

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 01.03.2001

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 01.03.2000

(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/186183

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 14.05.2003
(Věstník č. 5/2003)

(86) PCT číslo: PCT/US01/06564

(87) PCT číslo zveřejnění: WO01/064208

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2932

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C 225/20 A 61 P 7/02
A 61 K 31/135 A 61 P 9/10
A 61 P 17/06
A 61 P 19/00
A 61 P 11/00
A 61 P 11/06
A 61 P 1/00
A 61 P 25/28

(71) Přihlašovatel:

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US;

(72) Původce:

Palovich Michael Robert, Norristown, PA, US;
Weinstock Joseph, Wayne, PA, US;
Widdowson Katherine Lousia, King of Prussia, PA, US;

(74) Zástupce:

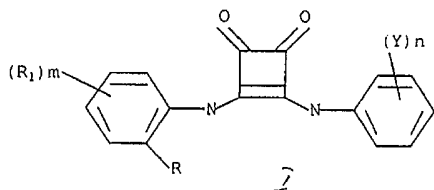
Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Antagonisté IL-8 receptoru

(57) Anotace:

Jsou popsány dianilinoskvaráty obecného vzorce I, kde jednotlivé symboly mají specifický význam, farmaceutický prostředek s jejich obsahem a jejich použití při léčbě onemocnění zprostředkovaných chemokinem, interleukinem-8 (IL-8).



Antagonisté IL-8 receptoru

Oblast techniky

Tento vynález se týká nové skupiny sloučenin dianilinoskvaranů, způsobů jejich přípravy, jejich použití při léčbě onemocnění zprostředkovaných IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 a ENA-78 a farmaceutických prostředků použitelných pro takovou léčbu.

Dosavadní stav techniky

Interleukin-8 (IL-8) byl nazýván mnoha názvy, jako například neutrofilní atraktant/aktivační protein-1 (NAP-1), neutrofilní chemotaktický faktor odvozený od monocytu (MDNCF), neutrofilní aktivační faktor (NAF), chemotaktický faktor T-buněk lymfocytů. Interleukin-8 je chemoatraktant pro neutrofilny, bazofily a podskupinu T-buněk. Je vytvářen většinou jaderných buněk včetně makrofágů, fibroblastů, endoteliálních a epiteliálních buněk vystavených TNF, IL-1 α , IL-1 β nebo LPS a neutrofilny samotnými po vystavení LPS nebo chemotaktickým faktorům, jako je FMLP. M. Baggiolini a kol., J. Clin. Invest., 84, 1045 (1989); J. Schroder a kol., J. Immunol. 139, 3474 (1987) a J. Immunol., 144, 2223 (1990); Strieter a kol., Science 243, 1467 (1989) a J. Biol. Chem. 264, 10621 (1989); Cassatella a kol., J. Immunol., 148, 3216 (1992).

GRO α , GRO β , GRO γ a NAP-2 také patří do skupiny α -chemokinů. Podobně jako IL-8 byly také tyto chemokiny označovány různými názvy. Například GRO α , β , γ byly označovány jako MGSA α , β a γ (Melanoma Growth Stimulating Activity), viz Richmond a kol., J. Cell Physiology, 129, 375 (1986) a Chang a kol., J. Immunol., 148, 451 (1992).

Všechny chemokiny z α -skupiny, které mají vzor ELR přecházející na vzor CXC, se váží na B receptor IL-8.

IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 a ENA-78 stimulují mnoho funkcí in vitro. Bylo prokázáno, že všechny tyto látky mají chemoatraktační vlastnosti vůči neutrofilům, zatímco IL-8 a GRO α mají rovněž chemotaktickou aktivitu vůči T-lymfocytům a bazofilním granulocytům. Dále IL-8 může indukovat uvolňování histaminu z bazofilních granulocytů u jak normálních, tak i atopických jedinců. GRO- α a IL-8 mohou také navíc indukovat uvolnění lysozomálního enzymu a respirační puknutí u neutrofilů. Bylo také prokázáno, že IL-8 zvyšuje povrchovou expresi Mac-1 (CD11b/CD18) na neutrofile bez nové syntézy proteinu. To může přispívat ke zvýšení adheze neutrofilů vůči vaskulárním endoteliálním buňkám. Mnoho známých onemocnění se vyznačuje masivní infiltrací neutrofilů. Protože IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ a NAP-2 podporují akumulaci a aktivaci neutrofilů, tyto chemokiny jsou zapojeny do mnoha akutních i chronických zánětlivých zdravotních poruch, jako je lupénka a revmatická artritida, Baggiolini a kol. FEBS Lett. 307, 97 (1992); Miler a kol., Crit. Rev. Immunol., 12, 17 (1992); Oppenheim a kol., Annu. Rev. Immunol., 9, 617 (1991); Seitz a kol., J. Clin. Invest 87, 463 (1991); Miller a kol., Am. Rev. Respir. Dis. 146, 427 (1992); Donnelly a kol., Lancet 341, 643 (1993). Navíc ELR chemokiny (obsahující aminokyselinový vzor před vzorem CXC) jsou také zapojeny do angiostázy, Strieter a kol., Science 258, 1798 (1992).

In vitro IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ a NAP-2 indukují změny tvaru neutrofilů, chemotaxi, uvolňování granulí a respirační puknutí vazbou na aktivační receptory 7-transmembrány, G-protein-příbuznou skupinu, zejména vazbou na receptory IL-8, zejména na B-receptor. Thomas a kol., J.

Biol.Chem. 266, 14839 (1991); Holmes a kol., Science, 253, 1278 (1991). Vývoj antagonistů na bázi nepeptidických malých molekul pro členy této skupiny receptorů má precedens. Viz souhrn v R. Freidinger: Progress in Drug Reaserch, Vol. 40, pp. 33 - 98, Birkhauser Verlag, Basel, 1993. Z tohoto důvodu představuje receptor IL-8 slibný směr ve vývoji nových protizánětlivých činidel.

Byly charakterizovány dva lidské receptory IL-8 s vysokou afinitou (homologie 77 %): IL-8R α , který váže pouze IL-8 s vysokou afinitou a IL-8RB, který má vysokou afinitu k IL-8 a rovněž i k GRO- α , GRO β , GRO γ a NAP-2. Viz Holmes a kol., výše; Murphy a kol., Science 253, 1280 (1991); Lee a kol., J. Biol. Chem. 267, 16283 (1992); LaRosa a kol., J. Biol. Chem. 267, 25402 (1992); a Gayle a kol., J. Biol. Chem. 268, 7283 (1993).

