

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 017110

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2012.09.28

(21) Номер заявки
200801906

(22) Дата подачи заявки
2007.02.26

(51) Int. Cl. C07D 239/50 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ПИРИМИДИНИЛСУЛЬФОАМИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИРИМИДИНИЛСУЛЬФОАМИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (ВАРИАНТЫ), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ОПОСРЕДОВАННОГО ИНТЕГРИНОМ α_4 , СПОСОБ СНИЖЕНИЯ И/ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО КОМПОНЕНТА ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ АУТОИММУННОГО ОТВЕТА

(31) 60/777,595

(32) 2006.02.27

(33) US

(43) 2009.02.27

(86) PCT/US2007/062824

(87) WO 2007/101165 2007.09.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛАН ФАМЭСЬЮТИКЭЛС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:

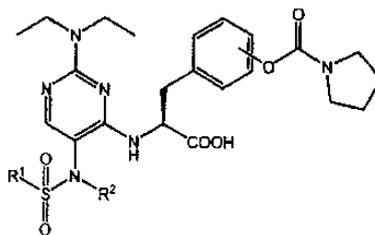
Смит Дженифер Л., Сэмкоу
Кристофер, Сюй Ин-Цзы, Конрэди
Андрей В. (US)

(74) Представитель:

Попеленский Н.К. (RU)

(56) WO-A-0043372
WO-A-03099809

(57) В настоящем изобретении предлагаются пиримидинилсульфонамидные соединения, охватываемые общей формулой I



I

связывающие VLA-4. Некоторые из указанных соединений ингибируют также адгезию лейкоцитов и, в частности, адгезию лейкоцитов, опосредованную VLA-4. Предложенные соединения являются эффективными при лечении воспалительных заболеваний у человека или животных, таких как астма, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, деменция при СПИДе, диабет, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, ревматоидный артрит, трансплантация ткани, метастазы опухоли и ишемия миокарда. Соединения по настоящему изобретению можно также применять для лечения воспалительных заболеваний головного мозга, таких как рассеянный склероз.

B1

017110

017110 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пиримидинилсульфонамидным соединениям, которые ингибируют адгезию лейкоцитов, в частности адгезию лейкоцитов, опосредованную интегринами $\alpha 4$, где интегрин $\alpha 4$ предпочтительно представляет собой VLA-4. Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, включающим вышеуказанные соединения, а также способам лечения, например, воспаления с использованием либо соединений, либо фармацевтических композиций, соответствующих данному изобретению.

Сведения о предшествующем уровне техники

Библиографический список.

Указанные ниже публикации приведены в данной заявке в виде надстрочных цифр.

1. Hemler and Takada, Европейская публикация патентной заявки № 330506, опубликована 30 августа 1989 г.

2. Elices et al., Cell., 60:577 584 (1990)
3. Springer, Nature, 346:425 434 (1990)
4. Osborn, Cell., 62:3 6 (1990)
5. Vedder et al., Surgery, 106:509 (1989)
6. Pretolani et al., J. Exp. Med., 180:795 (1994)
7. Abraham et al., J. Clin. Invest., 93:776 (1994)
8. Mulligan et al., J. Immunology, 150:2407 (1993)
9. Cybulsky et al., Science, 251:788 (1991)
10. Li et al., Arterioscler. Thromb., 13:197 (1993)
11. Sasseville et al., Am. J. Path., 144:27 (1994)
12. Yang et al., Proc. Nat. Acad. Science (USA), 90:10494 (1993)
13. Burkly et al., Diabetes, 43:529 (1994)
14. Baron et al., J. Clin. Invest., 93:1700 (1994)
15. Hamann et al., J. Immunology, 152:3238 (1994)
16. Yednock et al., Nature, 356:63 (1992)
17. Baron et al., J. Exp. Med., 177:57 (1993)
18. van Dinther-Janssen et al., J. Immunology, 147:4207 (1991)
19. van Dinther-Janssen et al., Annals. Rheumatic Dis., 52:672 (1993)
20. Elices et al., J. Clin. Invest., 93:405 (1994)
21. Postigo et al., J. Clin. Invest., 89:1445 (1991)
22. Paul et al., Transpl. Proceed., 25:813 (1993)
23. Okarhara et al., Can. Res., 54:3233 (1994)
24. Paavonen et al., Int. J. Can., 58:298 (1994)
25. Schadendorf et al., J. Path., 170:429 (1993)
26. Bao et al., Diff., 52:239 (1993)
27. Lauri et al., British J. Cancer, 68:862 (1993)
28. Kawaguchi et al., Japanese J. Cancer Res., 83:1304 (1992)
29. Konradi et al., PCT/USOO/01686, filed, January 21, 2000

Все вышеуказанные публикации включены в данном контексте в виде ссылки во всей своей полноте.

VLA-4 (называемый также интегрин $\alpha 4\beta 1$ и CD49d/CD29), впервые идентифицированный Hemler and Takada¹, представляет собой член семейства интегрин $\beta 1$ клеточных поверхностных рецепторов, каждый из которых включает две субъединицы, α -цепь и β -цепь. VLA-4 содержит $\alpha 4$ -цепь и $\beta 1$ -цепь. Существует по меньшей мере девять интегринов $\beta 1$, все имеющие одинаковую $\beta 1$ -цепь и каждый имеющий отличную от других α -цепь. Все указанные девять рецепторов связывают различный комплемент разных молекул клеточного матрикса, таких как фибронектин, ламинин и коллаген. VLA-4, например, связывается с фибронектином. VLA-4 также связывает нематриксные молекулы, которые экспрессируются эндотелиальными и другими клетками. Данные нематриксные молекулы включают VCAM-I, который экспрессируется на цитокин-активированных человеческих эндотелиальных клетках пупочной вены в культуре. Различные эпитопы VLA-4 отвечают за активности связывания фибронектина и VCAM-I, и показано, что каждая активность ингибируется независимо.²

Межклеточная адгезия, опосредованная VLA-4 и другими клеточными поверхностными рецепторами, ассоциирована с рядом воспалительных реакций. В области повреждения или другого воспалительного фактора активированные клетки сосудистого эндотелия экспрессируют молекулы, которые являются адгезивными в отношении лейкоцитов. Механизм адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам включает, отчасти, распознавание и связывание клеточных поверхностных рецепторов на лейкоцитах с соответствующими молекулами клеточной поверхности на эндотелиальных клетках. Будучи связанными, лейкоциты мигрируют через стенку кровеносного сосуда, чтобы проникнуть в область повреждения и высвободить химические медиаторы для борьбы с инфекцией. В плане обзоров по адгезивным рецепторам иммунной системы см., например, работы Springer³ и Osborn⁴.

Воспалительные нарушения головного мозга, такие как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), рассеянный склероз (MS) и менингит, представляют собой примеры нарушений центральной нервной системы, в которых механизм адгезии эндотелия/лейкоцитов приводит в результате к разрушению здоровой ткани головного мозга в других отношениях. Большие количества лейкоцитов мигрируют через гематоэнцефалический барьер (BBB) у пациентов с данными воспалительными заболеваниями. Лейкоциты высвобождают токсичные медиаторы, которые вызывают обширное повреждение ткани, приводящее в результате к поврежденной проводимости нервов и параличу.

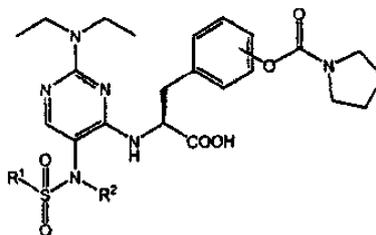
В других системах органов повреждение ткани происходит также через механизм адгезии, приводя в результате к миграции или активации лейкоцитов. Например, показано, что начальное повреждение сердечной ткани после ишемии миокарда может быть в последствии осложнено проникновением лейкоцитов в поврежденную ткань, вызывая еще одно повреждение (Vedder et al.)⁵. Другие воспалительные или медицинские состояния, опосредованные механизмом адгезии, включают, например, астму⁶⁻⁸, болезнь Альцгеймера, атеросклероз⁹⁻¹⁰, деменцию при СПИДе¹¹, диабет¹²⁻¹⁴ (включая острый ювенильный диабет), воспалительное заболевание кишечника¹⁵ (включая язвенный колит и болезнь Крона), рассеянный склероз¹⁶⁻¹⁷, ревматоидный артрит¹⁸⁻²¹, трансплантацию тканей²², метастазы опухолей²³⁻²⁸, менингит, энцефалит, инсульт и другие церебральные травмы, нефрит, ретинит, атопический дерматит, псориаз, ишемию миокарда и острое опосредованное лейкоцитами повреждение легкого, такое как происходит при респираторном дистресс-синдроме взрослых.

Замещенные аминопиримидины описаны как класс соединений, ингибирующих связывание VLA-4 с VCAM-I, и, соответственно, проявляют противовоспалительные свойства²⁹. Хотя данные соединения обладают антагонистическими свойствами в отношении данного связывания, повышенная биодоступность данных соединений повышала бы их эффективность.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение описывает соединения, их фармацевтически приемлемые соли и сложные эфиры, их композиции, синтез и способы лечения VLA-4-опосредованных заболеваний. Основываясь на данных *in vivo*, полученных для тех соединений, соответствующих настоящему изобретению, которые были оценены таким образом, данные соединения, как предполагают, проявляют повышенную биодоступность при пероральной доставке, которую измеряют принятым анализом площади под кривой (AUC).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение представляет соединения формулы I



I

где R¹ выбран из группы, состоящей из C₁-C₄алкила и C₁-C₄галоалкила, и

R² выбран из группы, состоящей из C₁-C₄алкила, C₂-C₄алкенила, C₂-C₄алкинила и C₃-C₆циклоалкила,

или их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

В ряде вариантов осуществления R¹ представляет собой C₁-C₂алкил. В других вариантах осуществления R¹ представляет собой метил или трифторметил. В еще одних вариантах осуществления R¹ представляет собой метил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₁-C₄алкил. В других вариантах осуществления R² представляет собой C₁-C₃алкил. В еще одних вариантах осуществления R² представляет собой метил, этил, изопропил или н-пропил. В другом варианте осуществления R² представляет собой метил или этил, и в еще одном варианте осуществления R² представляет собой изопропил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₃-C₆циклоалкил. В других вариантах осуществления R² представляет собой циклопентил.

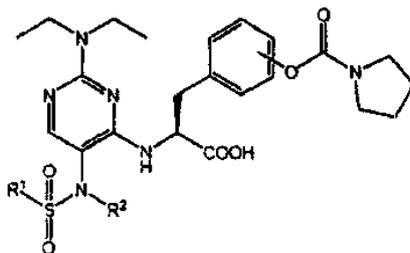
В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₂-C₄алкенил.

В других вариантах осуществления R² представляет собой аллил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₂-C₄алкинил.

В других вариантах осуществления R² представляет собой пропаргил.

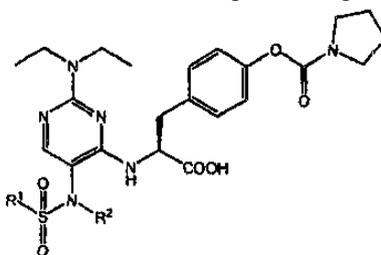
Примеры соединений, соответствующих настоящему изобретению, включают те, у которых группы R¹ и R² принимают значения, перечисленные в табл. I (включая их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры).



R ¹	R ²
Трифторметил	Этил
Метил	Изопропил
Метил	Циклопентил
Метил	Метил
Метил	Пропаргил
Метил	Этил
Метил	Аллил
Бутил	Этил
3-хлорпропил	Этил
3-хлорпропил	Метил
3,3,3-трифторпропил	Этил

R ¹	R ²
Пропил	Этил
Изопропил	Этил

В другом варианте осуществления настоящее изобретение представляет соединения формулы II



II

где R¹ выбран из группы, состоящей из C₁-C₄алкила и C₁-C₄галоалкила; и

R² выбран из группы, состоящей из C₁-C₄алкила, C₂-C₄алкенила, C₂-C₄алкинила и C₃-C₆циклоалкила,

или их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

В ряде вариантов осуществления R¹ представляет собой C₁-C₂алкил. В других вариантах осуществления R¹ представляет собой метил или трифторметил.

В еще одних вариантах осуществления R¹ представляет собой метил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₁-C₄алкил.

В других вариантах осуществления R² представляет собой C₁-C₃алкил.

В еще одних вариантах осуществления R² представляет собой метил, этил, изопропил или n-пропил.

В другом варианте осуществления R² представляет собой метил или этил, и в еще одном варианте осуществления R² представляет собой изопропил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₃-C₆циклоалкил.

В других вариантах осуществления R² представляет собой циклопентил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₂-C₄алкенил.

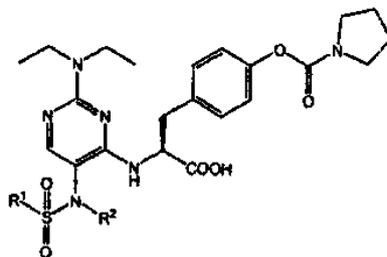
В других вариантах осуществления R² представляет собой аллил.

В ряде вариантов осуществления R² представляет собой C₂-C₄алкинил.

В других вариантах осуществления R² представляет собой пропаргил.

Примеры соединений, соответствующих данному изобретению, включают те, у которых группы R¹ и R² принимают значения, перечисленные в табл. 2 (включая их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры).

Таблица 2



R ¹	R ²
Трифторметил	Этил
Метил	Изопропил
Метил	Циклопентил
Метил	Метил
Метил	Пропаргил
Метил	Этил

R ¹	R ²
Метил	Аллил
Бутил	Этил
3-хлорпропил	Этил
3-хлорпропил	Метил
3,3,3-трифторпропил	Этил
Пропил	Этил
Изопропил	Этил

Орто- и мета-замещение пирролидинилкарбонилосигруппы на фенильном цикле также входят в объем настоящего изобретения.

Настоящее изобретение представляет также соединения, приведенные в табл. 3, а также их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

Таблица 3

	Структура	Название
3-1		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-1,1,1-трифторметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота

	Структура	Название
3-2		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-3		(S)-2-(5-(циклопентилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-4		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-метилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
	Структура	Название
3-5		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-проп-2-инил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-6		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-7		(S)-2-(5-(N-аллилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота

	Структура	Название
3-8		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилбутилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-9		(S)-2-(5-(3-хлор-N-этилпропилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-10		(S)-2-(5-(3-хлор-N-метилпропилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота

	Структура	Название
3-11		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-3,3,3-трифторпропилсульфонамидо)-пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-12		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилпропилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота
3-13		(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-2-метилпропилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота

В другом аспекте данное изобретение представляет фармацевтические композиции, включающие фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения, определенного в данном контексте.

В одном из аспектов, относящихся к способам, данное изобретение направлено на способ лечения заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, интегрином $\alpha 4$, предпочтительно VLA-4, у пациента, причем способ включает введение фармацевтической композиции, включающей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения, соответствующего изобретению.

Соединения и фармацевтические композиции по настоящему изобретению используют для лечения патологических состояний, опосредованных, по меньшей мере, отчасти интегринными $\alpha 4$, где интегрин $\alpha 4$ предпочтительно представляет собой VLA-4, или адгезию лейкоцитов. Указанные патологические состояния включают, например, астму, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, деменцию при СПИДе, диабет (включая острый ювенильный диабет), воспалительное заболевание кишечника (включая язвенный колит и болезнь Крона), рассеянный склероз, ревматоидный артрит, трансплантацию тканей, метастазы опухоли, менингит, энцефалит, инсульт и другие церебральные травмы, нефрит, ретинит, атонический дерматит, псориаз, ишемию миокарда и острое опосредованное лейкоцитами повреждение легкого, такое как происходит при респираторном дистресс-синдроме взрослых.

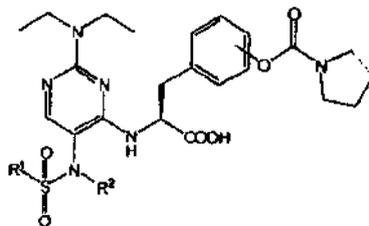
Другие патологические состояния включают, но без ограничения перечисленным, воспалительные состояния, такие как узелковая эритема, аллергический конъюнктивит, ретробульбарный неврит, увеит, аллергический ринит, анкилозирующий спондилит, псориаз, псориатический артрит, васкулит, синдром Рейтера, системная красная волчанка, прогрессирующей системный склероз, полимиозит, дерматомиозит, грануломатоз Вегнера, аортит, саркоидоз, лимфоцитопению, темпоральный артериит, перикардит, миокардит, застойная сердечная недостаточность, узелковый полиартериит, синдромы гиперчувствительности, аллергия, гиперэозинофильные синдромы, синдром Чарга-Штраусса, хроническое обструктивное легочное заболевание, гиперчувствительный пневмонит, хронический активный гепатит, интерстициальный цистит, аутоиммунная эндокринная недостаточность, первичный билиарный цирроз, аутоиммунная апластическая анемия, хронический персистирующий гепатит и тиреоидит.

В одном варианте осуществления патологическое состояние, опосредованное интегрином $\alpha 4$, представляет собой воспалительное заболевание.

В другом варианте осуществления патологическое состояние представляет собой аутоиммунное заболевание.

В ряде вариантов осуществления вышеуказанное заболевание выбрано из группы, включающей астму, рассеянный склероз и воспалительное заболевание кишечника. В других вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой болезнь Крона. В еще других вариантах осуществления указанное заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ получения соединения формулы I



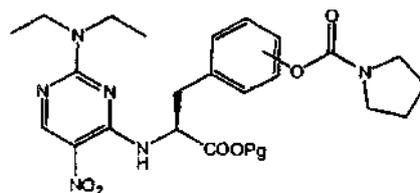
I

где R^1 выбран из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_4 галоалкила; и

R^2 выбран из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила и C_3 - C_6 циклоалкила;

или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров, причем данный способ включает:

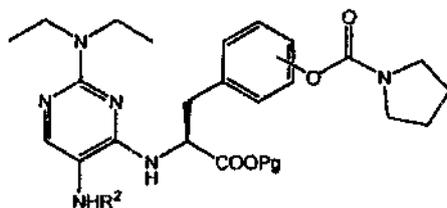
а) взаимодействие соединения формулы III



III

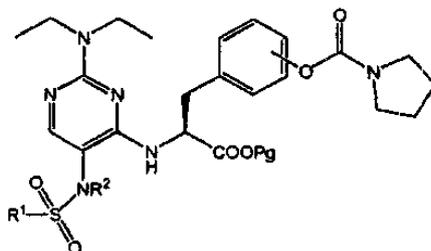
где Pg представляет собой защитную группу карбоксила, с C_1 - C_4 альдегидом или кетоном, C_2 - C_4 алкенилальдегидом или кетоном, C_2 - C_4 алкинилальдегидом или кетоном, C_3 - C_6 циклоалкилкетоним и

бензальдегидом в условиях восстановительного аминирования после восстановления нитрогруппы в формуле III до первичного амина для получения соединения формулы IV



IV

b) взаимодействие соединения IV с сульфонилогалогенидом формулы R^1SO_2Z , где Z представляет собой гало, при котором образуется соединение формулы V

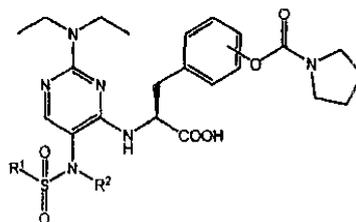


V

и

с) удаление защитной группы карбоксила для получения соединения формулы I.

В другом аспекте настоящее изобретение представляет способ получения соединений формулы I



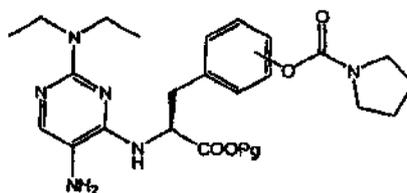
I

где R^1 выбран из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила и C_1 - C_4 галоалкила; и

R^2 выбран из группы, состоящей из C_1 - C_4 алкила, C_2 - C_4 алкенила, C_2 - C_4 алкинила и C_3 - C_6 циклоалкила,

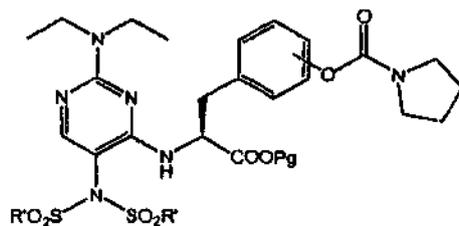
или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров, причем данный способ включает

a) взаимодействие соединения формулы VI



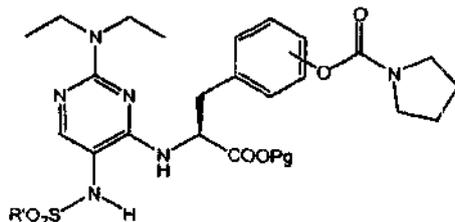
VI

где Pg представляет защитную группу карбоксила, с избытком R^1SO_2X для получения соединения формулы VII



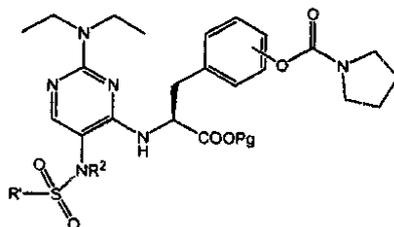
VII

b) избирательное удаление одной группы $-SO_2R'$ из соединения формулы VII для получения соединения формулы VIII



VIII

с) взаимодействие соединения VIII с алкилирующим агентом формулы R^2-X , где X представляет собой гало, или диметилсульфатом, где R^2 представляет собой метил, с образованием соединения формулы IX



IX

и

d) удаление защитной группы карбоксила для получения соединения формулы I.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Как утверждается выше, настоящее изобретение относится к соединениям, которые ингибируют адгезию лейкоцитов и, в частности, адгезию лейкоцитов, опосредованную, по меньшей мере частично, интегринами $\alpha 4$, предпочтительно VLA4. Тем не менее, для описания настоящего изобретения в дальнейших деталях сначала будут даны определения используемых терминов.

