені до і після подрібнення первинної кислоти фосфатної солі, які подані на Фіг.8, свідчать про значне зменшення розміру частинок і незмінності фізико-хімічних властивостей в результаті подрібнення.

Проте, натрієва сіль має низький ступінь кристалічності. Як видно з порошкової рентгенограми, приведеної на Фіг.11, отриманої для зразка 2 натрієвої солі, піки розширені і мають низьку інтенсивність, що свідчить про слабку кристалічність. Порошкова рентгенограма для зразка 1 натрієвої солі демонструє, що речовина знаходиться в основному в аморфній формі. Крім того, присутність гало на рентгенограмах обох зразків на середній ділянці значень 2-тета вказує на дуже слабку кристалічність речовини.

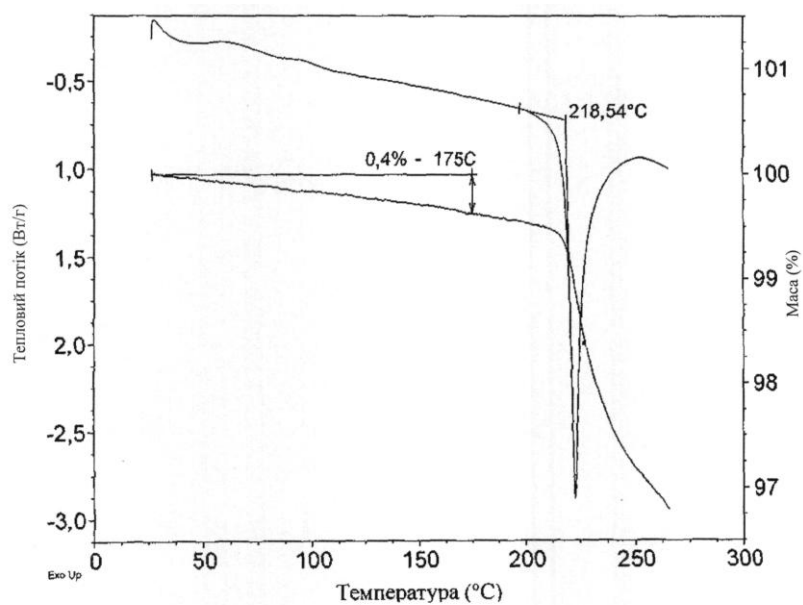
Крім того, показано, що первинна кисла фосфатна сіль існує тільки в одній поліморфній формі. Однак хлористоводнева сіль, як було показано, існує в трьох поліморфних формах, які при певних умовах можуть взаємно перетворюватися одна в одну. Одна з поліморфних форм хлористоводневої солі (див. рентгенограму для зразка 2 на Фіг.12) слабкокristалічна, оскільки піки на рентгенограмі широкі і мають низьку інтенсивність. Інша з поліморфних форм хлористоводневої солі (див. рентгенограму для зразка 1 на Фіг.12) має хорошу кристалічність.



Фіг. 1

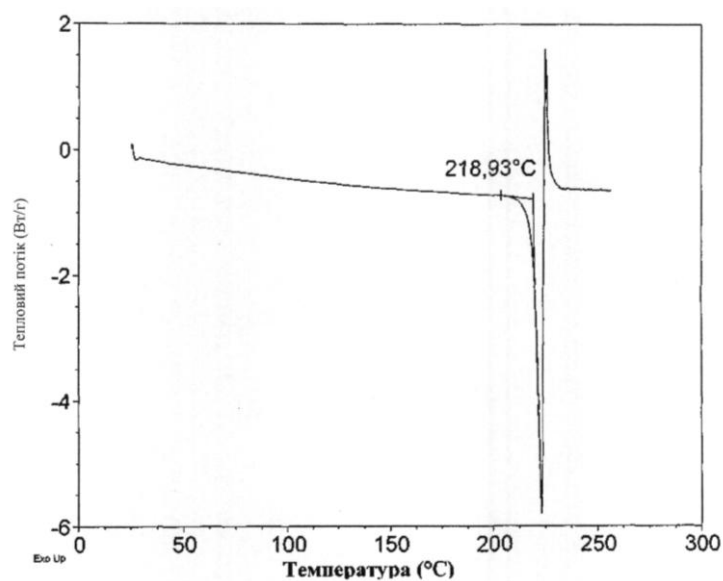
d Ангстрем	Інтенсивність Імпульсів за секунду	Інтенсивність %
14,8569	432	100
8,99176	20	4,6
7,98188	16	3,7
7,44027	140	32,4
6,62368	16	3,7
6,4151	129	29,9
6,1624	30	6,9
5,99021	56	13
5,66647	88	20,4
5,02924	43	10
4,63324	33	7,6
4,47588	52	12
4,38059	43	10
4,24939	62	14,4
4,00502	54	12,5
3,87391	97	22,5
3,80718	71	16,4
3,65039	31	7,2
3,60586	32	7,4
3,40887	102	23,6
3,34156	41	9,5
3,21265	54	12,5
3,11305	29	6,7
3,0758	22,6	5,2
2,96596	36	8,3
2,90645	35	8,1

