

Винахід відноситься до з'єднань, аналогічних талидоміду з класу, що містить піперидин-2,6-діони, до способу їх отримання і до їх використання в лікарських препаратах.

Надмірне створення цитокининового ЧПН-α (чинник пухлинного некрозу α) грає центральну роль в патогенезі синдрому «трансплантат проти господаря», або множинного склерозу, або відторгнення трансплантату, афтозного стоматиту, бугоркової лепрозої еритеми, хвороби Бека, ревматоїдного артриту і ряду інших захворювань, пов'язаної із запальними симптомами. Один з способів лікування цих захворювань заснований на направленому придушенні вивільнення ЧПН-α, шляхом застосування імунодепресантів або імуномодуючих активних інгредієнтів, такого як, наприклад, дексаметазон, пентоксифілін або талидомід.)

Однак, потрібно розрізняти симптоми, що вимагають загальної імунодепресії і такі симптоми, для яких переваги і нестачі імунодепресії повинні бути ретельно зважені. При лікуванні афтозного стоматиту талидомід показав себе більш дієвим в порівнянні з класичними імунодепресантами. Інші приклади захворювань, в яких талидомід показав високу ефективність, не приводячи до загальної імунодепресії, включають шкіряний червоний вовчак (H+G 69, с.с.816 - 822 (1994)), гангренозну піодермію і виразки геніталій з хворобою Behcet (The Lancet, 20.05.89, 89, с.с. 1093 - 1095). Збудники захворювань цих органів, які обмежуються шкірою і слизовими оболонками, є ендегенними посередниками, які впливають на ендотелій і на циркулюючі лейкоцити. Під впливом ЧПН-α і інших цитокинінів відбувається помітне збільшення клейкості ендотелію по відношенню до лейкоцитів, що значною мірою сприяє розвитку васкулоту. При наявності системних патогенних чинників дія самого талидоміду обмежується шкірою і слизовими оболонками, що вимагає (додаткової) імунодепресії. Приклади таких захворювань включають системний червоний вовчак, який, на відміну від шкіряного, викликає також ті, що являють загрозу для життя та змін внутрішніх судин, зокрема, бруньок; лепрареакцію П типу, що уражає очі і/або суглоби., а також хворобу Behcet, яка уражає очі і/або суглоби.

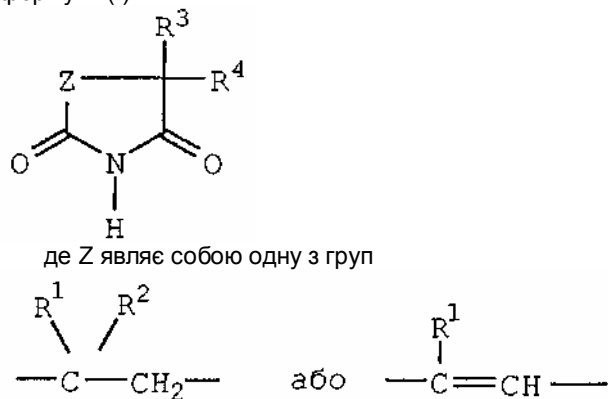
Речовини, які, подібно талидоміду, придушують цю видозміну ендотелію, але які в той же час повністю або частково блокують реакцію специфічного клітинного імунного захисту, можуть стати основою значного прогресу в лікуванні згаданих системних захворювань. Одним з ключових передвісників клітинного імунного відгуку є інтерлейкин-2, від якого залежить розмноження антигенів-специфічних лімфоцитів.

Внаслідок цього, при розробці нових лікарських препаратів однієї з переслідуючих цілей є приведення в дію протизапальних властивостей талидоміду спільно з імунодепресивними активними компонентами, якими талидомід при клінічному застосуванні самостійно не володіє.

Основною задачею даного винаходу була розробка з'єднань, аналогічних талидоміду з класу, що містить піперидин-2,6-діони, які інгібують вивільнення ЧПН-α, ініційоване запаленням, а також антиген-спровокований синтез інтерлейкіна-2.