Определения.

Если не указано иначе, следующие ниже термины, используемые в описании и формуле изобретения, имеют значения, приведенные ниже.

Как используют в данном контексте и пока не указано иначе, термин "алкил" относится к одновалентным неразветвленным и разветвленным углеводородным группам, имеющим от 1 до 4 атомов углерода и предпочтительно 1-3 атома углерода. Данный термин иллюстрирует такие группы, как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил.

Термин "алкенил" относится к неразветвленным или разветвленным одновалентным углеводородным группам, состоящим из 2-4 атомов углерода и предпочтительно из 2-3 атомов углерода и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно 1 центр виниловой ($>C=C<$) ненасыщенности. Примеры данных алкенильных групп включают винил ($-CH=CH_2$), аллил ($-CH_2CH=CH_2$), н-пропен-1-ил ($-CH=CHCH_3$), н-бутен-2-ил ($-CH_2CH=CHCH_3$) и т.п. В данный термин включают цис- и транс-изомеры и смеси данных изомеров.

Термин "алкинил" относится к неразветвленным или разветвленным одновалентным углеводородным группам, содержащим от 2 до 4 атомов углерода и предпочтительно 2-3 атома углерода и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно 1 центр ацетиленовой $-C\equiv C-$ ненасыщенности. Примеры данных алкинильных групп включают ацетиленил ($-C\equiv CH$), пропаргил ($-CH_2C\equiv CH$), н-пропин-1-ил ($-CH\equiv CHCH_3$) и т.п.

Термин "гало" или "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду и предпочтительно представляет собой фтор или хлор.

Термин "галоалкил" относится к алкильным группам, содержащим от 1 до 5 галогрупп. Предпочтительно, когда данные группы содержат от 1 до 3 галогрупп и 1-2 атома углерода. Примеры галоалкильных групп включают галометил (например, фторметил), дигалометил (например, дифторметил), тригалометил (например, трифторметил), галозтил (например, 2-хлорэт-1-ил), тригалозтил (например, 2,2,2-трифторэт-1-ил), галопропил (например, 3-хлорпроп-1-ил) и тригалопропил (например, 3,3,3-трифторпроп-1-ил).

"Фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель, который используют при получении фармацевтической композиции, которая в основном безопасна, нетоксична и не является ни биологически, ни иным образом нежелательной и включает носитель, который приемлем для ветеринарного применения, а также в качестве фармацевтического применения для человека. "Фармацевтически приемлемый носитель", как используют в описании и формуле изобретения, включает как один, так и более чем один такой носитель.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений, соответствующих данному изобретению, и которые не являются биологически или иным образом нежелательными. Во многих случаях соединения, соответствующие данному изобретению, способны к формированию солей кислот и/или оснований в силу присутствия амино- и/или карбоксильных групп или подобных им групп.

Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли можно получить из неорганических и органических оснований. Соли, полученные из неорганических оснований, включают, например, соли натрия, калия, лития, аммония, кальция и магния. Соли, полученные из органических оснований, включают, но без ограничения перечисленным, соли первичных, вторичных и третичных аминов, таких как алкиламины, диалкиламины, триалкиламины, замещенные алкиламины, ди(замещенный алкил)амины, три(замещенный алкил)амины, алкениламины, диалкениламины, триалкенил амины, замещенные алкениламины, ди(замещенный алкенил)амины, три(замещенный алкенил)амины, циклоалкиламины, ди(циклоалкил)амины, три(циклоалкил)амины, замещенные циклоалкиламины, дизамещенные циклоалкиламины, тризамещенные циклоалкиламины, циклоалкениламины, ди(циклоалкенил)амины, три(циклоалкенил)амины, замещенные циклоалкениламины, дизамещенный циклоалкениламин, тризамещенные циклоалкениламины, ариламины, диариламины, триариламины, гетероариламины, дигетероариламины, тригетероариламины, гетероциклические амины, дигетероциклические амины, тригетероциклические амины, смешанные ди- и триамины, в которых по меньшей мере два из заместителей на амине различны и выбраны из группы, состоящей из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, арила, гетероарила, гетероцикла и т.п. Включены также амины, в которых два или три заместителя совместно с атомом азота амина формируют гетероциклическую или гетероарильную группу.

Примеры подходящих аминов включают, только в качестве иллюстрации, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, три(изопропил)амин, три(н-пропил)амин, этаноламин, 2-диметиламиноэтанол, трометамин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, N-алкилглюкамины, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, морфолин, N-этилпиперидин и т.п. Следует также иметь в виду, что другие производные карбоновых кислот можно также использовать в практической реализации данного изобретения, например амиды карбоновых кислот, включая карбоксамиды, низший алкилкарбоксамиды, диалкилкарбоксамиды и т.п.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли можно получить из неорганических и органических кислот. Соли, полученные из неорганических кислот, включают соли хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты и т.п. Соли, полученные из органических кислот, включают соли уксусной кислоты, пропионовой кислоты, гликолевой кислоты, пировиноградной кислоты, щавелевой кислоты, яблочной кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, п-толуолсульфоновой кислоты, салициловой кислоты и т.п.

Термин "фармацевтически приемлемый катион" относится к катиону фармацевтически приемлемой соли.

Следует иметь в виду, что не предусмотрено включение в данном контексте всех замещенных групп, определенных в данном контексте, полимеров, полученных с помощью определенных заместителей с дальнейшими заместителями на них самих (например, замещенного арила, имеющего замещенную арильную группу в качестве заместителя, который сам является замещенным замещенной арильной группой и т.п.). В данных случаях максимальное число таких заместителей составляет три. Иначе говоря, каждое из вышеприведенных определений ограничено пределом, так что, например, замещенные арильные группы ограничены группой -замещенный арил-(замещенный арил)-(замещенный арил). Термин "лечить" или "лечение" заболевания включает:

(1) предупреждение заболевания, т.е. создание условий, при которых симптомы заболевания не раз-

виваются у млекопитающего, которое может подвергнуться воздействию или предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает или не проявляет симптомов заболевания,

(2) подавление заболевания, т.е. остановку или снижение уровня развития заболевания или его клинических симптомов или

(3) облегчение заболевания, т.е. создание условий для обратного развития заболевания или его клинических симптомов.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, которое при введении млекопитающему для лечения заболевания достаточно для осуществления данного лечения заболевания.

"Терапевтически эффективное количество" будет варьировать в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести и возраста, массы тела и т.п. млекопитающего, лечение которого предусматривают.

Интегрины представляют собой большое семейство гомологичных трансмембранных линкерных белков, которые являются основными рецепторами на клетках животных для связывания большинства белков внеклеточного матрикса, таких как коллаген, фибронектин и ламинин. Интегрины представляют собой гетеродимеры, состоящие из α -цепи и β -цепи.

В настоящее время идентифицировано двадцать различных гетеродимеров интегрин, включающих 9 различных α -субъединиц и 14 различных β -субъединиц. Термин "интегрины $\alpha 4$ " относится к классу гетеродимерных связанных с ферментом клеточных поверхностных рецепторов, которые содержат субъединицу $\alpha 4$, спаренную с любой из β -субъединиц. VLA-4 является примером интегрин $\alpha 4$ и представляет собой гетеродимер субъединиц $\alpha 4$ и $\beta 1$, и его также называют интегрин $\alpha 4 \beta 1$.

Получение соединений

Соединения, соответствующие настоящему изобретению, можно получить из легкодоступных исходных материалов, используя общие способы и процедуры. Следует иметь в виду, что когда приводят типичные или предпочтительные условия процесса (т.е. температуры реакции, время, молярные соотношения реагентов, растворители, давления и т.д.), могут быть также использованы другие условия, если не указано иначе, реакции могут варьировать в зависимости от конкретных используемых реагентов и растворителей, но данные условия может определить компетентный специалист в области техники путем рутинных методик оптимизации.

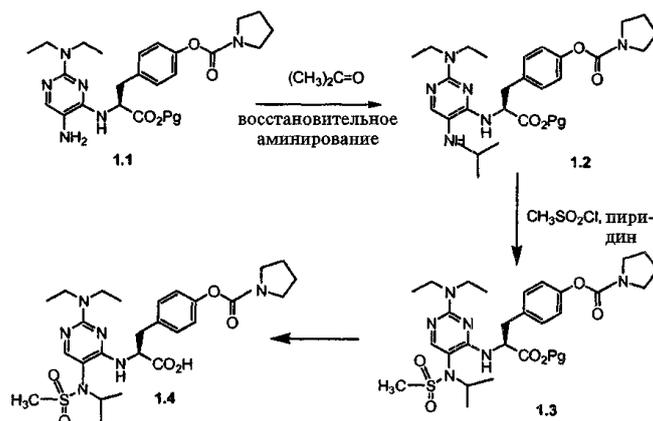
Кроме того, как будет очевидно компетентным специалистам в области техники, могут быть необходимы принятые защитные группы, чтобы предупредить вступление ряда функциональных групп в нежелательные реакции. Подходящие защитные группы для различных функциональных групп, а также подходящие условия для защиты и снятия защиты с конкретных функциональных групп хорошо известны в области техники. Например, многие защитные группы описаны в монографии T.W. Greene и G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Защитные группы в органическом синтезе), 2 изд., Wiley, New York, 1991, и ссылок, приведенных в данном контексте.

Более того, соединения, соответствующие настоящему изобретению, будут, как правило, содержать один или более хиральных центров. Соответственно при необходимости данные соединения можно получить или выделить в виде чистых стереоизомеров, т.е. в виде индивидуальных энантиомеров или диастереомеров или в виде смесей, обогащенных стереоизомерами. Все указанные стереоизомеры (и обогащенные смеси) включены в объем настоящего изобретения, если не указано иначе. Чистые стереоизомеры (или обогащенные смеси) можно получить, используя, например, оптически активные исходные материалы или стереоселективные реагенты, хорошо известные в области техники. Альтернативно можно разделить рацемические смеси данных соединений, используя, например, хиральную колоночную хроматографию, хиральные разделяющие агенты и т.п.

Большинству соединений, соответствующих настоящему изобретению, присваивают названия, используя ChemDraw v. 10.0 (имеется в фирме CambridgeSoft, 100 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140).

В одном варианте осуществления соединения, соответствующие настоящему изобретению, можно получить, как показано ниже на схеме 1, на которой только с целью иллюстрации R^1 представляет собой метил и R^2 представляет собой изопропил.

Схема 1



где Pg представляет собой защитную группу карбоксила, такую как бензил, трет-бутил и т.п.

Схема 1 особенно эффективна при получении соединений, в которых R^2 представляет собой алкил или циклоалкил.

На схеме 1 исходные 5-аминопиримидиновые промежуточные продукты, соединение 1.1, описаны в деталях в патенте США № US 7026328 В1 и только с целью иллюстрации показаны на данной схеме как 4-замещенные фенилаланиновые производные. Конечно, следует иметь в виду, что 2- и 3-замещенные фенилаланиновые производные получали бы с помощью аналогичной последовательности реакций.

В частности, на схеме 1 проводят реакцию 5-амино-2-диэтиламино-4-замещенного пиримидина, соединение 1.1 (полученного из соответствующего 5-нитропиримидина путем восстановления 5% Pd/C или 5% PtO₂ по массе), в принятых условиях восстановительного аминирования с небольшим избытком C₁-C₄альдегида или кетона, который на схеме 1 иллюстрируют ацетоном. На схеме 1 5-аминогруппа соединения 1.1 образует промежуточный имин (не показан), который *in situ* восстанавливают до соответствующего амина, соединения 1.2, принятыми восстановителями, такими как цианоборогидрид натрия, борогидрид натрия, водород над подходящим катализатором, таким как PtO₂, и т.п. Реакцию проводят в подходящем инертном носителе, таком как тетрагидрофуран, метилхлорид и т.п. Реакцию поддерживают при температуре от приблизительно 0 до приблизительно 30°C, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение приблизительно 0,5-16 ч. После завершения реакции соединение 1.2 выделяют принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п. или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Превращение аминогруппы в соединении 1.2 в соответствующую алкилсульфониламиногруппу соединения 1.3 осуществляют принятыми способами. Например, в одном способе соединение 1.2 взаимодействует с небольшим избытком алкансульфонилгалогенида, такого как метансульфонилхлорид в присутствии подходящего основания, такого как триэтиламин, диизопропилэтиламин и т.п., с целью связывания образованной кислоты. Предпочтительно, когда реакцию проводят в подходящем инертном растворителе, таком как тетрагидрофуран, диоксан, хлороформ и т.п.

Предпочтительно, когда реакцию проводят при температуре от приблизительно -5 до 30°C и продолжают, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение 0,5-16 ч. После завершения реакции соединение 1.3 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, использовать на следующей стадии без очистки и/или выделения.

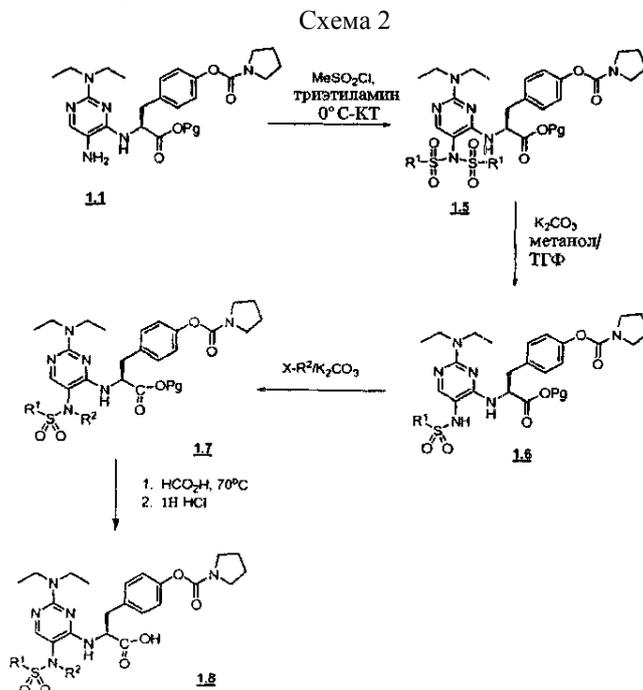
Алкилсульфонилгалогениды представляют собой либо известные соединения, либо соединения, которые можно получить принятыми способами синтеза. Данные соединения, как правило, получают из соответствующей сульфоновой кислоты, т.е. из соединений формулы R¹-SO₃H, где R¹ такое, как определено выше, при использовании трихлорида фосфора и пентахлорида фосфора. Реакцию, как правило, проводят путем взаимодействия сульфоновой кислоты с приблизительно 2-5 мол. экв. трихлорида фосфора или пентахлорида фосфора, либо в неразбавленном виде, либо в инертном растворителе, таком как дихлорметан, при температуре в интервале от 0 до приблизительно 80°C в течение от приблизительно 1 до приблизительно 48 ч с получением сульфонила хлорида. Альтернативно, сульфонила хлорид можно получить из соответствующего тиолового соединения, т.е. из соединения формулы R¹-SH, где R¹ такое, как определено выше, путем обработки тиола хлором (Cl₂) и водой в принятых условиях реакции.

Примеры сульфонила хлоридов для применения в настоящем изобретении включают, но без ограничения перечисленным, метансульфонилхлорид, этансульфонилхлорид, 2-пропансульфонилхлорид, 1-бутансульфонилхлорид, трифторметансульфонилхлорид, 2,2,2-трифторэтансульфонилхлорид и т.п.

Затем защитную группу карбоксила соединения 1.3 удаляют в принятых условиях, получая соединение 1.4, соединение формулы I. В одном варианте осуществления защитную группу трет-бутила мож-

но удалить путем взаимодействия с муравьиной кислотой. В другом варианте осуществления защитную группу бензила можно удалить путем взаимодействия с водородом в присутствии катализатора палладий/уголь, как правило, в протонном растворителе, таком как метанол, при повышенном давлении водорода. После завершения реакции соединение 1.4 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п.

В другом варианте осуществления соединения, соответствующие настоящему изобретению, можно получить, как показано на схеме 2.



где R^1 и R^2 такие, как определено в данном контексте; P_g представляет собой защитную группу карбоксила, а X означает гало.

На схеме 2 исходные 5-аминопиримидиновые промежуточные продукты, соединение 1.1, описаны в деталях в патенте США № US 7026328 B1 и только с целью иллюстрации показаны на данной схеме как 4-замещенные фенилаланиновые производные. Конечно, следует иметь в виду, что 2- и 3-замещенные фенилаланиновые производные получали бы с помощью аналогичной последовательности реакций.

В частности, на схеме 2 проводят реакцию 5-амино-2-диэтиламино-4-замещенного пиримидина, соединение 1.1 (полученного из соответствующего 5-нитропиримидина путем восстановления 5% Pd/C или 5% PtO₂ по массе), с небольшим избытком R^1 -сульфонилгалогенида, такого как метансульфонилхлорид, в присутствии подходящего основания, такого как триэтиламин, диизопропилэтиламин и т.п. с целью связывания образующейся кислоты. Предпочтительно, когда реакцию проводят в подходящем инертном растворителе, таком как тетрагидрофуран, диоксан, хлороформ и т.п. Предпочтительно, когда реакцию проводят при температуре от приблизительно -5 до 30°C и продолжают, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение 0,5-16 ч. После завершения реакции соединение 1.5 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, использовать на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Избирательное удаление одной группы $R^1\text{SO}_2$ - из соединения 1.5 осуществляют в принятых условиях. Например, реакция соединения 1.5 с основанием в протонном растворителе, таком как метанол, этанол или вода, необязательно в присутствии ТГФ и т.п., например в смеси 1:1 метанол/тетрагидрофуран или смеси 1:1 вода/тетрагидрофуран, дает соединение 1.6. Реакционная смесь включает избыток подходящего основания, такого как карбонат калия, карбонат натрия и т.п., и предпочтительно, когда реакцию поддерживают при повышенных температурах, таких как 20-60°C. Реакцию продолжают практически до завершения, которое, как правило, происходит в течение 24-144 ч. После завершения реакции соединение 1.6 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

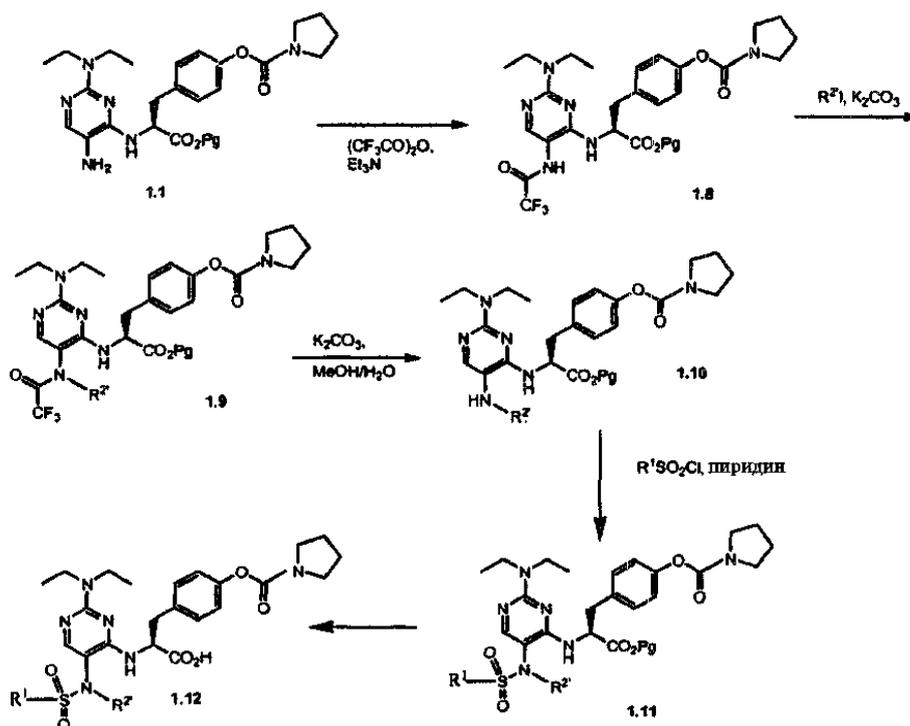
Реакция соединения 1.6 с избытком алкилгалогенида, диалкилсульфата, алкилгалогенида, алкилгалогенида или циклоалкилгалогенида (т.е. X-R^2 -"соединение галогенида") протекает в принятых условиях с получением соединения 1.7. Реакцию, как правило, проводят путем взаимодействия соединения 1.6 с приблизительно от 1,1 до 20 экв. соединения галогенида в инертном растворителе, таком как ацетон, хлороформ, метилхлорид и т.п., в присутствии основания, такого как карбонат калия, триэти-

ламин и т.п., для связывания кислоты, образующейся во время реакции. Предпочтительно, когда реакцию проводят при от приблизительно 20 до 60°C и продолжают практически до завершения реакции, которое, как правило, происходит в течение 0,1-16 ч. После завершения реакции соединение 1.6 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Затем защитную группу карбоксила соединения 1.7 удаляют в принятых условиях, получая соединение 1.8, соединение формулы I. В одном варианте осуществления защитную группу трет-бутила можно удалить путем взаимодействия с муравьиной кислотой. В другом варианте осуществления защитную группу бензила можно удалить путем взаимодействия с водородом в присутствии катализатора палладий/уголь, как правило, в протонном растворителе, таком как метанол при повышенном давлении водорода. После завершения реакции соединение 1.8 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п.