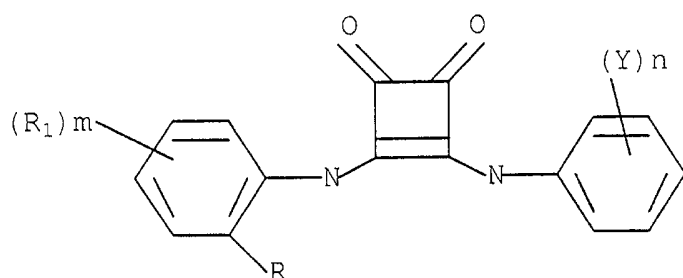
V této oblasti stále přetrvává potřeba sloučenin pro léčbu, které jsou schopny vazby s receptory IL-8 α nebo β . Podmínky spojené se zvýšenou produkcí IL-8 (který zodpovídá za chemotaxi neutrofilních a T-buněčných podjednotek do místa zánětu) by mohly být zlepšeny sloučeninami, které jsou inhibitory vazby receptoru IL-8.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje způsob léčby nemocí zprostředkovaných chemokinem, přičemž tento chemokin se váže na receptor IL-8 α nebo β . Tento způsob zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny vzorce (I) nebo její farmaceuticky přijatelné soli. Chemokinem je zejména IL-8.

Tento vynález se také týká možného způsobu inhibování vazby IL-8 k jeho receptorům u savců, přičemž tento způsob zahrnuje podávání tomuto savci účinného množství sloučeniny vzorce (I).

Užitečné sloučeniny vzorce (I) podle tohoto vynálezu mají následující vzorec:



(I)

kde:

R je vybrána ze skupiny sestávající z OH, SH a NHSO_2R_d ;

R_d je vybrána ze skupiny sestávající z NR_6R_7 , alkyly, aryl C_{1-4} alkyly, aryl C_{2-4} alkenylu, heteroarylu, heteroaryl- C_{1-4} alkyly, heteroaryl C_{2-4} alkenylu, heterocyklu a heterocykl C_{1-4} alkyly, kde arylové, heteroarylové a heterocyklické kruhy jsou všechny případně substituovány;

R_6 a R_7 jsou nezávisle vodík nebo C_{1-4} alkylová skupina nebo R_6 a R_7 společně s dusíkem, ke kterému jsou připojeny, tvoří 5- až 7-členný kruh, přičemž tento kruh případně obsahuje další heteroatom, který je vybrán z kyslíku, dusíku nebo síry, a tento kruh může být případně substituován;

R_1 je nezávisle vybrána ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, nitroskupiny, kyanoskupiny, halogensubstituovaného C_{1-10} alkyly, C_{1-10} alkyly, C_{2-10} alkenylu, C_{1-10} alkoxykupiny, halogensubstituované C_{1-10} alkoxykupiny, azidu, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_t\text{R}_4$, hydroxyskupiny, hydroxy C_{1-4} alkyly, arylu, aryl C_{1-4} alkyly, aryloxykupiny, aryl C_{1-4} alkyloxykupiny, heteroarylu, heteroarylalkylu, heterocyklu, heterocykl C_{1-4} alkyly,; heteroaryl C_{1-4} alkyloxykupiny, aryl C_{2-10} alkenylu, heteroaryl C_{2-10} alkenylu, heterocykl C_{2-10} alkenylu, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{R}_5$, C_{2-10} alkenyl $\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_{10}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{H}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{R}_8$,

$(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenyl-}$
 $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{OR}_{12}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{OC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_{17}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_4\text{R}_5$; nebo dvě jednotky R_1
 společně tvoří $\text{O}-(\text{CH}_2)_s\text{O}-$ nebo 5- až 6-členný nenasycený
 kruh;

q je 0 nebo celé číslo nabývající hodnotu 1 až 10;

t je 0 nebo celé číslo nabývající hodnotu 1 nebo 2;

s je celé číslo nabývající hodnotu 1 až 3;

R_4 a R_5 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající
 z vodíku, případně substituovaného C_{1-4} alkylu, případně
 substituovaného arylu, případně substituovaného
 aryl C_{1-4} alkylu, případně substituovaného heteroarylu,
 případně substituovaného heteroaryl C_{1-4} alkylu, heterocyklu a
 heterocykl C_{1-4} alkylu, nebo R_4 a R_5 společně s dusíkem, ke
 kterému jsou připojeny, tvoří 5- až 7-členný kruh, který
 případně obsahuje další heteroatom vybraný z kyslíku,
 dusíku nebo síry;

Y je nezávisle vybraná ze skupiny sestávající z vodíku,
 halogenu, nitroskupiny, kyanoskupiny,
 halogensubstituovaného C_{1-10} alkylu, C_{1-10} alkylu, C_{2-10} alkenylu,
 C_{1-10} alkoxyskupiny, halogensubstituované C_{1-10} alkoxyskupiny,
 azidu, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_t\text{R}_4$, hydroxyskupiny, hydroxy C_{1-4} alkylu,
 arylu, aryl C_{1-4} alkylu, aryloxyskupiny, aryl C_{1-}
 4 alkyloxyskupiny, heteroarylu, heteroarylalkylu,
 heteroaryl C_{1-4} alkyloxyskupiny, heterocyklu,
 heterocykl C_{1-4} alkylu; aryl C_{2-10} alkenylu,
 heteroaryl C_{2-10} alkenylu, heterocykl C_{2-10} alkenylu,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{R}_5$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_{10}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{H}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{R}_8$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{OR}_{12}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{OC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_d$, a $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_4\text{R}_5$; nebo dvě jednotky Y

společně tvoří $O-(CH_2)_sO-$ nebo 5- až 6-členný nenasycený kruh;

n je celé číslo nabývající hodnot 1 až 5;

m je celé číslo nabývající hodnot 1 až 4;

R_8 je vodík nebo C_{1-4} alkyl;

R_{10} je C_{1-10} alkyl $C(O)_2R_8$;

R_{11} je vybrána ze skupiny sestávající z vodíku, C_{1-4} alkylu, případně substituovaného arylu, případně substituovaného aryl C_{1-4} alkylu, případně substituovaného heteroarylu, případně substituovaného heteroaryl C_{1-4} alkylu, případně substituovaného heterocyklu a případně substituovaného heterocykl C_{1-4} alkylu;

R_{12} je vybrána z vodíku, C_{1-10} alkylu, případně substituovaného arylu a případně substituovaného arylalkylu; a

R_{17} je vybrána ze skupiny sestávající z C_{1-4} alkylu, arylu, arylalkylu, heteroarylu, heteroaryl C_{1-4} alkylu, heterocyklu a heterocykl C_{1-4} alkylu, kde arylové, heteroarylové a heterocyklické kruhy jsou všechny případně substituovány.

Podrobný popis vynálezu

Sloučeniny vzorce (I) mohou také být použity při veterinární léčbě savců jiných než člověk v případě potřeby inhibice IL-8 nebo jiných chemokinů, které se váží na receptory IL-8RA a RB. Onemocnění zprostředkovaná chemikiny, která lze léčit u zvířat terapeuticky nebo profylakticky, zahrnují chorobné stavy, jako jsou uvedeny zde dále v části Způsoby léčby.

