



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86091** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 31/47
A61P 29/00
C07D 215/26 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

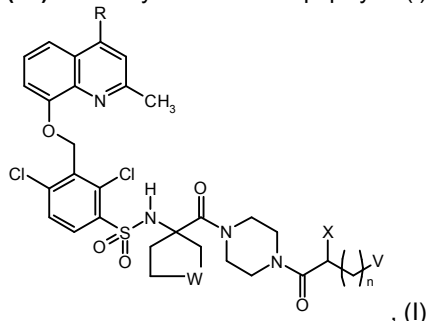
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) НЕПЕПТИДНІ АНТАГОНІСТИ БРАДИКІНІНУ ТА ЇХ ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

1

2

- (21) а200702710
(22) 27.09.2005
(24) 25.03.2009
(86) РСТ/ЕР2005/010412, 27.09.2005
(31) MI2004A001963
(32) 15.10.2004
(33) IT
(46) 25.03.2009, Бюл.№ 6, 2009 р.
(72) ФЕЛІЧЕТТІ ПАТРИЦІЯ, ФІНЧЕМ КРИСТОФЕР
ІНГО, ДЖОЛІТТІ АЛЕССАНДРО, МАДЖІ КАРЛО
АЛЬБЕРТО, КВАРТАРА ЛАУРА, РОССІ КРІСТІНА
(73) ІСТІТУТО ЛУЗО ФАРМАКО Д'ІТАЛІЯ С.П.А.
(56) WO 03/103671; 18.12.2003
(57) 1. Сполуки загальної формули (I)



- де
R - гідроген або метил;
W - простий зв'язок або атом кисню;
n = 3;
X - водень або аміногрупа -NR₁R₂, де R₁ та R₂ можуть бути незалежно воднем або вибраними з групи: метил, етил, н-пропіл, ізопропіл;
Y - група четвертинного амонію -NR₃R₄R₅, де R₃, R₄, R₅ можуть бути незалежно вибраними з групи: метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, н-пентил;
та їх фармацевтично прийнятні солі, енантіомери та суміші енантіомерів.
2. Солі сполук загальної формули (I) з неорганічними або органічними кислотами, вибраними з групи: хлоридна, бромідна, йодидна, сульфатна, фосфатна, оцтова, трифлуороцтова, пропіонова, щавлева, яблучна, малеїнова, бурштинова, малінова, аспарагінова, глутамінова.
3. Сполуки за п. 1 або 2, де:

- W - простий зв'язок;
n = 3;
X вибрано з групи: водень або група -NH₂;
Y - група четвертинного амонію -N(CH₃)₃⁺;
інші замісники за п. 1.
4. Сполуки за п. 1 або 2, де:
R вибрано з групи: водень або метил;
W - атом кисню;
n = 3;
X вибрано з групи: водень або група -NH₂;
Y - група четвертинного амонію -N(CH₃)₃⁺;
інші замісники за п. 1.
5. Сполука за п. 3:
[4-(S)-аміно-5-(4-{1-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметилхінолін-8-ілоксиметил)бензолсульфоніламіно]-циклопентанкарбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксипентил]триметиламоній хлорид, дигідрохлорид.
6. Сполуки за п. 4, вибрана з групи:
(4-(S)-аміно-5-(4-{4-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметилхінолін-8-ілоксиметил)бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксипентил]триметиламоній хлорид, дигідрохлорид;
(4-(S)-аміно-5-(4-(4-(2,4-дихлор-3-(2-метилхінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно)-тетрагідропіран-4-карбоніл)піперазин-1-іл)-5-оксипентил)-триметиламоній хлорид, гідрохлорид;
[5-(4-{4-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметилхінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксипентил]триметиламоній трифлуорацетат.
7. Фармацевтична композиція, що містить як активний інгредієнт сполуку за пп. 1-6 разом із фармацевтично прийнятними наповнювачами.
8. Застосування сполуки за пп. 1-6 для отримання фармацевтичної композиції для лікування усіх станів, де залучено активацію рецепторів брадикініну B₂.
9. Застосування сполуки за п. 8 для отримання фармацевтичної композиції для лікування запальних, алергічних та аутоімунних станів.

(13) **C2**

(11) **86091**

(19) **UA**

10. Застосування сполуки за п. 8 для отримання фармацевтичної композиції для лікування астми та хронічного бронхіту, алергічного, вазомоторного та вірусного риніту, хронічної обструктивної хвороби легень (COPD), ревматоїдного артриту, хронічної запальної хвороби кишечника (хвороба Крона та виразковий коліт), гломерулонефриту,

псоріазу, висипки, гострого та хронічного циститу, цирозу печінки, гломерулопатій та фіброзу легень, артеріосклерозу, гострого та хронічного болю, септичного, алергічного та посттравматичного шоку, гепаторенального синдрому при цирозі печінки, гіпотензії, алопеції, раку та антиангіогенних хвороб.

Заявлений винахід стосується непептидних сполук, що містять групу четвертинного амонію, що мають активність як специфічні антагоністи рецептору брадікініну (BK) B2, фармацевтичних композицій, що їх містять, та їх застосування для лікування усіх станів, де залучено активація рецепторів брадікініну B2.