В еще одном варианте осуществления соединения, соответствующие данному изобретению, получают, как показано ниже на схеме 3.

Схема 3



где R^1 такое, как определено выше, Pg представляет собой защитную группу карбоксила, такую как бензил, трет-бутил и т.п., и R^2 представляет собой алкильную, алкенильную, алкинильную или фенилалкиленовую группу, имеющую структуру CH_2 , присоединенную к группе йода.

На вышеприведенной схеме исходные 5-аминопиримидиновые промежуточные продукты, соединение 1.1, описаны в деталях в патенте США № US 7026328 B1 и только с целью иллюстрации показаны на данной схеме как 4-замещенные фенилalaniновые производные. Конечно, следует иметь в виду, что 2- и 3-замещенные фенилalaniновые производные получали бы с помощью аналогичной последовательности реакций.

В частности, на схеме 1 5-амино-2-диэтиламино-4-замещенный пиримидин, соединение 1.1 (полученный из соответствующего 5-нитропиримидина путем восстановления 5% Pd/C или 5% PtO₂ по массе), превращают в соответствующий трифторацетамид, соединение 1.8 принятыми способами. Например, небольшой избыток трифторуксусного ангидрида смешивают с соединением 1.1 в подходящем инертном разбавителе, таком как тетрагидрофуран, метиленхлорид, пиридин и т.п. Реакцию поддерживают при температуре от приблизительно 0°C до приблизительно 30°C, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение приблизительно 0,5-16 ч. После завершения реакции соединение 1.8 выделяют принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Превращение соединения 1.8 в соответствующий N(R^2), N-трифторацетамидопиримидин, соединение 1.9, снова осуществляют принятыми способами. Например, избыток галогенида R^2-I смешивают с соединением 1.8 в подходящем инертном носителе, таком как ДМФ, в присутствии избытка подходящего

основания, такого как карбонат калия. В одном варианте осуществления используют приблизительно 2 экв. R²-I и карбоната калия. Реакцию поддерживают в условиях окружающей среды в запечатанном контейнере и продолжают, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение 20-72 ч. После завершения реакции соединение 1.9 выделяют принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Затем трифторацетильную группу удаляют с получением соответствующего амина, соединения 1.10. В данном варианте осуществления трифторацетильная группа действует как защитная группа амина. Как указано выше, данная реакция обычно протекает, например, путем контактирования соединения 1.9 с большим избытком подходящего основания, такого как карбонат калия, в смеси воды и протонного растворителя, такого как метанол. Реакцию проводят при повышенных температурах, таких как 40-60°C, и продолжают, пока реакция практически не завершится. После завершения реакции соединение 1.10 выделяют принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п., или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Далее превращение аминной группы в соединении 1.10 в соответствующую алкилсульфониламидогруппу, соединение 1.11, осуществляют принятыми способами. Например, в одном способе соединение 1.10 контактирует с небольшим избытком алкилсульфонилгалогенида в присутствии подходящего основания, такого как триэтиламин, диэтиламины и т.п., с целью связывания образующейся кислоты. Предпочтительно, когда реакцию проводят в подходящем инертном растворителе, таком как тетрагидрофуран, диоксан, хлороформ и т.п.

Предпочтительно, когда реакцию проводят при температуре от приблизительно 0 до 30°C и продолжают, пока реакция практически не завершится, что, как правило, происходит в течение 2-48 ч. После завершения реакции соединение 1.11 выделяют принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п. или, альтернативно, используют на следующей стадии без очистки и/или выделения.

Затем защитную группу карбоксила соединения 1.11 можно удалить в принятых условиях, получая соединение 1.12, соединение формулы I. В одном варианте осуществления защитную группу трет-бутила можно удалить путем взаимодействия с муравьиной кислотой. В другом варианте осуществления защитную группу бензила можно удалить путем взаимодействия с водородом в присутствии катализатора палладий/уголь, как правило, в протонном растворителе, таком как метанол, при повышенном давлении водорода. После завершения реакции соединение 1.12 можно выделить принятыми способами, включая нейтрализацию, упаривание, экстракцию, осаждение, хроматографию, фильтрование и т.п.

Изобретение также включает сложные эфиры соединений, соответствующих настоящему изобретению. Получение сложных эфиров иллюстрируют на различных схемах, описанных выше, таких как схема 1 (соединение 1.3), на схеме 2 (соединение 1.7) и на схеме 3 (соединение 1.11). Более того, пример 1 описывает получение (S)-4-(3-трет-бутоксигидрокси-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксопропил)фенилпирролидин-1-карбоксилата, и пример 4 описывает получение (S)-4-(3-трет-бутоксигидрокси-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(проп-2-инил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксопропил)фенилпирролидин-1-карбоксилата. Сложные эфиры кислот, соответствующие настоящему изобретению, можно также получить из кислот, как правило, хорошо известных в области техники. Например, сложные метиловые эфиры аминокислот можно получить, используя способ, предложенный в статье Brenner и Huber, *Helv. Chim. Acta* 1953, 36, 1109.

Фармацевтические препараты.

При использовании в качестве фармацевтических агентов соединения, соответствующие настоящему изобретению, обычно вводят в форме фармацевтических композиций. Данные соединения можно вводить множеством путей, включая пероральный, ректальный, чрескожный, подкожный, внутривенный, внутримышечный и интраназальный. Данные соединения эффективны как в инъекционной, так и в пероральной композициях. Такие композиции получают способом, хорошо известным в области фармацевтики, и они включают по меньшей мере одно активное соединение.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, которые содержат в качестве активного ингредиента по меньшей мере одно соединение из вышеприведенных формул I-II, ассоциированных с фармацевтически приемлемыми носителями. При получении композиций, соответствующих настоящему изобретению, активный ингредиент обычно смешивают с наполнителем, разбавляют наполнителем или заключают в носитель, который может быть в форме капсулы, пакетиков, бумажного или иного контейнера. Используемый наполнитель, как правило, представляет собой наполнитель, подходящий для введения человеку или животным. Когда наполнитель служит в качестве разбавителя, он может представлять собой твердый, полутвердый или жидкий материал, который действует как транспортный агент, носитель или среда для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут находиться в форме таблеток, пилюль, порошков, лепешек, пакетиков, облаток, эликсиров, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (как твердых, так и в жидкой среде), мазей, содержащих, на-

пример, до 10 мас.% активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиториев, стерильных инъекционных растворов и стерильных упакованных порошков.

При приготовлении препарата может потребоваться измельчение активного соединения для получения частиц подходящего размера перед смешиванием с другими ингредиентами. Если активное соединение в существенной степени нерастворимо, его обычно измельчают для получения частиц размером меньше чем 200 меш. Если активное соединение в существенной степени водорастворимо, размер частиц обычно доводят измельчением до получения практически однородного распределения в препарате, например, приблизительно 40 меш.

Некоторые примеры подходящих наполнителей включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, манит, крахмалы, акациевую камедь, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп и метилцеллюлозу. Препараты могут дополнительно включать скользящие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты, эмульгаторы и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenzoаты; подсластители и вкусовые добавки. Композиции, соответствующие изобретению, могут быть составлены так, чтобы обеспечивать быстрое, замедленное или задержанное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту при использовании способов, известных в уровне техники.

Введение терапевтических агентов с помощью внутривенного препарата хорошо известно в фармацевтической промышленности. Внутривенный препарат должен обладать рядом качеств помимо того, что он представляет собой только композицию, в которой растворен лечебный фактор. Например, препарат должен способствовать общей стабильности активного ингредиента(ов), кроме того, производство препарата должно быть экономически эффективным. Все из данных факторов в конечном счете определяют общий успех и применимость внутривенного препарата.

Другие дополнительные добавки, которые могут быть включены в фармацевтические препараты соединений, соответствующих настоящему изобретению, представлены следующими: растворители - этанол, глицерин, пропиленгликоль; стабилизаторы - этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), лимонная кислота; антимикробные консерванты - бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен; забуферивающие агенты - лимонная кислота/цитрат натрия, гидротартрат калия, гидротартрат натрия, уксусная кислота/ацетат натрия, малеиновая кислота/малеат натрия, гидрофталат натрия, фосфорная кислота/дигидрофосфат калия, фосфорная кислота/гидрофосфат динатрия и модификаторы тоничности - хлорид натрия, маннит, декстроза.

Присутствие буфера может быть необходимо для поддержания водного pH в интервале от приблизительно 4 до приблизительно 8 и более предпочтительно в интервале от приблизительно 4 до приблизительно 6. Буферная система представляет собой, как правило, смесь слабой кислоты и ее растворимой соли, например цитрата натрия/лимонной кислоты, или однокатионную либо двукатионную соли двухосновной кислоты, например гидротартрат калия, гидротартрат натрия, фосфорная кислота/дигидрофосфат калия, фосфорная кислота/гидрофосфат динатрия.

Используемое количество буферной системы зависит от (1) требуемого pH и (2) количества лекарственного препарата. Как правило, используемое количество буфера составляет 0,5:1 - 50:1 в мольном соотношении состава буфер:лекарственный препарат (где моли буфера принимают как объединенные моли ингредиентов буфера, например цитрата натрия и лимонной кислоты) для поддержания pH в интервале 4-8 и, как правило, используют мольное соотношение 1:1 - 10:1 буфера (объединенного) к присутствующему лекарственному препарату.

Одним из используемых в изобретении буферов является цитрат натрия/лимонная кислота в интервале 5-50 мг/мл цитрата натрия к 1-15 мг/мл лимонной кислоты, что достаточно для поддержания водного pH 4-6 композиции.

Буферный агент может также способствовать предотвращению осаждения лекарственного препарата при образовании растворимого комплекса металла с растворенными ионами металла, например Ca, Mg, Fe, Al, Ba, которые могут выделяться из стеклянных контейнеров или резиновых пробок либо присутствовать в обычной водопроводной воде. Агент может действовать как конкурентный комплексирующий агент с лекарственным препаратом и образовывать растворимый комплекс металла, приводящий к присутствию нежелательных частиц.

Кроме того, присутствие агента, например хлорида натрия, в количестве приблизительно 1-8 мг/мл, для подведения тоничности до одинакового значения с кровью человека может потребоваться, чтобы избежать набухания или сморщивания эритроцитов при введении внутривенного препарата, приводящего к нежелательным побочным эффектам, таким как тошнота или диарея, и, возможно, к ассоциированным нарушениям крови. Как правило, тоничность препарата соответствует тоничности крови человека, которая лежит в интервале 282-288 мОсм/кг и, как правило, составляет 285 мОсм/кг, что эквивалентно осмотическому давлению, соответствующему 0,9% раствору хлорида натрия.

Внутривенный препарат можно ввести путем прямой внутривенной инъекции, внутривенного болюса или можно ввести путем инфузии посредством добавления к соответствующему инфузионному раствору, такому как инъекционный 0,9% хлорид натрия или другому совместимому инфузионному рас-

твору.

Предпочтительно, когда композиции готовят в виде единичной пероральной лекарственной формы, где каждая доза содержит от приблизительно 1 до приблизительно 250 мг, чаще от приблизительно 5 до приблизительно 100 мг, например от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг активного ингредиента. Термин "единичная лекарственная форма" относится к физически отдельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для человека и животных, причем каждая единица включает предварительно заданное количество активного начала, рассчитанное так, чтобы получить требуемый терапевтический эффект, в сочетании с подходящим фармацевтическим наполнителем.

Активное соединение эффективно в широком диапазоне доз и, как правило, вводится в терапевтически эффективном количестве. Однако следует иметь в виду, что количество соединения, вводимое фактически, будет определять лечащий врач в свете соответствующих обстоятельств, включая состояние, лечение которого предусматривают, выбранный путь введения, действительное соединение, которое вводят, возраст, массу тела и ответ конкретного больного, тяжесть симптомов у больного и т.п.

Для получения композиций в твердой форме, таких как таблетки, основной активный ингредиент смешивают с фармацевтическим наполнителем с формированием твердой предварительной перед получением препарата композицией, содержащей однородную смесь соединения, соответствующего настоящему изобретению. Называя данные предварительные перед получением препарата композиции однородными, имеют в виду, что активный ингредиент распределен равномерно по всей композиции, поэтому композицию можно легко разделить на одинаково эффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, пилюли и капсулы. Данный твердый предварительный препарат затем разделяют на унифицированные лекарственные формы вышеописанного типа, содержащие, например, от 0,1 до приблизительно 500 мг активного ингредиента, соответствующего настоящему изобретению.

Таблетки или пилюли, соответствующие настоящему изобретению, могут быть покрытыми и иным образом составлены, чтобы представить лекарственную форму, дающую преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля могут включать внутренний и наружный лекарственные компоненты, причем последний может находиться в форме покрытия на первом. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который служит для придания устойчивости к распаду в желудке и позволяет внутреннему компоненту проходить интактным в двенадцатиперстную кишку или задерживать его высвобождение. Множество материалов может быть использовано для данных энтеросолюбильных слоев или покрытий, причем данные материалы включают ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Жидкие формы, в которые могут быть включены новые композиции, соответствующие настоящему изобретению, для введения перорально или путем инъекции включают водные растворы, соответственно, сиропы с вкусовыми добавками, водные или масляные суспензии и эмульсии с вкусовыми добавками со съедобными маслами, такими как хлопковое масло, кунжутное масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также эликсиры и аналогичные фармацевтические носители.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые наполнители, как описано выше. Предпочтительно, когда композиции вводят пероральным или назальным респираторным путем для получения местного или системного эффекта. Композиции в предпочтительных фармацевтически приемлемых растворителях можно разбрызгивать при использовании инертных газов. Разбрызгиваемые растворы можно вдыхать непосредственно из распылителя, или распылитель может быть присоединен к маскам для лица, тенту или дыхательному аппарату с переменным положительным давлением. Раствор, суспензию или порошковые композиции можно вводить предпочтительно перорально или назально из устройств, которые доставляют препарат соответствующим образом.

Следующие примеры препаратов иллюстрируют фармацевтические композиции, соответствующие настоящему изобретению.

Пример препарата 1.

Получают твердые желатиновые капсулы, содержащие следующие ингредиенты:

Ингредиент	Количество (мг/капсулу)
Активный ингредиент	30,0
Крахмал	305,0
Стеарат магния	5,00

Вышеуказанные ингредиенты смешивают и наполняют ими твердые желатиновые капсулы в количестве 340 мг.

Пример препарата 2.

Состав для таблеток получают при использовании нижеуказанных ингредиентов:

Ингредиент	Количество (мг/таблетку)
Активный ингредиент	25,0
Целлюлоза, микрокристаллическая	200,0
Коллоидный диоксид кремния	10,0
Стеариновая кислота	5,0

Компоненты измельчают и прессуют с формированием таблеток, массой 240 мг каждая.

Пример препарата 3.

Получают ингаляционный препарат в виде сухого порошка, содержащий следующие компоненты:

Ингредиент	Масса %
Активный ингредиент	5
Лактоза	95

Активный ингредиент смешивают с лактозой и добавляют смесь в ингаляционное устройство для сухого порошка.

Пример препарата 4.

Таблетки, каждая из которых содержит 30 мг активного ингредиента, получают следующим образом:

Ингредиент	Количество (мг/таблетку)
Активный ингредиент	30,0 мг
Крахмал	45,0 мг
Микрокристаллическая целлюлоза	35,0 мг
Поливинилпирролидон (в виде 10% раствора в стерильной воде)	4,0 мг
Карбоксиметилкрахмал натрий	4,5 мг
Стеарат магния	0,5 мг

Ингредиент	Количество (мг/таблетку)
Тальк	1,0 мг

Активный ингредиент, крахмал и целлюлозу пропускают через сито 20 меш США и тщательно перемешивают. Раствор поливинилпирролидона смешивают с полученными в результате порошками, которые затем пропускают через сито 16 меш США. Полученные таким образом гранулы сушат при 50-60°C и пропускают через сито 16 меш США.

Карбоксиметилкрахмал натрий, стеарат магния и тальк предварительно пропускают через сито 30 меш США и затем добавляют к гранулам, которые после перемешивания прессуют на таблетировочной машине, получая таблетки массой 120 мг каждая.

Пример препарата 5.

Капсулы, каждая из которых содержит 40 мг лекарственного препарата, изготавливают следующим образом:

Ингредиент	Количество (мг/капсулу)
Активный ингредиент	40,0 мг
Крахмал	109,0 мг
Стеарат магния	1,0 мг
Итого	150,0 мг

Активный ингредиент, крахмал и стеарат магния смешивают, пропускают через сито 20 меш США и наполняют полученной смесью твердые желатиновые капсулы в количестве 150 мг.

Пример препарата 6.

Суппозитории, содержащие по 25 мг активного ингредиента каждый, получают следующим образом:

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	25 мг
Глицериды насыщенных жирных кислот	до 2000 мг

Активный ингредиент пропускают через сито 60 меш США и суспендируют в глицеридах насыщенных жирных кислот, предварительно расплавленных с использованием минимального необходимого нагревания. Затем смесь выливают в форму для суппозиториев номинальной емкостью 2,0 г и позволяют охладиться.

Пример препарата 7.

Суспензии, каждая из которых содержат 50 мг лекарственного препарата/дозу 5,0 мл, получают следующим образом:

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	50,0 мг
Ксантановая камедь	4,0 мг

Ингредиент	Количество
Карбоксиметилцеллюлоза натрий (11%)	
Микрокристаллическая целлюлоза (89%)	50,0 мг
Сахароза	1,75 г
Бензоат натрия	10,0 мг
Вкусовые добавки и красители	в достаточном количестве
Очищенная вода	до 5,0 мл

Активный ингредиент, сахарозу и ксантановую камедь смешивают, пропускают через сито 10 меш США и затем смешивают с предварительно приготовленным раствором микрокристаллической целлюлозы и карбоксиметилцеллюлозы натрия в воде. Бензоат натрия, вкусовые добавки и краситель разводят в некотором количестве воды и добавляют при перемешивании. Затем добавляют воду в достаточном количестве для получения требуемого объема.

Пример препарата 8.

Ингредиент	Количество (мг/капсулу)
Активный ингредиент	15,0 мг
Крахмал	407,0 мг

Ингредиент	Количество (мг/капсулу)
Стеарат магния	3,0 мг
Итого	425,0 мг

Активный ингредиент, крахмал и стеарат магния смешивают, пропускают через сито 20 меш США и полученной смесью наполняют твердые желатиновые капсулы в количестве 425,0 мг.

Пример препарата 9.

Подкожный препарат можно получить следующим образом:

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	5,0 мг
Кукурузное масло	1,0 мл

Пример препарата 10.

Внутривенный препарат можно получить следующим образом:

Ингредиент	Количество
Активный ингредиент	250 мг
Изотонический солевой раствор	1000 мл

В другом препарате, используемом в способах, соответствующих настоящему изобретению, применяют устройства для чрескожной доставки ("пластыри"). Данные чрескожные пластыри можно использовать для получения непрерывной или прерывающейся инфузии соединений, соответствующих настоящему изобретению, в контролируемых количествах. Конструкция и применение чрескожных пластырей для доставки фармацевтических агентов хорошо известны в области техники. См., например, патент США 5023252, выданный 11 июня 1991 г., в данном контексте включенный в виде ссылки. Данные пластыри можно сконструировать для непрерывной, пульсирующей доставки или доставки фармацевтических агентов по требованию.

Часто бывает желательно или необходимо ввести фармацевтическую композицию в головной мозг либо прямо, либо непрямым образом. Методы прямого введения обычно включают размещение катетера для доставки лекарственного препарата в желудочковую систему хозяина, чтобы обойти гематоэнцефалический барьер. Одна из данных имплантируемых систем доставки, используемая для доставки биологических факторов в специфические анатомические области тела, описана в патенте США 5011472, который в данном контексте включен в виде ссылки.