Následující výrazy použité v tomto textu označují:

- „halogen“ označuje všechny halogeny, tj. chlor, fluor, brom a jod.

- „C₂₋₅alkyl“ nebo „alkyl“ označuje jak nerozvětvené, tak i rozvětvené části řetězce skládající se z 2 až 5 atomů uhlíku, jestliže délka řetězce není jinak omezena, touto částí je například methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek.butyl, isobutyl, terc.butyl, n-pentyl a podobně.

- výraz „alkenyl“ je užit ve všech případech k označení nerozvětvených nebo rozvětvených částí řetězce skládajících se z 2 až 10 atomů uhlíku, jestliže délka řetězce není jinak omezena, touto částí je například ethenyl, 1-propenyl, 2-propenyl, 2-methyl-1-propenyl, 1-butenyl, 2-butenyl a podobně.

- výraz „aryl“ označuje fenyl a naftyl;

- „heteroaryl“ (samotný nebo v jakékoliv kombinaci jako je „heteroaryloxy“ nebo „heteroarylalkyl“) označuje 5- až 10-členný aromatický kruhový systém, ve kterém jeden nebo více kruhů obsahuje jeden nebo více heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z N, O nebo S, jako je například pyrrol, pyrazol, furan, thiofen, chinolin, isochinolin, chinazolinyl, pyridin, pyrimidin, oxazol, thiazol, thiadiazol, triazol, imidazol nebo benzimidazol.

- „heterocykl“ (samotný nebo v jakékoliv kombinaci jako je „heterocyklalkyl“ - označuje nasycený nebo částečně nenasycený 4- až 10-členný kruhový systém, ve kterém jeden nebo více kruhů obsahuje jeden nebo více heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z N, O, S, jako je například pyrrolidin, piperidin, piperazin, morfolin, tetrahydropyran nebo imidazolidin.

- výraz „arylalkyl“ nebo „heteroarylalkyl“ nebo „heterocyklalkyl“ označuje C₁₋₁₀alkyl, jak je definován výše, připojený na aryl, heteroaryl nebo heterocyklickou část, jak je zde definováno, jestliže není uvedeno jinak.

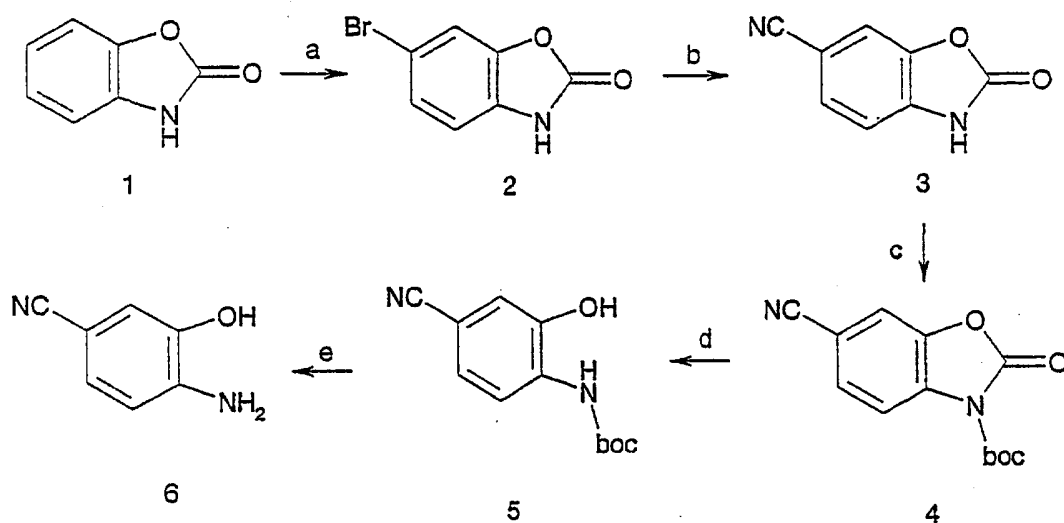
Výhodné sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou vybrány ze skupiny sestávající z:

- 1) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 2) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-chloranilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 3) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2,3-dichloranilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 4) 3-(4-nitro-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu; a
- 5) 3-(4-chlor-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu.

Způsoby přípravy

Sloučeniny vzorce (I) mohou být připraveny použitím pracovních postupů syntézy, z nichž některé jsou uvedeny v dále zobrazených schématech. Syntéza uvedená v těchto schématech je použitelná pro výrobu sloučenin vzorce (I) majících mnoho různých skupin R, R₁ a arylových skupin, které jsou podrobeny reakci, za použití případných substituentů, které jsou vhodně chráněny, aby bylo dosaženo shody se zde uvedenými reakcemi. Následné odstranění chránících skupin v těchto případech vede k získání požadovaných sloučenin obecně popsané povahy. Za použití standardních pracovních technik vzájemné přeměny funkčních skupin dobře známých odborníkovi v oboru mohou být z výchozího guanidinu připraveny další sloučeniny mající požadovaný vzorec. Ve schématech jsou uvedeny z ilustračních důvodů pouze sloučeniny vzorce (I).

Schéma 1

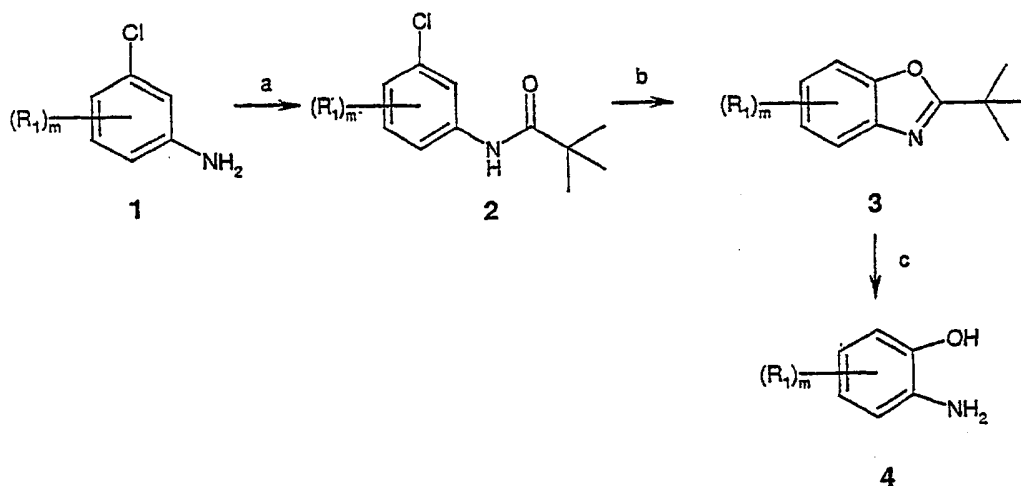


a) Br_2 , NaOAc, HOAc; b) CuCN, DMF, reflux; c) $(\text{BOC})_2\text{O}$, DMAP, TEA; d) K_2CO_3 , MeOH; e) TFA.