Брадікінін (BK) належить до кінінів та утворює, разом з калідином та Т-кініном підгрупу кінінів у ссавців. Кініни грають важливу роль як медіатори болю та запалення у центральній та периферійній симпатичній нервовій системі. Брадікінін є, зокрема, нонапептидом

(H-Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹-OH), продукованим організмом у патофізіологічних станах.

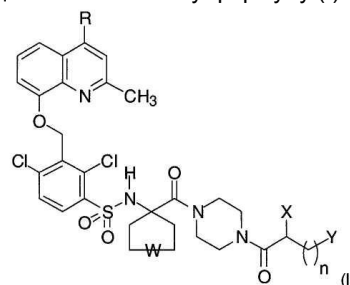
Два типи рецепторів кінінів існують, B1 та B2. Головною характеристикою рецептору B1 є те, що він є більш індуковуваним ніж конститутивним. Він експресується у тканинах у запальних або стресових станах. З іншого боку, B2 є конститутивним рецептором, звичайно присутнім в усіх тканинах та діє як медіатор при запальних процесах. Брадікінін та калідін вивільняються з їх білкових попередників (відомих як кініногени), протеолітичними ферментами кініногеназами. Серед них грають головну роль калікреїни, котрі однак, коли вивільнюється попередником, можуть діяти тільки протягом короткого часу і швидко руйнуються серією циркулюючих ферментів та мембран, загалом визначених як кінінази. Одна з цих кініназ розщеплює брадікінін на С-термінальному аргініні, таким чином утворюючи дез-Arg-BK, що діє як агоніст рецепторів B1.

Активація рецепторів брадікініну B1 та B2 індукує релаксацію судинних м'язів з наступною гіпотензією, збільшенням судинної проникності, скороченням гладеньких м'язів кишечника та респіраторного тракту, стимуляцією ноцицептивних нейронів, зміною іонної епітеліальної секреції, продукуванням нітрокислот та вивільненням цитокінів лейкоцитами та ейкозаноїдів з відмінних типів клітин. Як наслідок, антагоністичні сполуки рецепторів BK можна вважати новим класом медикаментів, припустимо активних у різних розладах. Можливі терапевтичні застосування вказаних антагоністів є запальні, алергічні та аутоімунні розлади, як-то астма та хронічний бронхіт (також індуковані подразнювачами), алергічний, вазомоторний та вірусний риніт, хронічна обструктивна хвороба легень (COPD), ревматоїдний артрит, хронічні запальні хвороби кишечника (хвороба Крона та виразковий коліт), гломерулонефрит, псоріаз, висипка, гострий та хронічний цистит; дегенеративні розлади, що характеризуються фіброзом, як-то цироз печінки, гломерулопатії та фіброз

легень, артеріосклероз; внаслідок їх анагетичної активності у лікуванні гострого та хронічного болю, наприклад при опіках, сильного головного болю, укусів комах, хронічного болю у ракових пацієнтів; при розладах серцево-судинної системи, як-то септичний, алергічний та пост-травматичний шок, та цирозу печінки з гепаторенальним синдромом; як антиракові та антиангіогенні засоби; у лікуванні гіпотензії та алопеції.

Різні пептидні та непептидні антагоністи рецептору брадікініну B2 є відомими у літературі. WO 03103671 розкриває велику родину сполук з антагоністичною активністю стосовно рецептору брадікініну B2. Сполуки заявленого винаходу, хоча і охоплені загальною формулою WO 03103671, не описані або не охарактеризовані у вказаному документі.

Заявлений винахід стосується непептидних сполук, котрі показують високу спорідненість та антагоністичну активність стосовно рецептору B2, що мають загальну формулу (I):



де:

R - гідроген або метил;

W - простий зв'язок або атом оксигену;

n=3;

X - гідроген або аміногрупа -NR₁R₂, де R₁ та R₂ можуть бути незалежно гідрогеном або вибраними з групи: метил, етил, н-пропіл, ізопропіл;

Y - група четвертинного амонію -NR₃R₄R₅, де R₃, R₄, R₅ можуть бути незалежно вибраними з групи: метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, н-пентил; та їх солі з фармацевтично прийнятними кислотами.

Переважаю, сполуки (I) утворюють солі з неорганічними або органічними кислотами, вибраними з групи: хлоридна, бромідна, йодидна, сульфатна, фосфатна, оцтова, трифлуороцтова, пропіонова, щавлева, яблучна, малеїнова, бурштинова, малонна, аспарагінова, глутамінова. Більш того, внаслідок наявності хірального центру винахід також охоплює два енантіомери або їх суміші, охоплюючи рацемічні суміші.

Сполуки загальної формули (I) мають антагоністичну активність in vivo та in vitro стосовно ре-

цептору В2 вище, ніж у більш структурно подібних аналогів, які описані у WO 03103671.

Переважають є сполуки загальної формули (I), де:

$n=3$;

X = гідроген або $-NH_2$;

Y - група четвертинного амонію $= -N(CH_3)_3^+$;

інші замісники визначені вище.

