

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 106894 A

7(51) C 07 D 209/42

A 61 K 31/404

A 61 P 29/00



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 106894

(22) Заявено на 02.07.2002

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 0000626 (32) 13.01.2000 (33) GB

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 4 на 30.04.2003

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

ASTRAZENECA AB, SOEDERTAELJE (SE)

(72) Изобретател(и):

Alan Wellington Faull

Jason Grant Kettle, Cheshire (GB)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:

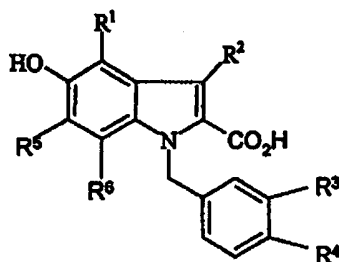
PCT/GB01/00069, 11.01.2001

(87) № и дата на PCT публикация:

WO01/51466, 19.07.2001

(54) ИНДОЛНИ ПРОИЗВОДНИ КАТО АНТАГОНИСТИ НА МСР-1 РЕЦЕПТОР

(57) Изобретението се отнася до съединения с формула



в която R¹ е водород, халоген или метокси, R² - водород, халоген, метил, етил или метокси, R³ - водород, група халоген или група трифлуорометил, R⁴ - водород, група халоген или група трифлуорометил, R⁵ - водород или халоген, R⁶ - водород или халоген, при условие, че когато R⁵ и R⁶ са водород и единият от R³ или R⁴ е хлор или флуор, тогава другият не е хлор или флуор, или до негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство. Съединенията са приложими за лечение на възпалителни заболявания, по-специално като антагонисти на МСР-1-свързан ефект при бозайници, включително при хора.

14 претенции

BG 106894 A

ИНДОЛНИ ПРОИЗВОДНИ КАТО АНТАГОНИСТИ НА MCP-1 РЕЦЕПТОР

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до анти-възпалителни съединения, които действат чрез антагонизъм към CCR2 рецептор (познат също като MCP-1 рецептор), водещо *inter alia* до инхибиране на моноцит-хемоатрактант протеин-1 (MCP-1). Тези съединения съдържат индолен остатък. Освен това изобретението се отнася до фармацевтични състави, които ги съдържат, метод за получаването им, междинни съединения, полезни за получаването им и използването им като терапевтични средства.

Предшестващо състояние на техниката

MCP-1 е член на фамилията хемокин про-възпалителни протеини, които посредничат левкоцитен хемотаксис и активиране. MCP-1 е C-C хемокин, който е един от най-ефикасните и селективни Т-клетки и моноцит хемоатрактант и активиращи известни средства. Счита се че MCP-1 е в основата на патофизиологията на голям брой възпалителни заболявания включително ревматоиден артрит, гломеруларни нефрити, фиброза на белите дробове, рестеноза (Международна патентна заявка WO 94/09128), алвеолити (Jones et al., 1992, J.Immunol., 149, 2147) и астма. Други заболявания, за които се счита че MCP-1 участва в тяхната патологията са атеросклерози (напр. Koch et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 772-779), псориазис (Deleuran et al., 1996, J. Dermatological Science, 13, 228-236), забавен тип свръхчувствителни реакции на кожата, възпалителни чревни

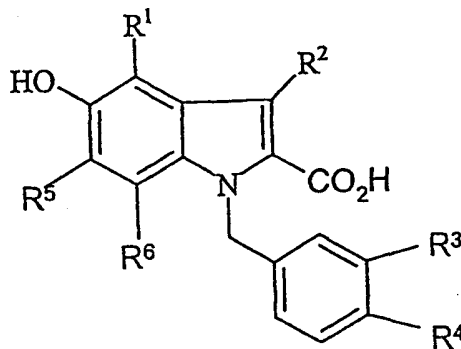
заболявания (Grimm et al., 1996, J. Leukocyte Biol., 59, 804-812), множествена склероза и мозъчна травма (Berman et al., 1996, J. Immunol., 156, 3017-3023). MCP-1 инхибитор може също така да се прилага при лечение на удар, реперфузни увреждания, исхемия, миокарден инфаркт и отхвърляне при трансплантация.

MCP-1 действа чрез CCR2 рецептор. MCP-2 и MCP-3 могат също да действат, поне частично, посредством този рецептор. Следователно в това описание, когато се отнася за "инхибиране или антагонизъм на MCP-1" или "MCP-1 опосредствени ефекти" това включва инхибиране или антагонизъм на MCP-2 и/или MCP-3 опосредствени ефекти когато MCP-2 и/или MCP-3 действат чрез CCR2 рецептор.

Техническа същност на изобретението

Заявителите са установили клас съединения, съдържащи индолни остатъци, които имат полезно инхибиращо действие към MCP-1. В международна патентна заявка, публикация No WO 99/07351 са описани клас индоли с инхибиращо действие към MCP-1. Тази заявка се основава на изненадващото разкритие, че частично заместени 5-хидрокси индоли са инхибитори на MCP-1, които притежават неочаквани и полезни свойства по отношение на ефикасност и/или кръвни нива и/или жизнелост и/или разтворимост.

Настоящото изобретение се отнася до съединение с формула (I):



(I)

В която

R^1 е водород, халоген или метокси група;

R^2 е водород, халоген, метил, етил или метокси група;

R^3 е група халоген или трифлуорометил група;

R^4 е група халоген или трифлуорометил група;

R^5 е водород или халоген;

R^6 е водород или халоген;

при условие, че когато R^5 и R^6 са и двата водород и единият от R^3 или R^4 е хлоро или флуоро, тогава другият не е хлоро или флуоро; или фармацевтично приемлива негова сол или пролекарство.

В тази заявка понятието "алкил" включва алкилни групи, както с права така и с разклонена верига, но когато се отнася до определени алкилни групи като например "пропил", то се има предвид само разновидността с права верига. Понятието "хало" се отнася до флуоро, хлоро, бромо и йодо.

Подходящи примери за R^1 са водород, флуоро, хлоро, бромо, йодо или метокси. За предпочитане R^1 е водород, флуоро или хлоро, и повече за предпочитане R^1 е водород.

Характерни примери за R^2 са водород, флуоро, хлоро, бромо, йодо, метил, етил или метокси. Подходящо R^2 е водород, флуоро, хлоро, бромо, йодо или метокси и за предпочитане R^2 е водород.

При едно изпълнение R^5 и R^6 са и двата водород. В този случай когато R^4 е трифлуорометил, R^3 е подходящо хлоро, флуоро, бромо или йодо група, за предпочитане хлоро, флуоро или бромо група и повече за предпочитане хлоро или флуоро.

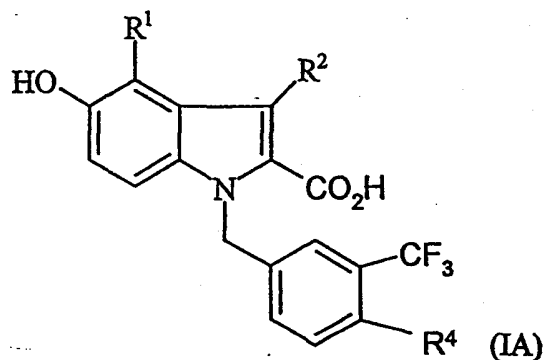
Алтернативно, когато R^5 и R^6 са и двата водород, R^3 е трифлуорометил и R^4 е халоген като флуоро, хлоро, бромо или йодо и за предпочитане хлоро или флуоро и повече за предпочитане хлоро.

Подобни комбинации на R^3 и R^4 могат да бъдат приложени, когато поне единият от R^5 и R^6 е различен от водород, но в този случай подходящо R^3 и R^4 са и двата халоген като флуоро, хлоро, бром и йодо, за предпочитане флуоро, хлоро или бром и повече за предпочитане флуоро или хлоро. Особени примери са случаите когато R^3 и R^4 са и двата хлоро, или R^3 и R^4 са и двата флуоро. Друга алтернатива е тази, при която единият от R^3 и R^4 е хлоро, а другият е флуоро.

Подходящо R^5 е водород, флуоро, хлоро или бром и за предпочитане R^5 е водород. Друго предпочитано значение за R^5 е например флуоро.

Подходящо R^6 е водород, флуоро, хлоро или бром. За предпочитане R^5 е водород или флуоро и повече за предпочитане водород.

При предпочитано изпълнение настоящото изобретение се отнася до съединение с формула (IA):



или фармацевтично приемлива негова сол или пролекарство, в която R^1 , R^2 и R^4 притежават посочените по-горе значения. За предпочитане R^1 и R^2 са водород. За предпочитане R^4 е хлоро или флуоро.

При друго предпочитано изпълнение изобретението се отнася до съединение с формула I или фармацевтично приемлива негова сол или пролекарство, където R^1 , R^2 и R^4 притежават посочените по-горе значения, R^3 е трифлуорометил, R^5 е халоген

и R⁶ е водород. За предпочитане R¹ и R² са водород. За предпочитане R⁴ е хлоро или флуоро, по-специално хлоро. За предпочитане R⁵ е флуоро.

Предпочитаните съединения съгласно настоящото изобретение включват всяко едно от съединенията, получени, съгласно примерите и същите са посочени в таблица 1.

Таблица 1

Пример	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1	H	H	CF ₃	Cl	H	H
2	H	H	F	CF ₃	H	H
3	H	H	Cl	CF ₃	H	H
4	H	H	Br	Cl	H	H
5	H	H	F	Br	H	H
6	H	H	Br	F	H	H
7	F	H	CF ₃	F	H	H
8	F	H	CF ₃	Cl	H	H
9	F	H	CF ₃	F	F	H
10	Cl	H	Cl	Cl	Cl	H
11	H	Br	CF ₃	F	H	H
12	H	Br	CF ₃	Cl	H	H
13	H	Br	Cl	CF ₃	H	H
14	H	Cl	F	CF ₃	H	H
15	H	I	F	CF ₃	H	H
16	H	CH ₃ O	CF ₃	Cl	H	H
17	H	H	CF ₃	F	Cl	H
18	H	H	CF ₃	Cl	Cl	H
19	H	H	CF ₃	Cl	H	F
20	H	H	CF ₃	Cl	Br	H
21	H	H	Cl	Cl	Br	H

22	H	H	CF ₃	Cl	F	H
23	H	H	Cl	Cl	F	H
24	H	H	Cl	Cl	Cl	H
25	Cl	H	CF ₃	Cl	H	H
26	Cl	H	CF ₃	Cl	Cl	H

Настоящото изобретение освен това се отнася и до всички тавтомерни форми на съединенията с формула (I).

Разбираемо е също така, че някои съединения с формула (I) могат да съществуват в солватна, както и в несолватна форма, като например хидратни форми. Разбираемо е също, че настоящото изобретение обхваща всички тези солватни форми.

Съединенията с формула (I) са инхибитори на моноцит хемоатрактант протеин-1. Освен това се счита, че те инхибират RANTES индуциран хемотаксис. RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) е друга форма хемокин от същата фамилия като MCP-1, с подобен биологичен профил, но действащ чрез CCR1 рецептор. Следователно друго предимство на настоящото изобретение е това, че като се инхибира активността както на MCP-1, така и на RANTES, то предоставя съединения с особено полезни свойства. В резултат на това тези съединения могат да бъдат използвани за лечение на болести посредством тези средства, по-специално възпалителни заболявания.

Подходящи фармацевтично приемливи соли на съединения с формула (I) включват алкални соли като соли на алкални метали например натрий, соли на алакалоземни метали като например калций или магнезий, соли на органични амини, например триетиламин, морфолин, N-метилпиперидин, N-етилпиперидин, прокаин, дибензиламин, N,N-дибензилетиламин или аминокислотни соли.

киселини като например лизин. Съгласно друг аспект, когато съединението е достатъчно алкално, подходящите соли включват присъединени соли на киселина като метансулфонат, фумарат, хидрохлорид, хидробромид, цитрат, малеат и соли образувани с фосфорна и сярна киселина. Може да има повече от един катион или анион в зависимост от броя на наситените функционалности и валентността на катионите и анионите. Предпочитана фармацевтично приемлива сол е натриева сол.

В техниката са известни различни форми на пролекарства. Например такива пролекарствени производни са посочени в:

- a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) and Methods in Enzymology, Vol. 42, 309-396. Edited by K. Widder, et al. (Academic Press, 1985);
- b) Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Prodrugs", by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);
- c) H. Bundgaard Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);
- d) H. Bundgaard et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); and
- e) N. Kakeya et al., Chem. Pharm Bull, 32, 692 (1984).