Požadovaný anilin 6 (schéma-1) může být připraven z komerčně dostupného benzoxazolinu 1 (schéma-1). Bromid 2 (schéma-1) může být připraven z benzoxazolinu 1 (schéma-1) za použití standardních podmínek bromace - bromu a octanu sodného v kyselině octové. Bromid 2 (schéma-1) může být přeměněn na kyanid 3 (schéma) za použití standardních postupů - kyanid mědný za varu pod zpětným chladičem s DMF. Amid 3 (schéma-1) může být přeměněn na BOC chráněnou sloučeninu 4 (schéma-1) za použití standardních podmínek - anhydrid BOC a triethylamin s katalytickým množstvím dimethylaminopyridinu v chlormethanu nebo jiném vhodném organickém rozpouštědle. Oxazolinon 4 (schéma-1) může být přeměněn na požadovaný anilin 6 (schéma-1) nejdříve hydrolýzou na fenol 5 (schéma-1) za použití standardních podmínek - uhličitán draselný v methanolu a následně odstraněním chránicí skupiny za použití standardních podmínek - kyselina trifluorooctová v chlormethanu nebo

jiném vhodném organickém rozpouštědle - tímto postupem vznikne anilin 6 (schéma-1).

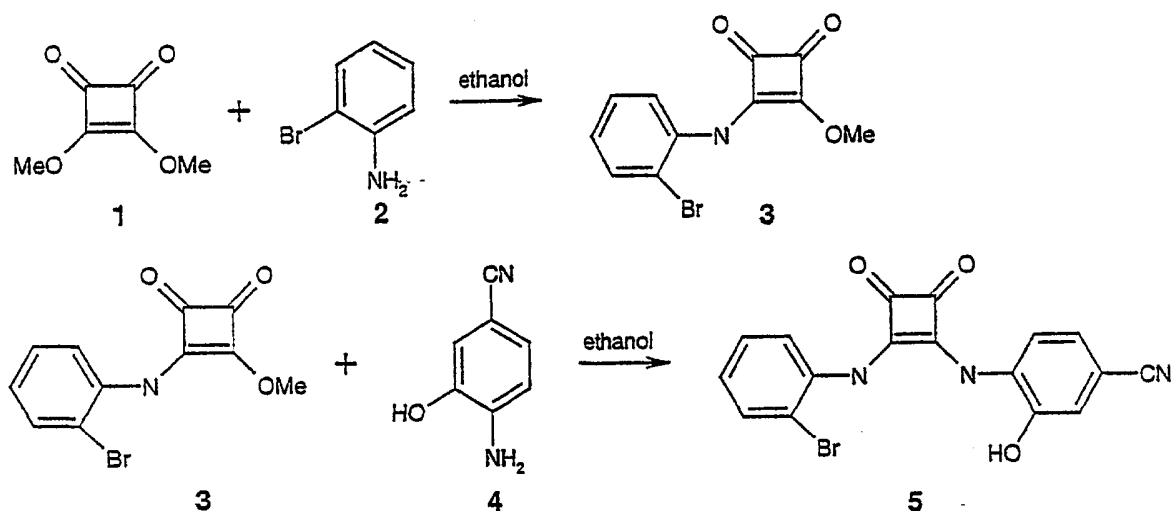
Schéma 2



a) PivCl, TEA; b) i. BuLi (2 ekv.) THF, $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$; ii. HCl; c) H_2SO_4 , H_2O .

Alternativně požadovaný substituovaný hydroxyanilin 4 může být připraven postupem zobrazeným ve schématu 2. Komerčně dostupné substituované 3-chloraniliny 1 mohou být přeměněny na amidy za použití standardních podmínek dobře známých v oboru - pivaloylchlorid a triethylamin ve vhodném organickém rozpouštědle, jako je chlormethan. Amid 2 může být přeměněn na benzoxazol 3 za použití nadbytečného množství silné báze, jako je butyllithium ve vhodném organickém rozpouštědle, jako je THF, za snížené reakční teploty (-20 až $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) s následným protickým zpracováním. Požadovaný fenolanilin 5 může být připraven z benzoxazolu 4 za použití standardních podmínek hydrolýzy, jako je kyselina sírová ve vodě zahřívána na teplotu $85\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Schéma 3



Sloučeniny vzorce 5 lze připravit z komerčně dostupného dimethylskvarátu 1, jak je znázorněno ve schématu 3. Meziprodukt 3 může být připraven reakcí diethyletherskvarátu 1 s požadovaným anilinem 2 v ethanolu nebo jiném vhodném organickém rozpouštědle za varu pod zpětným chladičem. Požadovaná sloučenina skvaranu 5 může být připravena reakcí skvaranu 3 se sekundárním anilinem 4 v ethanolu nebo jiném vhodném organickém rozpouštědle za varu pod zpětným chladičem.

Příklady provedení vynálezu

Příklady syntéz

Nyní bude tento vynález objasněn uvedením následujících příkladů, které jsou naprosto ilustrativní, ale nemají být chápány jako omezení rozsahu tohoto vynálezu. Všechny teploty jsou uvedeny ve stupních celsia, všechna rozpouštědla jsou nejvyšší dostupné čistoty a všechny reakce probíhají za bezvodých podmínek v atmosféře argonu, jestli není uvedeno jinak.

V příkladech jsou všechny teploty uvedeny ve stupních Celsia (°C). Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru VG Zab s použitím ionizace bombardováním rychlými atomy (FAB), jestliže není uvedeno jinak. ¹H-NMR (dále „NMR“) spektra byla zaznamenávána při frekvenci 250 MHz za použití spektrometru Bruker AM 250 nebo Am 400. Uváděné multiplicity jsou následující: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet a br označuje široký signál. Sat. označuje nasycený roztok, ekv. označuje poměr molárního ekvivalentu činidla k výchozí látce.

Příklad 1

Syntéza 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu

3-Methoxy-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dion

K roztoku 3,4-dimethoxycyklobut-2-en-1,2-dionu (1 mmol) v ethanolu (1 ml) byl přidán 2-bromanilin (1 mmol). Po ukončení reakce byla reakční směs zahuštěna a čištěna buď překrystalováním nebo chromatograficky za vzniku 3-methoxy-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu.

3-(4-Kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dion

K roztoku 3-methoxy-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu (1 mmol) v ethanolu (1 ml) byl přidán 4-kyan-2-hydroxyanilin (1 mmol). Po ukončení reakce byla reakční směs zahuštěna a čištěna buď překrystalováním nebo chromatograficky za vzniku 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu.