Особливо переважають є сполуки (I) де:

R - гідроген або метил;

W - атом оксигену;

$n=3$;

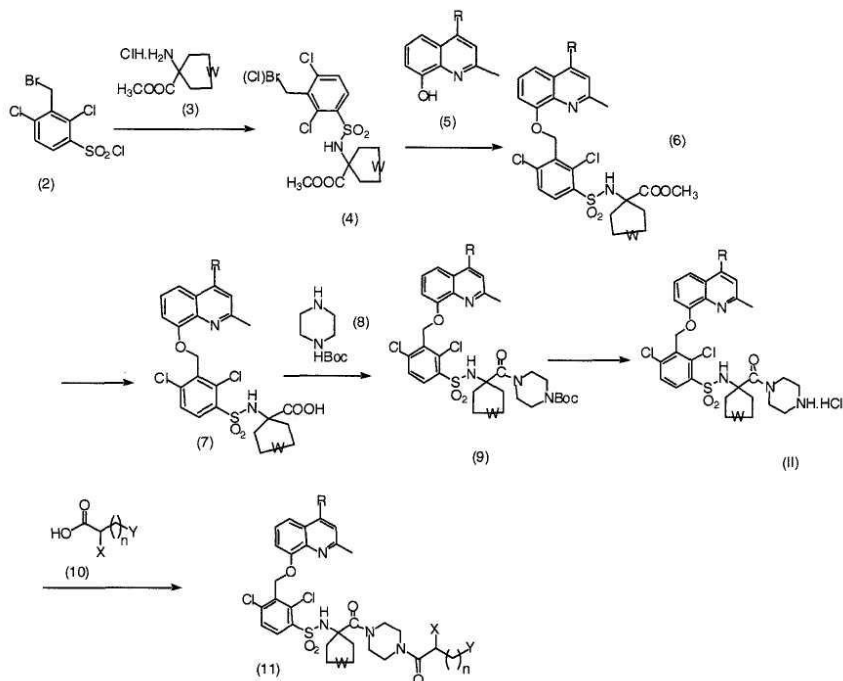
X - гідроген або $-NH_2$;

Y - група четвертинного амонію $-N(CH_3)_3^+$ -

Сполуки заявленого винаходу можна отримувати добре відомими способами синтезу.

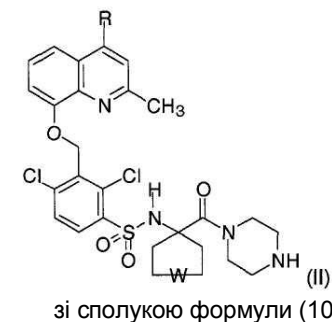
Переважають, сполуки загальної формули (I), які визначені вище, отримують конденсацією у присутності придатного агента конденсації, інтермедіату загальної формули (II), отриманого, як розкрито у WO03103671

Схема 1

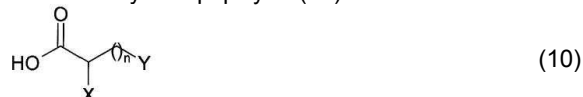


Сполуку формули (2) отримують, як описано у J. Med. Chem. 2001, 44, 1674-1689 бромованням відповідного похідного толуолу, котрий у свою чергу отримують, як описано у J. Fluorine Chemistry, 2000.101:85-89.

Перший етап стосується утворення сульфонамідо-зв'язку (4), отриманого конденсацією інтермедіатів (2) та (3). Цю реакцію проводять при кімнатній температурі, переважно у суміші ацетонітрил/вода (2:1), у присутності натрій гідрокарбонату ($NaHCO_3$). Вказана реакція перебігає з обміном хлору та бром у положенні бензилу: утворену суміш продуктів безпосередньо використовують у наступному етапі. Реакція суміші галоген-похідних з дизаміщеним гідроксикіноліном (5), у присутності калій карбонату (K_2CO_3) та калій йодиду (KI), в ацетоні при кипінні під зворотним холодильником, дає естерне похідне (6).



зі сполукою формули (10)



(10)

або її похідним, де карбоксильна група є належно активованою.

Спосіб синтезу ілюстровано у схемі 1

Сполуку формули (5), тобто 2,4-диметил-8-гідроксикінолін, де $R_4=R_5=CH_3$, отримують як розкрито у WO9640639.

Метил-естер формули (6) гідролізують в основних умовах до карбонової кислоти (7), котру конденсують з Вос-піперазином (8), для отримання інтермедіату (9). Вказану реакцію конденсації проводять відомим для синтезу пептидів способом, застосовуючи гідроксibenзотриазол для активації карбоксильної групи, засіб конденсації, як-то 1-етил-3-(3'-диметилпропіл) карбодіімід та кількість третинного аміну, діізопропілетиламіну, 3 еквіваленти на основі засобу конденсації. Сполуку (II) отримують відщепленням Вос-групи від інтермедіату (9), розчином гідрохлоридної кислоти (4N) у діоксані та виділенням вільного аміну з гідрохлориду.