Було виявлено, що з'єднання по винаходу відповідають вказаним вимогам.

Тому цей винахід відноситься до піперидин-2,6-діонів, які містять заступники в позиціях 3 і 5, загальної формули (I)



де атом вуглеводу із заступником R^1 пов'язаний з карбонільною групою, і в яких R^1 означає фталімідний радикал (коли Z являє собою $\text{—C(R}^2\text{)—CH}_2\text{—}$), або фталімідний радикал, який містить один або два заступники у вигляді гідрокси метокси- або аміногруп (коли Z являє собою $\text{—C(R}^1\text{)=CH—}$),

R^2 являє собою водень або C_1 C_6 -алкіл (прямий або розгалужений ланцюг),

R^3 являє собою водень, C_1 C_6 -алкільну групу (прямий або розгалужений ланцюг), або ж ароматичну або гетероароматичну кільцеву систему, а R^4 означає C_1 C_6 - алкільну групу (прямий або розгалужений ланцюг), або ж ароматичну або гетероароматичну кільцеву систему.

З піперидин-2,6-діонів формули (1), в яких Z означає $\text{—C(R}^1\text{R}^2\text{)—CH}_2\text{—}$, R^1 означає фталімід, а R^2 і R^3 означають водень, особливо переважними є з'єднання, в яких R^4 являє собою феніл.

З піперидин-2,6-діонів формули (1), в яких Z являє собою $\text{—C(R}^1\text{)=CH—}$, R^3 означає етил, а R^4 означає феніл, особливо переважними є з'єднання, в яких R^1 являє собою 3,4-диметоксифталімід.

Даний винахід, крім того, відноситься до способу отримання з'єднань, аналогічних талидоміду з класу, що містить піперидин-2,6-діони, загальної формули (I).

З'єднання загальної формули (1), де Z = $\text{—C(R}^2\text{)—CH}_2\text{—}$, можуть бути отримані шляхом конденсації фталевого ангідрида із заміщеною глутаміновою кислотою, такою як, наприклад, 4-фенілглутамінова кислота або 4-метилглутамінова кислота, в органічному розчиннику, переважно піридині, циклізації продукту в оцтовому ангідриді і подальшого перетворення в імід. Перетворення ангідриду в імід здійснюється тут шляхом синтезу з сечовини.

Ці цільові з'єднання формули (I) можуть також бути отримані шляхом реакції фталевого ангідриду із 5-заміщеним 3-аміноглутаримідом, переважно при нагріві в оцтовій кислоті.

З'єднання загальної формули (1), де Z = $\text{—C(R}^1\text{)=CH—}$ можуть бути отримані шляхом конденсації заміщеного фталевого ангідриду, такого як, наприклад, 3,4-диметоксифталевий ангідрид, із 5-заміщеними 3-аміно-3,4-дегідропіперидин-2,6-діонами, такими як, наприклад, 3-аміно-5-етил-5-феніл-глутаконімід, в органічному розчиннику, наприклад, оцтовій кислоті.

Приклад 1

2-(5-метил-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3-дигідро-2H-ізоіндол-1,3-діон (1)

2,00г (11ммоль) 4-метилглутамінової кислоти і 1,95г (13ммоль) фталевого ангідриду нагрівали протягом 6 годин при зрошуванні в 15мл сухого піридину. Після видалення розчинника шляхом дистиляції, залишок нагрівали до кипіння протягом 1 години в 10мл оцтового ангідриду. Тверду речовину, яка викристалізувалася після охолодження, відфільтровували при отсосі, а фільтрат піддали концентрації. Після обробки фільтрату ефіром осадок, що утворився, відфільтровували при отсосі, а очищені опади перекристалізували з чистого толуену. 2,00г (7ммоль) кристалічної речовини і 0,23г (3,8ммоль) сечовини ретельно перемісили і піддали синтезу на масляній бані при температурі біля 200°C протягом 30 хвилин. Затверджений розплав швидко нагріли до кипіння, з 4мл оцтового ангідриду і 6мл етанолу, введених підряд. Осаджену тверду речовину відфільтровували при отсосі і перекристалізували з суміші ДМФ/вода. Отримали 1,35г (67% теоретично) 2-(5-метил-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3- дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діона (1) з температурою плавлення від 270 до 272°C.