Непрямые методы обычно включают приготовление композиций, чтобы получить скрытую форму лекарственного препарата путем превращения гидрофильных лекарственных препаратов в лекарственные препараты, растворимые в жирах. Получение скрытой формы, как правило, осуществляют блокированием гидроксильных, карбонильных, сульфатных и первичных аминогрупп, присутствующих в лекарственном препарате, чтобы сделать лекарственный препарат более растворимым в липидах и способным к транспорту через гематоэнцефалический барьер. Альтернативно доставку гидрофильных лекарственных препаратов можно усилить внутриартериальной инфузией гипертонических растворов, которые могут временно открыть гематоэнцефалический барьер.

Другие подходящие препараты, предназначенные для использования в настоящем изобретении, можно найти в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences (Справочник Ремингтона по фармацевтическим наукам), Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17 изд. (1985).

Как отмечено выше, соединения, описанные в данном контексте, подходят для использования в

множестве вышеописанных систем доставки лекарственных препаратов. Кроме того, для увеличения полупериода существования введенного соединения в сыворотке *in vivo* соединения могут быть инкапсулированы, введены в полость липосом, получены в виде коллоида или могут быть использованы другие известные методы, которые обеспечивают увеличенный полупериод существования соединения в сыворотке. Существует множество способов получения липосом, как описано, например, в патентах США №№ 4235871, 4501728 и 4837028, выданных Szoka et al., каждый из которых включен в данном контексте в виде ссылки.

Соединения, обладающие желательной биологической активностью, можно модифицировать необходимым образом, чтобы получить требуемые свойства, такие как улучшенные фармакологические свойства (например, стабильность *in vivo*, биодоступность) или способность к определению в диагностических областях применения. Стабильность можно оценить множеством способов, например измерением полупериода существования белков при инкубировании с пептидазами или человеческой плазмой или сывороткой. Описан ряд таких анализов стабильности белка (см., например, статью Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1990. 15(2):83-93).

Конъюгаты, соответствующие настоящему изобретению, представляют собой антагонисты VLA-4 и предусмотрены для получения улучшенного удерживания *in vivo* по сравнению с неконъюгированными соединениями. Данное усовершенствованное удерживание конъюгата в организме приводило бы к более низким требуемым дозам лекарственного препарата, что, в свою очередь, давало бы в результате меньше побочных эффектов и более низкую вероятность токсичности. Кроме того, лекарственный препарат можно вводить пациенту менее часто, достигая при этом аналогичного или улучшенного терапевтического эффекта.

Ожидают, что конъюгаты, соответствующие данному изобретению, будут проявлять ингибирование *in vivo* адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, опосредованной VLA-4, посредством конкурентного связывания с VLA-4. Предпочтительно, когда соединения, соответствующие настоящему изобретению, можно использовать во внутривенных препаратах для лечения заболеваний, опосредованных VLA-4 или адгезией лейкоцитов. Такие заболевания включают воспалительные заболевания у млекопитающих пациентов, такие как астма, болезнь Альцгеймера, атеросклероз, деменция при СПИДе, диабет (включая острый ювенильный диабет), воспалительное заболевание кишечника (включая язвенный колит и болезнь Крона), рассеянный склероз, ревматоидный артрит, трансплантацию тканей, метастазы опухоли, менингит, энцефалит, инсульт и другие церебральные травмы, нефрит, ретинит, атопический дерматит, псориаз, ишемию миокарда и острое опосредованное лейкоцитами повреждение легкого, такое как происходит при респираторном дистресс-синдроме взрослых. Препараты, соответствующие настоящему изобретению, особенно эффективны при лечении воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза Крона и ревматоидного артрита.

Соответствующие модели *in vivo* для демонстрации эффективности при лечении воспалительных состояний включают ЕАЕ (экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит) у мышей, крыс, морских свинок и приматов, а также другие модели воспалений, зависящие от интегринов $\alpha 4$.

Воспалительное заболевание кишечника или "IBD" относится к группе нарушений, которые являются причиной того, что кишка воспаляется, как правило, проявляющиеся симптомами, включающими абдоминальные спазмы и боль, диарею, потерю массы тела и кишечное кровотечение. IBD является общим термином для двух близких заболеваний - язвенного колита ("UC") и болезни Крона ("CD").

Болезнь Крона ("CD") представляет собой хроническое аутоиммунное нарушение, которое приводит в результате к воспалению желудочно-кишечного (ЖК) тракта. Хотя может быть включена любая область ЖК тракта, CD наиболее часто поражает тонкую кишку и/или толстую кишку. При болезни Крона могут принимать участие все слои кишки, и нормальный здоровый участок кишки может находиться между очагами кишки, пораженной болезнью. CD ассоциируется с фиброзом, стенозом и образованием трещин, фистул между больным трактом и прилежащими органами (т.е. мочевым пузырем, другими сегментами кишки, кожей) и абсцессом. У больных CD, как правило, присутствует диарея, абдоминальная боль и потеря массы тела. Абдоминальная боль обычно является бессимптомной и может быть связана с болезненной воспаленной массой. Часто наблюдают повышение температуры, потерю массы тела, стоматит, перианальную фистулу и/или трещину, артрит и узелковую эритему. С CD связана значительная заболеваемость, особенно у пациентов с заболеванием, не контролируемым имеющимися в настоящее время лекарственными препаратами. До 75% пациентов с умеренным-тяжелым заболеванием требуют хирургического вмешательства и до 75% данных пациентов будут после хирургического вмешательства подвержены рецидивам болезни в течение 10 лет и до 50% будут подвергнуты повторному хирургическому вмешательству в течение 20 лет. Данный высокий уровень рецидивов указывает на необходимость новых эффективных лекарственных препаратов как для применения при активной форме заболевания, так и для поддержания ремиссии при заболевании.

Язвенный колит или "UC" представляет собой хроническое эпизодическое воспалительное заболевание толстой кишки и прямой кишки, характеризующееся кровавой диареей. Язвенный колит является воспалительным ответом, ограниченным в значительной степени слизистой и подслизистой кишечника. Язвенный колит можно классифицировать по его местонахождению: "проктит" включает только прямую

кишку, "проктосигмоидит" поражает прямую кишку и сигмовидную кишку, "левосторонний колит" охватывает всю левую сторону толстой кишки, "панколит" охватывает воспалением всю кишку. Лимфоциты и макрофаги многочисленны в повреждениях, вызываемых воспалительной болезнью кишки, и могут вносить вклад в воспалительные повреждения. Иллюстративную модель воспалительного заболевания кишечника на животных (IBD) используют с участием трансгенных крыс HLA-B27. Данные крысы способны к сверхэкспрессии молекулы HLA-B27 человека (ген тяжелой цепи и β -глобулина), которая ассоциирована со спондилоартропатиями, группой воспалительных состояний, поражающих скелет. Перед началом воспалительных изменений скелета у данных животных развивается негрануломатозное воспаление в тонкой кишке и диффузные абсцессы крипт на толстой кишке, патология, которая близка к патологии болезни Крона у человека. Исследования эффективности проводят модели IBD на трансгенных мышцах HLA-B27 с использованием соединений, соответствующих настоящему изобретению, как описано в примере J ниже.

Астма представляет собой заболевание, характеризующееся повышенной чувствительностью трахеобронхиального дерева к различным стимулам, потенцирующим пароксизмальное сокращение бронхиальных дыхательных путей. Стимулы вызывают высвобождение различных медиаторов воспаления из IgE-покрытых мастоцитов, включая гистамин, хемотаксические факторы эозинофилов и нейтрофилов, лейкотриены, простагландин и фактор активации тромбоцитов. Высвобождение данных факторов рекрутирует базофилы, эозинофилы и нейтрофилы, которые вызывают воспалительное повреждение.

Некоторые подходящие модели на животных для изучения астмы *in vivo* могут включать модель астмы на крысах и модель на овцах, как описано в примере E.

Атеросклероз является заболеванием артерий (например, коронарной, сонной, аорты и подвздошной). Основное повреждение, атерома, состоит из приподнятой локальной бляшки в интиме, имеющей липидное ядро и покрывающую фиброзную оболочку. Атеромы нарушают артериальный кровоток и ослабляют пораженные артерии. Инфаркты миокарда и головного мозга представляют собой основное последствие данного заболевания.

Макрофаги и лейкоциты рекрутируют в атеромы и вносят вклад в воспалительное повреждение.

Ревматоидный артрит представляет собой хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание, которое в основном вызывает повреждение и разрушение суставов. Ревматоидный артрит обычно сначала поражает мелкие суставы рук и ног, но затем может включать кисти, локти, лодыжки и колени. Артрит возникает от взаимодействия синовиальных клеток с лейкоцитами, которые путем инфильтрации проходят из кровотока в синовиальную выстилку суставов. См., например, монографию Paul, Immunology (Иммунология) (3 изд., Raven Press, 1993). Со временем может произойти эрозия костей, разрушение хряща и полная потеря целостности сустава. В конечном счете могут быть поражены многие системы органов.

Повреждение сустава при ревматоидном артрите начинается с пролиферации синовиальных макрофагов и фибробластов после запускающего события, возможно, аутоиммунного или инфекционного. Происходит инфильтрация лимфоцитов в периваскулярные области и пролиферация эндотелиальных клеток. Затем имеет место неоваскуляризация. Кровеносные сосуды в пораженном суставе закупориваются маленькими сгустками воспалительных клеток. С течением времени воспаленная синовиальная ткань начинает вести себя неорганизованно, образуя ткань инвазивного паннуса. Паннус проникает и разрушает хрящ и кость. Высвобождается множество цитокинов, интерлейкинов, протеиназ и факторов роста, вызывая дальнейшее разрушение сустава и развитие системных осложнений. См. раздел Firestein G.S. в монографии Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis (Этиология и патогенез ревматоидного артрита), под ред. Ruddy S., Harris E.D., Sledge C.B., Kelley W.N., Kelley's Textbook of Rheumatology (Учебник по ревматологии Келли), 7 изд., Philadelphia: W.B. Saunders, 2005:996-1042.

Подходящие модели на животных для изучения ревматоидного артрита могут включать артрит, вызываемый адьювантами ("AIA"), и артрит, вызываемый коллагеном ("CIA"), как описано в примерах G и H в данном контексте.

Другим показателем для соединений, соответствующих настоящему изобретению, является лечение отторжения органа или трансплантата, опосредованного VLA-4. В последние годы достигнуто значительное повышение эффективности хирургических способов трансплантации тканей и органов, таких как кожа, почка, сердце, легкое, поджелудочная железа и костный мозг. Возможно, основной значительной проблемой является отсутствие удовлетворительных агентов для индукции иммуноtolерантности у реципиента к трансплантированному аллотрансплантату или органу. Когда аллогенные клетки или органы трансплантируют хозяину (т.е. донор и реципиент являются разными субъектами одного вида), иммунная система хозяина, вероятно, усиливает иммунный ответ на чужеродные антигены трансплантата (болезнь хозяина против трансплантата), приводя к разрушению трансплантированной ткани. Клетки CD8⁺, клетки CD4 и моноциты, все они участвуют в отторжении трансплантированных тканей. Соединения, соответствующие настоящему изобретению, которые связываются с интегрином $\alpha 4$, используют, среди прочего, для блокирования иммунных ответов, индуцированных аллоантигеном, у реципиента, препятствуя, таким образом, участию данных клеток в разрушении трансплантированной ткани или органа. См.,

например, статьи Paul et al., *Transplant International* 9, 420-425 (1996); Georczynski et al., *Immunology* 87, 573-580 (1996); Georczynski et al., *Transplant. Immunol.* 3, 55-61 (1995); Yang et al., *Transplantation* 60, 71-76 (1995); Anderson et al., *APMIS* 102, 23-27 (1994).

Похожим является способ применения соединений, соответствующих настоящему изобретению, которые связываются с VLA-4, при модуляции иммунного ответа, участвующего в болезни "трансплантат против хозяина" ("GVHD"). См., например, статью Schlegel et al., *J. Immunol.* 155, 3856-3865 (1995). GVHD представляет собой потенциально летальное заболевание, которое происходит, когда иммунологически компетентные клетки переносятся аллогенному реципиенту. В данной ситуации иммунокомпетентные клетки донора могут атаковать ткани реципиента. Ткани кожи, кишечного эпителия и печени являются частыми мишенями и могут быть разрушены во время протекания GVHD. Заболевание представляет особенно тяжелую проблему, когда трансплантируют иммунную ткань, как при трансплантации костного мозга, но менее тяжелая GVHD, кроме того, также описана в других случаях, включая трансплантаты сердца и печени. Лечебные факторы, соответствующие настоящему изобретению, используют, среди прочего, для блокирования активации донорных Т-клеток, нарушая, таким образом, их способность лизировать клетки-мишени хозяина.

Дополнительное применение соединений, соответствующих настоящему изобретению, представляет собой ингибирование метастазов опухолей. Показано, что ряд опухолевых клеток экспрессирует VLA-4, и соединения, которые связывают VLA-4, блокируют адгезию данных клеток к эндотелиальным клеткам. См. статьи Steinback et al., *Urol. Res.* 23, 175-83 (1995); Orosz et al., *Int. J. Cancer* 60, 867-71 (1995); Freedman et al., *Leuk. Lymphoma* 13, 47-52 (1994); Okahara et al., *Cancer Res.* 54, 3233-6 (1994).

Дополнительное применение соединений, соответствующих настоящему изобретению, представляет собой лечение рассеянного склероза. Рассеянный склероз является прогрессирующим неврологическим аутоиммунным заболеванием, которое поражает по приблизительной оценке 250000-350000 человек в Соединенных Штатах Америки. Считают, что рассеянный склероз является результатом специфической аутоиммунной реакции, в которой некоторые лейкоциты атакуют и инициируют разрушение миелина, отделяющего покрытия, закрывающего нервные волокна. На модели рассеянного склероза на животных показано, что мышинные моноклональные антитела, направленные против VLA-4, блокируют адгезию лейкоцитов к эндотелию и, таким образом, препятствуют воспалению центральной нервной системы и последующему параличу у животных¹⁶.

Фармацевтические композиции, соответствующие изобретению, пригодны для применения в ряде систем доставки лекарственных препаратов. Подходящие для применения в настоящем изобретении препараты можно найти в справочнике Remington's Pharmaceutical Sciences (Справочник Ремингтона по фармацевтическим наукам), Macce Publishing Company, Philadelphia, PA, 17 изд. (1985).

Количество, вводимое пациенту, будет варьировать в зависимости от того, что вводят, с какой целью, такой как профилактики или лечение, состояния пациента, способа введения и т.п. При терапевтическом применении композиции вводят пациенту, уже страдающему от заболевания, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного снятия симптомов заболевания и его осложнений. Количество, адекватное для осуществления этого, определяют как "терапевтически эффективная доза". Количество, эффективные для данного применения, будут зависеть от болезненного состояния, которое лечат, а также от мнения лечащего врача, зависящего от таких факторов, как тяжесть воспаления, возраст, масса тела и общее состояние пациента и т.п., с учетом данных, полученных на соответствующей модели на животном, такие как представлены в данном контексте. Способы оценки подходящих для человека доз, основанные на данных результатах, известны в области техники. (См., например, монографию Wagner, J.G. *Pharmacokinetics for the Pharmaceutical Scientist.* (Фармакокинетика для фармацевтов) Technomic, Inc., Lancaster, PA 1993).

Композиции, вводимые пациенту, находятся в форме вышеописанных фармацевтических композиций. Данные композиции можно стерилизовать с помощью принятых способов стерилизации или можно стерилизовать фильтрованием. Полученные в результате водные растворы можно упаковать для применения в том виде, в котором они находятся, или лиофилизировать, причем перед использованием лиофилизированный препарат смешивают со стерильным водным носителем.

Соединения, обладающие требуемой биологической активностью, можно модифицировать по необходимости, получая требуемые свойства, такие как улучшенные фармакологические признаки (например, стабильность *in vivo*, биодоступность) или способность определяться в диагностических областях применения. Стабильность можно оценить рядом способов, например измерением полупериода существования белков при инкубировании с пептидазами или человеческой плазмой или сывороткой. Описан ряд данных анализов стабильности белков (см., например, статью Verhoef et al., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 1990, 15(2):83-93).

Терапевтическая доза соединений, соответствующих настоящему изобретению, будет варьировать в соответствии, например, с конкретным применением, для которого проводят лечение, способом введения соединения, состоянием здоровья и общим состоянием больного и мнением лечащего врача. Например, для внутривенного введения доза, как правило, будет находиться в интервале от приблизительно 20 до приблизительно 2000 мкг/кг массы тела, предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 500

мкг, более предпочтительно от приблизительно 100 до приблизительно 300 мкг/кг массы тела. Подходящие интервалы доз для интраназального введения в основном составляют от приблизительно 0,1 пг до 1 мг/кг массы тела. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости доза-ответ, полученных на основании тест-систем *in vitro* или на моделях на животных.

Соединения, соответствующие данному изобретению, также способны к связыванию или антагонистическому действию в отношении активности интегринов $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$. Согласно этому, соединения, соответствующие настоящему изобретению, используют также для предупреждения или реверсии симптомов, нарушений или заболеваний, вызываемых связыванием данных интегринов с их соответствующими лигандами.

В другом аспекте изобретения соединения и композиции, описанные в данном контексте, могут быть использованы для ингибирования миграции иммунных клеток из кровотока в центральную нервную систему в случае, например, рассеянного склероза, или в области, которые приводят в результате к вызываемой воспалением деструкции миелина. Предпочтительно, когда реагенты ингибируют миграцию иммунных клеток таким образом, что это ингибирует демиелинизацию и далее может способствовать ремиелинизации. Реагенты могут также препятствовать демиелинизации и стимулировать ремиелинизацию центральной нервной системы при родственных метаболических нарушениях, при которых инфильтрация иммунных клеток действует на развитие миелинового покрытия в основном в ЦНС. Предпочтительно, когда реагенты также снижают паралич при введении пациенту с параличом, вызванным демиелинизирующим заболеванием или состоянием.

Воспалительные заболевания, лечение которых предусмотрено композициями, соединениями и способами, описанными в данном контексте, включают, в основном, состояния, связанные с демиелинизацией. Гистологически миелиновые патологии представляют собой либо демиелинизацию, либо дисмиелинизацию. Демиелинизация подразумевает разрушение миелина. Дисмиелинизация относится к нарушенному образованию или поддержанию миелина в результате дисфункции олигодендроцитов. Предпочтительно, когда композиции и способы, описанные в данном контексте, предусматривают лечение заболеваний и состояний, связанных с демиелинизацией, и помощь при ремиелинизации. Дополнительные заболевания или состояния, лечение которых предусматривают, включают менингит, энцефалит и повреждения спинного мозга и состояния, которые, как правило, вызывают демиелинизацию в результате воспалительной реакции.

Композиции, соединения и коктейли, описанные в данном контексте, предусматривают для применения при лечении состояний и заболеваний, ассоциированных с демиелинизацией. Заболевания и состояния, включающие демиелинизацию, содержат, но без ограничения перечисленным, рассеянный склероз, врожденные нарушения обмена веществ (например, фенилкетонурию (PKU), болезнь Тея-Сакса, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Гоше, синдром Гурлера, болезнь Краббе и другие формы лейкодистрофии, которые поражают развивающуюся оболочку), невропатии с патологической миелинизацией (например, синдром Джиллиана-Барра, хроническая иммунная демиелинизирующая полиневропатия (CIDP), многоочаговая CIDP, многоочаговая двигательная невропатия (MMN), синдром анти-MAG (миелин-ассоциированного гликопротеина), синдром GALOP (аббревиатура от слов Gait disorder, Autoantibody, Late-age, Onset, Polyneuropathy (полиневропатия, развивающаяся в старческом возрасте, сопровождающаяся появлением антител и нарушением походки), синдром антител к сульфатидам, синдром антител к GM2, синдром POEMS (аббревиатура от слов Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, M-Protein and Skin changes (полиневропатия, органомегалия, эндокринопатия, изменения M-белка и кожи), известный также как синдром Кроу-Фуказе и болезнь Такацуки, периневрит, синдром IgM к антителам GDIIb), демиелинизацию, связанную с лекарственными препаратами (например, вызываемую введением хлороквина, FK506, перекисилина, прокаинамида и цимельдина), другие врожденные демиелинизирующие состояния (например, углевод-дефицитный гликопротеин, синдром Кокейна, врожденное гипомиелинирование, врожденную мышечную дистрофию, болезнь Фарбера, синдром Маринеско-Шегрена, метахроматическую лейкодистрофию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, болезнь Рефсума, прионовые состояния и болезнь Салла) и другие демиелинизирующие состояния (например, менингит, энцефалит (известный также как диссеминированный энцефаломиелит, ADEM) или повреждение спинного мозга) или заболевания. Имеются различные модели заболеваний, которые могут быть использованы для изучения данных заболеваний *in vivo*. Например, модели на животных включают, но без ограничения перечисленным

Модель заболевания	Вид
экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE)	Мышь, крыса, морская свинка
EAE, вызванный гликопротеином миелина олигодендроцитов (MOG)	Крыса
Модель демиелинизации с использованием трансгенного TNF- α	Мышь

Наиболее распространенным демиелинизирующим заболеванием является рассеянный склероз ("MS"), но многие другие метаболические и воспалительные нарушения приводят в результате к недостаточной или патологической миелинизации. MS представляет собой хроническое неврологическое заболевание, которое в большинстве случаев возникает в молодости. Только в Соединенных Штатах Америки насчитывают приблизительно 350000 случаев MS. За исключением травмы MS является наиболее частой причиной нетрудоспособности вследствие неврологического заболевания в молодости и в зрелые годы.