Фіг. 2

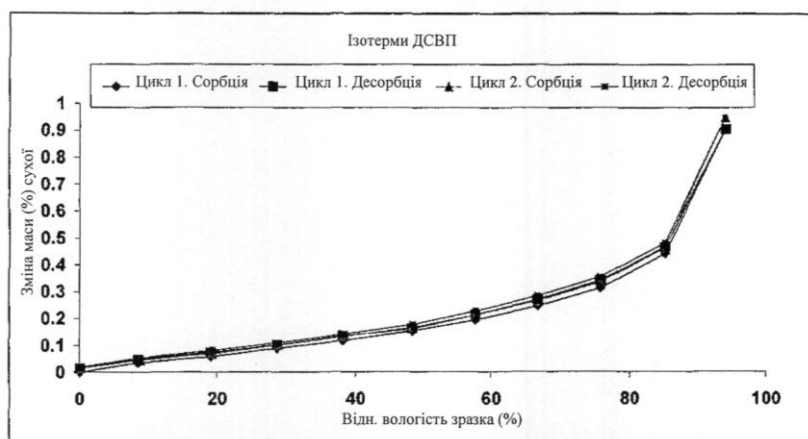


Тепловий процес	Первинна кисла фосфатна сіль
Температура плавлення	219°C

Фіг. 3

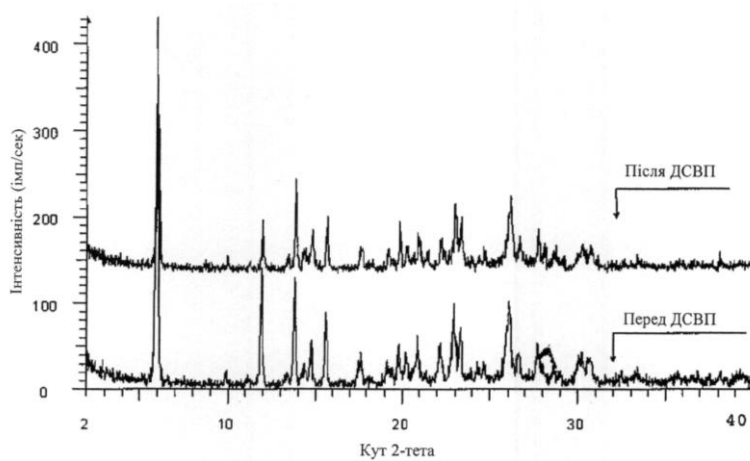


Фіг. 4

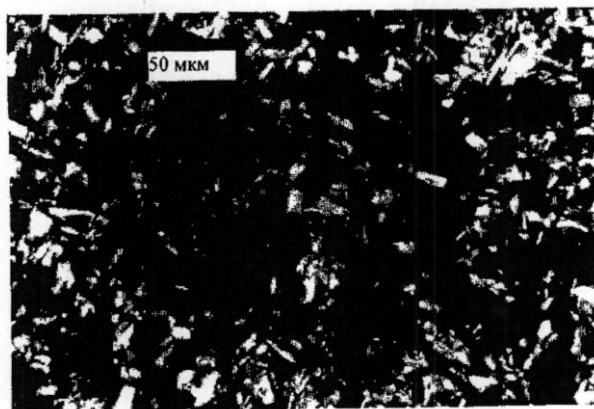


	Зразок Відн. вологість (%)	Зміна маси (%)		
		Сорбція	Десорбція	Гістерезис
Цикл 1	0,1	0,0000	0,0133	
	8,6	0,0340	0,0464	0,0124
	19,2	0,0572	0,0730	0,0158
	28,7	0,0879	0,1004	0,0124
	38,2	0,1169	0,1335	0,0166
	48,3	0,1518	0,1609	0,0091
	57,7	0,1932	0,2123	0,0191
	66,9	0,2447	0,2679	0,0232
	75,9	0,3118	0,3400	0,0282