Приклад 2

2-(5-феніл-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3- дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діон (2)

3,00г (12ммоль) 4-фенілглутамінової кислоти і 2,12г (14ммоль) фталевого ангідриду нагрівали протягом 6 годин при зрошуванні в 40мл сухого піридину. Після видалення розчинника шляхом дистиляції залишок вмістили в 50мл 5%-й HCl і екстрагували етилацетатом. Органічну фазу промили водою, знебарвили активованим вугіллем і висушили над сульфатом натрію. Після видалення розчинника шляхом дистиляції залишок нагрівали при зрошуванні протягом 1 години в 40мл оцтового ангідриду. Потім розчин піддали концентрації і обробили ефіром. Осадок, що утворився, відфільтровували при отсосі і перекристалізували з безводного толуену. 2,00г (6ммоль) кристалічної речовини і 0,19г (3ммоль) сечовини піддали синтезу на масляній бані при температурі біля 200°C протягом 30 хвилин. Утверджений розплав швидко нагріли до кипіння, з 4мл оцтового ангідриду і 8мл етанолу, введених підряд. Осаджену тверду речовину відфільтровували при отсосі і перекристалізували з суміші ДМФ/вода. Отримали 0,80г (40% теоретично) 2-(5-феніл-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3- дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діона (2) з температурою плавлення від 228 до 231 °C.

Приклад 3

2-(5-етил-5-феніл-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3-дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діон (3)

1,00г (4ммоль) 3-аміно-5-етил-5-феніл-глутаконіміда розчинили в 40 мл безводного етанолу, обробили розчин 0,1г палладізованого деревного вугілля (10% Pd/C) і перемішували протягом 8,5 годин в атмосфері водню. Потім розчин відфільтровувати від каталізатора, а фільтрат випарили до сухого стану. Залишок нагрівали протягом 4 годин при зрошуванні з 0,70г (5ммоль) фталевого ангідриду в 40мл крижаної оцтової кислоти. Після видалення розчинника шляхом дистиляції залишок перекристалізували з етанолом. Отримали 0,99г (63% теоретично) 2-(5-тил-5-феніл-2,6-диоксо-піперидин-3-іл)-1,3- дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діона (3) з температурою плавлення 174 - 177°C.

Приклад 4

2-(5- етил-5-феніл-2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагідропіридин-3-іл)-4,5-диметокси-1,3 -дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діон (4)

0,45г (2ммоль) 3-аміно-5-етил-5-феніл-глутаконіміда і 0,4 г (2ммоль) 4,5-диметоксифталевого ангідриду нагрівали протягом 5 годин при зрошуванні в 15мл крижаної оцтової кислоти. Потім розчин випарили до сухого стану, і осад перекристалізували з етанолу. Отримали 0,55г (67% теоретично) 2-(5-етил-5-феніл-2,6-диоксо-1,2,5,6-тетрагідропіридин-3-іл)-4,5-диметокси-1,3-дигідро-2Н-ізоіндол-1,3-діона (4) з температурою плавлення 203 - 205°C.

З'єднання по винаходу нетоксичні і тому застосовні в якості фармацевтичне активних інгредієнтів. Відповідно до цього, цей винахід також відноситься до використання з'єднань, аналогічних талидоміду з класу, що містить піперидин-2,6-діони, загальної формули (I), як активні інгредієнти лікарські препарати, переважно як речовини, переважні вивільнення ЧПН-α, ініційоване запаленням, а також антиген-спровокований синтез інтерлейкіну-2.