Примери на такива пролекарства са *in vivo* отцепващи се естери на съединение, съгласно настоящото изобретение. *In vivo* отцепващ се естер на съединение съгласно настоящото изобретение, съдържащ карбоксилна група е например фармацевтично приемлив естер, който е отцепен в тялото на човек или животно и образува изходната киселина. Подходящи фармацевтично приемливи естери за карбокси включват C₁₋₆ алкил естери, например метил или етил; C₁₋₆ алкоксиметил естери

например метоксиметил; C_{1-6} алканоилоксиметил естери
например пивалоилоксиметил; фталидил естери; C_{3-8}
циклоалкоксикарбонилокси C_{1-6} алкил естери например 1-
циклохексилкарбонилоксиетил; 1,3-диоксолан-2-илметил естери
например 5-метил-1,3-диоксолан-2-илметил; C_{1-6}
алкоксикарбонилоксиетил естери например 1-
метоксикарбонилоксиетил; аминокарбонилметил естери и техни
моно- или ди-N- (C_{1-6} алкил) различни видове, например N,N-
диметиламинокарбонилметил естери и N-
етиламинокарбонилметил естери; и могат да бъдат образувани на
всяка една карбоксилна група в съединението съгласно
настоящото изобретение. *In vivo* отцепван естер на съединение
съгласно настоящото изобретение, съдържащо хидроксилна
група е например фармацевтично приемлив естер, който се
отцепва в тялото на човек или животно и се образува изходната
карбоксилна група. Подходящите фармацевтично приемливи
естери за хидроксилна група включват C_{1-6} алканоилестери
например ацетил естери; и бензоил естери, в които фенилната
група може да бъде заместена с аминометил или N-заместен
моно- или ди- C_{1-6} алкил аминометил, например 4-
аминометилбензоил естери и 4-N,N-диметиламинометилбензоил
естери.

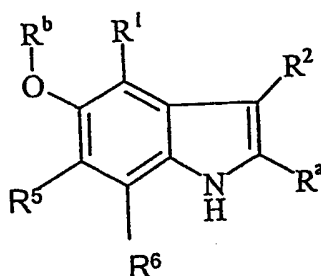
Други примери на такива пролекарства са *in vivo* отцепвани
амиди на съединение съгласно настоящото изобретение.

Примерите на такива *in vivo* отцепвани амиди включват N- C_{1-6}
алкиламид и N,N-ди-(C_{1-6} алкил)амид като N-метил, N-етил, N-
пропил, N,N-диметил, N-етил-N-метил или N,N-диетиламид.

Съгласно друг аспект настоящото изобретение се отнася до
метод за получаване на съединение с формула (I) или негова

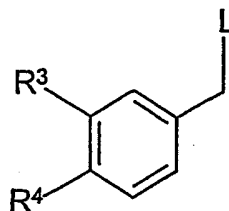
фармацевтично приемлива сол или пролекарство, който метод включва:

а) съединение с формула (II)



(II)

в която R^1 , R^2 , R^5 и R^6 притежават посочените значения съгласно формула (I), R^a е карбоксилна група или нейна блокирана форма и R^b е водород или подходяща хидроксил блокираща група, взаимодейства със съединение с формула (III)



(III)

в която R^3 и R^4 придежават значенията съгласно формула (I) и L е двупозиционна група; и след това ако е необходимо:

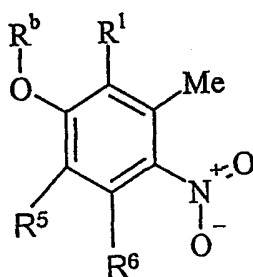
- i) превръщане на съединение с формула (I) в друго съединение с формула (I);
- ii) отстраняване на всяка една от блокиращите групи; или
- iii) образуване на негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство.

Подходящи значения за L са например халогено или сулфонилокси група, например хлоро, бромно, метансулфонилокси или толуол-4-сулфонилокси група.

Съединения с формула (II) и (III) подходящо взаимодействат заедно в инертен органичен разтворител като N,N-

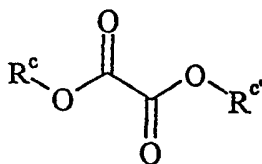
диметилформаид, дихлорометан или ацетонитрил в присъствие на основа като например натриева основа, натриев хидрид или калиев карбонат. Подходящо реакцията се извършва в присъствие на фазово трансферен катализатор като кисел тетра-п-битиламониев сулфат. Реакционното време е в граници от 1-6 часа, за предпочитане 1-3 часа. Използва се умерена температура например 15-30°C, за предпочитане 20-25°C.

Съединения с формула (II) могат да бъдат търговски продукти или те могат да бъдат получени чрез модифициране като се използват известни начини за производство на налични търговски продукти- съединения с формула (II). По-специално те могат да бъдат получени като съединение с формула (IV)



(IV)

в която R¹, R⁵, R⁶ и R^b притежават посочените по-горе значения, взаимодейства със съединение с формула (V)



(V)

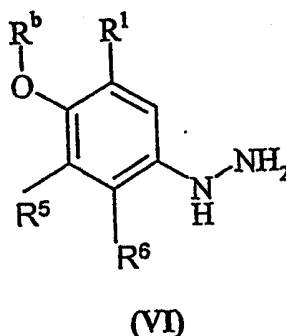
в която R^c и R^c всеки независимо един от друг са избрани от C₁₋₄-алкил.

Съединенията с формула (IV) и (V) взаимодействат подходящо заедно при реакционен режим Reissert както и в инертен разтворител (като тетраhydroфуран) в присъствие на основа (като например калиев етоксид) при температура в

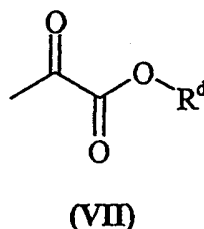
граници от 15-30°C, за предпочитане 20-25°C, в продължение на 10-20 часа, за предпочитане 15-17 часа. Полученото съединение се изолира и се разтваря в алкохол като етанол и органична киселина (като например оцетна киселина) и се добавя трансферен метален катализатор (като например 10% Pd/C) и циклохексан. След това сместа може да бъде нагрявана при температура 60-120°C, за предпочитане 70-90°C в продължение на 15-25 часа, за предпочитане 16-20 часа и се получава съединение с формула (II), в която R^a е -CO₂R^c.

Подходящо R^c и R^{c'} са C₁₋₄алкил, за предпочитане метил или етил.

Алтернативно, съединения с формула (II) могат да бъдат получени като съединение с формула (VI)



в която R¹, R⁵, R⁶ и R^b притежават посочените по-горе значения, взаимодейства със съединение с формула (VII):



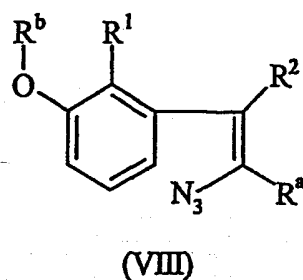
в която R^d е C₁₋₄алкил.

Подходящо R^d е C₁₋₄алкил, за предпочитане метил или етил.

Подходящи съединения (VI) и (VII) и двете взаимодействат при режим Fischer като например органична киселина (като оцетна киселина) в алкохол (като етанол), при температура 60-

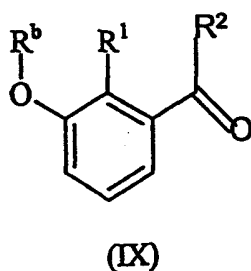
90°C, за предпочитане 75-85°C, в продължение на 1-5 часа, за предпочитане в продължение на 1-3 часа. Полученото съединение се смесва със силна киселина (като например полифосфорна киселина) и се нагрява при температура 90-150°C, за предпочитане 100-120°C, в продължение на 0.5-4 часа, за предпочитане в продължение на 0.5-2 часа и се получава съединение с формула (II), в която R² е водород. Тогава по желание R² може по избор да бъде превърнат в друго значение на R² както е дефинирано, съгласно формула (I) по известните в техниката методи.

При предпочитано изпълнение съединенията с формула (II) се получават чрез циклиране на съединение с формула (VIII)

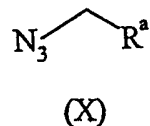


в която R¹, R^a, R^b и R² притежават посочените по-горе значения.

Циклирането може да бъде извършено като съединението се нагрява под обратен хладник в органичен разтворител като ксилен. Съединения с формула (VIII) се получават подходящо като съединение с формула (IX)



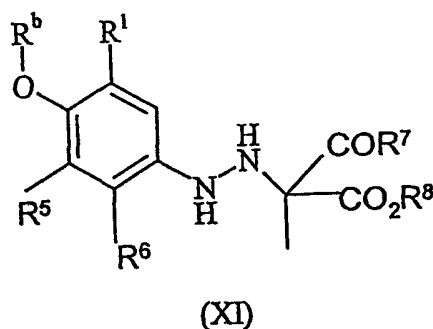
в която R^1 , R^2 и R^b притежават посочените по-горе значения, взаимодействия със съединение с формула (X)



в която R^a притежава посоченото по-горе значение.

Подходящо реакцията се провежда в органичен разтворител като например алкохол, по-специално метанол, в присъствие на основа като например алкоксид на алкален метал, по-специално натриев метоксид. Подходящо е да се използва умерена температура от -30°C до 20°C .

При друго изпълнение съединение с формула (II) се получава чрез циклиране на съединение с формула (XI)

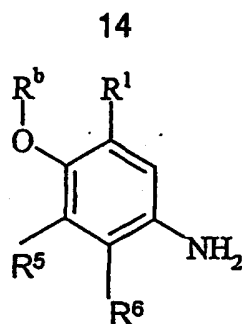


в която R^1 и R^b притежават посочените по-горе значения, R^7 е алкил като например метил, и R^8 е карбоксил блокираща група като например алкил, по-специално метил.

Циклирането се провежда подходящо при режим Japp Klingemann като се нагрява разтвор на съединението в органичен разтворител като например толуол и подходяща киселина като например p-толуол сулфонова киселина.

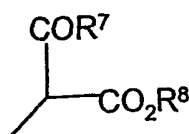
Подходящо е получаването на съединение с формула (XII) като съединение с формула (XII)

00.07.02



(XII)

в която R^1 , R^b , R^5 и R^6 притежават посочените по-горе значения, взаимодействия със съединение с формула (XII)



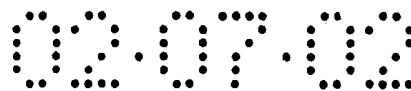
(XIII)

в която R^7 и R^8 притежават значенията, посочени по-горе съгласно формула (XI). Съединение с формула (XII) се разтваря подходящо в разредена киселина като например 1.5N HCl в присъствие на нитрит като например натриев нитрит при умерено ниска температура от -30°C до 0°C , за предпочитане -5°C .

След това този разтвор се смесва с разтвор на съединение с формула (XIII) в органичен разтворител като например етанол в присъствие на разтвор на основа като например основа на алкален метал, например воден разтвор на натриева основа.

Съединения с формула (III), (IV), (V), (VI), (VII), (IX), (X) и (XII) са известни налични търговски продукти или се получават по методи известни в тази област на техниката по стандартни методики на налични търговски или известни материали.

Необходимо е да се има предвид, че при някои споменати тук реакции може да бъде необходимо/желателно да бъдат блокирани някои чувствителни групи на съединенията. В такъв случай, когато е необходимо или желателно блокиране, то на обикновения специалист от тази област на техниката се познати методите за блокиране. Така, ако реагентите включват групи като например карбоксилна група или хидроксилна група може да



бъде желателно да бъде блокирана групата в някои от споменатите тук реакции.

Подходяща блокираща група за хидроксилната група е например ацилна група, например алканоил група като ацетил, ароил група като например бензоил или арилметил група като например бензил. Условието на деблокиране на горните блокиращи групи по необходимост варира в зависимост от избраната блокиращата група. Така например ацилна група като алакноил или ароил група може да бъде отстранена например чрез хидролиза с подходяща основа като основа на алкален метал, например литиева или натриева основа. Алтернативно арилметил група като например бензил група може да бъде отстранена например чрез хидрогениране върху катализатор като например паладий върху въглерод.

Подходяща блокираща група за карбоксилна група е например естерифицираща група например метил или етил група, които могат да бъдат отстранени например чрез хидролиза с основа като например натриева основа, или например t-бутил група, която може да бъде отстранена например чрез обработване с киселина, например органична киселина като трифлуороцетна киселина, или например бензил група, която може да бъде отстранена например чрез хидрогениране върху катализатор като например паладий върху въглерод.