	85,2	0,4404	0,4644	0,0241
Цикл 2	94,1	0,9040	0,9040	
	0,1	0,0133	0,0182	
	8,9	0,0440	0,0531	0,0091
	19,4	0,0672	0,0804	0,0133
	28,8	0,0995	0,1086	0,0091
	38,4	0,1310	0,1410	0,0100
	48,4	0,1659	0,1758	0,0100
	57,8	0,2123	0,2272	0,0149
	66,9	0,2629	0,2828	0,0199
	75,8	0,3326	0,3541	0,0216
	85,2	0,4611	0,4802	0,0191
	94,0	0,9463	0,9463	

Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

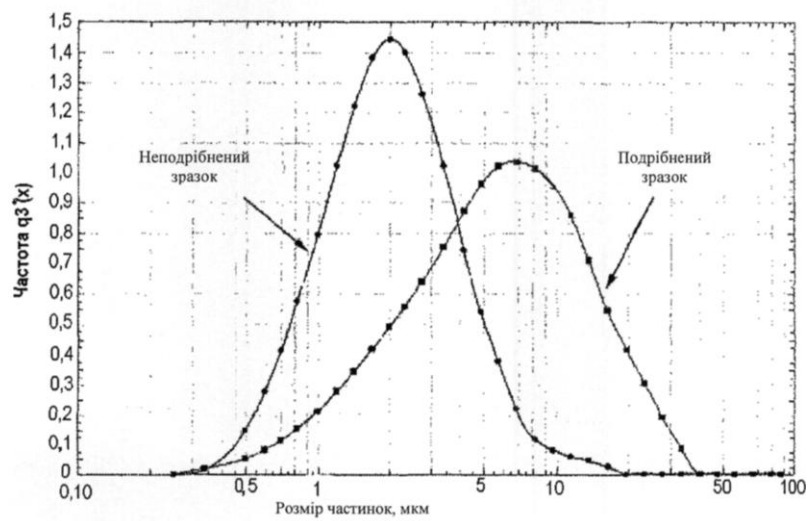
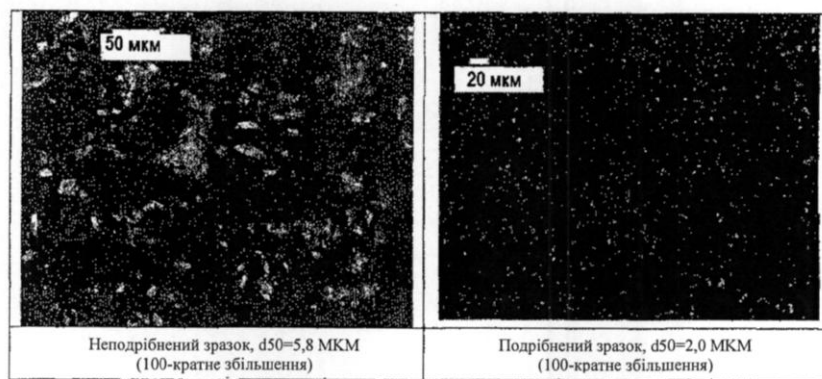
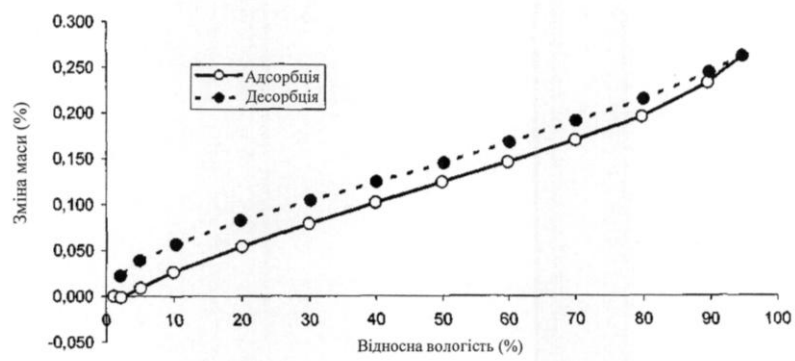
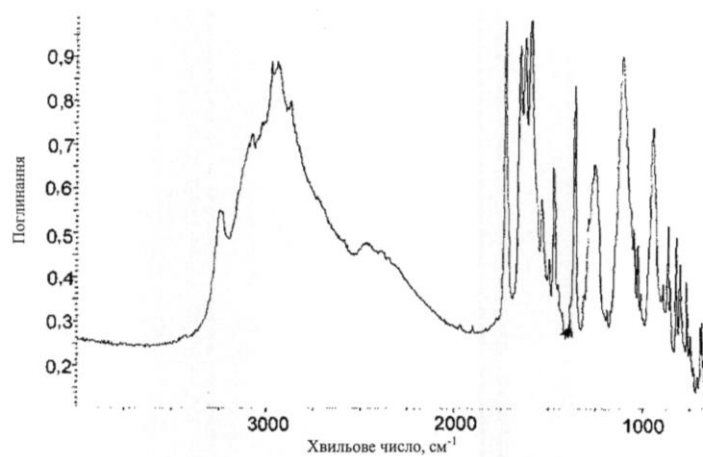