Похідне (11) отримують конденсацією інтермедіату (10) з амінокислоти (11) відомим способом, описаним для отримання (9) з (7). Будь-яку Вос-групу можна видаляти з інтермедіату (11), розчином гідрохлоридної кислоти (4Н) у діоксані, відповідно отримуючи кінцеву сполуку. Коли групи триалкіламонію нема у будь-якому з комерційно доступних інтермедіатів, її можна синтезувати, починаючи з відповідного аміну відомими способами [Rapoport et al, J. Org. Chem, 1977, 42:139-141; Chen et al, J. Biochem., 1978, 56:150-152].

Сполуки винаходу використовують у лікуванні усіх розладів, де активація рецептору брадікініну має бути заблокованою або зменшеною. Вони є зокрема придатними для лікування запальних, алергічних та аутоімунних розладів, як-то астма та хронічний бронхіт, алергічний, вазомоторний та вірусний риніт, хронічна обструктивна хвороба легень (COPD), ревматоїдний артрит, хронічні запальні хвороби кишечника (хвороба Крона та виразковий коліт), гломерулонефрит, псоріаз, висипка, гострий та хронічний цистит, цироз печінки, гломерулопатії та фіброз легень, артеріосклероз, гострий та хронічний біль, септичний, алергічний та пост-травматичний шок, цироз печінки з гепатorenальним синдромом, гіпотензія, алопеція, або як антиракові та антіангіогенні засоби.

Для застосування у терапії сполуки винаходу слід належно формувати разом з фармацевтично прийнятними носіями/наповнювачами. Переважними є фармацевтичні форми, придатні для перорального застосування, як-то таблетки, капсули, гранули, порошки, розчини, суспензії, сиропи тощо. Ці фармацевтичні препарати можна отримувати

ти звичайними способами, застосовуючи відомі інгредієнти, як-то ліганди, дезинтегратори, мастила, наповнювачі, стабілізатори, розріджувачі, барвники, ароматизатори, змочувальні агенти та інші наповнювачі, відомі фахівцям. Пероральні композиції також містять форми з уповільненим вивільненням, як-то покриті кишково-розчинним покриттям таблетки або гранули. Тверді пероральні композиції можна отримувати звичайними способами змішування, наповнення або пресування. Рідкі пероральні препарати можуть бути у формі, наприклад, водних або масляних суспензій або розчинів, емульсій, сиропів, або можуть бути сухим продуктом для відтворення водою або іншим придатним носієм перед застосуванням.

Дозування може залежати від віку та загального стану пацієнта, природи та суворості хвороби або розладу та шляху і режиму застосування. Як правило, при пероральному застосуванні до дорослої людини сполуки заявленого винаходу загалом застосовуватимуть у загальному добовому дозуванні від 1 до 1000мг, переважно від 5 до 300мг, в одиничній дозі або у поділених дозах.

Наступні приклади ілюструють винахід.

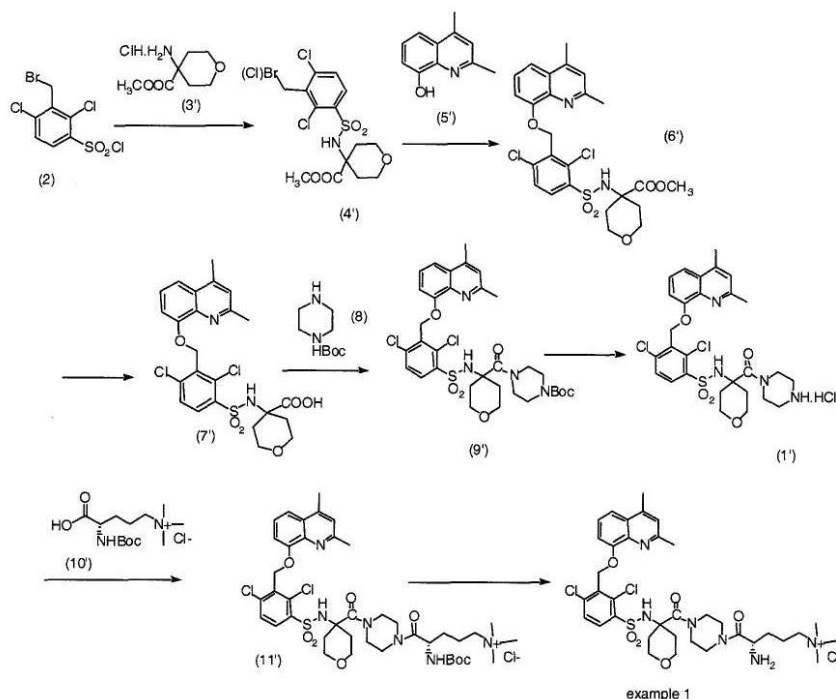
Приклад 1

(4-(S)-аміно-5-(4-{4-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксо-пентил]триметиламонію хлорид, дигідрохлорид

(Сполука загальної формули I, де R=CH₃, W=O-, X=NH₂, n=3, Y=N(CH₃)₃⁺Cl⁻).

Сполуку синтезують способом синтезу, ілюстрованим у схемі 2

Схема 2



Загальні способи: аналітична ВЕРХ: Потік: 1мл/хвил; Мобільна фаза: А-0,1% трифлуороцтова кислота у воді, В-0,1% трифлуороцтова кислота у

ацетонітрилі; Колонка: Zorbax Eclipse XDB C8, 5 мікрон, 150×4,6мм.