Блокиращите групи могат да бъдат отстранени при всеки подходящ етап на синтеза като се използват подходящи начини, които са добре известни в областта на химията.

Някои описани тук междинни съединения могат да бъдат нови, например междинните съединения с формула (II) и така те придават допълнителен характерен признак на настоящото изобретение.

Когато е необходимо фармацевтично приемлива сол на съединение с формула (I) може да бъде получена например като споменатото съединение взаимодейства с подходяща киселина (която доставя физиологично приемлив анион) или с подходяща основа (която доставя физиологично приемлив катион) или по всеки друг подходящ традиционен начин за получаване на сол.

Съгласно друг аспект настоящото изобретение се отнася до фармацевтичен състав, който съдържа съединение с формула (I) съгласно определението дадено по-горе или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство, свързани с фармацевтично приемлива лекарствена среда или носител.

Съставите съгласно настоящото изобретение могат да бъдат под форма, подходяща за орално прилагане (например таблетки, хапчета са смучене, твърди или меки капсули, водни или маслени суспензии, емулсии, диспергиращи се прахове или гранули, сиропи или елексири), за прилагане на място (например кремове, мехлеми, гелове или водни или маслени разтвори или суспензии), за прилагане чрез инхалиране (например прахове от фини частици или течен аерозол), за прилагане чрез инсулфлация (като например прах от фини частици) или за парентерално прилагане (например като стерилни водни или маслени разтвори за интравенозно, подкожно, интрамускулно дозиране или като супозитори за ректално дозиране).

Съединенията съгласно настоящото изобретение могат да бъдат получени по традиционни методи като се използват конвенционални фармацевтични лекарствени среди, които са добре познати в тази област на техниката. Така съединения, които се предвиждат за орално прилагане могат да съдържат например един или повече оцветители, подсладители ароматизатори и/или консерванти.

Подходящи фармацевтично приемливи лекарствени среди за формуване на таблетки включват например инертни разредители като лактоза, натриев карбонат, калциев фосфат или калциев карбонат, средства за гранулиране и дезинтегриране като царевично нишесте или алгинова киселина; свързващи вещества като нишесте; смазващи вещества като магнезиев стеарат, стеаринова киселина или талк; консерванти като етил или пропил р-хидроксibenзоат и антиоксиданти като аскорбинова киселина. Формите за приложение като таблетки могат да бъдат непокрити или покрити, както за модифициране на тяхната дезинтеграция и следващото абсорбиране на активния инградиент в стомашно-чревния тракт, така и за подобряване на тяхната стабилност и/или вид в други случаи като се използват традиционни покриващи средства и операции, които се добре познати в тази област на техниката.

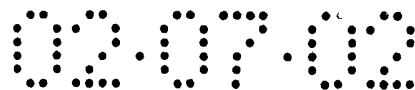
Съставите за орално прилагане могат да бъдат под формата на желатинови капсули, в които активният инградиент е смесен с инертен твърд разредител например калциев карбонат, калциев фосфат или каолин, или меки желатинови капсули, в които активният инградиент е смесен с вода или масло като например масло от фъстъци, течен парафин или маслинено масло.

Водните суспензии обикновено съдържат активния инградиент под формата на фини прахове заедно с едно или повече суспендиращи средства като натриева карбоксиметилцелулоза, метилцелулоза, хидроксипропилметилцелулоза, натриев алгинат, поливинил-пиролидон, смола от трагакант или акациева смола; диспергиращи или омокрящи средства като летицин или полимерни продукти на алкилен оксид с мастни киселини (например полиоксиетилен стеарат) или полимерни продукти на

етилен оксид с алифатни алкохоли с дълга верига, например хептадекаетиленоксигетанол, или полимерни продукти на етилен оксид с частични естери, производни на мастни киселини и хекситол като полиоксиетилен сорбитол моноолеат или полимерни продукти на етилен оксид с алифатни алкохоли с дълга верига например хептадекаетиленоксигетанол, или полимерни продукти на етилен оксид с частични естери производни на мастни киселини и хекситол като полиоксиетилен сорбитол моноолеат, или полимерни продукти на етилен оксид с частични естери производни на мастни киселини и хекситол анхидриди например полиетилен сорбитан моноолеат. Водните суспензии могат също да съдържат един или повече консерванти (като например етил или пропил р-хидроксibenзоат, анти-оксиданти (като аскорбинова киселина, оцветители, ароматизатори и/или подсладители (като захароза, захарин или аспартам).

Маслените суспензии могат да бъдат приготвени като активният инградиент се суспендира в растително масло (като масло от фъстъци, маслинено масло, сусамено масло или кокосово масло) или минерално масло (като например течен парафин). Маслените суспензии могат също да съдържат съгъстващи средства като например пчелен восък, твърд парафин или цетилов алкохол. Подсладителите като тези посочени по-горе и ароматизаторите могат да бъдат добавени, за да се осигури апетитен орален препарат. Тези състави могат да бъдат запазени като се добавят антиоксиданти като например аскорбинова киселина.

Диспергиращите се прахове и гранули, подходящи за получаване на водни суспензии чрез добавяне на вода, обикновено съдържат активния инградиент заедно с



диспергиращо или омекрящо средство, суспендиращо средство и един или повече консерванти. Подходящи диспергиращи или омекрящи средства и суспендиращи средства могат да бъдат представени с примери като тези, които са споменати по-горе. Освен това може да има лекарствени среди като подсладители, ароматизатори и оцветители.

Фармацевтичните състави съгласно настоящото изобретение могат също да бъдат под формата на водно-маслени емулсии. Маслената фаза може да бъде растително масло като например маслинено масло или масло от фъстъци или минерално масло като например течен парафин или техни смеси. Подходящи емулгиращи средства могат да бъдат например природно-срещани смоли като акациева смола, смола трагакант, природно-срещани фосфатиди като например соеви зърна, лецитин, естери или частични естери производни на мастни киселини и хекситол анхидриди (например сорбитан моноолеат) и полимерни продукти на споменатите частични естери с етилен оксид като полиоксиетилен сорбитан моноолеат. Емулсиите могат да съдържат също така подсладители, средства за ароматизиране и консерванти.

Сиропи и елексири могат да бъдат приготвени с подсладители като глицерол, полиетилен гликол, сорбитол, аспартам или захароза и могат да съдържат също облекчаващо средство, консервант, средство за ароматизиране и/или оцветител.

Фармацевтичните средства могат да бъдат също под формата на стерилни водни или маслени суспензии за инжектиране, които могат да бъдат приготвени съгласно известните начини като се използва едно или повече подходящи диспергиращи или омекрящи средства и суспендиращи средства,

които са посочени по-горе. Стерилен препарат за инжектиране може да бъде също инжекционен стерилен разтвор или суспензия в нетоксичен парентерално-приемлив разредител или разтворител, като например разтвор в 1,3-бутандиол.

Супозиторни форми за прилагане могат да бъдат приготвени като активният инградиент се смеси с подходяща недразнеща лекарствена среда, която при обичайна температура е твърда, но се втечнява при ректалната температура и следователно ще бъде стопена в ректума и ще отдели лекарството. Подходящите лекарствени среди включват например кокосово масло и полиетилен гликоли.

Форми за местно прилагане, като например кремове, мехлеми, гелове и водни или маслени разтвори или суспензии, обикновено могат да бъдат получени като се приготви препарат от активен инградиент с конвенционална приемлива за прилагане на място течност или разредител като се използват традиционни методи, които са добре познати в тази област на техниката.

Състави прилагани чрез инсуфлация могат да бъдат под формата на фин прах, съдържащ частици със срден диаметър например 30 μ или много по-малък, като самият прах съдържа активен инградиент самостоятелно или разреден с един или повече физиологично приемливи носители като например лактоза. След това праховете за инсуфлация се поставят по подходящ начин в капсули, съдържащи например 1 до 50 мг активен инградиент за използване с турбо-инхалиращо устройство, такова каквото се използва за инсуфлация на познатото средство натриев хромогликат.

Съставите за прилагане чрез инхалиране могат да бъдат под формата на подходящо пресовани аерозоли, пригодени да

диспергират активният инградиент или като аерозол, съдържащ
фино носителни твърди частици или като течни капчици. Могат
да бъдат използвани подходящи аерозолни пропеланти като
например летливи флуорирани въглеводороди или въглеводороди
и аерозолното устройство е пригодено да отделя отмерено
количество от активния инградиент.

За допълнителна информация за приготвяне на формите за
прилагане може за справка да се използва глава 25.2 в том V на
Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of
Editorial Board), Pergamon Press 1990.

Количеството активен инградиент което се комбинира с
една или повече лекарствени среди за получаване на единична
дозирана форма по необходимост варира в зависимост от
лекувания пациент и от специфичния начин за прилагане.
Например формите, предназначени за орално прилагане на хора
обикновено съдържат например от 0.5 мг до 2 г активно средство
свързано с пригодно и подходящо количество лекарствени среди,
които могат да варират от 5 до 98% тегловни от общия състав.
Дозираните единични форми обикновено съдържат около 1 мг до
около 500 мг активен инградиент. За допълнителна информация
за начините на прилагане и режима на дозиране може да се
използва за справка глава 25.3 в том 5 на Comprehensive
Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board),
Pergamon Press 1990.

Количеството на дозата за терапевтични или
профилактични цели на съединенето с формула I естествено ще
варира съгласно естеството и тежестта на състоянието,
възрастта и пола на животното или пациента и начина за
прилагане, съобразно добре известните принципи в медицината.
Както е споменато по-горе, съединенията с формула I са полезни

при лекуване на заболявания или медицински състояния, които се дължат напълно или частично на ефекта на MCP-1 и/или RANTES, например ревматоидни артрити.

При използване на съединение с формула I за терапевтични или профилактични цели, те се прилагат обикновено така, че дневната доза да бъде в границите например от 0.5 мг до 75 мг на кг от теглото, ако е необходимо и в разделни дози. Обикновено се прилагат по-малки дози, когато се използва парентерален начин за прилагане. Така например при интервенозно прилагане обикновено се използва доза например в границите от 0.5 до 30 мг на кг от теглото на пациента. Подобно за прилагане чрез инхалиране се използват дози в границите например от 0.5 мг до 25 мг на кг от теглото на пациента. Оралното прилагане е по-малко предпочитано.

Съгласно друг аспект настоящото изобретение се отнася до съединение с формула (I) или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство, съгласно дадените по-горе определения за използване при метод за терапевтично лечение на човек или животно. Подходящо изобретението се отнася до метод за лечение на възпалително заболяване чрез прилагане на съединение с формула (I) или негова фармацевтично приемлива сол, или пролекарство, или фармацевтичен състав.

Друг характерен признак на настоящото изобретение е използването като лекарство на съединение с формула (I) и негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство.

Подходящо съединение с формула (I) или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство се използват като лекарство антагонист на MCP-1 опосредствен ефект (и/или RANTES опосредствен ефект) за топлокръвни животни като например човек.

Така съгласно друг аспект настоящото изобретение се отнася до използване на съединение с формула (I) или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство за получаване на лекарство използвано като антагонист на MCP-1 опосредствен ефект (и/или RANTES опосредствен ефект) за топлокръвни животни като например човек.

Съгласно друг характерен признак настоящото изобретение се отнася до метод на антагонизъм на MCP-1 опосредствен ефект за топлокръвно животно, като например човек, при необходимост на такова лечение, което включва прилагането на споменатото животно на ефективно количество от съединение с формула (I) или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство, както са дефинирани по-горе.

Биологично тестване

Следващите биологични методи за тестване, данните и примерите служат за илюстриране на настоящото изобретение.

Съкращения

ATCC-American Type Culture Collection, Rockville, USA

BCA- Бицинкронна киселина (използване, с меден сулфат, за анализ на протеина)

BSA- телешки серум албумин

DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium (модифицирана орлова среда Dulbecco)

EGTA-Етилен бис(оксиетиленнитрило)тетраоцетна киселина

FCS- Foetal calf serum -фетален телешки серум

HEPES-(N-[2-хидроксиетил]пиперазин-N'-[2-етансулфонова киселина])

HBSS- Балансиран солев разтвор Hank (Hank's Balanced Salt Solution)

hMCP-1 човешки моноцит хемоатрактивен протеин-1 (Human Monocyte Chemoattractant Protein-1)

PBS- фосфат буфериран солеви разтвор (Phosphate buffered saline)

PCR- полимеразна верижна реакция (Polymerase chain reaction)

AMPLITAQ™-доставен от Perkin-Elmer Cetus, се използва като източник на термостабилна ДНК полимераза

Binding buffer- свързващ буфер е 50 mM HEPES, 1mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.5% фетален телешки серум, регулиран с 1M NaOH до pH 7.2.