Fig. 8



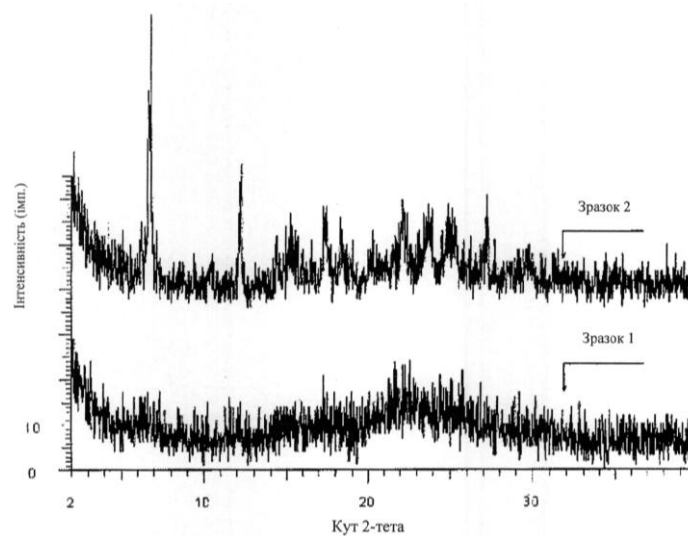
Зміна маси (%)	Відносна вологість зразка(%)
0,000	1,14
-0,001	2,17
0,008	5,05
0,026	9,90
0,054	19,94
0,079	29,92
0,102	39,92
0,124	49,86
0,146	59,83
0,170	69,89
0,196	79,69
0,234	89,51
0,263	94,72
0,245	89,77
0,215	79,96
0,191	70,01
0,168	60,03
0,145	50,15
0,124	40,04
0,104	30,17
0,083	19,81
0,056	10,26
0,039	4,87
0,022	2,07

Фіг. 9

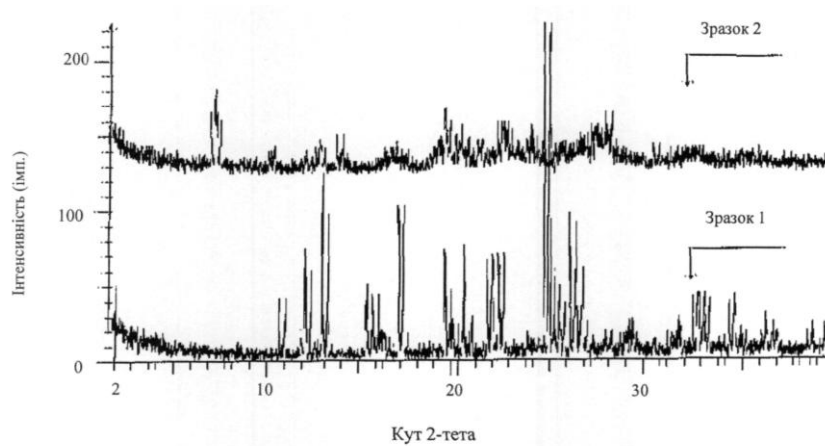


Місцезнаходження піка (cm⁻¹)
3 246,33
2 943,13
1 729,41
1 654,53
1 625,97
1 595,66
1 535,18
1 494,85
1 471,73
1 362,52
1 251,90
1 107,05
1 051,19
1 027,20
945,09
892,45
864,26
852,33
823,94
803,36
768,17
749,19
695,68
687,27
668,53

Фіг. 10



Фіг. 11



Фіг. 12