Způsoby léčby

Sloučeniny vzorce (I) nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli mohou být použity při výrobě léčiva pro profylaktickou nebo terapeutickou léčbu jakýchkoliv onemocnění u lidí nebo jiných savců, které je zhoršeno nebo způsobeno nadměrnou nebo neregulovanou tvorbou cytokinu IL-8 savčími buňkami, jako jsou například monocyty a/nebo makrofágy, nebo jiné chemokiny, které se váží na receptor IL-8 α nebo β , který je také označován jako receptor typu I nebo typu II.

Tento vynález poskytuje způsob léčby onemocnění zprostředkovaných chemkinem, přičemž tento chemokin se váže na receptor IL-8 α nebo β . Tento způsob zahrnuje podávání účinného množství sloučeniny vzorce (I) nebo její farmaceuticky přijatelné soli. Chemokiny jsou zejména IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 a ENA-78.

Pro účely tohoto vynálezu sloučeniny vzorců (I) a (II) mají všechny dávkování stejné, a kompozice jako u vzorce (I) jsou zaměnitelně použitelné.

Sloučeniny vzorce (I) jsou podávány v dostatečném množství pro inhibici funkce cytokinů, zejména IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78 tak, že jsou biologicky snižovány normální hladiny fyziologické funkce nebo v některém případě na podnormální hladiny tak, aby došlo ke zlepšení stavu při onemocnění. Abnormální koncentrace IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78 například v souvislosti s tímto vynálezem představují:

(i) koncentrace volného IL-8 větší nebo rovny 1 pikogramu na ml; (ii) jakékoliv hladiny IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78 v buňkách nad normální fyziologické koncentrace; nebo (iii) přítomnost IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78 ve vyšších koncentracích než jsou bazální

nebo vytvořené koncentrace v buňkách nebo tkáních IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78.

Existuje mnoho onemocnění, ve kterých nadměrná nebo neregulovaná tvorba IL-8 je zapojena ve zhoršování a/nebo vyvolání onemocnění. Mezi onemocnění zprostředkované chemokiny patří lupénka, atopická dermatitida, osteoartritida, revmatická artritida, astma, chronické obstruktivní onemocnění plic, syndrom respirační úzkosti dospělých, zánětlivé střevní onemocnění, Crohnova choroba, vředovitý zánět tlustého střeva, mrtvice, septický šok, roztroušená skleróza, endotoxický šok, gramnegativní seps, syndrom toxického šoku, srdeční a ledvinové reperfuze poškození, glomerulární nefritida, trombóza, reakce mezi příjemcem a štěpem, Alzheimerova choroba, odhojení aloimplantátu, malárie, restenóza, angiogeneze, ateroskleróza, osteoporóza, zánět dásní a nežádoucí uvolnění hematopoetických kmenových buněk a onemocnění způsobená respiračními viry, herpetickými viry a epidemickou hepatitidou, meningitida, cystická fibróza, předčasný porod, kašel, svědění, dysfunkce více orgánů, trauma, namožení, podvrknutí, zhmoždění, lupénková artritida, opar, encefalitida, vaskulitida CNS, traumatické poškození mozku, nádory CNS, subarachnoidální krvácení, postchirurgické trauma, intersticiální zánět plic, hypersenzitivita, artritida vyvolaná krystaly, akutní a chronická pankreatitida, akutní alkoholová hepatitida, nekrotizující enterokolitida, chronická sinusitida, uveitida, polymyozitida, vaskulitida, akné, žaludeční a dvanáctníkové vředy, celiakie, ezofagitida, glositida, neprůchodnost dýchacích cest, přecitlivělost dýchacích cest, bronchiolitida obliterans vyvolávající zapal plic, bronchiektázie, bronchiolitida, bronchiolitida obliterans, chronická bronchitida, cor pulmonae, dušnost, rozedma, hyperkapnie, hyperinflace, hypoxémie, záněty vyvolané

hyperoxií, hypoxie, chirurgické snížení plicního objemu, plicní fibróza, plicní hypertenze, hypertrofie pravé komory, sarkoidóza, drobné onemocnění dýchacích cest, nesoulad mezi ventilací a perfuzí, sípání, nachlazení a lupus.

Tato onemocnění se především vyznačují masivní infiltrací neutrofilů, infiltrací T-buněk nebo neovaskulárním růstem a jsou spojovány s zvýšenou tvorbou IL-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2 nebo ENA-78, která je zodpovědná za chemotaxi neutrofilů na místo zánětu nebo za řídící růst endoteliálních buněk. Oproti jiným zánětovým cytokinům (IL-1, TNF a IL-6) mají IL-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2 nebo ENA-78 jedinečnou vlastnost, která podporuje chemotaxi neutrofilů, spouštění enzymů včetně spouštění elastázy a rovněž i tvorbu a aktivaci hyperoxidu. Chemokiny- α , ale zejména IL-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2 nebo ENA-78 působící prostřednictvím receptoru IL-8 typu I nebo II, mohou podporovat neovaskularizaci nádorů působením na řídící růst endoteliálních buněk. Proto inhibicí IL-8 vyvolaná chemotaxe nebo aktivace by vedla k přímému snížení infiltrace neutrofilů.

Nedávno objevené důkazy také ukazují na roli chemokinů při léčbě infekcí HIV, Littleman a kol., Nature 381, str. 661 (1996) a Koup a kol., Nature 382, str. 667 (1996).

Nedávno bylo naznačeno použití inhibitorů IL-8 při léčbě aterosklerózy. V článku Boisvert a kol., J.Clin. Invest, 1998, 101: 353-363 bylo ukázáno během transplantace kostní dřeně, že nepřítomnost receptorů IL-8 na kmenových buňkách (a proto, na monocytech/makrofázích) vede ke zpomalení vývoje aterosklerotických plátů u myši s nedostatkem LDL receptorů. Toto zjištění je podporováno v následujících odkazech: Apostolopoulos a kol.,

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1996, 16: 1007-1012; Liu a kol., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997, 17: 317-323; Rus a kol., Atherosclerosis., 1996, 127:263-271; Wang a kol., J. Biol. Chem., 1996, 271:8837 -8842; Yue a kol., Eur. J.Pharmacol., 1993, 240:81-84; Koch a kol., Am. J.Pathol., 1993, 142: 1423-1431; Lee a kol., Immunol. Lett., 1996, 53, 109-113; Terkeltaub a kol., Arterioscler. Thromb., 1994, 14: 47-53.

Tento vynález také poskytuje prostředek pro léčbu akutních stavů, ale i pro prevenci, poškození CNS u citlivých jedinců, prostřednictvím sloučenin vzorce (I), které působí jako antagonisty chemokinových receptorů.