Причину MS еще предстоит определить. MS характеризуется хроническим воспалением, демиелинизацией и глиозом (рубцеванием). Демиелинизация может привести в результате как к отрицательным, так и к положительным эффектам на аксональную проводимость. Патологии, связанные с положительной проводимостью, включают замедленную аксональную проводимость, различное блокирование проводимости, которое происходит в присутствии высоко-, но не низкочастотных серий импульсов, или полное блокирование проводимости. Патологии положительной проводимости включают генерацию эктопических импульсов, одновременный или последующий механический стресс и патологическое "перекрестное связывание" демиелинизированных аксонов.

T-клетки, реактивные в отношении миелиновых белков, либо миелинового основного белка (MBP), либо миелинового протеолипидного белка (PLP), как показано, опосредуют воспаление ЦНС при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите. Наблюдают также пациентов, имеющих повышенные уровни иммуноглобулина (Ig) ЦНС. Кроме того, возможно, что некоторые из повреждений тканей, наблюдаемые при MS, опосредованы продуктами цитокинов активированных T-клеток, макрофагов или астроцитов.

В настоящее время 80% пациентов, у которых диагностирован MS, живут 20 лет после начала развития болезни. Варианты лечения для ведения MS включают: (1) лечение, направленное на модификацию течения заболевания, включая лечение острых ухудшений, и направленное на длительное подавление заболевания; (2) лечение симптомов MS; (3) предупреждение и лечение медицинских осложнений и (4) управление вторичными личностными и социальными проблемами.

Начало MS может быть резким или таким мягким, что не заставляет больного обратиться за медицинской помощью. Наиболее распространенные симптомы включают слабость в одной или нескольких конечностях, нечеткость зрения вследствие ретробульбарного неврита, сенсорные нарушения, двоение в глазах и атаксия. Течение болезни можно разделить на три основные категории: (1) рецидивирующий MS, (2) хронический прогрессирующий MS и (3) неактивный MS. Рецидивирующий MS характеризуется повторяющимися приступами неврологической дисфункции. Приступы MS, как правило, включают от нескольких дней до нескольких недель и за ними может последовать полное, частичное выздоровление или не последовать выздоровление. Выздоровление после приступов, как правило, происходит в течение нескольких недель-нескольких месяцев после максимального проявления симптомов, хотя редко некоторое выздоровление может продолжаться в течение 2 или более лет.

Хронический прогрессирующий MS приводит к постепенному ухудшению без периодов стабилизации или ремиссии. Данная форма развивается у больных с рецидивирующим MS в предшествующей истории болезни, хотя у 20% больных не возвращаются никакие рецидивы. Хотя при прогрессирующем течении могут иметь место острые рецидивы.

Третья форма представляет собой неактивный MS. Неактивный MS характеризуется фиксированными неврологическими недостаточностями переменной величины. Большинство пациентов с неактивным MS имеют предшествующую историю болезни рецидивирующим MS.

Течение болезни зависит также от возраста пациента. Например, благоприятные прогностические

факторы включают раннее начало (исключая детство), рецидивирующее течение и незначительную остаточную нетрудоспособность в течение 5 лет после начала. Напротив неблагоприятный прогноз ассоциирован с началом в позднем возрасте (т.е. в возрасте 40 лет и старше) и прогрессирующим течением. Данные варианты взаимозависимы, поскольку хронический прогрессирующий MS имеет тенденцию к началу в более позднем возрасте, чем рецидивирующий MS. Нетрудоспособность при хроническом прогрессирующем MS обычно обусловлена прогрессирующей параплегией или квадриплегией (параличом) у пациентов. В одном аспекте изобретения предпочтительно, когда пациентов будут лечить, когда пациент находится в состоянии ремиссии, а не в стадии рецидива заболевания.

Кратковременное применение либо адренокортикотропного гормона, либо пероральных кортикостероидов (например, перорального преднизона или внутривенного метилпреднизолона) является единственной специфической лечебной мерой для лечения пациентов с острым ухудшением MS.

Более новые способы лечения MS включают лечение пациента интерфероном β -1b, интерфероном β -1a и Сорахоне® (ранее известным как сополимер 1). Показано, что данные три лекарственных препарата существенно снижают уровень рецидивов заболевания. Данные лекарственные препараты вводятся самим больным внутримышечно или подкожно.

Однако ни один из современных способов лечения не подавляет демиелинизацию, не говоря о том, что он способствует или дает возможность спонтанной ремиелинизации или уменьшает паралич. Один аспект изобретения предусматривает лечение MS агентами, описанными в данном контексте, либо в виде монотерапии, либо в комбинации с другими стандартными способами лечения.

Облучение может вызывать демиелинизацию. Считают, что токсичность в отношении центральной нервной системы (ЦНС), обусловленная облучением, является причиной (1) повреждения сосудистых структур, (2) уничтожения предшественников олигодендроцитов-2 астроцитов и зрелых олигодендроцитов, (3) уничтожения популяций нервных стволовых клеток в гиппокампе, мозжечке и коре головного мозга и генерализованных изменений экспрессии цитокинов. Наибольшее радиационное повреждение обусловлено радиотерапией, применяемой при лечении некоторых форм рака. В качестве обзора см. статью Belka et al., 2001 Br. J. Cancer 85: 1233-9. Однако воздействие излучения может быть также причиной у космонавтов (см. статью Horwell, 1994 Adv. Space Res. 14: 433-42), а также событием, обусловленным воздействием радиоактивных веществ.

Предусматривают также паллиативное или облегчающее лечение данных состояний и заболеваний.

Примеры

Следующие примеры синтеза и биологические примеры предлагают для иллюстрации данного изобретения и никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения. Если не указано иначе, все температуры даны в градусах Цельсия. В нижеприведенных примерах следующие сокращения имеют следующие значения. Если сокращение не определено, оно имеет свое общепринятое значение.

Å = ангстремы,

br s = широкий синглет,

BSA = бычий сывороточный альбумин,

d = дублет,

dd = дублет дублетов,

dq = дублет квартетов,

dсекстет = дублет секстетов,

ДМФ = диметилформамид,

EC₅₀ = доза, при которой желательный ответ присутствует у 50% популяции,

ЭДТА = этилендиаминтетрауксусная кислота,

EtOAc = этилацетат,

EtOH = этанол,

Et₃N = триэтиламин,

EM = длина волны эмиссии (в нм),

EX = длина волны возбуждения (в нм),

г = грамм,

HBSS = сбалансированный солевой раствор Хенка,

HEPES = 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота,

HPLC = высокоэффективная жидкостная хроматография,

час или ч = часы,

IC₅₀ = концентрация ингибитора, которая требуется для ингибирования фермента in vitro,

in. = дюйм,

i.p. = внутривентриально,

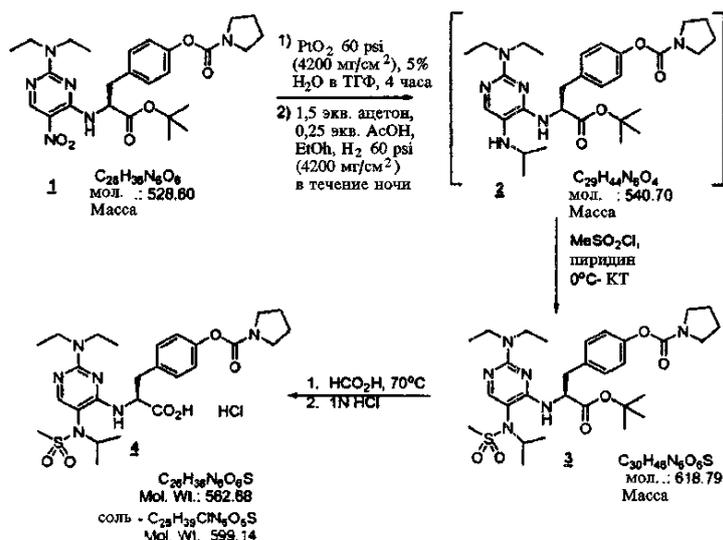
i-PrOH = изопропанол,

кг = килограмм,

л = литр,

ЖХ/МС = жидкостная хроматография/масс-спектрометрия,
 гл = мультиплет,
 m^2 = квадратные метры,
 М = молярный,
 мбар = миллибар,
 мг = миллиграмм,
 МГц = мегагерц,
 мин = минуты,
 мл = миллилитры,
 мм = миллиметры,
 mM = миллимолярный,
 ммоль = миллимоли,
 мОсм = миллиосмоль
 МТВЕ = метил-трет-бутиловый эфир,
 m/z или M/Z = соотношение мас./заряд,
 Н = нормальный,
 нг = нанogramмы,
 нм = нанометры,
 ЯМР = ядерно-магнитный резонанс,
 PBS = забуференный фосфатом солевой раствор,
 PBS++ = PBS с добавлением кальция и магния,
 Промиль = частиц/миллион,
 psi = фунты/квадратный дюйм,
 p.o. = per os (перорально), дословно "через рот", включает пероральный зонд,
 q = квартет,
 q.s. = в достаточном количестве,
 R_f = фактор удерживания (соотношение расстояние, пройдённое субстанцией/расстояние, пройденное фронтом растворителя),
 об./мин = количество оборотов в минуту,
 кт или КТ = комнатная температура,
 R_t = время удерживания,
 s = синглет,
 t = триплет,
 ТФА = трифторуксусная кислота,
 ТГФ = тетрагидрофуран,
 ТСХ = тонкослойная хроматография,
 УФ = ультрафиолет,
 мас./мас. = соотношение массы к массе,
 мас./об. = соотношение массы к объёму,
 мкг = микрограммы,
 мкм = микроны,
 мкМ = микромолярный.
 Пример 1. Получение (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты.
 Протокол синтеза, используемый в примере 1, кратко показан на схеме 4, иллюстрируемой ниже.

Схема 4

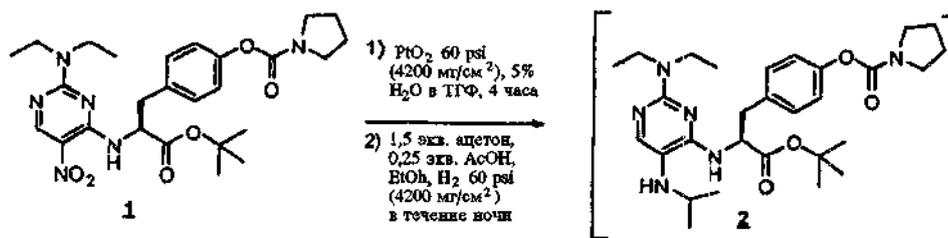


На схеме 4 соединение 4 получают последовательно в трех емкостях из 5-нитропиримидинового соединения 1. Протокол синтеза согласно схеме 4 существенно упрощает получение данного соединения благодаря по меньшей мере одному фактору из нижеследующих:

- 1) существенно ускоренная стадия восстановления нитрогруппы;
- 2) рационализированная последовательность восстановления/восстановительного аминирования, которую проводят в той же колбе с тем же растворителем и тем же катализатором, вследствие чего манипуляции сокращаются и воздействие воздуха на чувствительные к кислороду продукты сводится к минимуму;
- 3) условия стадии восстановительного аминирования сводят к минимуму генерацию побочного продукта бис-изопропиламинопиримидина, устраняя, таким образом, необходимость хроматографической очистки соединения 3;
- 4) описаны условия, посредством которых возможно очистить промежуточный продукт моно-изопропиламинопиримидин, соединение 2, тритурацией соответствующей соли L-винной кислоты (поэтому необходимость отдельной очистки соединения 2 также становится необязательной вследствие усовершенствований стадии восстановительного аминирования), и
- 5) определены условия отдельной очистки соединения 3 посредством кристаллизации из МТВЕ-гексана или МТВЕ-циклогексана.

В стадиях реакции схемы 4 экспресс-хроматографию проводят с помощью Biotage Flash 75L при использовании силикагелевых картриджей KP-Sil 800 г (32-63 μM , 60 \AA , 500-550 m^2/g). Описывают R_f для аналитической тонкослойной хроматографии с использованием тонких пластинок 250 μM для нормальной фазы EM Sciences Silica Gel 60 F(254). ЯМР-спектры получают на спектрометре Varian Gemini 300 МГц (300 МГц для ^1H -спектров и 75 МГц для ^{13}C -спектров). Аналитическую ВЭЖХ проводят на приборе Agilent 1100 Series HPLC с колонкой Phenomenex Luna, 3 μm , C-18, 30 \times 4,6 мм. Детектором является УФ при 210 нм. Используют растворители 0,1% ТФА в воде и 0,1% ТФА в ацетонитриле. Стандартная скорость потока составляет 1,5 мл/мин, и стандартный способ называют М1 с использованием градиента растворителя, изменяющегося от 20 до 70% CH_3CN в течение 2,33 мин. Альтернативный способ называют М2 со скоростью потока 2 мл/мин и изменением градиента от 20 до 70% CH_3CN в течение 1,75 мин. Способ М15 имеет скорость потока 1,5 мл/мин. При составе растворителей, изменяющемся от 20 до 70% CH_3CN в течение 10 мин, поддерживая 70% в течение 2 мин с последующим линейным возрастанием до 95% в течение 1 мин и поддержанием на уровне 95% в течение 2 мин. ЖХ/МС проводят на приборе Agilent 1100 Series HPLC с Series 1100 MSD с электроспреей ионизацией (пока не указано иначе, как с химической ионизацией). Колонка и условия соответствуют свободно протекающей ВЭЖХ.

Стадия 1. Получение (S)-4-(3-трет-бутоксипропил)-5-(диэтиламино)-2-(2-(изопропиламино)пиримидин-4-иламино)-3-оксопропил)фенилпирролидин-1-карбоксилата (2).



Нитропиримидинкарбамат 1 (100 г, 189 ммоль) и PtO_2 (6,33 г, 27,85 ммоль) суспендируют в 360 мл влажного ТГФ (5% H_2O). Смесь перемешивают при комнатной температуре под водородом (60 psi (4200 g/cm^2)). Через 3 ч ТСХ (50% EtOAc /гексаны на силикагеле) показывает полное восстановление нитро-группы (анализ ТСХ на диоксиде кремния с EtOAc показывает $R_f=0,2$ (полоса) для аминопиримидина и $R_f=0,86$ для исходного нитропиримидинкарбамата). В этом плане использование PtO_2 для обеих стадий в данном двухстадийном процессе дает возможность проведения реакции в одной емкости с введением такой характеристики, как резкое повышение скорости восстановления нитрогруппы. В любом случае предпринимают меры для сведения к минимуму воздействия воздуха/кислорода, поскольку аминопиримидиновый продукт чувствителен к окислению.

Этанол (200 мл), ацетон (21 мл, 1,5 экв.) и ледяную уксусную кислоту (3,0 мл, 0,28 экв.) добавляют к раствору аминопиримидина в колбу для гидрогенизации. После откачивания воздуха и продувания в колбу под давлением накачивают H_2 (60 psi (4200 g/cm^2)). Восстановительному аминированию позволяют протекать в течение ночи. ТСХ на силикагеле с использованием EtOAc в качестве элюента дает $R_f=0,41$ (полоса) для изопропиламинопиримидина и $R_f=0,11$ для исходного аминопиримидинкарбамата. Как ТСХ, так и ЖХ/МС подтверждают завершённую реакцию при практическом отсутствии образованного бис-изопропиламинопиримидина. При необходимости ВЭЖХ можно использовать как альтернативное средство для мониторинга протекания реакции. Неочищенный реакционный раствор разбавляют EtOAc (1 л) и фильтруют через слой основного оксида алюминия (400 мл). Оксид алюминия промывают EtOAc (200 мл) и EtOH (200 мл) и объединенные органические растворы концентрируют в вакууме. Из колбы удаляют газ под N_2 . Вязкое масло перерастворяют в безводном толуоле (700 мл) и концентрируют. После удаления газа из колбы под азотом продукт сушат снова путем азеотропного удаления других 400 мл толуола. Получают вязкое масло красновато-коричневого цвета.

Как доказано ЖХ/МС, при данном способе образуется очень мало примеси бис-изопропиламинопиримидинкарбамата по сравнению с предшествующими способами, при которых требуется удаление примеси бис-изопропиламинопиримидинкарбамата с помощью хроматографии.

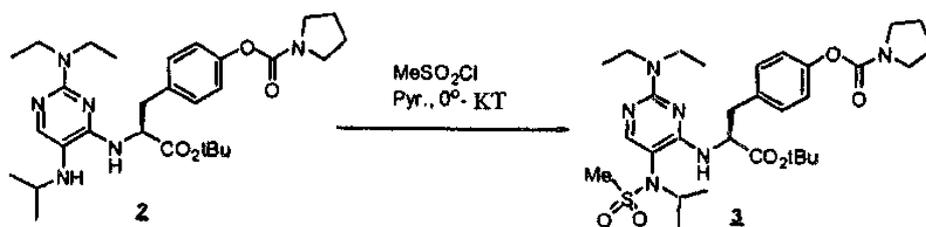
Если требуется формальная очистка моноизопропиламинопиримидина на стадии 2, его можно осадить из ТГФ/эфира в виде соли (L)-винной кислоты и тритурировать. Приведем лабораторный пример: (5,09 г, выход 99,6%) L-винную кислоту (1,42 г) растворяют в горячем ТГФ (45 мл). Горячий раствор винной кислоты добавляют к смоле изопропиламинопиримидина 2 (5,1 г). Смесь взбалтывают и нагревают, пока не станет однородной. Раствор изменяет цвет с розово-фиолетового на коричнево-желтый. Раствор концентрируют в вакууме, получая коричнево-желтую смолу. Добавляют эфир (~150 мл), после чего наблюдают замасливание. Эфирную смесь концентрируют в вакууме. Добавляют ацетон (~20 мл) и затем эфир (~200 мл) и снова наблюдают образование вязкого масла. Смесь концентрируют в третий раз. Добавляют метилхлорид (5-10 мл), а затем эфир (~80 мл). Наблюдают образование осадка коричнево-желтого цвета под супернатантом яркого оранжево-розового цвета. Смесь фильтруют. Осадок промывают эфиром (50 мл) и затем снова смесью (~60 мл) ацетона и эфира (1:1).

Осадок сушат под вакуумом в течение ночи, получая твердое вещество кремового цвета (4,9 г, выход 76%). Маленькую аликвоту твердой соли винной кислоты растворяют в изо- PrOH и EtOH и пропускают через маленький слой основного оксида алюминия, получая свободное основание. Аликвоту свободного основания анализируют ТСХ и ЖХ/МС. Оставшуюся соль суспендируют в смеси CH_2Cl_2 (250 мл) и 1N MnHCO_3 (150 мл). При перемешивании и небольшом барботировании твердое вещество растворяется и амин свободного основания экстрагируют в органический слой. Водный слой экстрагируют еще раз EtOAc (150 мл) и органические экстракты объединяют и сушат над MgSO_4 (прибл. 150 г). Высушенный органический раствор пропускают через слой основного оксида алюминия (прибл. 100 г), получая раствор светло-розового цвета, который концентрируют в вакууме, получая смолу коричнево-желтого/розового цвета (3,28 г, выход 64% от исходного нитрокарбамата).

Исследуют ряд других кислот в попытке образования солей с моноизопропиламинопиримидинкарбаматом 2. p-Толуолеульфоновая кислота и метансульфоновая кислота дают масло. Твердые соли могли бы образовываться с HCl и H_3PO_4 , но винная кислота, по-видимому, дает наиболее благоприятные характеристики растворимости. Соли HCl и фосфорной кислоты, по-видимому, легко растворяются в CH_2Cl_2 , изо- PrOH и ацетоне, тогда как соль винной кислоты, по-видимому, наиболее не растворима в CH_2Cl_2 и только частично растворима в других растворителях.

Стадия 2. Получение (S)-4-(3-трет-бутокси-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфон-

амидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксопропил)фенилпирролидин-1-карбоксилата (3).



Изопропиламинопиримидинкарбамат 2, полученный на стадии 1 (предположительно 189 ммоль), растворяют в пиридине (680 мл) и раствор охлаждают до 0°C под N₂. Метансульфонилхлорид (44 мл, 3,0 экв.) добавляют через шприц-насос в течение 20 мин к холодному пиридиновому раствору изопропиламинопиримидинкарбамата. Ледяную баню удаляют и раствору позволяют согреться до КТ. Раствору дают возможность перемешиваться в течение 6 ч. Отбирают маленькую аликвоту и проводят мини-обработку (разводят EtOAc, промывают 5% KН₂РO₄, солевым раствором и затем сушат над MgSO₄). Анализ ТСХ показывает, что реакция завершена и в основном чистая (только одно пятно, кроме исходного пятна от остаточного пиридина). Неочищенный реакционный раствор концентрируют. Когда собирают 650 мл дистиллята, масло кроваво-красного цвета разводят EtOAc (2 л). Органический раствор промывают 5% KН₂РO₄ (1 л и 750 мл), 0,2Н лимонной кислотой (1 л) и солевым раствором (1 л). Органический раствор сушат над MgSO₄ (150 г). Высушенный органический раствор фильтруют через слой силикагеля (1 л), получая раствор зелено-черного цвета. Колбу и силикагель промывают EtOAc (1,5 л), получая общий объем органического раствора 3,5 л. Раствор фильтруют через слой основного оксида алюминия (300 мл), получая раствор темно-зеленого цвета. Раствор концентрируют в вакууме. Получают смолу красноватого цвета (150 г).