Non-Essential Amino Acids-незаменими аминокиселини (100X концентрация) е: L-аланин, 890 мг/л; L-аспарагин, 1320 мг/л; L-аспартинова киселина 1330 мг/л, L-глутаминова киселина, 1470 мг/л, глицин, 750 мг/л; L-пролин 1150 мг/л и L-серин 1050 мг/л.

Хипоксантин и тимидин добавка (50x концентрация) е хипоксантин 680 мг/л и тимидин 194 мг/л.

Пеницилин-стрептомицин е: пеницилин G (натриева сол); 5000 единици/мл; стрептомицин сулфат 5000 $\mu\text{g}/\text{мл}$.

Human monocytic cell line THP-1 -cells Човешка моноцитна клетъчна линия THP-1 клетки се доставят от ATCC, каталожен номер ATCC TIB-202.

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)-балансиран солев разтвор на Hank, получаван от Gibco; виж Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1949, 71, 196.

Синтетична културална клетъчна среда, RPMI 1640 се получава от Gibco; съдържа неорганични соли [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 мг/л; KCl 400 мг/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 мг/л; NaCl 6000 мг/л; NaHCO_3 2000 мг/л & Na_2HPO_4 (безводен) 800 мг/л], D-глюкоза 2000 мг/л, редуциран глутатион 1 мг/л, аминокиселини и витамини.

FURA-2/AM е 1-[2-(5-карбоксиоксазол-2-ил)-6-аминобензофуран-5-окси]-2-(2'-амино-5'-метилфеноксид)-етан-N,N,N',N'-тетраоцетна киселина пентаацетоксиметил естер и се получава от Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA.

Кръвен седиментационен буфер съдържа 8.5 г/л NaCl и 10г/л хидроксиетил целулоза.

Лизиращ буфер е 0.15M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1mM EDTA

Свързващ буфер от цели клетки е 50mM HEPES, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.5% BSA, 0.01% NaN₃, регулиран до pH 7.2 с 1M NaOH.

Промиващ буфер е 50 mM HEPES, 1mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, 0.5% горещ неактивиран фетален телешки серум, 0.5M NaCl регулиран до pH 7.2 с 1M NaOH.

Основните молекулярни биологични процедури се следват по методите, описани в сборника "Molecular Cloning A Laboratory Manual" Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

i) Клониране и експресиране на hMCP-1 рецептор

MCP-1 рецептор B (CCR2B) копи ДНК се клонира чрез PCR от THP-1- клетка RNA като се използват подходящи олигонуклеотидни праймери на базата на публикуваните секвенции на MCP-1 рецепторни последователности (Chargo et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 91, 2752). Получените PCR продукти се клонират във вектор PCR-II™ (In Vitrogen, San Diego, CA). CCR2B копи ДНК (не съдържат грешки) се субклонират (като Hind III- Not I фрагменти в еукариотен експресиращ вектор pCDNA3 (In Vitrogen) за да се образуват съответно pCDNA3/CCR2A и pCDNA3/CCR2B.

Линейните pCDNA3/CCR2B се трансфектират в CHO-K1 клетки чрез утаяване с калциев фосфат (Vigler et al., 1979, Cell, 16,

777). Трансфектираните клетки се избират чрез добавяне на Генетицин сулфат (G418, Gibco BRL)-1 мг/мл, 24 часа след клетъчна трансфекция. Получаването на RNA и Northern blotting се извършва както е описано преди това (Needham et al., 1995, Prot. Express. Purific., 6, 134). CHO-K1 клон 7 (CHO-CCR2B) се идентифицира на базата на най-високо експесиращ MCP-1 рецептор B.

(ii) Получаване на мембранни фрагменти

CHO-CCR2B-клетки се отглеждат в DMEM към който е добавен 10% фетален телешки сывум 2 mM глутамин, 1x незаменими аминокиселини, 1x хипоксантин и тимидин добавка и пеницилин-стрептомицин (в 50 µг стрептомицин/мл, Gibco BRL). Мембранни фрагменти се приготвят като се използва метод за клетъчно лизиращо/ диференциално центрофугиране, както е описано преди това (Siciliano et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 19658). Съдържанието на протеин се определя количествено чрез BCA-белтъчен анализ (Pierce, Rockford, Illinois) съгласно указанията на производителя.

iii) Анализ

125 I-MCP -1 се получава като се използва метода за конюгация по Bolton and Hunter (Bolton et al., 1973, *Biochem. J.*, 133, 529; Amersham International plc]. Равновесно-свързващите анализи за равновесно свързване се извършват като се използва метода на Ernst et al., 1994, *J. Immunol.*, 152, 3541. Накратко променливи количества 125 I-белязани MCP-1 се добавят към 7 µг пречистени CHO-CCR2B клетъчни мембрани в 100 µл свързващ буфер. След инкубиране при стайна температура в продължение на 1 час свързващите реакционни смеси се филтрират и промиват 5-кратно с промиваща система за култивационни блюда (Brandel MLR-96T клетъчен колектор) като се използва

ледено студен свързващ буфер. Преди използване филтрите (Brandel GF/B) се накисват предварително в продължение на 60 мин в 0.3% полиетиленимин. При провеждане на филтрирането отделните филтри се разпределят в епруветки от 3.5 мл (Sarstedt No 55.484) и свързващите ^{125}I -белязан MCP-1 се определят (LKB 1277 Gammamaster). Конкурентното свързване на студено се извършва както е посочено по-горе като се използва 100 pM ^{125}I -белязан MCP-1 в присъствие на различни концентрации небелязан MCP-1. Неспецифичното свързване се определя чрез включване в реакцията на 200-кратен моларен излишък на небелязан MCP-1.

Изследването на лигандното свързване с мембранны фрагменти, получени от CHO-CCR2B клетки показва, че CCR2B рецепторът присъства в концентрации 0.2 pmol/mg от мембранныя протеин и свързва MCP-1 селективно и с висок афинитет ($\text{IC}_{50} = 110 \text{ pM}$, $K_d = 120 \text{ pM}$). Свързването към тези мембрани е напълно обратимо и достига равновесие след 45 мин при стайна температура и е налице линейна зависимост между MCP-1 свързването и CHO-CCR2B клетъчно мембранны концентрации, когато се използва MCP-1 при концентрации между 100 pM и 500 pM.

Анализираните съединения разтворени в DMSO (5 μl) се тестват в конкуренция с 100 pM белязан MCP-1 в концентрационен диапазон (0.01-50 μM) в две повторения, като се използват осем точкови дозо-съответстващи криви и се изчислява IC_{50} концентрациите.

Изследвани съединения съгласно настоящото изобретение имат IC_{50} стойности 50 μM или по-малко в описания тук метод за hMCP-1 рецепторно свързване.

b) MCP-1 опосредствена Ca^{2+} -обмяна в THP-1 клетки

Моноцитна човешка клетъчна линия THP-1 се отглежда в синтетична културална клетъчна среда RPMI 1640 с добавен 10% фетален телешки серум, 6 mM глутамин и пеницилин-стрептомицин (50 μg стрептомицин/мл, Gibco BRL). THP-1 клетки се промиват в HBSS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) + 1 mg/мл BSA и се ресуспендират в същия буфер при плътност 3×10^6 клетки/мл. Тогава клетките се обработват с 1 mM FURA-2/AM в продължение на 30 минути при 37°C , промиват се двукратно в HBSS и се ресуспендират при 1×10^6 клетки/мл. THP-1 клетъчна суспензия (0.9 мл) се добавя към 5 мл налична кювета, съоръжена с матнитна бъркалка вал и 2.1 мл предварително затоплен (37°C) HBSS съдържащ 1 mg/мл BSA, 1 mM MgCl_2 и 2 mM CaCl_2 . Кюветата се поставя във флуорисциращ спектрофотометър (Perkin Elmer, Norwalk, CT) и се инкубира предварително в продължение на 4 минути при 37°C с разбъркване. Флуоресценцията се записва в продължение на 70 сек и клетките се стимулират чрез добавяне след 10 сек в кюветата на hMCP-1. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ се екситира при дължина на вълната 340 nm и 380 nm алтернативно и съответно измерване интензитета на флуоресцентната емисия при 510 nm. Съотношението на интензитетите на излъчваната флуоресцентна светлина след ексцитирането при 340 nm и 380 nm, (R), се изчислява за да се покаже и изчисли цитоплазмичния $[\text{Ca}^{2+}]$ по следващото уравнение:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{K_d(R - R_{\min})(Sf_2/Sb_2)}{(R_{\max} - R)}$$

където K_d за FURA-2 Ca^{2+} комплекс при 37°C се приема за 224 nm. $R_{\max}$ е максималното съотношение на флуоресценция



определено след добавяне на 10mM йономицин, R_{min} е минималното съотношение определено чрез съответно добавяне на разтвор без Ca^{2+} , съдържащ 5 mM EGTA и Sf12/Sb2 е съотношението на стъпностите на флуоресценция при 380 nm екситиране определено при R_{min} и R_{max} съответно.

Стимулирането на THP-1 клетки с hMCP-1 предизвиква бързо и променливо нарастване на $[Ca^{2+}]_i$ по специфичен и зависим от дозата начин. Дозовите реакционни криви показват приблизително EC_{50} 2 nM. Изследваните съединения се разтварят в DMSO (10 μ l) се анализират за инхибиране отделянето на калций като същите се добавят към клетъчна суспензия 10 секунди преди добавяне на лиганд и измерване намаляването на транзиентното нарастване в $[Ca^{2+}]_i$. Изследваните съединения се проверяват също и за отсъствие на агонистична активност чрез пряко добавяне на hMCP-1.

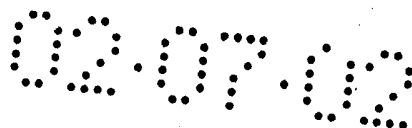
с) hMCP-1 и RANTES опосредстван хемотаксис

In vitro изследване на хемотаксис се провежда като се използва човешка моноцитна клетъчна линия THP-1. Клетъчната миграция през поликарбонатните мембрани се измерва като се преброяват тези, преминаващи както директно чрез Coulter изброяване или непряко като се използва колориметричен анализ за жизнест, който измерва способността за разцепване на тетразолиева сол от митохондриалната дихателна верига (Scudiero D.A. et al., 1988, Cancer Res. 48, 4827-4833).

Хемоаттрактанти се поставят в 96-гнездна микротитърна плака, която формира долното гнездо на хемотаксисната камера, към която се прикрепя необработена с PVP поликарбонатна адхезивна ограничаваща филтърна мембрана с размер на порите 5 μ m (NeuroProbe MB series, Cabin John, MD 20818, USA), съгласно



указанията на производителя. Хемоатрактантът се разрежда подфодящо в синтетична клетъчна културална среда, RPMI 1640 (Gibco) или се добавя 2 mM глутамин и 0.5% BSA, или алтернативно HBSS с Ca^{2+} и Mg^{2+} без фенолово червено (Gibco) плюс 0.1% BSA. Всяко разреждане се обезгазва под вакуум в продължение на 30 минути се поставят (400 μl) в долните гнезда на камерата и THP-1 клетки (5×10^5 в 100 μl RPMI 1640+0.5% BSA) се инкубират във всяко гнездо на горната камера. За инхибирането на хемотаксис хемоатрактантът се държи при постоянна под максималната концентрация, определена предварително (1nM MCP-1) и се добавя към долното гнездо заедно с изследваните съединения, разтворени в DMSO (крайна концентрация на DMSO <0.05% об/об) при вариращи концентрации. Камерата се инкубира в продължение на 2 часа при 37°C под 5% CO_2 . Средата се отстранява от горните гнезда, които след това се промиват с 200 μl физиологичен солев разтвор преди отваряне на камерата, мембранната повърхност се подсушава чрез избърсване и 96-гнездната плака се центрофугира на 600 g в продължение на 5 минути за отбиране на клетките. Над утайката (150 μl) се аспирира и към гнездата се добавя 10 μl клетъчен пролиферационен реагент, WST-1, {4-[3-(4-йодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолио]-1,3-фенил дисулфонат} плюс електрон свързващ реагент (Boehringer Mannheim, катал. No 1644807). Плаката се инкубира при 37% в продължение на 3 часа и абсорбирането на разтворимия формазанов продукт се отчита с микротитърен брояч на 450 nm. Данните се нанасят на разгънат лист, коригират се за евентуални случайни миграции при отсъствие на хемоатрактант и се изчисляват средните стойности на абсорбция, средната стойност на стандартната грешка и се пресмятат тестовете за значимост.



hMPC-1 индуцираната от клетъчната миграция концентрация с характеризиращ бифазен отзвук е максимално 0.5-1.0 nM.