Poškození CNS zahrnuje jak otevřené, tak i prostupující poranění hlavy, jako je chirurgický zákrok nebo uzavřené poranění hlavy, jako je poranění oblastí hlavy. Do této definice také náleží ischemická mrtvice, zejména mozkové oblasti.

Ischemická mrtvice může být definována jako ložisková neurologická porucha, která je způsobena nedostatečným zásobováním krví určité mozkové oblasti, obvykle jako důsledek embólie, trombózy nebo lokálního ateromatičkého uzavření krevní cévy. V této souvislosti vyvstává úloha zánětlivých cytokinů a tento vynález poskytuje prostředek pro potenciální léčbu těchto poškození. Do současné doby bylo relativně málo prostředků pro léčbu akutních poškození.

TNF- α je cytokin s protizánětlivým působením, které zahrnuje adhezní molekulární expresi endoteliálních leukocytů. Leukocyty infiltrují do ischemicky narušených buněk mozku a proto sloučeniny inhibující nebo snižující koncentraci TNF by byly užitečné pro léčbu ischemického poškození mozku. Viz Liu a kol., Stroke, Vol. 25, No. 7, str. 1481-88 (1994), na který se tímto odkazuje.

Modely uzavřených poranění hlavy a jejich léčby směsnými činidly 5-LO/CO jsou diskutovány v článku Shohami a kol., J. of Vasc & Clinical Physiology and Pharmacology, Vol. 3, No. 2, str. 99-107(1992), na který se tímto odkazuje. Bylo zjištěno, že léčba, která snižuje vznik edému, také zlepšuje funkční výsledek u takto ošetřených zvířat.

Sloučeniny vzorce (I) jsou podávány v dostatečném množství, aby inhibovaly IL-8, vážící se na receptory IL-8 alfa nebo beta, z vazby na tyto receptory, což je potvrzeno snížením aktivace a chemotaxe netrofilů. Zjištění, že sloučeniny vzorce I jsou inhibitory vazby IL-8 se opírá o účinky sloučenin vzorců (I) v in vitro zkouškách vazby na receptor, které jsou dále popsány. Bylo zjištěno, že sloučeniny vzorce (I) jsou inhibitory receptorů IL-8 typu II.

Výraz „onemocnění nebo stádia onemocnění zprostředkovaná IL-8“, jak je zde použit, označuje všechna stádia onemocnění, ve kterých hraje úlohu IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78, buď produkcí IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78 samotných nebo uvolněním dalších monokinů, jako je například IL-1, IL-6 nebo TNF. Stádium onemocnění, ve kterém je například IL-1 hlavní složkou a jehož tvorba a působení zhoršuje stav onemocnění nebo zakrývá odezvu na IL-8, by proto mohlo být považováno za stádium onemocnění zprostředkované IL-8.

Výraz „onemocnění nebo stádia onemocnění zprostředkované chemokiny“, jak je zde použit, označuje všechny stádia onemocnění, ve kterých hraje úlohu chemokin, který se váže na receptor IL-8 α nebo β , jako je například IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 nebo ENA-78. To by zahrnovalo stádia onemocnění, ve kterých IL-8 hraje úlohu, buď tvorbou samotného IL-8 nebo způsobem uvolnění dalších monokinů,

jako je například IL-1, IL-6 nebo TNF. Stádium onemocnění, ve kterém je například IL-1 hlavní složkou, jejíž tvorba a působení zhoršuje stav onemocnění nebo zakrývá odezvu na IL-8, by proto mohlo být považováno za stádium onemocnění zprostředkované IL-8.

Výraz „cytokin“, jak je zde použit, označuje jakýkoliv vylučovaný polypeptid, který ovlivňuje činnost buněk a je molekulou, která reguluje interakce mezi buňkami reakcemi imunitními, zánětlivými a hematopoietickými. Mezi cytokiny patří například monokiny a lymfokiny, bez ohledu na to, ze kterých buněk vznikly. Například monokiny jsou obecně označovány jako látky vytvářené a vylučované jednodernými buňkami, jako jsou makrofágy a/nebo monocyty. Mnoho dalších buněk avšak také vytváří monokiny, buňky „natural killer“, fibroblasty, bazofilní granulocyty, endoteliální buňky, mozkové astrocyty, stromální buňky kostní dřeně, epiderální keratinocyty a B-lymfocyty. Obecně je konstatováno, že lymfokiny jsou vytvářeny lymfocytovými buňkami. Mezi cytokiny například patří interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), nádorový nekrotický faktor alfa (TNF- α) a nádorový nekrotický faktor beta (TNF- β).

Výraz „chemokin“, jak je zde použit, označuje jakýkoliv vylučovaný polypeptid, který ovlivňuje činnost buněk a je molekulou, která reguluje interakce mezi buňkami reakcemi imunitními, zánětlivými a hematopoietickými, podobně jako výraz „cytokin“ výše. Chemokin je převážně vylučován buněčnými transmembránami a způsobuje chemotaxi a aktivaci specifických bílých krvinek, leukocytů, neutrofilů, monocytů, makrofágů, T-buněk, B-buněk, endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva. Mezi chemokiny například patří IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, IP-10, MIP-1 α , MIP- β , PF4 a MPC 1, 2 a 3.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou také užitečné v normalizování počtu leukocytů a rovněž i normalizování hladiny cirkulujících chemokinů.

Farmaceutický prostředek ze sloučeniny vzorce (I) nebo její farmaceuticky přijatelné soli bude pro léčebné použití připraven v souladu se standardní farmaceutickou praxí. Tento vynález se proto také týká farmaceutického prostředku obsahujícího účinné, netoxické množství sloučeniny vzorce (I) a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

Sloučeniny vzorce (I), jejich farmaceuticky přijatelné soli a z nich vytvořené farmaceutické prostředky mohou být vhodně podávány jakýmkoliv způsobem běžně používaným pro aplikaci léčiv, jako je orální, místní, parenterální nebo inhalační podávání. Sloučeniny vzorce (I) mohou být podávány v běžných dávkovacích formách připravených spojením sloučeniny vzorce (I) se standardním farmaceutickým nosičem podle běžných pracovních postupů. Sloučeniny vzorce (I) mohou také být podávány v běžných dávkách společně se známou druhou terapeuticky účinnou sloučeninou. Tyto pracovní postupy mohou zahrnovat míchání, granulování, lisování nebo rozpouštění vhodných složek na požadovaný přípravek. Forma a charakter farmaceuticky přijatelného nosiče nebo ředidla závisí na množství aktivní složky, se kterou má být spojována, na způsobu podávání a na dalších dobře známých proměnných. Nosič/nosiče musí být „přijatelny/přijatelné“ ve smyslu kompatibility s jinými složkami přípravku a nesmí škodit jeho příjemci.