Інтермедіат (2) 2,4-Дихлор-3-бромметил-бензолсульфонілхлорид

10мл хлорсульфонової кислоти додають краплями з 4,8мл 2,6-дихлортолуолу протягом 2 годин, з магнітною мішалкою при кімнатній температурі. Після завершення додавання, суміш гріють при 40°C протягом 2 годин, отримуючи пурпурний розчин, котрий охолоджують та обережно виливають у лід-воду (0,5л), енергійно перемішуючи. Білий твердий продукт фільтрують, порошокують, промивають водою, сушать КОН та очищають промивкою n-гексаном, додаванням 200мл розчиннику енергійно перемішуючи. Суміш фільтрують, твердий продукт викидають та розчинник випарюють до сухого стану для отримання 2,4-дихлор-3-метил-бензолсульфонілхлориду як кристалічний білий твердий продукт. Вихід: 85%.

ВЕРХ-чистота: 86% (30% В, 3%/хвил, RT=19,7 хвил).

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ (млн $^{-1}$) 2,6 (s, 3H), 7,5 (d, 1H), 7,95 (d, 1H); IEP(+): m/z 260 [M+H] $^+$.

Цей інтермедіат бромують у таких умовах: 20 ммоль 2,4-дихлор-3-метил-бензолсульфонілхлориду розчиняють в ацетонітрилі. Додають 2 еквіваленти NBS, перемішуючи при кімнатній температурі до повної солюбілізації NBS. Остаточо, додають 0,1 еквівалент азобісізобутиронітрилу (AIBN) та суміш гріють при 70°C протягом приблизно 6 годин. Розчин випарюють, залишок переносять в етилацетат, промивають H_2O та 5% NaHCO_3 , сушать сухим Na_2SO_4 та фільтрують. Органічну фазу випарюють, отримуючи в'язку, світло-забарвлену рідину, котру переносять у петролейний етер. Залишок фільтрують, та розчин дає (2') як світло-забарвлений кристалічний твердий продукт.

ВЕРХ-чистота: 95% (50% В до 5%/хвил, RT=18,72).

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ (млн $^{-1}$) 4,85 (s, 2H), 7,58 (d, 1H), 8,08 (d, 1H); IEP(+): m/z 338,1 [M+H] $^+$.

Інтермедіат (3) 4-Аміно-тетрагідропіран-4-карбонової кислоти метил-естер гідрохлорид

4-Аміно-тетрагідропіран-4-карбонової кислоти гідрохлорид (0,025 моль) суспендують у 13мл CH_3OH , охолоджують до -60°C та додають краплями SOCl_2 (3 еквівалент), перемішуючи. Після завершення додавання, суміш залишають нагріватися до кімнатної температури, тоді поступово гріють до кипіння для отримання прозорого розчину (приблизно 2 години), котрий охолоджують, залишок фільтрують та концентрують під вакуумом.

Вихід 80%. Чистота (ЯМР): 85%.

^1H -ЯМР (DMCO-d_6): δ (млн $^{-1}$) 1,91-2,04 (m, 4H), 3,78 (s, 3H), 3,60-3,85 (m, 4H), 9,00 (s, 3H). IEP(+): m/z 160,1 [M+H] $^+$.

Інтермедіат (4') 4-(3-Бромметил-2,4-дихлор-бензолсульфоніламіно)-тетрагідропіран-4-карбонової кислоти метил-естер

Інтермедіат (3') (1,1 еквівалент) розчиняють у воді разом з 4 еквівалентами K_2CO_3 . Цей розчин додають у розчин 1 еквіваленту (10 ммоль) інтермедіату (2) в ацетонітрилі та перемішують при кімнатній температурі до утворення осаду (4 годин). Розчинник випарюють та залишок розчиняють в етилацетаті та 0,1M HCl (1/1). Органічну фа-

зу відокремлюють та сушать Na_2SO_4 . Розчинник випарюють, утворений твердий продукт промивають циклогексаном, отримуючи білий твердий продукт, де хлор/бром похідні присутні у співвідношенні 10/1. Вихід: 60%.

ВЕРХ-чистота: 88% (20% В при 3%/хвил; RT=14,11 (Br) та 14,47 (Cl)).

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ (млн $^{-1}$) 1,81-1,99 (2H, m), 2,07-2,25 (2H, m), 3,49-3,71 (7H, m), 4,81 (1,5H, s, [Br]), 4,94 (0,3H, s, [Cl]), 5,30 (1H, brs), 7,47-7,53 (1H, m), [7,49 (d, J 8,5 Гц, X = Br), 7,51 (d, J 8,5 Гц, X = Cl)], 7,91-7,98 (1H, m), [7,94 (d, J 8,5 Гц, X = Br), 7,96 (d, J 8,5 Гц, X = Cl)].