При алтернативен вид на горната методика флуоресцентно таргентни клетки могат да бъдат използвани при крайната фаза на определяне. В този случай използваните THP-1 клетки се обработват флуоресцентно чрез инкубиране в присъствие на 5mM Calcein AM (Glycine, N,N'-[[3',6'-бис(ацетокси)-3-оксоспиро[изобензофуран-1(3H), 9'[9H]ксантен]-2',7'-диил]бис(метилен)]бис[N-[2-[(ацетилокси)метокси]-2-оксоетил]]-бис[(ацетилокси)метил]естер; Molecular Probes) в продължение на 45 минути на тъмно. Клетките се отделят чрез центрофугиране и ресуспендиране в HBSS (без фенол червено) с Ca^{2+} , Mg^{2+} и 0.1% BSA. 50µл (2x10⁵ клетки) на клетъчна суспензия се оставя върху филтъра над всяко гнездо, както по-горе, комплекта се инкубира при 37°C в продължение на 2 часа в среда от 5% CO₂. В края на инкубирането клетките се отмиват от горната повърхност на филтъра с фосфат буфериран солеви разтвор, филтърът се отделя от плаката и броят на клетките прикрепени както в долната част на филтъра или в долното гнездо се оценяват чрез отчитане на флуоресценцията при дължини на вълната 485 nm при възбуждане и 538 nm при излъчване (fmax, Molecular Devices). Данните се нанасят на разгънат лист, корегират се за евентуални случайни миграции при отсъствие на хемоатрактант и се изчисляват средните стойности на флуоресценция, средната стойност на стандартната грешка, процента на инхибиране и IC₅₀ на тестваните съединения и се пресмятат тестовите за значимост.. Освен MCP-1 индуцирания хемотаксис, тази алтернативна форма на методиката може също така да бъде използвана за определяне инхибирането на RANTES (2nM) образуван хемотаксис.

d) **Свързване към човешки периферни моноядрени клетки (PBMCs)**

i) **Получаване на човешки PBMCs**

Свежа човешка кръв (200 мл) се взема от доброволни донори, събрана в антикоагулант натриев цитрат и се постига крайна концентрация 0.38%. Кръвта се смесва със седиментационен буфер и се инкубира при 37°C в продължение на 20 минути. Над утайката се отделя и центрофугира при 1700 об/мин в продължение на 5 мин (Sorvall RT6000D). Получената утайка се ресуспендира в 20 мл RPMI/BSA (1мг/мл) и 4x5 мл клетки се наслойват внимателно върху 4x5 мл Lymphoprep^{RM} (Nycomed) в 15 мл центрофужни епруветки. Епруветките се центрофугират при 1700 об/мин в продължение на 30 минути (Sorvall RT6000D) и полученият слой от клетки се отделя и се пренася в 50 мл епруветки Falcon. Клетките се промиват двукратно в лизиращ буфер за отстраняване на евентуално останали червени кръвни клетки, последвано от двукратно промиване в RPMI/BSA. Клетките се ресуспендират в 5 мл свързващ буфер. Броят на клетките се измерва чрез Coulter брояч и се добавя допълнително свързващ буфер, за да се получи крайна концентрация 1.25×10^7 PBMCs/мл.

ii) **Анализ**

[¹²⁵I]MCP-1 се приготвя като се използва конюгация по Bolton and Hunter (Bolton et al., 1973, Biochem. J., 133, 529; Amersham International plc). Равновесно свързваните анализи се извършват като се използва метода на Ernst et al., 1994, J. Immunol., 152, 3541. Накратко 50 µл ¹²⁵I-белязан MCP-1 (крайна концентрация 100pM) се добавя към 40 µл (5×10^5 клетки) клетъчна суспензия в 96-гнездна платка. Съединения разредени в свързващ буфер за интактни клетки от базисен разтвор 10 mM в DMSO се добавят

към крайния обем 5 μ л за поддържане на постоянна концентрация DMSO при опита 5%. Общото свързване се определя при отсъствие на съединение. Неспецифичното свързване се определя като се добави 5 μ л студен MCP-1 и се получава крайна концентрация на опита 100 nM. Гнездата за анализиране се приготвят до краен обем 100 μ л със свързващ буфер за интактни клетки и плочките се херметизират. След инкубиране при 37°C в продължение на 60 минути свързващите реакционни смеси се филтрират и промиват в продължение на 10 секунди като се използва ледено студен промиващ буфер използващ плако-промивач (Brandel MLR-96T Cell Harvester). Филтри (Brandel GF/B) се наkisват предварително в продължение на 60 минути в 0.3% в полиетиленимин плюс 0.2% BSA преди използване. След филтриране отделните филтри се отделят в епруветки 3.5 мл (Sarstedt No 55,484) и свързващите 125 I-белязан MCP-1 се определят (LKB 1277 Gammamaster).

Ефикасността на изследваните съединения се определя чрез двукратно анализиране като се използват шест точки на криви доза-отзив и се определят IC₅₀ концентрациите.

При ефективни дози от тестваните съединения съгласно настоящото изобретение не се наблюдава физиологично неприемлива токсичност.

Настоящото изобретение се илюстрира допълнително, но не се ограничава със следните примери, при които ако не е посочено друго се използват обичайните методики,

i) N,N-диметилформаид (DMF) се обезводнява върху молекулярно сито 4Å. Безводен тетраhydroфуран (THF) се получава от Aldrich SURESEAL™ бутилки, други налични търговски реагенти и разтворители се използват без допълнително

пречистване, ако не се изисква друго. Екстракти с органични разтворители се обезводняват върху безводен магнезиев сулфат.

ii) ^1H , ^{13}C и ^{19}F NMR се записват на Bruker WM200, WM250, WM300 или WM400 апарати като се използва DMSO- d_6 със Me_4Si или CCl_3F и подходящ вътрешен образец, ако не е посочено друго. Химични отклонения се отбелязват като δ (ppm) и броя на пиковете се обозначават както следва: s-синглет, d-дублет, dd-дублет от дублети, t-триплет, dt-дублет от триплети, q-квартет, m-мултиплет, br-широк.

iii) Масспектъра се отчита на VG 12-12 квадрупол, VG 70-250 SE, VG ZAB 2-SE или VG модифициран AEI/Kratos MS9 спектрометри.

iv) За TLC анализи се използва Merk precoated TLC plates (силикагел 60 F254, $d=0.25$ mm).

v). Флаш хроматография се извършва на силициев двуокис (Merk Kieselgel: Art.9385).

Пример 1

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина

Натриева основа (1M, 100 мл) се добавя към бъркан разтвор на етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (11.82 г) във вода (50 мл) и метанол (150 мл). Реакцията се бърка при 55°C в продължение на 6 часа. Метанолът се отстранява под вакуум и останалият разтвор се подкиселява чрез добавяне на водна солна киселина (2M, 50 мл) и така продуктът се утаява като бял твърд продукт. Продуктът се филтрира, промива с вода и обезводнява под вакуум и се добива кремав твърд продукт (9.53 г), който се пречиства чрез колонна хроматография като в качеството на елюант се използва

етилацетат. Кристализирането от метанол/вода води до получаване на съединението от заглавието като кремав твърд продукт (7.08 г, 71%) NMR: (CD_3SOCD_3) δ 5.84 (s, 2H), 6.83 (dd, 1H), 6.95 (d, 1H), 7.11-7.19 (m, 2H), 7.36 (d, 1H), 7.55-7.64 (m, 2H), 9.03 (s, 1H); m/z 368 (M-H^+).

Описаната в горния пример последователност от операции се повтаря като се използва подходящ индол естер като изходен материал. Така се получени съединенията описани по-долу.

Пример 2

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина

50% добив. NMR: (CD_3SOCD_3) δ 5.87 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.99 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.67 (t, 1H); m/z 352 (M-H^+).

Пример 3

N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина

55% добив. NMR: (CD_3SOCD_3) δ 5.9 (s, 2H), 6.9 (m, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.25 (s, 2H), 7.4 (m, 2H), 7.8 (d, 1H), 9.1 (s, 1H); m/z 368/370 (M-H^+).

Пример 4

N-(3-бромо-4-хлоробензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина

71% добив. NMR: (CD_3SOCD_3) δ 5.76 (s, 2H), 6.80 (d, 1H), 6.95 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.47 (d, 1H), 9.00 (s, 1H); m/z 380 (MH^+).

Пример 5**N-(3-флуоро-4-бромобензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина**

53% добив. NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 1H), 6.70 (d, 1H), 6.80 (dd, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.00 (d, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 9.00 (s, 1H) 12.82 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁺).

Пример 6**N-(3-бромо-4-флуоробензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина**

55% добив. NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.77 (s, 2H), 6.80 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 6.99 (m, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.23 (t, 1H), 7.38 (m, 2H), 9.00 (s, 1H); m/z 362 (M-H⁺).

Пример 7**N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина**

(58% добив). NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.85 (s, 2H), 7.0 (t, 1H), 7.1 (m, 2H), 7.2-7.3 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.95 (dd, 1H), 9.3 (s, 1H), 13.1 (s, 1H); m/z 370 (M-H⁺).

Пример 8**N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-флуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина**

(97% добив). NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 7.0 (t, 1H), 7.16 (dd, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.3 (s, 1H); m/z 386 (M-H⁺).

Пример 9**N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4,6-дифлуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина**

83% добив. NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.80 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.30-7.50 (m, 2H), 7.58 (m, 1H), 9.60 (s, 1H); M/z 388.2 (M-H⁺).

Пример 10

N-(3,4-хлоробензил)- 4,6-дихлоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

82% добив. NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.92 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.99 (dd, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.55 (s, 1H); m/z 406, 404, 402 (M-H⁺).

Пример 11

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил) -3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

92% добив. NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (dd, 1H), 7.35-7.55 (m, 2H), 7.60 (dd, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 430/432 (M-H⁺).

Пример 12

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

(309 мг, 87%) NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.85 (s, 2H), 6.80-7.0 (m, 3H), 7.40 (d, 1H), 7.75 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); M/z 446/448 (M-H⁺).

Пример 13

N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил) -3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

82% добив NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.4 (s, 1H); m/z 447 (M-H⁺).

Пример 14

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил) -3-хлоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (m, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.6 (d, 1H), 9.4 (s, 1H); m/z 386.0 (M-H⁺).

Пример 15

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил) -3-йодо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

NMR: (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 6.8 (s, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2 (m, 1H), 7.4 (m, 2H), 7.6 (d, 1H), 9.3 (s, 1H); m/z 478 (M-H⁺).

Пример 16

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -3-метокси -5-
гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

(108% добив като хидрат) NMR: 3.9 (s, 3H), 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 6.9 (d, 1H), 7.2 (d, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.6 (m, 2H), 9.1 (s, 1H); m/z 398 (M-H⁺).

Пример 17

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил) -5-гидрокси-6-хлороиндол-
2-карбоксилна киселина

(68% добив) NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.4-7.55 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 386 (M-H⁺).

Пример 18

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -5-гидрокси-6-хлороиндол-2-
карбоксилна киселина

71% добив, NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.74 (s, 2H), 7.04-7.21 (m, 3H), 7.53-7.63 (m, 2H), 7.7 (s, 1H), 9.72 (bs, 1H); m/z 402.1/404.5 (M-H⁺).

Пример 19

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -5-гидрокси-7-флуороиндол-
2-карбоксилна киселина

55% добив, NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.90 (s, 2H), 6.60 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.52 (m, 1H), 7.60 (d, 1H); M/z (-) 385.85 (M-H⁺).

Пример 20

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -5-гидрокси-6-бromoиндол-2-
карбоксилна киселина

90% добив, NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.82 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.18 (d, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.82 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 13.00 (s, 1H); m/z 446.18 (M-H⁺).