Крім як мінімум одного з'єднання формули (I), лікарські препарати по винаходу містять речовини-носії, наповнювачі, розчинники, розжикувачі, барвники і/або зв'язуючі. Вибір цих допоміжних речовин і їх кількостей залежить від того, чи будуть ліки застосовуватися шляхом орального внутрішньовенного, внутрішньочеревного, внутрішньокірного, внутрішньом'язового, внутрішньоназального, трансбукального або місцевого введення. Препарати в формі таблеток, пілюль, драже, капсул, гранул, капель, соків або сиропів зручні для орального вживання, а розчини, суспензії, що швидко приготуються, сухі препарати і аерозолі зручні для парентерального і місцевого застосування, а також для застосування шляхом інгаляцій. З'єднання по винаходу у вигляді осадів в розрідженій формі, що вживається за допомогою плівки-носія або пластикових наклейок, можливо, з добавками агентів, сприяючих вбиранню в шкіру, є прикладами зручних форм введення препарату через шкіру. З'єднання по винаходу можуть із заповільненням вивільнятися з тих форм препаратів, які можна вживатись орально або через шкіру.

Кількість активного інгредієнта, що призначається пацієнту, залежить від ваги пацієнта, типу вживання, симптомів і міри важкості захворювання. Звичайно призначається від 1 до 15 мг/кг як мінімум одного з'єднання, аналогічного талидоміду формули (I).

Фармакологічні дослідження

Вивільнення ЧПН-α може бути досліджене *in vitro* на людських одноклітинних клітках периферичної крові (Т-клітки, В-клітки і моноцити), після стимуляції ліпополісахаридом (ЛПС). ЛПС є складовою частиною стінки бактерійної клітки і стимулює моноцити і макрофаги.

Крім стимуляції ЛПС, вивільнення ЧПН-α може бути також спровоковане шляхом стимуляції людських одноклітинних кліток периферичної крові Т-клітками моноклональних антитіл, які реагують виборче з активаційний антигенами (antiCD2 - antiCD28) або шляхом синдрому токсичного шоку бактерійним антигеном toxin-1 TSST-1. Крім вивільнення ЧПН-α, ці стимулюючі агенти приводять, серед інших впливів, до стваркня інтерлейкіна-2 II-2).

ЛПС-стимуляція одноклітинних кліток: вплив на ЧПН-α

Вивільнення ЧПН-α може бути досліджене *in vitro* на людських одноклітинних клітках периферичної крові, а саме, Т-клітки, В-клітки і моноцити, після стимуляції ліпополісахаридом (ЛПС). ЛПС є складовою частиною стінки бактерійної клітки і стимулює моноцити і макрофаги.

Одноклітинні клітки отримували з обробленої гепарином крові як мінімум трьох добровільних донорів. 3

цією метою в кожному випадку відділяли відомими способами через градієнт Ficoll-Paque 20мл крові, а потім клітки збирали і промивали три рази субстрат клітинної культури. Цей субстрат клітинної культури складався з поживної середовища RPMI 1640 з доданням 2мМ глутаміну (Life Technologies, Eggenstein), 10% зародкової телячої сироватки (Life Technologies), 50мг/л стрептоміцину (Sigma, Deisenhofen), 50 міжнародних одиниць пеніциліну, (Sigma) і 100мкМ β -еркаптоетанолу (Merck, Darmstadt). Одноядерні клітки остаточно вмістили в 15мл субстрат клітинної культури і розділили на 1-мл порції в стерильних 24-ячейкових інкубаційних чашках (Sigma). 1мл диметилсульфоксиду (DMSO, Merck) або 1мл розчину випробуваної речовини (в DMSO; кінцева концентрація в тестах: 0,5; 5; 12,5 і 50мкг/мл) було додано до кожної з 1-мл порції і порції піддали інкубації протягом 1 години в CO₂ інкубаційній коморі (5% CO₂, атмосферна вологість 90%). Потім до кожної порції, крім контрольної, додали 2,5мкг ЛПС (з E. Coli 0127: B8, Sigma). Інкубацію культур продовжували протягом 20 годин. Після випробувань концентрацію ЧПН- α в рідині клітинних культур визначали з використанням тестів, що серійно випускаються ELISA (Boehringer Mannheim). Величину інгібування ЧПН- α розраховували виходячи з виміряних значень для контрольних порцій, які не оброблялися активним інгредієнтом, і для порцій, які витримувалися в інкубаторі з випробуваними з'єднаннями. Концентрації, які дають 50%-е інгібування вивільняючи ЧПН- α (величини IC₅₀) розраховували по методу аналізу лінійної регресії.