Použitý farmaceutický nosič může být například buď tuhá látka nebo kapalina. Mezi tuhé nosiče například patří laktóza, bílá hlínka, sacharóza, mastek, želatina, agar, pektin, arabská guma, stearát hořečnatý, kyselina stearová a podobně. Mezi kapalné nosiče například patří sirup, podzemnicový olej, olivový olej, voda a podobně. Nosič nebo ředidlo může obsahovat stabilizační látku dobře známou

v oboru, jako je glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát samotný nebo s voskem.

Může být využita široká škála farmaceutických forem. Jestliže je použit tuhý nosič, potom přípravek může být tabletován, vkládán do tvrdých želatinových kapslí ve formě prášku nebo kuliček nebo může být ve formě pilulek a pastilek. Množství tuhého nosiče se bude výrazně lišit, ale výhodně bude od asi 25 mg do asi 1 g. Jestliže je použit kapalný nosič, potom bude ve formě sirupu, emulze, měkké želatinové kapsle, sterilní injektovatelné kapaliny v ampuli nebo nevodné kapalně suspenze.

Sloučeniny vzorce (I) mohou být podávány topicky, tj. nesystémovým podáváním. To zahrnuje podávání sloučeniny vzorce (I) zevně na pokožku, do dutiny ústní nebo vkapáváním této sloučeniny do ucha, oka a nosu tak, aby tato sloučenina významně nevstupovala do krevního řečiště. Naopak systémové podávání označuje orální, intravenózní, intraperitoneální a intramuskulární podávání.

Mezi přípravky vhodné pro místní podávání patří tekuté a polotekuté přípravky vhodné pro pronikání přes kůži k místu zánětu, jako jsou mazání, lotion, krémy, masti nebo pasty a kapky vhodné pro podávání do oka, ucha nebo nosu. U místního podávání může přípravek obsahovat od 0,001 % do 10 % hmotn. aktivní složky a například 1 až 2 % z hmotnosti přípravku. Ačkoliv může obsahovat až 10 % hmotn. aktivní složky, výhodně bude obsahovat méně než 5 % hmotn., výhodněji od 0,1 % do 1 % hmotn.

Mezi lotion podle tohoto vynálezu patří ty, které jsou vhodné pro aplikaci na kůži a do očí. Oční lotion mohou obsahovat sterilní vodný roztok, případně obsahující baktericidní látku, a mohou být připraveny podobnými způsoby, které jsou používány při přípravě kapek. Lotion a mazání pro aplikaci na kůži mohou také obsahovat činidlo

urychlující, vysoušení a ochlazení kůže, jako je alkohol nebo aceton a/nebo zvlhčovač, jako je glycerol nebo olej, jako je ricinový olej nebo podzemnicový olej.

Krémy, masti nebo pasty podle tohoto vynálezu jsou polotuhé kompozice aktivní složky pro zevní aplikaci. Mohou být připraveny mícháním aktivní složky v jemně rozptýlené nebo práškové formě, samotné nebo v roztoku nebo suspenzi ve vodné nebo nevodné kapalině za pomoci vhodného strojního zařízení s mastným nebo nemastným základem. Tento základ může obsahovat uhlovodíky, jako je tvrdý, měkký nebo tekutý parafin, glycerol, včelí vosk, kovové mýdlo; rostlinné lepidlo; olej přírodního původu, jako je mandlový olej, kukuřičný olej, podzemnicový olej, ricinový olej nebo olivový olej; tuk z ovčí vlny nebo jeho deriváty nebo mastnou kyselinu, jako je kyseliny stearová nebo kyselina olejová společně s alkoholem, jako je propylen nebo makrogel. Přípravek může obsahovat jakékoliv vhodné povrchově aktivní činidlo jako je anionaktivní, kationaktivní nebo neionogenní tenzid, jako je ester sorbitanu nebo jeho polyoxyethylenový derivát. Také mohou být použita suspenzační činidla, jako jsou přírodní gummy, deriváty celulózy nebo anorganické látky jako oxidy křemíku, a další složky, jako je lanolin.

Kapky podle tohoto vynálezu mohou obsahovat sterilní vodné nebo olejovité roztoky nebo suspenze a mohou být připraveny rozpuštěním aktivní složky ve vhodném vodném roztoku baktericidního a/nebo fungicidního činidla a/nebo jakékoliv jiné vhodné konzervační látky a výhodně s povrchově aktivní látkou. Výsledný roztok může být potom přečištěn filtrací, převeden do vhodného obalu, který je potom uzavřen a sterilizován v autoklávu nebo zahříván při teplotě 98 - 100 °C po dobu 30 minut. Alternativně tento roztok může být sterilizován filtrací a převeden do obalu aseptickým pracovním postupem. Mezi vhodné baktericidní a

fungicidní činidla vhodná pro použití v kapkách například patří fenylmerkuriumnitrát nebo acetát (0,002 %), benzalkoniumchlorid (0,01 %) a chlorhexidinacetát (0,01 %). Mezi vhodná rozpouštědla pro přípravu olejovitého roztoku patří glycerol, zředěný alkohol a propylenglykol.

Sloučeniny vzorce (I) mohou být podávány parenterálně, tj. intravenózně, intramuskulárně, podkožně, intranazálně, intrarektálně, intravaginálně nebo intraperitoneálně. Obecně jsou preferovány podkožní a intramuskulární formy parenterálního podávání. Vhodné dávkovací formy pro taková podávání mohou být připraveny běžnými pracovními postupy. Sloučeniny vzorce (I) mohou být podávány inhalačně, tj. intranazálním a orálním inhalačním podáváním. Vhodné dávkovací formy pro takové podávání, jako jsou aerosolový přípravek nebo dávkovací inhalátor, mohou být připraveny běžnými pracovními postupy.

U všech způsobů použití popsaných v tomto vynálezu pro sloučeniny vzorce (I) bude výhodně denní orální dávka od asi 0,01 do 80 mg/kg celkové tělesné hmotnosti. Denní parenterální dávka bude výhodně od asi 0,001 do asi 80 mg/kg celkové tělesné hmotnosti. Denní místní dávka bude výhodně od 0,1 mg do 150 mg, podávaná 1 až 4 krát, výhodně 2 až 3-krát denně. Denní inhalační dávka bude výhodně od asi 0,01 mg/kg do asi 1 mg/kg. Odborníkům je zřejmé, že optimální množství a časování jednotlivých dávek sloučeniny vzorce (I) nebo její farmaceuticky přijatelné soli bude záviset na povaze a rozsahu onemocnění, na formě, způsobu a místě podávání a na konkrétním léčeném pacientu. Optimální dávkování může být stanoveno běžnými postupy. Odborníky bude také zřejmé, že optimální průběh léčby, tj. počet dávek sloučeniny vzorce (I) nebo její farmaceuticky přijatelné soli podávaných denně po definovaný počet dnů, může být zjištěn odborníkem za použití běžných testů pro stanovení doby trvání léčby.