Інтермедіат (6') 4-[2,4-Дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбонової кислоти метил-естер

Хінолін (5') (0,48 ммоль) та LiOH (2,5 еквівалент) перемішують при кімнатній температурі під азотом у метил-етил-кетоні (МЕК). Суміш перемішують під азотом протягом 90 хвил. Інтермедіат (4) розчиняють у суміші МЕК/сухий ДМФ (2/1) (42мл, 12мл/ммоль), та розчин, що містить хінолін, додають краплями до реакційної суміші, перемішуючи. Перемішування продовжують протягом 16 годин. Реакційну суміш концентрують під вакуумом та залишок розчиняють в етилацетаті (50мл, 100мл/ммоль). Органічну фазу промивають (3x50мл) буферним розчином pH=4,2, сушать Na_2SO_4 , фільтрують та концентрують під вакуумом для отримання жовтого масла. Вихід: 33%. ВЕРХ-чистота: 77% (20% В, 3%/хвил; RT=9,54).

^1H -ЯМР (DMCO-d_6): δ (млн $^{-1}$) 1,80-1,95 (m, 4H), 2,56 (s, 3H), 2,64 (s, 3H), 3,32-3,40 (m, 2H), 3,42-3,55 (m, 2H), 3,60 (s, 3H), 5,57 (s, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,50 (dd, 1H), 7,67 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 8,02 (d, 1H), 8,77 (bs, 1H);

IEP(+): m/z 553,1 [M+H] $^+$.

Інтермедіат (7') 4-[2,4-Дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбонова кислота

Інтермедіат формули (6') розчиняють у ТГФ та розчин додають до 10 еквівалентів 1M LiOH у воді. Суміш перемішують протягом 4 годин при 40°C, тоді розчинник випарюють. Залишок розчиняють у воді та 0,1 M HCl додають до pH=4. Водну фазу екстрагують дихлорметаном та органічну фазу сушать Na_2SO_4 . Розчинник випарюють для отримання жовтого твердого залишку. Вихід: 90%. ВЕРХ-чистота: 99% (20%В, 3%/хвил; RT=7,72).

^1H -ЯМР (DMCO-d_6): δ (млн $^{-1}$) 1,75-1,90 (m, 4H), 2,56 (s, 3H), 2,64 (s, 3H), 3,10-3,35 (m, 2H), 3,38-3,50 (m, 2H), 5,58 (s, 2H), 7,30 (s, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,67 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 8,03 (d, 1H), 8,64 (bs, 1H).

IEP(+): m/z 539,1 [M+H] $^+$.

Інтермедіат (9') 4-трет-бутоксикарбоніл-((4-(2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)бензолсульфоніламіно)-тетрагідропіран-4-карбоніл)-піперазин-1-іл)

(7') (1,3 ммоль) та HOBt (1,1 еквівалент) суспендують у 50мл сухого ДМФ у 100мл круглодонній колбі під азотом. Суміш охолоджують до +4°C та додають у EDCI. HCl (1,1 еквівалент), перемішуючи. Перемішування при +4°C продовжу-

ють для години, тоді DIPEA (2 еквівалент) та Вос-піперазин (1 еквівалент) додають та суміш залишають нагріватися до кімнатної температури, перемішуючи. Після 12 годин розчинник випарюють, залишок розчиняють у 40мл ДХМ та органічну фазу промивають розсоллом (20мл) та сушать Na_2SO_4 . Розчинник випарюють для отримання масла, котре очищають на колонці 70г Varian Mega Bond (етилацетат, $R_f=0,50$), отримуючи жовтий твердий продукт.

Вихід: 96%. ВЕРХ-чистота: 98% (20% В, 3% В/хвил, $RT=11,14$).

^1H -ЯМР (CDCl_3): δ (млн $^{-1}$) 1,45 (s, 9H); 1,55-1,80 (m, 2H), 2,05-2,20 (m, 4H), 2,56 (s, 3H), 2,64 (s, 3H), 3,38-3,90 (m, 10H), 5,58 (s, 2H), 7,10 (s, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,46 (t, 1H), 7,67 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 8,03 (d, 1H), 8,64 (bs, 1H).

ІЕР(+) MS : m/z 707,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Інтермедіат (1') (4-(2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно)-тетрагідропіран-4-карбоніл)-піперазин-1-іл

0,62 ммоль (9') додають у 10мл суміші HCl /діоксан 4М та суміш перемішують протягом 3 годин. Розчинник випарюють та залишок сушать сублімацією, отримуючи гідрохлорид (1') як жовтий твердий продукт. Вихід: 98%. ВЕРХ-чистота: 92% (20% В, 3%/хвил; $RT=5,34$).

^1H -ЯМР (D_2O): δ (млн $^{-1}$) 1,55-2,10 (m, 7H), 2,90-3,10 (m, 9H), 3,20-3,55 (m, 9H), 6,0 (s, 2H), 7,60-8,10 (m, 8H), 8,95 (d, 1H).

ІЕР(+) MS : m/z 609,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Інтермедіат (10') (4-трет-бутоксикарбоніламіно-4-карбокси-бутил)-триметиламонію

10 ммоль Вос-Оrn-ОН суспендують у метанолі (20мл) та суспензію додають у 44ммоль ізосечовини. Колбу закривають та перемішують при кімнатній температурі протягом 2 діб. Утворений розчин контролюють ТШХ (елюент: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 40/54/6; Вос-Оrn-ОН $R_f=0,29$; (10') R_f : 0,11, виявлення KMnO_4).