Колбу продувают азотом, закрывают крышкой и помещают в холодильник, пока не образуется твердое вещество красно-коричневого цвета. ЖХ/МС показывает приемлемую чистоту, но анализ ТСХ показывает пятно ярко-красного цвета на старте, а также две-три очень незначительных примеси. Запах пиридина все еще присутствует. Твердое вещество красно-коричневого цвета растворяют в смеси CH₂Cl₂ (100 мл), ТГФ (200 мл) и эфира (800 мл). Раствор фильтруют/элюируют через слой силикагеля (1 л) и силикагель промывают эфиром (3 л). Большая часть окрашенных примесей на старте остается на силикагеле. Раствор концентрируют, получая масло красного цвета, которое сушат с получением пенистого твердого вещества розового цвета (100 г), которое при анализе показывает чистоту 94,7% по данным ЖХ/МС. Затем материал хроматографируют на силикагеле (2 л), элюируют CH₂Cl₂ (3 л), CH₂Cl₂ и эфиром (1:1; 4 л), эфиром (4 л), системой эфир:ТГФ (1:1; 4 л) и EtOAc с 5% Et₃N и 2% EtOH (4 л). Элюент CH₂Cl₂:эфир дает масло красного цвета смешанных фракций (12,4 г; фракция А) и эфирный элюент дает масло коричнево-желтого цвета (13 г; фракция В), которая является в основном чистой. Массу материала оставляют на колонке и предполагают, что требуемый продукт кристаллизуется на колонке. Элюция системой эфир:ТГФ и EtOAc (с 5% Et₃N и 2% EtOH) позволяет перерастворить продукт и элюировать в концентрированном слое (фракция С). Фракцию А и фракцию В объединяют и концентрируют вместе. Фракцию С концентрируют отдельно. При концентрировании и сушке кристаллы образуются в обеих фракциях. Дальнейшие исследования показывают, что твердое вещество можно перекристаллизовать из метил-трет-бутилового эфира (МТВЕ), циклогексана, эфир-гексана (1:1), МТВЕ-гексанов или циклогексан-гексанов. Объединенные фракции А и В и фракцию С, каждую, перекристаллизовывают из МТВЕ-гексанов, получая сложный трет-бутиловый эфир 3 в виде твердого вещества белого цвета (57,75 г в целом с чистотой >99%) и фильтрата/маточных жидкостей красного цвета. Маточные жидкости концентрируют, получая масло красного цвета (24 г). Масло из маточной жидкости хроматографируют на приборе Biotage 75 и элюируют 4% ТГФ в CH₂Cl₂ (12 л), получая обогащенные фракции, которые затем концентрируют и перекристаллизовывают, получая дополнительные 14 г очищенного сложного трет-бутилового эфира.

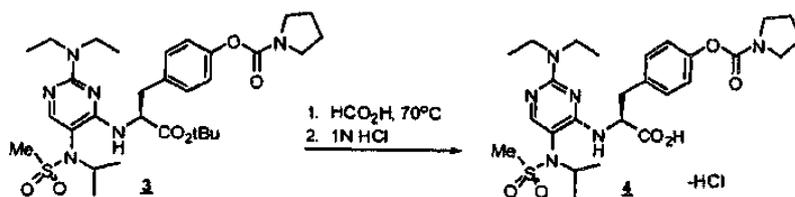
ЖХ/МС способом М2 дает t_R=1,97 мин с M/Z = 619 для [M+1]⁺ для целевого продукта.

ЖХ/МС способом М15 дает t_R=6,09 мин с M/Z = 619 для [M+1]⁺ для целевого продукта.

Данные ¹Н ЯМР-спектроскопии (CDCl₃, 300 МГц) δ, промилль: 0,88 (d, j = 6 Гц, 1,4Н), 1,04 (d, j = 6 Гц, 2Н), 1,20 (m, 10Н), 1,37 (s, 4,8Н), 1,39 (s, 4,8Н), 1,93 (AA'BB'¹, 4Н), 2,80 (s, 1,7Н), 2,9 (s, 1,6Н), 3,18 (m, 2,4Н), 3,4-3,7 (m, перекрывающее два очевидных триплета, 8,3Н), 4,40 (секстет, j = 6 Гц, 1,1Н), 4,8 (секстет, 1Н), 5,64 (d, j = 6,5 Гц, 0,5Н), 5,70 (d, j = 6,5 Гц, 0,5Н), 7,03 (m, 2Н), 7,18 (очевидный dd, 2Н), 7,80 (d, j = 4 Гц, 1Н). Данные ¹Н ЯМР-спектроскопии показывают ротамеры.

Предполагают, что обработку метансульфонилхлоридом следует проводить в ТГФ с маленьким количеством или без дополнительного основания. При использовании основания следует использовать такое основание, как триэтиламин или диизопропилэтиламин.

Стадия 3. Получение (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты (4).



Раствор в муравьиной кислоте (1,5 л) сложного трет-бутилового эфира, полученного на стадии 2 (57,75 г, 0,093 моль), нагревают до 50°C в течение ночи и затем концентрируют в вакууме. Альтернативно реакцию можно также проводить при 70 или 80°C в течение 60-90 мин.

К неочищенному продукту добавляют воду (приблизительно 100 мл) и смесь концентрируют досуха. Остаток сушат под высоким вакуумом. Неочищенный продукт растворяют и концентрируют дважды из 1,0N HCl (250 и 200 мл). Продукт дважды растворяют в горячем ТГФ и концентрируют досуха, получая пенистое твердое вещество. Пенистое твердое вещество сушат под высоким вакуумом при 65°C в течение 2 ч. Данное твердое вещество выскребают из колбы и сушат в вакуумной печи в течение ночи (60°C, 28 дюймов (708 мм) Hg), получая соль хлористо-водородной кислоты (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты-5 (50,9 г; чистота 98,3%).

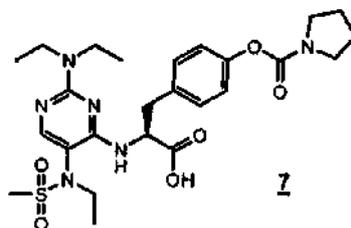
ЖХ/МС способом M15 дает $t_R=1,96$ мин с $M/Z = 563$.

ЖХ/МС способом M2 дает $t_R=1,43$ мин с $M/Z = 563$.

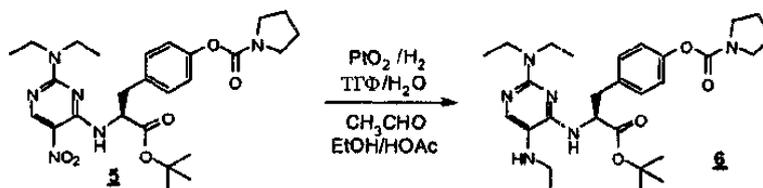
Данные ^1H ЯМР-спектromетрии (CD_3OD , 300 МГц) δ , промилль: 0,80 (d, j = 6 Гц, 1,4H), 1,02 (d, j = 6 Гц, 1,6H), 1,23 (m, 9,2H), 1,80-2,0 (AA'BB' + m, 5,2H), 2,99 (d, 3,2H), 3,2-3,45 (m, 4,5H), 3,45-3,8 (m, 7,6H), 4,40 (секстет, 1H), 4,90 (m, 3H), 7,00 (d, 2H), 7,23 (d, 2H), 7,60 (d, 0,25H), 7,75 (d, 1H), 7,83 (d, 0,25H).

Данные ^{13}C ЯМР-спектromетрии (CD_3OD , 75 МГц) δ , промилль: 6,5, 14,7, 14,8,15,4, 15,5, 19,4, 20,0, 20,2, 29,91, 30,44, 33,95, 34,15, 41,03, 41,08, (41,71, 41,99, 42,28, 42,6, 42,8, 43,1 - пики растворителя), 47,21, 47,36, 50,01, 50,42, 62,43, 102,11, 102,23, 116,78, 124,9, 125,19, 128,54, 129,01, 138,49, 139,02, 145,53, 145,60, 145,78, 148,68, 156,77, 156,86, 166,91, 167,07.

Пример 2. Получение (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты (7).



Стадия 1. Восстановление/восстановительное этилирование в одной емкости (S)-4-(3-трет-бутокси-2-(2-(диэтиламино)-5-нитропиримидин-4-иламино)-3-оксoproпил)фенилпирролидин-1-карбоксилата (6).



Нитрокарбамат (соединение 5, 10,8 г, 20 ммоль) суспендируют в ТГФ (35 мл) и добавляют воду (1 мл, 3 об.%). Раствор перемешивают, добавляют катализатор Адамса (0,360 г, 6 мол.%) и раствор дезоксигенируют с помощью трех циклов откачки (50 мм Hg) и наполняют сухим азотом (10 psi (700 г/см²)). Наконец, реакционную емкость под давлением заполняют водородом (60 psi (4200 г/см²)) и интенсивно перемешивают реакционную смесь в течение 90 мин. Если необходимо или требуется, течение реакции гидрогенизации можно мониторировать ТСХ (силикагель, элюция системой дихлорметан-метанол (95:5)). R_f нитрокарбамата составляет 0,95, первичного амина = 0,16.

Водород заменяют сухим азотом (три цикла откачки и заполнения азотом). Добавляют этанол (25 мл), уксусную кислоту (0,3 мл) и ацетальдегид (1,2 мл, 21 ммоль, 1,05 экв.), емкость частично откачивают при низких давлениях (приблизительно 150 мм Hg) с целью минимизации потери летучего ацетальдегида, наполняют азотом (10 psi (700 см²)) и интенсивно перемешивают смесь в течение 50 мин. В конце данного периода азот заменяют водородом (60 psi (4200 г/см²)) путем двукратной частичной откачки и повторного создания давления водорода. Смесь перемешивают следующие 45 мин. Протекание восста-

новительного аминирования можно мониторировать ТСХ (силикагель, элюция системой дихлорметан-метанол (95:5)). R_f первичного амина = 0,16, вторичного амина = 0,32 и третичного амина = 0,43. В конце процесса водород удаляют с помощью трех циклов отсасывания и наполнения азотом, катализатор отфильтровывают на слое целлита, используя для промывания метанол, из фильтратов удаляют жидкость досуха, получая масло янтарного цвета (11,9 г). Продукт чувствителен к кислороду, приводящему к существенному потемнению и появлению материала с низким R_f при ТСХ. Все манипуляции следует осуществлять с соответствующими предосторожностями.

Продукт реакции очищают экспресс-хроматографией, используя смесь дихлорметан-метанол (97:3), содержащую 0,3% гидроксида аммония. Фракции, содержащие N-этиловый продукт, объединяют, получая 7,9 г соединения 6 в виде масла янтарного цвета (чистота 98,5%; выход 73%). Чистота неочищенного продукта, по-видимому, соответствует многим целям, особенно, если известно, что продукт последующих предусматриваемых реакций является кристаллическим.

Данные ^1H ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 7,60 (s, 1H), 7,17 (d, J=8,4 Гц, 2H), 7,05 (d, J=8,4 Гц, 2H), 5,75 (d, J=7,5 Гц, 1H), 4,84 (q, J=6,6 Гц, 1H), 3,64-3,46 (m, 8H), 3,19 (d, J=6,3 Гц, 2H), 2,86 (q, J=7,2 Гц, 2H), 1,94 (m, 4H), 1,39 (s, 9H), 1,20-1,11 (m, 9H).

Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 171,7, 157,7, 157,5, 153,1, 150,3, 145,8, 133,7, 130,2, 121,5, 117,4, 81,8, 54,7, 46,4, 46,3, 42,4, 41,7, 37,4, 28,0, 25,8, 24,9, 15,5, 13,5.

МС (m/z): 527.3 [M+1].

Стадии 2 и 3. (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилметилсульфонамидо)-пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота (7).

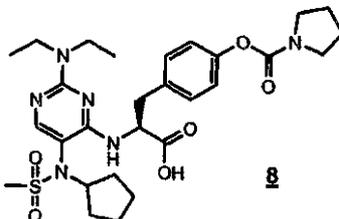
Следуя способам, соответствующим стадиям 2 и 3 примера 1, соединение 6 превращают в соответствующую (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту 7, которая характеризуется следующим.

Данные ^1H ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 8,17 (s, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,26-7,23 (m, 2H), 7,00-6,98 (d, 2H), 4,85-4,82 (m, 1H), 3,58-3,51 (m, 6H), 3,43-3,39 (m, 3H), 2,96-2,84 (m, 3H), 2,01-1,91 (m, 4H), 1,29-0,97 (m, 9H).

Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 175,6, 165,7, 157,2, 155,2, 152,0, 151,8, 151,7, 151,3, 136,0, 135,9, 131,5, 123,0, 110,5, 56,7, 43,8, 39,4, 39,2, 37,4, 26,7, 25,8, 14,4, 13,3;

МС: M (+H) 549.

Пример 3. Получение (S)-2-(5-(N-циклопентилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты (8).



Следуя способам, соответствующим примеру 1, и используя циклопентанон вместо ацетона (пример 1) или ацетальдегид (пример 2), получают (S)-2-(5-(N-циклопентилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту 8, которая характеризуется следующим.

Данные ^1H ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 7,74-7,71 (d, 1H), 7,28-7,24 (m, 2H), 7,04-7,00 (m, 2H), 5,00-4,95 (m, 1H), 4,37-4,27 (m, 1H), 3,60-3,37 (m, 9H), 3,00-2,97 (d, 3H), 2,03-1,78 (m, 6H), 1,67-1,40 (m, 6H), 1,31-1,23 (m, 6H).

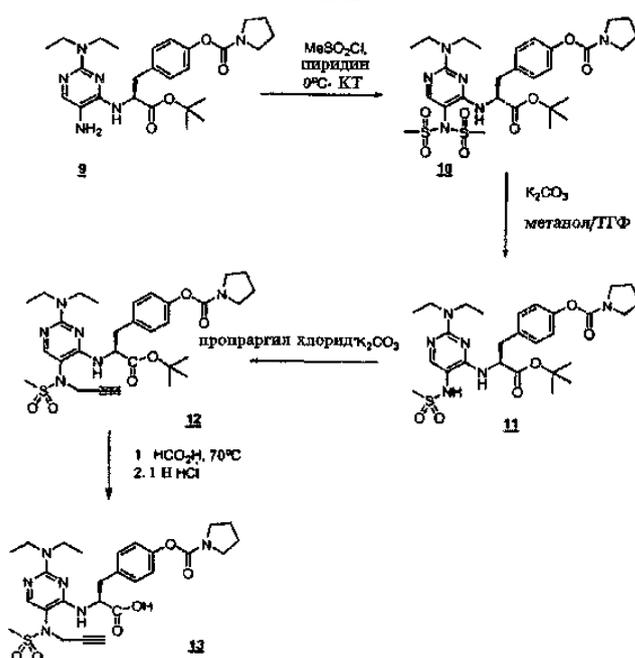
Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 173,6, 173,4, 163,1, 155,1, 152,4, 152,0, 145,3, 144,7, 135,5, 135,1, 131,6, 131,4, 123,2, 109,6, 109,4, 62,5, 62,3, 56,7, 56,5, 48,1, 40,3, 40,1, 36,8, 36,4, 31,2, 30,5, 26,7, 25,8, 23,2, 23,1, 12,7;

МС: M (+H) 589.

Пример 4. Получение (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(проп-2-инил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты (13).

Протокол синтеза, используемый в примере 4, кратко показан на схеме 6, иллюстрируемой ниже.

Схема 6



Стадия 1. (S)-4-(3-трет-бутоксипропил)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(метилсульфонил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксипропил)фенилпирролидин-1-карбоксилат (10).

Аминопиримидин (2,0 г, 4,0 ммоль - соединение 9) (получено восстановлением соединения V) растворяют в дихлорметане (10 мл).

Добавляют ТГФ (10 мл) и триэтиламин (2,8 мл, 20 ммоль) и охлаждают реакцию на ледяной бане. Добавляют метансульфонил хлорид (1,1 мл, 14 ммоль) и нагревают реакцию до комнатной температуры в течение 18 ч. Реакционную смесь концентрируют в вакууме и остаток переводят в этилацетат. Раствор промывают 0,2N лимонной кислотой, водой, насыщенным NaHCO_3 и соевым раствором. Органический слой сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют в вакууме, получая неочищенный продукт в виде пены коричневого цвета. Остаток очищают экспресс-хроматографией (2:3 этилацетат/гексаны), получая 2,2 г (73%) дисульфонилированного материала в виде пены желтого цвета (соединение 10).

Стадия 2. (S)-4-(3-трет-бутоксипропил)-2-(2-(диэтиламино)-5-(метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксипропил)фенилпирролидин-1-карбоксилат (11).

Соединение 10 (2,2 г, 3,4 ммоль) растворяют в метаноле (5 мл) и ТГФ (5 мл). Добавляют 1,0M K_2CO_3 (10 мл) и реакционную смесь нагревают до 40°C в течение 96 ч. Реакционную смесь подкисляют до pH 3 2N HCl и экстрагируют этилацетатом. Органический слой промывают соевым раствором, сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют в вакууме, получая 1,68 г (86%) продукта в виде пены бежевого цвета, соединение 11. Неочищенный материал используют без очистки.

Стадия 3. (S)-4-(3-трет-бутоксипропил)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(проп-2-инил)метил-сульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-оксипропил)фенилпирролидин-1-карбоксилат (12).

Соединение 11 (0,20 г, 0,35 ммоль), K_2CO_3 (0,073 г, 0,53 ммоль) и ацетон помещают в запечатанную пробирку и перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляют пропаргилхлорид (0,26 мл, 3,5 ммоль) и запечатывают реакцию и нагревают с обратным холодильником в течение 48 ч. Реакционную смесь концентрируют в вакууме и остаток переносят в этилацетат. Раствор промывают водой и соевым раствором. Органический слой сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют в вакууме, получая неочищенный продукт в виде пленки оранжевого цвета. Остаток очищают экспресс-хроматографией (1:1 этилацетат/гексаны), получая 0,11 г (51%) соединения 12 в виде прозрачной пленки.

МС (m/z) 615, (M+H)⁺.

Стадия 4. (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(проп-2-инил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановая кислота (13).

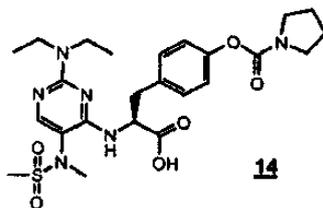
Муравьиную кислоту (2 мл) добавляют к трет-бутиловому эфиру (100 мг) и перемешивают при 40°C в течение ночи. Муравьиную кислоту удаляют при пониженном давлении, получая соединение 13 с количественным выходом и следующими характеристиками.

Данные ^1H ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 8,13 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,26-7,24 (d, 2H), 7,02-6,99 (d, 2H), 4,59-4,44 (m, 1H), 4,04-3,79 (m, 1H), 3,64-3,53 (m, 6H), 3,45-3,39 (t, 3H), 3,08-2,84 (m, 4H), 2,84-1,89 (m, 4H), 1,22-1,17 (t, 6H).

Данные ^{13}C ЯМР-спектроскопии, CDCl_3 , (δ): 165,3, 155,3, 151,8, 136,1, 131,5, 123,0, 76,1, 76,0, 56,8, 49,9, 48,1, 43,8, 41,2, 40,2, 37,4, 26,7, 25,9, 13,3; и

MS: M (+H) 559.

Пример 5. Получение (S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-метилметилсульфоамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролдин-1-карбонилокси)фенил)пропановой кислоты (14).



Следуя способам, описанным в примере 4, и используя диметилсульфат вместо пропаргилхлорида, получают титульное соединение, характеризующееся следующим.

Данные ^1H ЯМР-спектromетрии, CDCl_3 , (δ): 8,14 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,26-7,23 (d, 2H), 7,01-6,98 (d, 2H), 4,84-4,81 (m, 1H), 3,60-3,53 (m, 6H), 3,43-3,38 (m, 3H), 3,09 (s, 3H), 2,94 (s, 3H), 2,00-1,91 (m, 4H), 1,22-1,18 (t, 6H).

Данные ^{13}C ЯМР-спектromетрии, CDCl_3 , (δ): 175,5, 165,4, 160,7, 156,3, 155,3, 151,8, 149,1, 136,0, 131,6, 123,0, 113,4, 56,9, 43,9, 38,8, 38,1, 37,4, 26,7, 25,8, 13,2; и

MS: M (+H) 535.

Пример А. Анализ адгезии $\alpha 4\beta 1$ интегрин: адгезия клеток JurkatTM к фибронектину плазмы человека.

Описание методики.