Пример 21

N-(3,4-дихлоробензил) -5-гидрокси-6-бromoиндол-2-карбоксилна
киселина

92% добив, NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.80 (s, 2H), 6.85 (m, 1H), 7.15 (s, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.50 (d, 1H), 7.80 (s, 1H), 9.80 (s, 1H); m/z 412.1 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 22

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -5-гидрокси-6-флуороиндол-2-карбоксилна киселина

97% добив, NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.8 (s, 2H), 7.1-7.2 (m, 3H), 7.49 (d, 1H), 7.55-7.63 (m, 2H), 9.49 (s, 1H), 12.86 (bs, 1H); m/z 386, 388 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 23

N-(3,4-дихлоробензил) -5-гидрокси-6-флуороиндол-2-карбоксилна киселина

97% добив, NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.75 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.1-7.2 (m, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 9.50 (bs, 1H); m/z 353 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 24

N-(3,4-дихлоробензил) -5-гидрокси-6-хлороиндол-2-карбоксилна киселина

41% добив, NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.8 (s, 2H), 6.9 (dd, 1H), 7.2 (s, 2H), 7.3 (d, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.65 (s, 1H), 9.75 (s, 1H); m/z 398, 396 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 25

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-хлоро -5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

93% добив. NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.86 (s, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.09-7.13 (m, 2H), 7.4 (d, 1H), 7.58-7.68 (m, 2H), 9.66 (bs, 1H); m/z 402, 404 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Пример 26

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4,6-дихлоро -5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина

76% добив. NMR (CD_3SOCD_3) δ 5.86 (s, 2H), 7.09 (dd, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.59 (d, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.81 (s, 1H), 9.64 (bs, 1H); m/z 392, 394 (M-H^+).

Пример 27

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилна киселина (пролекарство на съединение №1 от пример 1)

Към разтвор на N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил) -5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина (1.01 г) в затоплен етилацетат (80 мл) се добавя 4-диметиламинопиридин (30 мг) и оцетен анхидрид (0.64 мл) и получената смес се бърка в продължение на 18 часа. Органиката се промива с 1N HCl и се обезводнява. Органиката се концентрира и пречиства чрез колонна хроматография, отмива се с етилацетат и се получава желания продукт (808 мг, 72%). ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 2.25 (s, 3H), 5.9 (s, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.65 (d, 1H); m/z 410 (M-H^+).

Получаване на изходните материали

Изходните материали за горните примери са или търговски продукти или се получават лесно по стандартни методи от познати материали. Например следните реакции (методи A-E) са илюстрация, но не са ограничителни за получаването на изходни материали, използвани при горните реакции.

Метод А

Етил 5-ацетокси-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)индол-2-карбоксилат

i) Етил 5-хидроксииндол-2-карбоксилат

Борен трибромид (64.58 г) се добавя на капки към бъркан разтвор на етил 5-метоксииндол-2-карбоксилат (20 г) в дихлорометан (1000 мл) при -78°C под атмосфера на аргон. Реакцията се оставя да се затопли до стайна температура и се бърка допълнително в продължение на 2 часа. Реакцията се излива в лед/наситен воден разтвор на натриев бикарбонат при разбъркване и се екстрахира с етил ацетат. Обединените органични екстракти се промиват с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат, вода, наситен воден разтвор на натриев хлорид и се обезводняват. Разтворът се концентрира *in vacuo* и остатъкът се пречиства чрез колонна хроматография като се използва 0-60% диетил етер: *изо*-хексан като елюант и се получава продукт като бял твърд продукт (9.02 г, 48%).
NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.31 (t, 3H), 4.29 (q, 2H), 6.79 (dd, 1H), 6.90 (dd, 1H), 7.22 (d, 1H), 8.84 (s, 1H), 11.52 (brs, 1H); m/z 206 (MH^+).

ii) Етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

Бъркан разтвор на етил 5-хидроксииндол-2-карбоксилат (7.79 г) и 4-диметиламинопиридин (20 мг) в оцетен анхидрид (80 мл) се нагрява при 80°C в продължение на 4 часа. Реакцията се концентрира *in vacuo* и остатъкът се разтваря в етилацетат. Обединените органични екстракти се промиват със солна киселина (2M), наситен воден разтвор на натриев бикарбонат, вода, наситен воден разтвор на натриев хлорид и се обезводняват. Разтворът се концентрира *in vacuo* и се получава продуктът като жълт твърд продукт (9.39 г, 100%). NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.20 (t, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.19 (q, 2H), 6.86 (dd, 1H), 6.97 (d, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.29 (d, 1H); m/z 248 (MH^+).

iii) Етил 5-ацетокси-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)индол-2-карбоксилат

Натриев хидрид (1.78 г) се добавя към бъркан разтвор на етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (10 г) и 3-трифлуорометил-4-хлоробензилбромид (11.64 г) в DMF (200 мл) в атмосфера на аргон. Реакцията се бърка при температура на околната среда в продължение на 16 часа, след това се концентрира *in vacuo* и остатъкът се разпределя между етилацетат и вода. Обединените органични екстракти се обезводняват, концентрират под вакуум и пречистват чрез колонна хроматография като се използва i-хексан-15% етилацетат/изохексан като елюант и се получава кремав твърд продукт. Кристализиране от етилацетат/изохексан води до получаване на продукта като кремав твърд продукт (13.26 г, 74%). NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.37 (t, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.82 (s, 2H), 7.0-7.09 (m, 2H), 7.22-7.29 (m, 1H), 7.31-7.4 (m, 2H), 7.43 (d, 1H), 7.51 (s, 1H).

Последователността от операции описана в метод A i)-iii) се повтаря като се използва подходящ бензил халид. Така се получават описаните по-долу съединения.

Етил N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

860 мг, 96% NMR (CDCl_3) δ 1.39 (t, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.83 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.08 (dd, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.50 (t, 1H); m/z 424 (MH^+).

Етил N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

55% добив. NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 2H), 7.2 (m, 2H), 7.4 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.55 (d, 1H); m/z 440/422 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Етил N-(3-бромо-4-хлоробензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

15% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.74 (s, 2H), 6.83 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.24 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.40 (d, 1H); m/z 449 (MH⁺).

Етил N-(3-флуоро-4-бромобензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат
77% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.37 (t, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.77 (s, 2H), 6.72 (d, 1H), 6.74 (d, 1H), 7.03 (dd, 1H), 7.23 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (t, 1H).

Етил N-(3-бромо-4-флуоробензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат
41% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.40 (t, 3H), 2.34 (s, 3H), 4.37 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95 (dd, 1H), 7.05 (dd, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (d, 1H), 7.62 (d, 1H); m/z 433 (MH⁺).

Метод В

Метил N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

i) 2-флуоро-3-бензилоксибензалдехид

2-флуоро-3-хидроксибензалдехид (16.49 г) се разтваря в диметилформамид (200 мл) и се бърка под атмосфера на аргон. Добавя се натриев хидрид (60% в минерално масло, 5.18 г) и сместа се бърка в продължение на 30 минути. Добавя се бензил бромид (16.8 мл) и сместа се бърка в продължение на една нощ. Реакционната смес се концентрира *in vacuo* и полученият остатък се разпределя между диетил етер (200 мл) и вода (200 мл). Обединените органични екстракти се промиват с вода (400 мл), обезводняват (магнезиев сулфат) и концентрират *in vacuo*. Остатъкът се пречиства чрез флаш колонна хроматография като се използва градиентно 0-10% етилацетат/изо-хексан като елюант и се получава желания продукт като жълт твърд продукт (18.41 г, 68%): ¹H NMR (CD₃SOCD₃) δ 5.20 (s, 2H), 7.2-7.6 (m, 8H), 10.21 (s, 1H).

ii) Метил-2-азидо-3-(2-флуоро-3-бензилоксифенил)пропеноат

Смес на метилазидоацетат (36.64 г) и 2-флуоро-3-бензилокси бензалдехид (18.32 г) в метанол (250 мл) се добавя на капки при разбъркване в продължение на 1 час към смес на натриев метоксид (17.20 г) в метанол (100 мл) при -25°C в поток от аргон. Сместа продължава да се бърка в продължение на 20 минути, оставя се да се затопли до 5°C и се бърка в продължение на една нощ.

Получената утайка се отфильтрува, след това се промива последователно със студен метанол, разреден с вода разтвор на оцетна киселина и вода. Полученият твърд продукт се обезводнява под вакуум и се получава продукта като бледо кафяв твърд продукт (16.70 г), който се използва без допълнително пречистване.

iii) Метил-4-флуоро-5-бензилоксииндол-2-карбоксилат

Разтвор на метил-2-азидо-3-(2-флуоро-3-бензилоксифенил)пропеноат (16.7 г) в ксилен (600 мл) се добавя на капки при разбъркване към ксилен под обратен хладник (2.4 л) в продължение на 1 час и се бърка допълнително в продължение на 20 минути. Реакционната смес се концентрира под вакуум и се пречиства чрез флаш колонна хроматография като се използва градиентно 0-100% етилацетат/изо-хексан като елюант и се получава продукта като жълт твърд продукт (12.93 г, 54%). $^1\text{H NMR}$ (CD_3SOCD_3) δ 3.85 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 7.05-7.45 (m, 8H), 12.06 (s, 1H); m/z 300.4 (MH^+).

По подобен начин се повтарят етап (ii) и (iii), но като се използва 2-хлоро-3-метоксибензалдехид и етил азидоацетат и се получава:

Етил-4-хлоро-5-метоксииндол-2-карбоксилат

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.31 (t, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (d, 1H), 7.22 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 12.2 (bs, 1H).

iv) Метил-N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-бензилоксииндол-2-карбоксилат

Натриев хидрид (60% в минерално масло, 75 мг) се добавя към разтвор на метил-4-флуоро-5-бензилоксииндол-2-карбоксилат (257 мг) в диметилформамид (10 мл), охладен до 5°C и сместа се бърка под атмосфера на аргон в продължение на 30 минути. Добавя се 3-трифлуорометил-4-флуоробензил хлорид (280 мг) и сместа се оставя да се затопли до стайна температура и след това се бърка в продължение на 4 часа. Реакционната смес се разпределя между етилацетат и вода. Органичните екстракти се промиват с вода, обезводняват се (магнезиев сулфат), концентрират се под вакуум и се пречистват чрез флаш колонна хроматография като се използва изо-хексан, последвано от 5% етилацетат/изо-хексан като елюант и се получава желания продукт (140 мг, 34%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.9 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.3-7.5 (m, 7H); m/z 476 ($\text{M}+\text{H}^+$).

По подобен начин, но като се използват подходящ индол и бензил халид се получава:

Етил-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-хлоро-5-метоксииндол-2-карбоксилат

82%добив. NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3-7.5 (m, 3H).

v) Метил-N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

Смес от метил-N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-бензилоксииндол-2-карбоксилат (140 мг) и 5% Pd/C (50 мг) в етилацетат (10мл) се разбърква под водородна атмосфера в продължение на 5 часа, филтрира се през целит, концентрира се под вакуум и се пречиства чрез флаш колонна хроматография като се използва градиентно 10-25% етилацетат/изо-хексан като елюант и се получава желания продукт (60 мг, 53%). ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.9 (s, 3H), 4.9 (d, 1H), 5.8 (s, 2H), 6.9-7.2 (m, 4H), 7.4 (m, 2H); m/z 384 ($\text{M}-\text{H}^+$).

По подобен начин, но като се използва подходящия бензил халид се получава:

Метил-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-флуоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

89% добив. NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.80 (s, 3H), 5.92 (s, 2H), 7.05 (t, 1H), 7.11 (dd, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 9.37 (s, 1H); m/z 401 (MH^+).

По подобен начин, но като се използва 2,4-дифлуоро-3-хидроксибензалдехид се получава:

Етил-N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4,6-дифлуоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 3.80 (s, 3H), 5.80 (s, 2H), 7.20-7.60 (m, 5H), 9.70 (s, 1H); m/z 402.2 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Етил-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-хлоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

се получава от етил-N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-хлоро-5-метоксииндол-2-карбоксилат като се използва метода описан в E(iv). 42% добив
 ^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.39 (t, 3H), 4.32 (q, 2H), 5.37 (s, 1H), 5.79 (s, 2H), 6.99-7.11 (m, 3H), 7.31-7.39 (m, 2H), 7.47 (d, 1H); m/z 430, 432 ($\text{M}-\text{H}^+$).

Метод С

Етил 5-ацетокси-3-бромоиндол-2-карбоксилат

N-бромосукцинимид (0.14 г) се добавя към бъркан разтвор на етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (0.2 г) в DMF (3.0 мл). Реакцията се бърка в продължение на 4 часа, след това се излива във вода. Получената утайка се филтрира, обезводнява се под вакуум и се получава съединението от заглавието като бял прах (0.23 г, 87%). NMR 1.38 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.38 (q, 2H), 7.10 (dd, 1H), 7.23 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 12.28 (bs, 1H); m/z 326 (M^+).