Метанол випарюють під вакуумом та залишок переносять у 150мл води та фільтрують. Круглодонну колбу та твердий продукт промивають водою (2 \times 50мл) та усі промивальні водні фракції комбінують, тоді концентрують під вакуумом (40мл). Утворений твердий продукт (4,068г) суспендують у воді (40мл), фільтрують (для видалення будь-яких залишків сечовини) та очищають FCK на зворотно-фазовій LiChroprep RP-18 (40-63 мікрон). Колонку (19 \times 7см) елюють 3% CH_3CN у воді та фракції (приблизно 100мл) аналізують ТШХ. Фракції, що містять чистий продукт (500мл), комбінують, концентрують під вакуумом для видалення CH_3CN , сушать сублімацією та остаточно випарюють з 150мл абсолютного етанолу, отримуючи 442 мг білого високо гігроскопічного твердого продукту. Вихід: 16%.

^1H -ЯМР (DMCO-d_6): δ (млн $^{-1}$) 1,38 (s, 9H) 1,58-1,75 (m, 4H), 3,03 (s, 9H), 3,29 (m, 2H), 3,45 (m, 1H), 6,49 (d, d, 1H);

ІЕР(+) MS : m/z 275,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Інтермедіат (11') (4-(S)-трет-бутоксикарбоніламіно-5-(4-(2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)бензолсульфоніламіно)тетрагідро-

піран-4-карбоніл)піперазин-1-іл)-5-оксо-пентилтриметил-амонію хлорид

Інтермедіат (10'), 1,2 ммоль, розчиняють у ДМФ та розчин додають у дициклогексилкарбодіїмід (1,2 еквівалент) та HOBT (1,2 еквівалент). Суміш перемішують протягом 30 хвил, тоді додають у діізопропіламінометил-полістирол (1,5 еквівалент) та інтермедіат (1') (1 еквівалент). Суміш перемішують протягом 24 годин. Смолю фільтрують, розчинник випарюють та залишок розчиняють у воді та етилацетаті. Водну фазу відокремлюють та сушать сублімацією. Сирий продукт очищають препаративною ВЕРХ (колонка Vydac 218TP, C18, 250 \times 50мм, потік 60мл/хвил, градієнт 10%-70% $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\%$ TFA у 120хвил, детектор УФ при 240нм, збір 55-75хвил), отримуючи інтермедіат (11'), котрий сушать сублімацією як білий твердий матеріал. Вихід: 46%. ВЕРХ-чистота: 98% (20% В, 3%/хвил; $RT=7,68$).

^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ : 1,4 (s, 9H), 1,8-1,45 (m, 6H), 1,95-1,85 (m, 2H), 2,81 (m, 6H), 3,08 (s, 9H), 3,70-3,18 (m, 7H), 4,01-3,56 (5H, m), 4,57-4,45 (m, 1H), 5,59 (s, 2H), 7,25 (d, 1 H), 7,90-7,43 (m, 4H), 8,02 (d, 1H), 8,85 (s, 1H).

ІЕР(+) MS : m/z 863,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(4-(S)-Аміно-5-(4-{4-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбоніл)піперазин-1-іл)-5-оксо-пентилтриметил-амонію хлорид, дигідрохлорид

0,45 ммоль (11') додають у 10мл суміші HCl /діоксан 4М. Суміш перемішують протягом 6 годин, розчинник випарюють та залишок сушать сублімацією, отримуючи кінцеву сполуку як білий твердий матеріал. Вихід: 87%. ВЕРХ-чистота: 98% (20% В, 3%/хвил; $RT=5,14$).

^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ : 1,95-1,60 (m, 8H), 2,81 (m, 6H), 3,08 (s, 9H), 3,70-3,18 (m, 12H), 4,57-4,45 (m, 1H), 5,59 (s, 2H), 7,90-7,60 (m, 4H), 8,02 (d, 1H), 8,5 (s, 3H), 8,85 (s, 1H).

ІЕР(+) MS : m/z 763,1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Приклад 2

(4-(S)-Аміно-5-(4-(2,4-дихлор-3-(2-метил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламіно)тетрагідропіран-4-карбоніл)-піперазин-1-іл)-5-оксо-пентил)-триметиламонію хлорид, гідрохлорид

^1H ЯМР (DMCO-d_6) δ : 8,90 (1H, s), 8,47-8,34 (4H, m), 8,02 (1H, d), 7,81 (1H, d), 7,73-7,37 (4H, m), 5,62 (2H, s), 4,57-4,45 (1H, m), 4,01-3,56 (5H, m), 3,43-3,18 (7H, m), 3,06 (9H, s), 2,78-2,61 (4H, m), 2,89 (1H, s), 1,97-1,60 (9H, m). ВЕРХ: $RT = 9,26$ хвил. MS : $[\text{M}]^+ 749$.