96-Луночные планшеты (планшеты Costar 3590 EIA) покрывают человеческим фибронектином (Gibco/BRL, № по каталогу 33016-023) в концентрации 10 мкг/1 мл в течение ночи при 4°C. Затем планшеты блокируют раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA; 0,3%) в солевом растворе. Клетки JurkatTM (поддерживаемые в log-фазе роста) метят кальцеином АМ согласно инструкциям изготовителя и суспендируют в концентрации 2×10^6 клеток/мл в HEPES/солевой раствор/BSA. Затем клетки подвергают воздействию исследуемого и контрольного соединений в течение 30 мин при комнатной температуре, прежде чем перенести их в отдельные лунки планшета, покрытого фибронектином. Адгезии позволяют происходить в течение 35 мин при 37°C. Затем лунки промывают осторожным отсасыванием и пипетированием свежим солевым раствором.

Флуоресценцию, ассоциированную с оставшимися адгезивными клетками, количественно оценивают, используя ридер флуоресценции для планшетов при EX 485/EM 530.

Клеточные культуры получают путем первого разделения стационарной фазы клеток JurkatTM 1:10 в день первый и 1:2 в день второй для проведения анализа в день 3. Клетки, разделенные 1:10 в день первый, разделяют 1:4 в день третий 3 для анализа в день 4.

Для получения планшетов для анализа сначала готовят рабочий раствор человеческого фибронектина Gibco/BRL (№ по каталогу 33016-023) в PBS++ с концентрацией 10 мкг/мл.

Затем планшет Costar 3590 EIA покрывают 50 мкл/лунку в течение 2 ч при комнатной температуре (хотя его можно оставить на ночь при 4°C). Наконец, содержимое планшета отсасывают и блокируют планшет буфером HEPES/солевой буфер, 100 мкл/лунку в течение 1 ч при КТ с последующим трехкратным промыванием 150 мкл PBS++.

Разведения соединения осуществляют получением серийных разведений 1:3 следующим образом. В каждый планшет (4 соединения/планшет) добавляют 600 мкл в 4 пробирки для титрования Bio-Rad в штативе для пробирок для титрования. В каждую соответствующую пробирку добавляют достаточно соединения, чтобы получить 2X концентрацию при использовании методов, хорошо известных в области техники. Используя планшеты Falcon Flexiplates в ряды В-Г добавляют 100 мкл HEPES/солевого буфера или человеческой сыворотки. Используют набор многоканальных пипеток до 180 мкл с четырьмя наконечниками, находящимися на равных расстояниях на пипетке. Каждый набор из четырех пробирок смешивают 5 раз и 180 мкл 2X соединения переносят в первую колонку разведений каждого соединения в ряду В, оставляя ряд А пустым. В другие лунки в ряду А добавляют 180 мкл. Серийные разведения осуществляют на планшете путем переноса 50 мкл в следующее разведение и пятикратного перемешивания с заменой наконечников каждый раз после перемешивания. Разведения заканчивают в ряду F. В ряду G соединение отсутствует.

Раствор 20 мкг/мл в HEPES/солевом буфере или человеческой сыворотке антитела 21/6 представляет собой положительный контроль, и его отставляют в сторону в углублении для реагентов, чтобы добавить в планшет с суспензией клеток.

Окрашивание клеток осуществляют, начиная со сбора клеток JurkatTM в log-фазе путем центрифугирования в пробирках объемом 50 мл (1100 об./мин в течение 5 мин). Клетки ресуспендируют в 50 мл PBS++, центрифугируют и ресуспендируют в 20 мл PBS++. Клетки окрашивают добавлением 20 мкл кальцеина АМ в течение 30 мин при КТ. Объем доводят до 50 мл HEPES/солевым буфером и клетки под-

считывают, центрифугируют и ресуспендируют до получения 2×10^6 клеток/мл в HEPES/солевом растворе или человеческой сыворотке.

Соединения инкубируют, используя следующий способ. В новый гибкий планшет 65 мкл окрашенных клеток добавляют в ряды В-Н. Затем 65 мкл 2Х соединений добавляют в соответствующие ряды в соответствии с разметкой планшета и смешивают 3Х. 65 мкл антитела 2Х-21/6 добавляют в ряд Н и перемешивают три раза. Наконец, планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин.

Адгезию к фибронектину измеряют с помощью ридера флуоресценции для планшетов при EX 485/EM 530 после следующей обработки. После инкубирования клетки перемешивают 3Х и 100 мкл переносят в покрытые фибронектином планшеты и инкубируют в течение приблизительно 35 мин. Каждый планшет промывают ряд за рядом путем осторожного пипетирования 100 мкл PBS++ комнатной температуры, направленного вниз по бокам лунок, и поворачивая планшет на 90° для отсасывания. Данную процедуру повторяют в целом для 3 промываний. Каждую лунку заполняют 100 мкл после промывания пипетированием, направленным вниз по боку лунки.

Значение IC_{50} рассчитывают для каждого соединения как в присутствии человеческой сыворотки, так и в отсутствие человеческой сыворотки. IC_{50} представляет собой концентрацию, при которой рост или активность ингибируются на 50%. Соединения, описанные в данном контексте, как показано, имеют IC_{50} менее чем 0,1 мкМ при тестировании в соответствии с анализом с использованием фибронектина.

Пример В. Анализ насыщения *in vitro* для определения связывания исследуемых соединений с $\alpha 4\beta 1$.

Клетки Jurkat™ в log-фазе роста промывают и ресуспендируют в плазме нормального животного, содержащей 20 мкг/мл антитела 15/7 (см. статью Yednock et al., J. Biol. Chem., (1995) 270(48):28740). Клетки Jurkat™ разводят в два раза либо в образцах нормальной плазмы, содержащей известные количества исследуемого соединения, в различные концентрации, лежащих в интервале от 66 до 0,01 мкМ, используя стандартное 12-точечное серийное разведение для стандартной кривой, или в образцах плазмы, полученных из периферической крови животных, прошедших лечение исследуемым соединением.

Затем клетки инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре, дважды промывают забуференным фосфатом солевым раствором ("PBS"), содержащим 2% сыворотку телячьих эмбрионов и по 1 мМ хлорида кальция и хлорида магния (среда для анализа) для удаления несвязанного антитела 15/7.

Затем на клетки воздействуют конъюгированным с фикоэритрином козым $F(ab')_2$ к мышинному Fc IgG (Immunotech, Westbrook, ME), который адсорбируют для любой неспецифической перекрестной реактивности путем совместного инкубирования с 5% сывороткой, полученной от исследуемых видов животных в разведении 1:200, и инкубируют в темноте при $4^\circ C$ в течение 30 мин.

Клетки дважды промывают средой для анализа и ресуспендируют в ней. Затем их анализируют с помощью стандартного анализа с помощью сортера клеток с активированной флуоресценцией ("FACS"), как описано в статье Yednock et al., J. Biol. Chem., 1995, 270:28740.

Затем данные представляют в виде графика зависимости флуоресценции от дозы, например нормального типа зависимости доза-ответ. Уровни дозы, которые приводят к верхнему плато кривой, представляют уровни, необходимые для получения эффективности в модели *in vivo*.

Результаты анализа $\alpha 4$ -зависимой активности *in vitro* показывают, что некоторые из соединений, соответствующих данному изобретению, при тестировании в данном анализе показывают ингибирование интегрин $\alpha 4\beta 1$ интегрин при EC_{50} меньше чем 20 мкг/мл.

Пример С. Анализ *in vitro* для определения связывания соединений с VLA-4.

Анализ *in vitro* используют для оценки связывания исследуемого соединения с интегрином $\alpha 4\beta 1$. Соединения, которые связывают в данном анализе, могут быть использованы оценки уровней VCAM-1 в биологических образцах посредством принятых анализов (например, конкурентных анализов). Данный анализ чувствителен к значениям IC_{50} таким низким, как приблизительно 1 мкМ.

Активность интегрин $\alpha 4\beta 1$ измеряют путем взаимодействия растворимого VCAM-1 с клетками Jurkat™ (например, Коллекция американских типовых культур №№ TIB 152, TIB 153 и CRL 8163), линией Т-клеток человека, которая экспрессирует высокие уровни интегрин $\alpha 4\beta 1$. VCAM-1 взаимодействует с клеточной поверхностью интегрин $\alpha 4\beta 1$ -зависимым образом (см. статью Yednock et al., J. Biol. Chem., 1995, 270:28740).

Рекомбинантный растворимый VCAM-1 экспрессируют как химерный слитый белок, содержащий семь внеклеточных доменов VCAM-1 на N-конце и константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 на C-конце. Слитый белок VCAM-1 получают и очищают способом, описанным в статье Yednock, см. выше.

Клетки Jurkat™ выращивают в RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки телячьих эмбрионов, пенициллина, стрептомицина и глутамина, как описано в статье Yednock, см. выше.

Клетки Jurkat™ инкубируют с 1,5 мМ MnCl и 5 мкг/мл антитела 15/7 в течение 30 мин на льду. Mn⁺² активирует рецептор, чтобы усилить связывание лиганда, и 15/7 представляет собой моноклональное антитело, которое распознает активированную/занятую лигандом конформацию интегрин $\alpha 4\beta 1$ и блокирует молекулу в данной конформации, стабилизируя тем самым взаимодействие VCAM-1/интегрин

$\alpha 4\beta 1$. См. статью Yednock et al., выше. Антитела, подобные антителу 15/7, получают от других исследователей (см. статью Luque et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:11067), и их можно использовать в данном анализе.

Затем клетки инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре с исследуемыми соединениями в различных концентрациях, лежащих в интервале от 66 до 0,01 мкМ, используя стандартное 5-точечное серийное разведение. Затем 15 мкл растворимого рекомбинантного слитого белка V₃AM-1 добавляют к клеткам JurkatTM и инкубируют в течение 30 мин на льду. См. статью Yednock et al., выше.

Затем клетки дважды промывают и ресуспендируют в конъюгированном с PE козым F(ab')₂ к мышиному Fc IgG (Immunotech, Westbrook, Me.) в разведении 1:200 и инкубируют на льду в темноте в течение 30 мин. Клетки дважды промывают и анализируют с помощью стандартного анализа с помощью сортера клеток с активированной флуоресценцией ("FACS"), как описано в статье Yednock et al., выше.

Соединения, имеющие IC₅₀ меньше чем приблизительно 15 мкМ, обладают аффинностью связывания с $\alpha 4\beta 1$.

При тестировании в данном анализе соединения, полученные в вышеописанных анализах, имеют или, как ожидают, имеют IC₅₀ 15 мкМ или меньше (или, как ожидают, должны быть активными *in vivo*). Определенное соединение в данном анализе имеет IC₅₀ меньше чем 5 мкМ.

Пример D. Кассетное дозирование и анализ сыворотки для определения биодоступности.

Скрининг пероральной биодоступности проводят введением дозы крысам в кассете, т.е. смеси 6 соединений/дозирований/раствор. Кассета включает 5 тест-продуктов и стандартное соединение в общей дозе 10 мг/кг. Каждое соединение/тест-продукт превращают в натриевую соль с помощью эквимолярного 1N NaOH и растворяют в воде в концентрации 2 мг/мл. Кассету получают смешиванием равных объемов каждого из шести растворов. Кассетный дозирующий раствор хорошо перемешивают и затем подводят pH до 7,5-9. Дозированный раствор получают за день до исследования и перемешивают в течение ночи при комнатной температуре.

В данном скрининге используют самцов крыс Sprague Dawley (SD) из Charles River Laboratories в возрасте 6-8 недель. Крыс выдерживают на карантине в течение по меньшей мере одного дня, и они имеют постоянный доступ к пище и воде. За ночь до введения кассеты крыс не кормят в течение приблизительно 16 ч.

На каждую кассету выделяют четырех крыс SD. Каждой крысе перорально вводят одну дозу дозирующего раствора. Дозированный объем (5 мл/кг) и время регистрируют, а крыс кормят через 2 ч после дозирования. Образцы крови собирают посредством сердечной пункции в следующие точки времени: 4 ч, 8 ч и 12 ч. Непосредственно перед отбором крови крыс анестезируют газообразным CO₂ в течение 10-20 с. После сбора 12-часовых образцов крыс безболезненно умерщвляют асфиксией с помощью CO₂ с последующим смещением шеи.

Образцы крови до обработки хранят в гепаринизированных микропробирках при температуре ниже комнатной (4°C). Образцы крови центрифугируют (10000 об./мин в течение 5 мин) и образцы плазмы удаляют и хранят в морозильной камере при -20°C до проведения анализа на уровни лекарственных препаратов. Уровни лекарственных препаратов в плазме анализируют, используя протокол для прямой преципитации плазмы.

Образцы плазмы *in vivo* получают в 1,5 мл 96-луночной планшете добавлением в указанном порядке 100 мкл тест-плазмы, 150 мкл метанола с последующим взбалтыванием в течение 10-20 с. Добавляют 150 мкл 0,05 нг/мкл внутреннего стандарта ацетонитрила и взбалтывают в течение 30 с, добавлением в указанном порядке 100 мкл контрольной мышиной плазмы, с последующим добавлением 150 мкл метанола и взбалтыванием в течение 10-20 с. Добавляют 150 мкл 0,05 нг/мкл внутреннего стандарта ацетонитрила и взбалтывают в течение 30 с. В образцы вводят 0-200 нг (10 концентраций) соединения, представляющего интерес, в 50% метаноле для получения интервала стандартной кривой в интервале от 0,5 до 2000 нг/мл. Образец снова взбалтывают в течение 30 с.

Затем образцы центрифугируют в течение 20-30 мин при 3000 об./мин в микроцентрифуге Eppendorf, прежде чем перенести супернатант в чистый 96-луночный планшет. Затем органический растворитель упаривают до тех пор, пока образцы не станут сухими (под N₂ при 40°C/30-60 мин (ZymarkTurbovap)).

Затем остаток растворяют в 200-600 л подвижной фазы (50% CH₃OH/0,1% ТФА). Затем проводят ЖХ/МС/МС, используя тройной квадрупольный масс-спектрометр PE-Sciex API-3000 (SN0749707), Perkin-Elmer, автоматическое устройство для отбора проб Series2Q0, и насос Shimadzu 10A. Сбор осуществляют с использованием PE-Sciex Analyst (вариант 1.1) и анализ данных, а также количественное определение проводят с помощью PE-Sciex Analyst (вариант 1.1). Образец объемом 5-50 мкл вводят в колонку с обращенной фазой ThermoHypersil DASH-18 (Keystone 2,0x20 мм, 5 мкм, PN: 8823025-701), используя подвижную фазу 25% CH₃OH, 0,1% ТФА-100% CH₃OH, 0,1% ТФА. Время прохождения составляет приблизительно 8 мин при скорости потока приблизительно 300 мкл/мин.

Площадь под кривой (AUC) рассчитывают, используя линейную формулу трапеций от t=0 до последнего времени отбора образца концентрации в плазме t_x (см. Handbook of Basic Pharmacokinetics

(Справочник по основной фармакокинетике), Wolfgang A. Ritschel и Gregory L. Kearns, 5 изд., 1999).

$$AUC^{0-tx} = \sum_{n=0}^{n-1} ((C_n + C_{n+1})/2) \times (t_{n+1} - t_n) \text{ [в (мкг/мл)ч]}$$

В случае системы кассетного дозирования, образцы 4, 8 и 12 ч после внесосудистого введения дозы, AUC рассчитывают от $t = 0$ до $t = 12$ ч. Каждое из соединений в вышеприведенных примерах 1-5 при тестировании в данном анализе дает AUC по меньшей мере 5 мкг·ч/мл при нормализации по введению в дозе 10 мг/кг.

Пример E. Модели астмы (E1).

Воспалительные состояния, опосредованные интегрином $\alpha 4\beta 1$, включают, например, приток эозинофилов, гиперчувствительность и закупорку дыхательных путей, которые имеют место при хронической астме. Ниже описаны модели астмы на животных, которые используют для исследования *in vivo* действия соединений, соответствующих настоящему изобретению, предназначенных для применения при лечении астмы.

Модель астмы на крысах (E2).

Следуют способам, описанным в статьях Chapman et al., *Am J. Resp. Crit. Care Med.*, 153-4, A219 (1996) и Chapman et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155:4, A881 (1997), обе из которых включены в виде ссылки в своей полноте.

Овальбумин (ОА; 10 мкг/мл) смешивают с гидроксидом алюминия (10 мг/мл) и инъецируют (*i.p.*) крысам Brown Norway в день 0. Инъекции ОА совместно с адьювантом повторяют в дни 7 и 14. В день 21 сенсибилизированных животных удерживают в пластиковых трубах и подвергают воздействию (60 мин) аэрозоля ОА (10 мг/кг) в системе, действующей только через нос. Животных умерщвляют через 72 ч с помощью пентобарбитала (250 мг/кг, *i.p.*). Легкие орошают через трахейную канюлю, используя 3 аликвоты (4 мл) раствора Хенка (HBSS×10, 100 мл; ЭДТА 100 мМ, 100 мл; HEPES 1M, 25 мл; готовят в 1 л H₂O); выделяют клетки и объединяют и общий объем выделенной жидкости доводят до 12 мл добавлением раствора Хенка. Подсчитывают общее число клеток (счетчик Sysmex microcell F-500, TOA Medical Electronics Otd., Japan) и делают мазки, разводя выделенную жидкость (до приблизительно 10^6 клеток/мл) и перенося пипеткой аликвоты (100 мкл) в центрифуге (Cytospin, Shandon, U.K.). Мазки сушат на воздухе, фиксируют, используя раствор быстрого зеленого в метаноле (2 мг/мл) в течение 5 с, и окрашивают эозином G (5 с) и тиразином (5 с) (Diff-Quick, Browne Ltd. U.K.) с целью дифференцировки эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов. В целом подсчитывают 500 клеток/мазок с помощью световой микроскопии под масляной иммерсией (×100). Соединения, соответствующие данному изобретению, могут быть получены в 0,5% карбоксиметилцеллюлозе и 2% суспензии Tween 80 и перорально вводят крысам, которых сенсибилизируют аллергеном овальбумином. Считают, что соединения, которые подавляют вызываемое аллергеном накопление лейкоцитов в дыхательных путях активно сенсибилизированных крыс Brown Norway, активны в данной модели.

Модель астмы на мышах (E3).

Соединения оценивают также на модели активного воспаления на мышах, следуя способам, описанным в статьях Kung et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 13:360-365, (1995) и Schneider et al., (1999). *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:448-457, (1999), каждая из которых включена в виде ссылки в их полноте. Самок мышей Black/6 (в возрасте 8-12 недель) сенсибилизируют в день 1 путем внутрибрюшинной инъекции 0,2 мл смеси ова/квасцы, включающей 20 мкг ова (марка 4, Sigma) и 2 мг квасцов для инъекций (Pierce). Повторную инъекцию проводят в день 14. Мышам выводят в дни 28 и 29 1% ова (в 0,9% солевом растворе) в виде аэрозоля в течение 20 мин. Мышей безболезненно умерщвляют и собирают образцы бронхоальвеолярной промывной жидкости (3 мл) в день 30 через 48 ч после первого введения. Эозинофилы количественно определяют способом окрашивания FACS/FITC. Соединения, соответствующие настоящему изобретению, получают в 0,5% карбоксиметилцеллюлозе и 2% суспензии Tween 80 и перорально вводят мышам, которых сенсибилизируют к аллергену овальбумину. Считается, что соединения, которые подавляют вызываемое аллергеном накопление лейкоцитов в дыхательных путях активно сенсибилизированных мышей C57BL/6, активны в данной модели.

Модель астмы на овцах (E4).

В данной модели используют способы, описанные в статьях Abraham et al., *J.Clin. Invest*, 93:776-787 (1994) и Abraham et al., *Am J. Respir. Crit. Care Med.*, 156:696-703 (1997), обе из которых включены в виде ссылки в своей полноте. Соединения, соответствующие данному изобретению, оценивают путем внутривенного (водный солевой раствор), перорального (2% Tween 80, 0,5% карбоксиметилцеллюлозы) и аэрозольного введения овцам, которые гиперчувствительны к антигену *Ascaris suum*. Считают, что соединения, которые снижают ранний вызванный антигеном бронхиальный ответ и/или блокируют ответ дыхательных путей поздней фазы, например, обладают защитным эффектом в отношении вызванных антигеном поздних ответов и гиперчувствительности дыхательных путей ("АНР"), активный в данной модели.

Страдающих аллергией овец, у которых, как показано, развиваются оба, ранний и поздний бронхиальные ответы на введенный ингаляционным путем антиген *Ascaris suum*, используют для изучения эффектов исследуемых соединений на дыхательные пути. После местной анестезии носовых проходов 2% лидокаином через одну ноздрю продвигают баллонный катетер в нижний отдел пищевода. Затем живот-

ных интубируют трубкой с надувной манжетой через другую ноздрю с помощью гибкого бронхоскопа с волоконной оптикой.