Метод C2

Етил 5-ацетокси-3-хлороиндол-2-карбоксилат

Разтвор на етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (500 мг) в дихлорометан (10 мл) се бърка при стайна температура в присъствие на N-хлоросукцинимид (297 мг) и калиев карбонат (279 мг) в продължение на една нощ. Получената утайка се отделя чрез филтриране, промива се със студен дихлорометан, последвано от вода и се обезводнява под вакуум в продължение на една нощ и се получава желанния продукт като бял прах (425 мг, 75%). NMR: 1.35 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.5 (d, 1H), 12.2 (s, 1H); m/z 281.9 (MH^+).

Метод C3

Етил 5-ацетокси-3-йодоиндол-2-карбоксилат

Разтвор на етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (1 г) в диметилформамид (2 мл) се бърка при стайна температура в присъствие на калиев карбонат (1.12 г) и йод (1.029 г) в продължение на 18 часа. Реакцията се разрежда с вода (30 мл) и полученият твърд продукт се отфилтрува, промива се с вода и се обезводнява; получава се желанния продукт (1.32 г, 87%). NMR δ (CD_3SOCD_3) 1.4 (t, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.1 (d, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.45 (d, 1H), 12.3 (s, 1H); m/z 372 ($M-H^-$).

Етил N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-5-ацетокси-3-йодоиндол-2-карбоксилат

Към разтвор на етил 5-ацетокси-3-йодоиндол-2-карбоксилат (400 мг) в диметилформаид (15 мл) се добавя калиев карбонат (340 мг), тетрабутил амониев йодид (10 мг) и 4-флуоро-3-трифлуорометилбензил бромид (330 мг). Сместа се бърка в продължение на 18 часа. Сместа се разрежда с вода (10 мл) и се екстрахира с етилацетат. Органичните екстракти се обезводняват, концентрират и пречистват чрез колонна хроматография като се използва 5% етилацетат/изо-хексан като елюант и се получава желаното съединение (520 мг, 89%).

NMR δ (CD_3SOCD_3) δ 1.3 (t, 3H), 2.25 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.2 (m, 3H), 7.4 (m, 1H), 7.8 (m, 2H); m/z 550 (MH^+).

По подобен начин, но като се използва подходящия етил 5-ацетокси-3-халоиндол-2 карбоксилат и бензил халид се получава:

Етил N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-5-ацетокси-3-хлороиндол-2-карбоксилат

70% добив. 458.1 (MH^+).

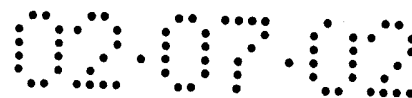
Етил N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-5-ацетокси-3-бромоиндол-2-карбоксилат

96% добив. NM (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0-7.2 (m, 3H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (m, 2H); m/z 502/504 (MH^+).

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетокси-3-бромоиндол-2-карбоксилат

79% добив. NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 7.05 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.3 (m, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (s, 1H); m/z 518/520 (MH^+).

Етил N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил)-5-ацетокси-3-бромоиндол-2-карбоксилат



63% добив. NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 5.8 (s, 2H), 6.95 (d, 1H), 7.1 (dd, 1H), 7.25 (m, 2H), 7.5 (m, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 518/520 (MH^+).

Метод D

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-3-метокси-5-хидроксииндол-2-карбоксилат

i) Етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

Смес на етил 3-бензилоксииндол-2-карбоксилат (10 г), циклохексен (50 мл) и 10% паладий върху въглерод (2 г) в етилацетат (500 мл) се нагрява под обратен хладник в продължение на 4 часа. Сместа се охлажда и филтрира през целит. Добавя се ацетанхидрид (5 мл) и N-диметиламинопиридин (0.1 г) и сместа се нагрява под обратен хладник в продължение на 15 минути. Сместа се охлажда и се добавя етанол, за да разруши излишъка от ацетанхидрид. Сместа се концентрира и остатъкът прекристализира от етил ацетат/изо-хексан и се получава желания продукт под формата на бели иглички (6.44 г, 77%). NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.33 (t, 3H), 2.23 (s, 3H), 4.32 (q, 2H), 7.0 (dd, 1H), , 7.13 (s, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 11.93 (bs, 1H); m/z (M-H^+).

ii) Етил 5-ацетокси диазоиндол-2-карбоксилат

Към разтвор на етил 5-ацетоксииндол-2-карбоксилат (5 г) се добавя натриев нитрит (20 г), а след това на капки ледена оцетна киселина (20 мл). След като се добави половината, се отделя кафяв дим. Сместа се изстудява до -10°C и се добавя остатъкът от оцетна киселина. Сместа се разбърква в продължение на 18 часа. Добавя се допълнително количество натриев нитрит (10 г) и оцетна киселина (10 мл) и получената смес се разбърква в

продължение на 18 часа. Сместа се разпределя между етилацетат и вода. Органичните екстракти се отделят, обезводняват и концентрират до малък обем. Добавя се хексан и получения твърд продукт се филтрира и се получава желания продукт (5.2 г, 94%). NMR δ (CDCl_3) δ 0.8 (t, 3H), 4.5 (q, 2H), 7.1 (dd, 1H), 7.4 (d, 1H), 8.0 (d, 1H); m/z 273 ($M+H^+$).

iii) Етил 3-метокси-5-ацетоксииндол-2-карбоксилат

Към разтвор на етил 5-ацетокси диазоиндол-2- карбоксилат (4.6 г) в 1,2-дихлороетан се добавя метанол (10 мл), последвано от катализно количество родиев (II)ацетат димер и получената смес се нагрява под обратен хладник в продължение на 18 часа. Сместа се концентрира и получения остатък се пречиства чрез колонна хроматография като се използва 20% етилацетат/изохексан като елюант и се получава желания продукт, който се пречиства допълнително чрез титруване с диетил етер (2.34 г, 50%). NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.3 (s, 3H), 4.05 (s, 3H), 4.4 (q, 2H), 7.05 (dd, 1H), 7.2-7.25 (m, 2H), 7.45 (d, 1H), 8.4 (bs, 1H); m/z 278.4 ($M+H^+$).

Метод Е

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5- хидрокси-6-хлороиндол-2-карбоксилат

i) Етил 2-ацетил-2-(N'-(3-хлоро-4-метоксифенил) хидразино) пропионат

Етер на HCl (60 мл) се добавя към разтвор на 3-хлоро-р-анизидин в етилацетат (300 мл) за утаяване на сол, която се отделя чрез филтриране и обезводняване на въздух. Солта (18.5 г) се суспендира в 1.5N HCl (230 мл) при -5°C под аргон. Разтвор на натриев нитрит (6.9 г) във вода (50 мл) се добавя в продължение

на 15 минути и се образува разтвор/гъста суспензия, която се бърка при -5°C в продължение на още 1 час (разтвор А).

Разтвор на натриева основа (5.36 г) във вода (10 мл) се добавя към разтвора на етил-2-метилацетоацетат (13.5 мл) в етанол (80 мл) при 5°C . Реакцията се бърка при 5°C в продължение на още 1 час и рН се регулира до 4 чрез добавяне на натриев ацетат (20 г). (Разтвор В).

Разтвор В се добавя към разтвор А при -5°C и сместа се оставя да се затопли до температура на околната среда в продължение на 3 часа, след което се разпределя между вода (250 мл) и етилацетат (250 мл). Органичната фаза се обезводнява (магнезиев сулфат), концентрира се под вакуум и се пречиства чрез колонна хроматография като се използва 15% етилацетат/изохексан като елюант и се получава желания продукт (7г, 21%).
NMR (CDCl_3) δ 1.24 (t, 3H), 1.63 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.22-4.35 (m, 2H), 7.02 (d, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.83 (d, 1H); m/z 270 ($\text{M}-\text{CH}_3\text{CONH}$)⁺.

По подобен начин, но като се използва като изходен материал 3-флуоро-4-метоксианилин се получава:

Етил 2-ацетил-2-(N'-(3-флуоро-4-метоксифенил)хидразино)пропионат

NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.25 (t, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 7.4 (t, 1H), 7.50 (dd, 1H), 7.6 (d, 1H); m/z 255 ($\text{M}+\text{H}^+$).

По подобен начин, но като се използва като изходен материал 3,5-дихлоро-4-метоксианилин се получава:

Етил 2-(N'-(3,5-дихлоро-4-метоксифенил)хидразино)пропионат

NMR (CDCl_3) δ 1.4 (t, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.13 (s, 2H), 7.52 (bs, 1H); m/z 307 (MH^+).

ii) Етил 5-метокси-6-хлороиндол-2-карбоксилат

Разтвор на 2-ацетил-2-{N'-(3-хлоро-4-метоксифенил)хидразино}пропионат (1г) и p-толуолсулфонова киселина (1 г) в толуол (30 мл) се бърка при 100°C в продължение на 18 часа. След това сместа се концентрира и пречиства чрез колонна хроматография като се използва 15% етилацетат/изохексан като елюант и се получава желания продукт (70 мг, 8%). NMR (CDCl_3) δ 1.42 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.42 (q, 2H), 7.11 (s, 2H), 7.46 (s, 1H), 8.86 (bs, 1H).

По подобен начин, но като се използва като изходен материал етил 2-ацетил-2-(N'-(3-флуоро-4-метоксифенил)хидразино)пропионат се получава:

Етил 5-метокси-6-флуороиндол-2 карбоксилат NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.3 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 7.1 (s, 1H), 7.2 (d, 1H), 7.3 (d, 1H); m/z 237 (MH^+).

По подобен начин, но като се използва като изходен материал етил 2-(N'-(3,5-дихлоро-4-метоксифенил)хидразино)пропионат се получава:

Етил 5-метокси-4,6-дихлороиндол-2 карбоксилат NMR (CD_3SOCD_3) δ 1.38 (t, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 7.23 (s, 2H), 7.5 (bs, 1H); m/z 307 (MH^+).

iii) Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5 метокси-6-хлороиндол-2-карбоксилат

Етил 5-метокси-6-хлороиндол-2-карбоксилат се алкилира с 3-трифлуорометил-4-хлоробензил бромид като се използва методиката, описана в метод A(iii) и се получава желания продукт (650 мг, 64%); NMR (CDCl_3) δ 1.36 (t, 3H), 3.93 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.43 (d, 1H).

По подобен начин, но като се използва подходящ индол и бензил халид се получава:

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5 метокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат

NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.9 (s, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.4 (m, 4H), 7.55 (d, 1H), 7.9 (s, 1H).

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5 метокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат

NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 3.8 (s, 3H), 4.2 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 6.9 (d, 1H), 7.3-7.4 (m, 3H), 7.5 (d, 1H), 7.6 (d, 1H).

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5 метокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат

NMR(CD₃SOCD₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.72 (s, 2H), 6.95-7.05 (m, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.3 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.43 (s, 1H).

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5 метокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат

NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.33 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.42 (s, 1H).

Етил N-(3-трифлуорометил-4-дихлоробензил)-5 метокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат

NMR(CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.35 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.09 (d, 1H), 7.25-7.5 (m, 4H).

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5 метокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат

NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.69 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.09 (d, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.24-7.35 (m, 3H); m/z 414 (MH⁺).

iv) Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат

Смес на етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-метокси-6-хлороиндол-2-карбоксилат (650 мг) и триметилсилилийодид (0.8 мл) в хлороформ (50 мл) се бърка при

02.07.00

50°C в продължение на 18 часа. След това аликвоти от триметилсилилийодид се добавят, докато изходният материал не се изчерпи и след това реакцията се излива в метанол (100 мл). Сместа се концентрира под вакуум и се пречества чрез колонна хроматография като се използва 15% етилацетат/изохексан като елюант и се получава желания продукт като бял твърд продукт (276 мг, 44%); NMR (CDCl₃) δ 1.36 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.24-7.51 (m, 3H), 7.38 (d, 1H), 7.44 (d, 1H).