Приклад 3

[5-(4-{4-[2,4-Дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензол-сульфоніламіно]тетрагідропіран-4-карбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксо-пентил]-триметил-амонію трифлуорацетат.

^1H -ЯМР (DMCO-d_6): δ (млн $^{-1}$) 1,53 (s, 2H, m); 1,69 (m, 4H); 1,90 (m, 2H); 2,45 (t, 2 H); 2,78 (m, 6H); 3,04 (9 H, s); 3,23 - 3,57 (7H, m); 5,68 (2H, s); 7,38-8,18 (5H, m); 8,04 (1H, d, J = 8,42Гц); 8,82 (1 H, s). ВЕРХ:

$RT = 5,65$ хвил. MS : $[\text{M}]^+ 748$.

Приклад 4

[4-(S)-Аміно-5-(4-{1-[2,4-дихлор-3-(2,4-диметил-хінолін-8-ілоксиметил)-бензолсульфоніламі-но]циклопентанкарбоніл}піперазин-1-іл)-5-оксо-пентил]-триметил-амонію хлорид, дигідрохлорид.

¹H ЯМР (ДМСО-d₆) δ: 8,90 (1H, s), 8,48 (3H, s), 8,02 (1H, d), 7,95-7,63 (3H, m), 5,59 (2H, s), 4,57-4,45 (1H, m), 3,97-3,24 (10H, m), 3,08 (9H, s), 2,95-2,61 (5H, m), 1,97-1,72 (8H, m), 1,42 (4H, s); ВЕРХ: RT = 5,88 хвил. МС: [M]⁺ 747,2.

Біологічна активність

Визначення спорідненості стосовно рецептору В2 проводили дослідженням зв'язування сполук заявленого винаходу з рецептором В2 людини, експресованим у клітинах CHO, способом, описа-

ним Bellucci et al, Br. J. Pharmacol. 2003, 140:500-506; значення зв'язування виражене як pK_i.

Антагоністичну активність (виражено як pA₂) визначали як інгібування індукованого брадікініном продукування інозитолів у клітинах CHO, трансфектованих рецептором В2 людини, способом, описаним Bellucci et al, Br. J. Pharmacol. 2003, 140:500-506.

In vivo активність сполук заявленого винаходу визначали як ефективність інгібування індукованого ВК бронхоспазму у морської свинки [Tramontana et al., J. Pharmacol. Exp. Therap., 296:1051-1057, 2001], вимірюючи його дозу (it=інтратрахеальне застосування) (у нмоль/кг), котра інгібувала 80% бронхіальне скорочення протягом принаймні 210 хвил.

Приклад	W	R	X	Y	n	pK _i	pA ₂	it Доза
WO03103671 пр. 55	зв'язок	H	NH ₂	NHC(=NH)NH ₂	3	8,7	8,4	300
WO03103671 пр. 63	зв'язок	CH ₃	NH ₂	NH ₂	4	9,1	8,9	300
WO03103671 пр. 57	зв'язок	H	NH ₂	N(CH ₃) ₂	4	8,8	8,3	300
WO03103671 пр. 59	зв'язок	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₂	4	8,8	9,0	300
WO03103671 пр. 44	зв'язок	CH ₃	NH ₂	NHC(=NEt)NHEt	3	10,1	9,0	300
WO03103671 пр. 88	зв'язок	CH ₃	N(CH ₃) ₃	N(CH ₃) ₃	4	9,7	8,2	-

Приклад 1	0	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₃	3	10,3	10,3	30
Приклад 2	0	H	NH ₂	N(CH ₃) ₃	3	10,2	9,7	100
Приклад 3	0	CH ₃	H	N(CH ₃) ₃	3	10,1	9,5	100
Приклад 4	зв'язок	CH ₃	NH ₂	N(CH ₃) ₃	3	10,1	9,4	100

Переважні сполуки заявленого винаходу порівнювали зі сполуками більш структурно подібними розкритим у WO03103671. Неочікувано виявлено, що сполуки винаходу мають активності in vivo та in vitro вище, ніж у структурно подібних аналогів з WO03103671. Тести на антагоністичну активність на клітинах, трансфектованих рецептором людини та in vivo є високо предиктивними стосовно очікуваних доз для терапевтичного застосування у людей.

Скорочення

it = інтратрахеальне застосування; iv = внутрішньовенне застосування; ДХМ = дихлорметан; MeOH = метанол; ТГФ = тетрагідрофуран; ДМСО =

диметилсульфоксид; ДМФ = диметилформамід; AcOEt = етилацетат; AcOH = оцтова кислота; TFA = трифлуороцтова кислота; NBS = N_α-бромсукцинімід; бро = бензоіл пероксид; Вос = трет-бутоксикарбоніл; НОВт=1-гідрокси-бензотриазол; EDC=1-етил-3-(3'-диметилпропіл)карбодіімід; DIPEA = діізопропілетиламін; ВЕРХ = високоефективна рідинна хроматографія; ТШХ = тонко-шаров хроматографія; ЯМР = ядерний магнітний резонанс; ІЕР = іонізація електророзпиленням; МС = Мас-спектрометрія; FCC = флеш-колонкова хроматографія; RT = час утримання.