Плевральное давление определяют по Abraham (1994). Аэрозоли (см. состав ниже) получают, используя одноразовый медицинский ингалятор, который дает аэрозоль со среднемассовым аэродинамическим диаметром 3,2 мкм, как определяют с помощью каскадного импактора Андерсена. Ингалятор соединяют с дозиметрической системой, состоящей из электромагнитного клапана и источника сжатого воздуха (20 psi (1400 мг/см²)). Выходное отверстие ингалятора направляют в пластиковый тройник, один конец которого соединен с дыхательным входом поршневого респиратора.

Электромагнитный клапан активируют в течение секунды в начале дыхательного цикла респиратора. Аэрозоли доставляют при VT 500 мл и частоте 20 вдохов/мин. В качестве контроля используют только 0,5% раствор бикарбоната натрия.

Для оценки бронхиальной чувствительности генерируют суммарные кривые зависимости концентрация-ответ на карбохолин согласно Abraham (1994). Бронхиальные биоптаты берут до и после начала лечения и через 24 ч после введения антигена. Бронхиальные биоптаты предварительно получают согласно Abraham (1994).

Исследование адгезии альвеолярных макрофагов *in vitro* можно также осуществить согласно Abraham (1994) и можно рассчитать долю адгезивных клеток.

Аэрозольный препарат.

Раствор соединения в 0,5% бикарбонате натрия/солевом растворе (мас./об.) в концентрации 30,0 мг/мл получают, используя следующий способ.

А. Получение 0,5% бикарбоната натрия/маточного солевого раствора: 100,0 мл.

Ингредиент	г/10,0 мл	Конечная концентрация
Бикарбонат натрия	0,5 г	0,5 %
Солевой раствор	оставшаяся часть до 10,0 мл	оставшаяся часть до 100%

Способ.

1. Добавляют 0,5 г бикарбоната натрия в мерную колбу объемом 100 мл.
2. Добавляют приблизительно 90,0 мл солевого раствора и обрабатывают ультразвуком до растворения.
3. При необходимости доводят до 100,0 мл солевым раствором и тщательно перемешивают.

В. Получение 30,0 мг/мл соединения: 10,0 мл.

Ингредиент	г/10,0 мл	Конечная концентрация
Соединение	0,300 г	30,0 мг/мл
0,5% бикарбонат натрия/маточный солевой раствор	оставшаяся часть до 10,0 мл	оставшаяся часть до 100%

Способ.

1. Добавляют 0,300 г соединения в мерную колбу объемом 100 мл.
2. Добавляют приблизительно 9,7 мл 0,5% бикарбоната натрия/маточного солевого раствора.
3. Обрабатывают ультразвуком, пока соединение полностью не растворится.
4. При необходимости доводят до 10,0 мл 0,5% бикарбонатом натрия/маточным солевым раствором и тщательно перемешивают.

Пример F. Вызываемый адьювантом артрит у крыс.

Вызываемый адьювантом артрит ("AIA") представляет собой модель на животных, используемую в исследовании ревматоидного артрита ("RA"), который вызывают инъекцией *M. tuberculosis* в основание хвоста крыс Lewis. Через 10-15 дней после инъекции у животных развивается тяжелый прогрессирующий артрит.

Как правило, соединения тестируют на их способность изменять опухание задней лапы и повреждение кости, обусловленное отеком, вызываемым адьювантом у крыс. Для количественной оценки подавления опухания задней лапы, обусловленного AIA, определяют две фазы воспаления: (1) первичное и вторичное инъецированной задней лапы и (2) вторичное неинъецированной задней лапы, которое, как правило, начинает развиваться через приблизительно 11 дней после индукции воспаления в инъецированной лапе. Уменьшение последнего типа воспаления является показателем иммунодепрессивной активности. См. статью Chang, Arth. Rheum., 20, 1135-1141 (1977).

Использование модели RA на животных, такой как AIA, дает возможность изучить клеточные события, участвующие в ранних стадиях заболевания. Экспрессия CD44 на макрофагах и лимфоцитах положительно регулируется во время раннего развития адьювантного артрита, тогда как экспрессия LFA 1 положительно регулируется позднее при развитии заболевания. Понимание взаимодействий между молекулами адгезии и эндотелием на ранних стадиях адьювантного артрита могло бы привести к существенным достижениям в способах, используемых для лечения RA.

Пример G. Вызываемый коллагеном артрит у крыс.

Цель. Определить эффективность исследуемого соединения, соответствующего изобретению (Соединения А), введенного согласно предложенному дозированию (дни (-1)-20) для подавления воспаления, разрушения хряща и резорбции костей, которые происходят при развитии коллагенового артрита типа II у крыс.

Животные. Сначала используют 54 самки крыс Lewis (Harlan) массой 125-150 г (50 инъецируют коллаген, чтобы получить 50 отвечающих в дни 10, 11, 12 для 6 из 10). Животным (10/группу артрита, 4/группу нормального контроля), помещенным по 4-5/клетку, дают адаптироваться в течение 4-8 дней. Животным дважды в день вводят дозу 3, 10 и 30 мг/кг.

Материалы. Агенты или лекарственные препараты в носителе, коллаген типа II, неполный адьювант Фрейнда, метотрексат (Sigma), соединение А.

Общая схема исследования.

Дозирование начинают в день -1.

Адаптированных животных анестезируют изофлураном и заданными инъекциями коллагена (DO). В день 6 их анестезируют снова для второй инъекции коллагена. Коллаген готовят, получая раствор 4 мг/мл в 0,01N уксусной кислоте. Равные объемы коллагена и неполного адьюванта Фрейнда эмульгируют встряхиванием руками, пока частицы данного материала держат форму при помещении в воду. Каждое животное получает 300 мкл смеси, каждый раз распределяемой в 3 областях на спине.

Измерение штангенциркулем нормальных (до заболевания) правого и левого коленных суставов проводят в день 9. В дни 10-12 наблюдается начало артрита.

Крыс взвешивают в дни (-)1, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 и 20 исследования и измерения штангенциркулем коленей проводят каждый день, начиная с дня 9. Конечные массы тела определяют в день 20. После последнего измерения массы тела животных анестезируют для последнего сбора плазмы и затем безболезненно умерщвляют.

Как задние лапы, так и колени удаляют. Задние лапы взвешивают, помещают (с коленями) в формалин и затем обрабатывают для микроскопии.

Обработка суставов.

После выдерживания в течение 1-2 дней в фиксаторе и затем в течение 4-5 дней в декальцификаторе коленные суставы разрезают пополам в продольном направлении, колени разрезают пополам во фронтальной плоскости, обрабатывают, заключают, делают срезы и окрашивают толуидиновым синим.

Соединение А демонстрирует существенное подавление по сравнению с контрольными группами животных, не получающих лечения от воспаления колена, и гистопатологией колена в тестируемых дозах (3,0, 10,0 и 30,0 мг/кг).

Пример H. Индукция колита у крыс HLA-B27.

Эффективность соединений, соответствующих настоящему изобретению, в обратном развитии колита определяют у трансгенных крыс HLA-B27. Трансгенных крыс HLA-B27 используют как модель на животных воспалительного заболевания кишечника, которое имитирует болезнь Крона у человека. Крысы характеризуются сверхэкспрессией белков человеческой тяжелой цепи HLA-B27 MHC класса I и микроглобулина β -2, которые индуцируют ряд аутоиммунных заболеваний, которые включают воспаление кишечника.

Терапевтический эффект соединения А, соответствующего настоящему изобретению, в устранении колита оценивают на трансгенных крысах HLA-B27. Больным крысам вводят подкожно дозу 100 мг/кг соединения А два раза в день в течение 16 дней. Образцы, полученные от животных, которым вводят дозу 100 мг/кг соединения А, показывают клиническое и гистологическое устранение колита и имитируют аналогичную эффективность с группой положительного контроля, которую лечат антителом GG5/3 к α 4.

Результаты показателя активности заболевания (DAI), показывающие в целом улучшенные результаты для крыс, которым вводят дозу 100 мг/кг соединения А, соответствующего настоящему изобрете-

нию, и 10 мг/кг GG5/3 (положительный контроль), чем у крыс, которым вводят носитель. Консистенция кала и результаты FOB для крыс, получающих соединение А и GG5/3, статистически отличаются от группы животных, получающих носитель.

Индукция колита.

20 трансгенных крыс HLA-B27 (в возрасте 6-9 недель) заказывают в фирме Taconic. Крыс адаптируют в отделении для животных в течение 10 недель. Подстилку для животных из различных клеток смешивают один раз в неделю для контроля "грязной" флоры окружающей среды.

Варианты лечения.

Крыс включают в исследование и случайным образом распределяют на четыре группы (n=5) на основе массы и результатов DAI ($FC \geq 3$, $FOB \geq 2$). Экспериментальным группам вводят подкожно 100 мг/кг соединения А (рН 2,8) два раза в день в течение 16 дней и заканчивают в низшей точке. Контрольные группы включают группу, обработанную носителем (рН 3,2), и группу положительного контроля GG5/3 (мышинное антитело к крысиному интегрину $\alpha 4$), вводимого подкожно в дозе 10 мг/кг (5 мл/кг) в день 0, день 3 и день 6, и заканчивают в низшей точке в день 8 (см. табл. 5). Препараты соединения А и носителя получают каждые 5 дней.

Таблица 5

План исследования IBD

Лечение	N	Доза (мг/кг/ день)	Объем дозы (мл/кг)	Путь	Частота	Состав
Носитель	5	0	0	SC	два раза в день	0,9% солевой раствор, рН 3,3 с 10 Н NaOH
Соединение А	5	100	5	SC	два раза в день	0,9% солевой раствор, рН 3,3 с 10 Н NaOH
GG5/3	3	30	5	SC	День 0, 3 и 6	1xPBS

SC = подкожно.

Определение показателей конечных точек.

Величины показателя активности заболевания, тест консистенции кала и тест на обнаружение крови в кале определяют 4 раза в неделю для получения прижизненных клинических результатов. Основным определением для исследования является гистопатологический анализ слепой кишки, проксимального отдела толстой кишки, среднего отдела толстой кишки и дистального отдела толстой кишки. Используют систему подсчета IBD (табл.6).

Система подсчета IBD

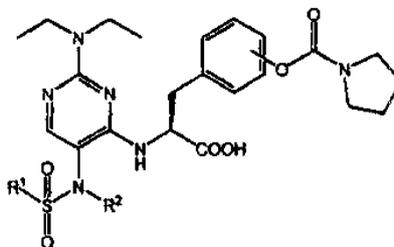
Множество концевых точек	
A	Разрушение эпителия и желез
B	Расширение железистых крипт
C	Истощение и утрата бокаловидных клеток
D	Инфильтраты воспалительных клеток
E	Отек
F	Сосудистая гиперемия
G	Абсцессы крипт
H	Атрофия

Величины показателя активности заболевания (DAI) ниже у крыс, которым вводили соединение А и GG5/3 (положительный контроль), чем в группе животных, которым вводили только носитель. Данные AUC консистенции кала и теста на обнаружение крови в кале для групп, которым вводили соединение А и GG5/3 (положительный контроль), также статистически отличны от результатов по группе животных, которым вводили только носитель.

Хотя некоторые варианты осуществления, представленные в изобретении, проиллюстрированы и описаны, следует иметь в виду, что в нем могут быть сделаны различные изменения, не выходящие за пределы сущности и объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пиримидинилсульфонамидные соединения, охватываемые общей формулой I



I

в которой R¹ выбран из группы, включающей C₁-C₄алкил и C₁-C₄галоалкил; а

R² выбран из группы, включающей C₁-C₄алкил, C₂-C₄алкенил, C₂-C₄алкинил и C₃-C₆циклоалкил; или их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

2. Соединения по п.1, в которых R¹ представляет собой C₁-C₂алкил.

3. Соединения по п.1, в которых R¹ представляет собой метил или трифторметил.

4. Соединения по п.1, в которых R¹ представляет собой метил.

5. Соединения по п.1, в которых R² представляет собой C₁-C₄алкил.

6. Соединения по п.1, в которых R² представляет собой C₁-C₃алкил.

7. Соединения по п.6, в которых R² представляет собой метил или этил.

8. Соединения по п.6, в которых R² представляет собой изопропил.

9. Соединения по п.1, в которых R² представляет собой C₃-C₆циклоалкил.

10. Соединения по п.9, в которых R² представляет собой циклопентил.

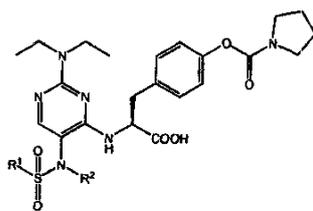
11. Соединения по п.1, в которых R² представляет собой C₂-C₄алкенил.

12. Соединения по п.11, в которых R² представляет собой аллил.

13. Соединения по п.1, в которых R² представляет собой C₂-C₄алкинил.

14. Соединения по п.13, в которых R² представляет собой пропаргил.

15. Пиримидинилсульфонамидные соединения, охватываемые общей формулой II



II

в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а

R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил, C_2 - C_4 алкинил и C_3 - C_6 циклоалкил, или их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

16. Соединения по п.15, в которых R^1 представляет собой C_1 - C_2 алкил.

17. Соединения по п.15, в которых R^1 представляет собой метил или трифторметил.

18. Соединения по п.15, в которых R^1 представляет собой метил.

19. Соединения по п.15, в которых R^2 представляет собой C_1 - C_4 алкил.

20. Соединения по п.15, в которых R^2 представляет собой C_1 - C_3 алкил.

21. Соединения по п.20, в которых R^2 представляет собой метил или этил.

22. Соединения по п.20, в которых R^2 представляет собой изопропил.

23. Соединения по п.16, в которых R^2 представляет собой C_3 - C_6 циклоалкил.

24. Соединения по п.23, в которых R^2 представляет собой циклопентил.

25. Соединения по п.15, в которых R^2 представляет собой C_2 - C_4 алкенил.

26. Соединения по п.25, в которых R^2 представляет собой аллил.

27. Соединения по п.15, в которых R^2 представляет собой C_2 - C_4 алкинил.

28. Соединения по п.27, в которых R^2 представляет собой пропаргил.

29. Пиримидинилсульфонамидные соединения, выбранные из группы, включающей

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-1,1,1-трифторметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-изопропилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(5-(N-циклопентилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-метилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-(проп-2-инил)метилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилметилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(5-(N-аллилметилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилбутилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(5-(3-хлор-N-этилпропилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(5-(3-хлор-N-метилпропилсульфонамидо)-2-(диэтиламино)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-3,3,3-трифторпропилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

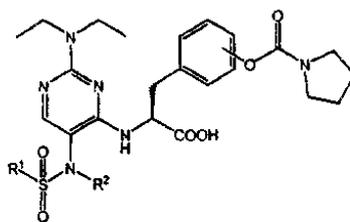
(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этилпропилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту и

(S)-2-(2-(диэтиламино)-5-(N-этил-2-метилпропилсульфонамидо)пиримидин-4-иламино)-3-(4-(пирролидин-1-карбонилокси)фенил)пропановую кислоту;

а также их фармацевтически приемлемые соли или сложные эфиры.

30. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

31. Способ лечения заболевания, опосредованного, по меньшей мере частично, интегрином $\alpha 4$ у больного, заключающийся в том, что указанному больному вводят фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений, охватываемых общей формулой



I

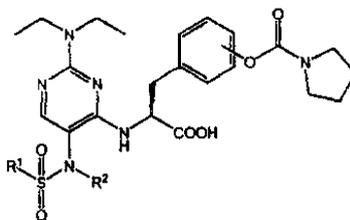
в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил и C_2 - C_4 алкинил; или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров.

32. Способ по п.31, в котором указанное заболевание выбрано из группы, включающей астму, рассеянный склероз и воспалительное заболевание кишечника.

33. Способ по п.31, в котором указанное заболевание представляет собой болезнь Крона.

34. Способ по п.31, в котором указанное заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

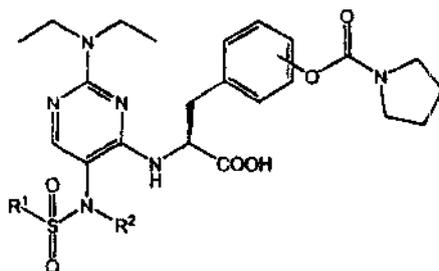
35. Способ снижения и/или предупреждения воспалительного компонента заболевания у больного млекопитающего, который заключается в том, что указанному млекопитающему вводят фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений, охватываемых общей формулой



I

в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил и C_2 - C_4 алкинил; или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров.

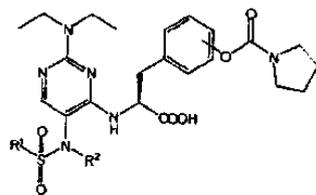
36. Способ снижения и/или предупреждения аутоиммунного ответа у млекопитающего больного, который заключается в том, что указанному млекопитающему вводят фармацевтическую композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из соединений, охватываемых общей формулой



I

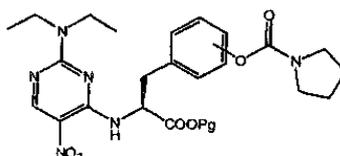
в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил и C_2 - C_4 алкинил; или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров.

37. Способ получения пиримидинилсульфонамидных соединений, охватываемых общей формулой I



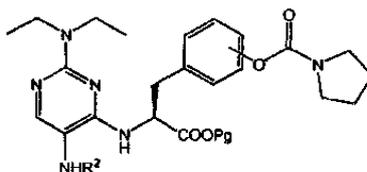
I

в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил, C_2 - C_4 алкинил и C_3 - C_6 циклоалкил, или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров, в котором осуществляют взаимодействие соединения формулы III



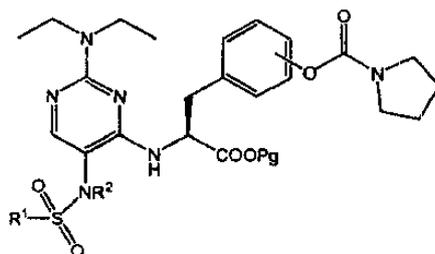
III

где P_g представляет собой защитную группу карбоксила, с C_1 - C_4 альдегидом или кетоном, C_2 - C_4 алкенилальдегидом или кетоном, C_2 - C_4 алкинилальдегидом или кетоном, C_3 - C_6 циклоалкилкетон и бензальдегидом в условиях восстановительного аминирования после восстановления нитрогруппы в формуле III до первичного амина с образованием соединения формулы IV



IV

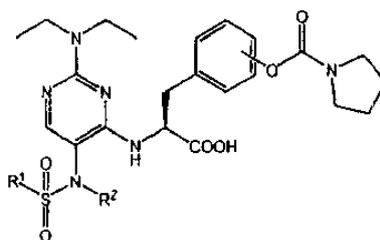
затем полученное соединение формулы IV вводят во взаимодействие с сульфонилогенидом формулы R^1SO_2Z , где Z представляет собой галоген, с образованием соединения формулы V



V

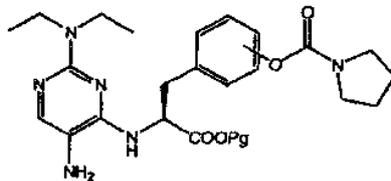
после чего из полученного соединения формулы (V) удаляют защитную группу карбоксила с образованием соединения формулы I.

38. Способ получения пиримидинилсульфонамидных соединений, охватываемых общей формулой I



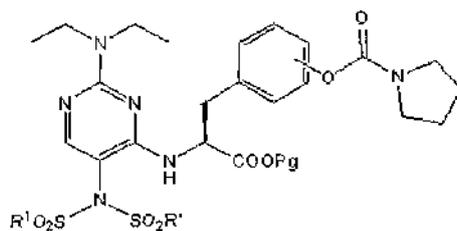
I

в которой R^1 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил и C_1 - C_4 галоалкил; а R^2 выбран из группы, включающей C_1 - C_4 алкил, C_2 - C_4 алкенил, C_2 - C_4 алкинил и C_3 - C_6 циклоалкил, или их фармацевтически приемлемых солей или сложных эфиров, в котором осуществляют взаимодействие соединения формулы VI



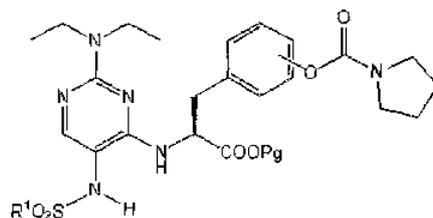
VI

где Pg представляет собой защитную группу карбоксила, с избытком R^1SO_2X с образованием соединения формулы VII



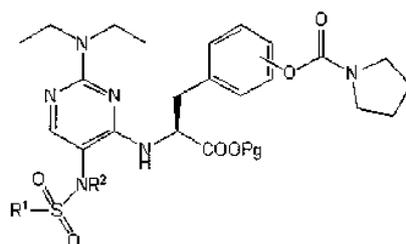
VII

затем из полученного соединения формулы VII избирательно удаляют одну группу $-SO_2R^1$ с образованием соединения формулы VIII



VIII

после чего полученное соединение формулы VIII вводят во взаимодействие с алкилирующим агентом формулы R^2-X , где X представляет собой галоген, или с диметилсульфатом, где R^2 представляет собой метил, с образованием соединения формулы IX



IX

а затем из полученного соединения формулы IX удаляют защитную группу карбоксила с образованием соединения формулы I.