Таблиця показує інгібуючий вплив з'єднань по винаходу на ЛПС-спровоковане вивільнення ЧПН- α :

Таблиця

Приклад №	Інгібування вивільнення ЧПН- α (в %) при кінцевій концентрації в тесті 50 мкг/мл	IC ₅₀ [мкг/мл]
1	48%	Не визначено
2	69%	8,7
3	80%	11,0
4	90%	2,0

Стимуляція Т-кліток: інгібування ІІ-2

Вивільнення інтерлейкіна-2 може бути досліджене шляхом стимуляції *in vitro* людських одноядерних кліток периферичної крові, які, крім Т-кліток, містять також В-клітки і моноцити. Шляхом поліклональної стимуляції через постійні епітопи рецепторів Т-кліток або через так звані допоміжні сигнал-передаючі поверхневі молекули, отримують вимірний діапазон, який більш виразно виражений, ніж при стимуляції антигенів менших популяцій Т-кліток. Було використано поєднання двох таких допоміжних сигналів, а саме, сигналів, що передаються через поверхневі молекули CD2 і CD 8.

Одноядерні клітки отримували з обробленої гепарином крові як мінімум трьох добровільних донорів. З цією метою в кожному випадку відділяли відомими способами через градієнт Ficoll-Paque 20мл крові, а потім клітки збирали і промивали три рази субстрат клітинної культури. Цей субстрат клітинної культури складався з поживної середовища RPMI 1640 з доданням 2мМ глутаміну (Life Technologies, Eggenstein), 10 % зародкової телячої сироватки (Life Technologies), 50 мг/л стрептоміцину (Sigma, Deisenhofen), 50 міжнародних одиниць пеніциліну, (Sigma) і 100мкМ β -еркаптоетанолу (Merck, Darmstadt). Одноядерні клітки остаточно вмістили в 15мл субстрат клітинної культури і розділили на 1-мл порції в стерильних 24-ячейкових інкубаційних чашках (Sigma). До кожної з 1-мл порцій додали 1мл диметилсульфоксиду (DMSO, Merck) або 1мл розчину випробуваної речовини (в DMSO); (кінцева концентрація в тестах: 0,5; 5; 12,5 і 50м г/мл) і порції піддали інкубації протягом 1 години в CO₂ інкубаційній камері (5 % CO₂, атмосферна вологість 90%). Потім до кожної порції, крім контрольної, додали 0,1мкг/мл моноклональних антитіл (клон номер AICD2.M1 від Prof. Dr. Meuer; anti-CD28 від CLB, Amsterdam). Інкубацію культур продовжували протягом 20 годин. Після випробувань концентрацію ІІ - 2 в рідині клітинних культур визначали з використанням тестів, що серійно випускаються ELISA (Boehringer Mannheim). Величину інгібування ІІ-2 розраховували виходячи з виміряних значень для контрольних порцій, які не оброблялися активним інгредієнтом, і для порцій, які витримувалися в інкубаторі з випробуваними з'єднаннями.

У цих умовах, при концентрації 50мкг/мл, речовина з прикладу 4 інгібувало CD2-CD28-стимульований синтез ІІ - 2 на 86 \pm 6%. При використанні стафілококового суперантигену (з E. Coli 0127: B8, Sigma, Deisenhofen) TSST-1 (0,1мкг/мл) як стимул Т-кліток синтез ІІ-2 інгібується на 77 \pm 20%.

Вищеописані дослідження показують, що з'єднання, аналогічні талидоміду з класу, що містить піперидин-2,6-діони формули (I), інгібують як вивільнення ЧПН- α , ініційоване запаленням, так і антиген-спровокований синтез інтерлейкіну-2.