По подобен начин, но като се използват етил N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат или етил N-(3,4-дихлоробензил)-5 метокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат или етил N-(3,4-дихлоробензил)-5-метокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат или етил N-(3,4-дихлоробензил)-5-метокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат или етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-метокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат или етил N-(3-трифлуорометил-4-дихлоробензил)-5-метокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат се получава:

Етил N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат

53% добив. NMR (CD₃SOCD₃) δ 1.25 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.85 (s, 2H), 7.1-7.25 (m, 3H), 7.4 (t, 1H), 7.5 (d, 1H), 7.8 (s, 1H), 9.8 (s, 1H); m/z 414 (M-H⁺)

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат 31% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.4 (t, 3H), 4.3 (q, 2H), 5.7 (s, 2H), 6.8 (dd, 1H), 7.0 (d, 1H), 7.1-7.3 (m, 2H); m/z 380 (M-H⁺)

Етил N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-5-хидрокси-6-флуороиндол -2-карбоксилат

26% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.35 (t, 3H), 4.31 (q, 2H), 4.95 (dd, 1H), 5.72 (s, 2H), 6.96 (d, 1H), 7.01 (dd, 1H), 7.23-7.3 (m, 2H), 7.37 (d, 1H), 7.44 (s, 1H); m/z 414, 416 (M-H⁺)

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат 69% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.34 (q, 2H), 5.65 (bs, 1H), 7.7 (s, 2H), 6.82 (dd, 1H), 7.1 (d, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.35 (s, 1H); m/z 436, 434, 432, 430 (M-H⁺)

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-4,6-дихлороиндол -2-карбоксилат
80% добив. NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H), 4.36 (q, 2H), 5.66 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 7.0 (dd, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.35-7.41 (m, 2H), 7.43 (d, 1H), 466, 468 (M-H⁺)

Етил N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол -2-карбоксилат 37% добив. m/z 398 (M-H⁺).

Метод F2

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетокси-6-бромоиндол -2-карбоксилат

(i) Етил-5-метокси-6-бромоиндол-2-карбоксилат

Методиката описана в метод E(i)- (ii) се повтаря като се използва 3-бромо-4-метокси анилин и се получава желания продукт (24% добив): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.30 (t, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.30 (q, 2H), 7.05 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 11.79 (s, 1H); m/z 296.3 (M-H⁺).

(ii) Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетокси-6-бромоиндол -2-карбоксилат

Методиката описана в метод A(i)- (iii) се повтаря като се използва подходящ бензил халид и се получава желания продукт: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1.22 (t, 3H), 2.32 (s, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.90 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.60 (d, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.68 (m, 1H), 8.10 (s, 1H).

По подобен начин, но като се използва 3,4-дихлоробензил хлорид се получава:

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетокси-6-бromoиндол -2-карбоксилат
 m/z 486.2 ($M-H^+$).

Метод Е3

Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-7-флуороиндол -2-карбоксилат

(i) Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-бензилокси-7-флуороиндол -2-карбоксилат

Методиката описана в пример E(I)-(iii) се повтаря като се използва 2-флуоро-4-бензилокси анилин като изходен материал и се получава желания продукт (71% добив); 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 1.22 (t, 3H), 4.25 (q, 2H), 5.10 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 6.95 (m, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.30-7.50 (m, 6H), 7.60 (m, 2H).

(ii) Етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-7-флуороиндол -2-карбоксилат

Към разтвор на етил N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-бензилокси-7-флуороиндол -2-карбоксилат (50 мг) в етилацетат (5 мл) се добавя катализно количество 5% паладий върху въглерод и получената смес се бърка под атмосфера на водород в продължение на 72 часа. Сместа се филтрира и концентрира под вакуум и се получава желания продукт (59 мг); m/z 414.25 ($M-H^+$).

Пример 27

Фармацевтични състави

Този пример илюстрира, но не ограничава представителни фармацевтични дозирани форми на настоящото изобретение, както е дефинирано тук (активният инградиент се означава "съединение X") за терапевтично или профилактично прилагане при хора:

(a)

Таблетка I	мг/таблетка
Съединение X	100
Лактоза Ph. Eur	182.75
Натриева кроскармелоза	12.0
Паста от царевично нишесте (5% т/об паста)	2.25
Магнезиев стеарат	3.0

(b)

Таблетка II	мг/таблетка
Съединение X	50
Лактоза Ph. Eur	223.75
Натриева кроскармелоза	6.0
Царевично нишесте	15
Поливинилпиролidon (5% т/об паста)	2.25
Магнезиев стеарат	3.0

(c)

Таблетка III	мг/таблетка
Съединение X	1.0
Лактоза Ph. Eur	93.25
Натриева кроскармелоза	4.0
Паста от царевично нишесте (5% т/об паста)	0.75
Магнезиев стеарат	1.0

(d)

Капсула	мг/капсула
Съединение X	10
Лактоза Ph. Eur	488.5
Магнезий	1.5

(e)

Инжекция I	(50 мг/мл)
Съединение X	5% тегл/об
1M разтвор на натриева основа	15% об/об
0.1M солна киселина	регулиране до pH 7.6
Полиетилентликол 400	4.5% тегл/об
Вода за инжектиране	до 100%

(f)

Инжекция II	(10 мг/мл)
Съединение X	1% тегл/об
Натриев фосфат ВР	3.6 % тегл/об
0.1M разтвор на солна киселина	15% об/об
Вода за инжектране	до 100%

(g)

Инжекция III	(1 мг/мл, буфериран до pH 6)
Съединение X	0.1% тегл/об
Натриев фосфат ВР	2.26% тегл/об
Лимонена киселина	0.38% тегл/об
Полиетилентликол 400	3.5% тегл/об
Вода за инжектиране	до 100%

(h)

Аерозол I	мг/мл
Съединение X	10.0
Сорбитан триолеат	13.5
Трихлорофлуорометан	910.0
Дихлородифлуорометан	490.0

(i)

Аерозол II	мг/мл
Съединение X	0.2
Сорбитан триолеат	0.27
Трихлорофлуорометан	70.0
Дихлородифлуорометан	280.0
Дихлоротетрафлуороетан	1094.0

(j)

Аерозол III	мг/мл
Съединение X	2.5
Сорбитан триолеат	3.38
Трихлорофлуорометан	67.5
Дихлородифлуорометан	1086.0
Дихлоротетрафлуороетан	191.6

(k)

Аерозол IV	мг/мл
Съединение X	2.5
Соев лецитин	2.7
Трихлорофлуорометан	67.5
Дихлородифлуорометан	1086.0
Дихлоротетрафлуороетан	191.6

(l)

Мазило	мл
Съединение X	40 мг
Етанол	300 μ л
Вода	300 μ л
1-додэцилазациклохептан-2-он	50 μ л
Пропилен гликол	до 1 мл

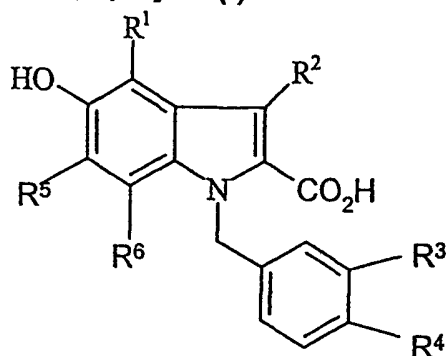
Забелѐжка:

Съединение X в горните форми за прилагане може да съдържа съединение като илюстрираните в горните примери.

Горните форми за прилагане могат да бъдат получени по традиционни методики, които са известни в областта на фармацията. Таблетките (a)-(c) могат да бъдат плътно покрити чрез традиционни средства, например като се направи покритие от целулозен ацетат фталат. Аерозолните форми за прилагане (h)-(k) може да бъдат използвани посредством стандартни, оразмерени дозирани аерозолни устройства за аерозолно впръскване, и суспендиращите средства сорбитан триолеат и соев лецитин може да бъдат заместени с алтернативно суспендиращо средство като например сорбитан моноолеат, сорбитан сескиолеат, полисорбат 80, полиглицерол олеат или олеинова киселина.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Съединение с формула (I):



(I)

В КОЯТО

R¹ е водород, халоген или метокси група;R² е водород, халоген, метил, етил или метокси група;R³ е халоген или трифлуорометил група;R⁴ е халоген или трифлуорометил група;R⁵ е водород или халоген;R⁶ е водород или халоген;

при условие, че когато R⁵ и R⁶ са и двата водород и единият от R³ или R⁴ е хлоро или флуоро, тогава другият не е хлоро или флуоро; или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство.

2. Съединение съгласно претенция 1, в което във формула

(I):

R¹ е водород, флуоро или хлоро;R² е водород, хлоро, бром, йодо или метокси група;R³ е флуоро, хлоро, бром, йодо;R⁴ е трифлуорометил ;R⁵ и R⁶ са водород;

3. Съединение съгласно претенция 1, в което във формула

(I):

R¹ е водород, флуоро или хлоро;

R^2 е водород, хлоро, бромо, йодо или метокси група;

R^3 е трифлуорометил ;

R^4 е флуоро, хлоро, бромо или йодо;

R^5 и R^6 са водород.

4. Съединение съгласно претенция 1, в което във формула (I):

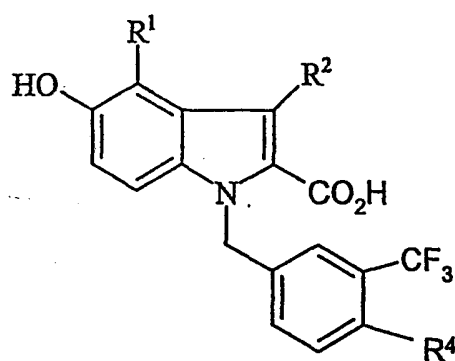
R^1 е водород, флуоро или хлоро;

R^2 е водород, хлоро, бромо, йодо или метокси група;

R^3 и R^4 и двата са халоген, по-специално флуоро, хлоро или бромо или единият от R^3 и R^4 е хлоро, а другият от R^3 и R^4 е флуоро;

единият или двата R^5 и R^6 е халоген.

5. Съединение съгласно претенция 1, което съединение е с формула (IA):



(IA)

в която R^1 , R^2 и R^4 притежават посочените в претенция 1 значения или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство.

6. Съединение съгласно претенция 1, което може да е всяко едно от следните:

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-бромо-4-хлоробензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-флуоро-4-бромобензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-бромо-4-флуоробензил)-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4-флуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-флуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-флуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-4,6-дифлуоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3,4-хлоробензил)-4,6-дифлуороиндол-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-хлоро-4-трифлуорометилбензил)-3-бромо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-3-хлоро-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-флуоро-4-трифлуорометилбензил)-3-йодо-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-3-метокси-5-гидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-флуоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-7-флуороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-6-бромоеиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-6-бромоеиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидрокси-6-флуороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-6-флуороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3,4-дихлоробензил)-5-хидрокси-6-хлороиндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4-хлоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

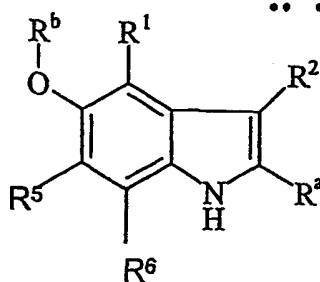
N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-4,6-дихлоро-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина;

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-ацетоксииндол-2-карбоксилна киселина (пролекарство на

N-(3-трифлуорометил-4-хлоробензил)-5-хидроксииндол-2-карбоксилна киселина).

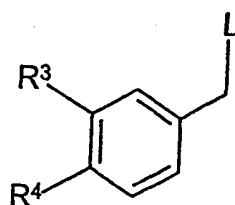
7. Метод за получаване на съединение съгласно претенция 1 или фармацевтично приемлива негова сол или пролекарство, характеризиращ се с това, че включва:

(а) съединение с формула (II):



(II)

в която R^1 , R^2 , R^5 и R^6 притежават посочените в претенция 1 значения, R^a е карбоксилна група или нейна блокирана форма и R^b е водород или подходяща хидроксил блокираща група, взаимодейства със съединение с формула (III):



(III)

в която R^3 и R^4 притежават посочените в претенция 1 значения, и L е заместима група;
и по избор следното:

(b) (i) полученото съединение с формула (I) се превръща в друго съединение с формула (I);

(ii) отстраняване на всички блокиращи групи; или

(iii) образуване на негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство.

8. Съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство за използване в метод за лечение на човек или животно чрез терапия.

9. Съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство за прилагане като лекарство.

10. Съединение съгласно претенция 9, което се използва като лекарство за антагонистизиращ MCP-1 опосредстван ефект при топлокръвно животно.

11. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че съдържа съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство, заедно с фармацевтично приемлива лекарствена среда или носител.

12. Използване на съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство при получаване на лекарства използвани за антагонистизиращ MCP-1-опосредстван ефект при топлокръвно животно.

13. Метод за лечение на възпалително заболяване, характеризиращ се с това, че включва прилагане на нуждаещия се от такова лечение пациент на съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство или фармацевтичен състав съгласно претенция 11.

14. Метод на антагонистизиращ MCP-1 опосредстван ефект на топлокръвно животно нуждаещо се от такова лечение, характеризиращ се с това, че включва прилагане на споменатото животно на ефективно количество от съединение съгласно всяка една от претенции от 1 до 6 или негова фармацевтично приемлива сол или пролекарство или фармацевтичен състав съгласно претенция 11.