Dále bude tento vynález charakterizován následujícími biologickými příklady, které jsou pouze ilustrativní a nemají být chápány jako omezení rozsahu tohoto vynálezu.

Biologické příklady

Inhibiční účinky sloučenin podle tohoto vynálezu vůči chemokinům IL-8 a GRO- α byly stanoveny následující in vitro testem:

Zkoušky vazby na receptor:

Lidský rekombinantní [125 I]IL-8 se specifickou aktivitou 2000 Ci/mmol byl získán od Amersham Corp., Arlington Heights. GRO- α byl získán od NEN-New England Nuclear. Všechny další chemikálie byly analytické kvality. Vysoké koncentrace receptorů rekombinantního lidského IL-8 typu α a β byly individuálně exprimovány ve vaječnickových buňkách čínského křečka, jak bylo dříve popsáno (Holmes a kol., Science, 1991, 253, 1278). Vaječnickové membrány z čínského křečka byly homogenizovány podle dříve popsaného protokolu (Haour a kol., J. Biol Chem., 249, pp. 2195-2205 (1974), s tou výjimkou, že homogenizační pufr byl zaměněn za 10 mM Tris-HCl, 1mM MgSO₄, 0,5 mM EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina), 1 mM PMSF (α -toluensulfonylfluorid), 0,5 mg/L Leupeptin, pH 7,5. Koncentrace membránových proteinů byla stanovena za použití testovací mikrosoupravy od Pierce Co. s hovězím sérovým albuminem jako standardem. Všechny zkoušky byly prováděny v 96-jamkové mikrodestičce. Každá reakční směs obsahovala 125 I IL-8 (0,25 nM) nebo 125 I GRO- α a 0,5 μ g/ml IL-8R α nebo 1,0 μ g/ml IL-8R β membrán v pufrech 20 mM Bis-Trispropanu a 0,4mM Tris HCl o pH 8,0, obsahujícími 1,2 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 25 mM NaCl a 0,03 % CHAPS. Dále bylo přidáno léčivo

nebo zkoumaná sloučenina, která byla rozpuštěna v DMSO tak, aby konečná koncentrace byla mezi 0,01 nM a 100 uM. Zkouška byla zahájena přidáním ^{125}I -IL-8. Po 1 hodině při pokojové teplotě byla deska sklizena za použití zařízení Tomtec 96-well na filtrační plachetku ze skleněných vláken impregnovanou 1% polyethyleniminem/0,5% BSA a byla třikrát promyta 25mM NaCl, 10mM TrisHCl, 1mM MgSO_4 , 0,5mM EDTA, 0,03% CHAPS, pH 7,4. Filtr byl potom sušen a byla zjišťována četnost pulsů na detektoru Betaplate s kapalným scintilátorem. Receptor rekombinantního IL-8R α nebo typu I je také označován v tomto textu jako nepermisivní receptor a receptor rekombinantního IL-8R β nebo typu II je také označován v tomto textu jako permisivní receptor.

Všechny ověřované sloučeniny vzorce (I) uvedené v tomto textu v části příklady syntéz, příklad 1 až 15, vykazovaly hodnotu IC_{50} od asi 45 do asi <1 $\mu\text{g/ml}$ u permisivních modelů pro inhibici receptoru IL-8. U testovaných sloučenin z příkladů 1 až 12 bylo také zjištěno, že jsou to inhibitory vazby Gro- α asi na stejné úrovni.

Zkouška na chemotaxi:

Inhibiční vlastnosti těchto sloučenin in vitro byly stanoveny zkouškou na chemotaxi u neutrofilů, jak je popsáno v Current Protocols in Immunology, Vol I, Suppl 1, Unit 6.12.3., na který se tímto odkazuje. Neutrofily byly izolovány z lidské krve, jak je popsáno v Current Protocols in Immunology, Vol I, Suppl 1, Unit 7.23.1., na který se tímto odkazuje. Chemoatraktanty IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2 a ENA-78 byly vloženy do dolní komůrky 48-multijamkové komůrky (Neuro Probe, Cabin John, MD) v koncentračním rozsahu mezi 0,1 a 100 nM. Tyto dvě komůrky byly odděleny 5 μm polykarbonátovým filtrem. Když byly

testovány sloučeniny podle tohoto vynálezu, byly smíchány s buňkami (0,001 - 1000 nM) právě před přidáním buněk do horní komůrky. Buňky byly inkubovány po dobu 45 až 90 minut při teplotě asi 37 °C ve zvlhčovaném inkubátoru s 5% CO₂. Na konci inkubační doby byla polykarbonátová membrána odstraněna a vrchní strana byla opláchnuta, potom byla membrána obarvena podle protokolu Diff Quick (Baxter Products, McGaw Park, IL, USA). Buňky, které se pohybovaly pomocí chemotaxe k chemokinu, byly vizuálně spočítány na mikroskopu. Obecně byly počítány 4 pole z každého vzorku, tyto hodnoty byly zprůměrovány, a tím bylo možno stanovit průměrný počet buněk, které se pohybovaly. Každý vzorek byl testován v triplicátech a každá sloučenina byla alespoň čtyřikrát testována. K určitým buňkám (pozitivní kontrolní buňky) nebyla přidána žádná sloučenina, tyto buňky reprezentují maximální chemotaktickou odezvu buněk. V případě, že je požadována negativní kontrola (nestimulovaná), nepřidá se do dolní komůrky žádný chemokin. Rozdíl mezi pozitivní a negativní kontrolou představuje chemotaktickou aktivitu buněk.

Zkouška na uvolňování elastázy:

Sloučeniny podle tohoto vynálezu byly testovány na jejich schopnost zabránit uvolňování elastázy z lidských neutrofilů. Neutrofily jsou izolovány z lidské krve, jak je popsáno v Protocols in Immunology, Vol I, Suppl 1, Unit 7.23.1. Buňky PMNs $0,88 \times 10^6$ suspendované v Ringerově roztoku (NaCl 118 mM, KCl 4,56 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,03 mM, glukóza 11,1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4) byly odpipetovány do každé jamky na 96-jamkové mikrodestičce v objemu 50 µl. K této destičce je přidána testovací sloučenina (0,001 - 1000 nM) v objemu 50 µl, cytochalasin B v objemu 50 µl (20 µg/ml) a Ringerův pufr v objemu 50 µl. Tyto buňky byly ponechány ohřát (37 °C, 5% CO₂ a rel.

vlhkost 95 %) po dobu 5 min, potom k nim byl přidán IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, aby byla dosažena konečná koncentrace v rozsahu od 0,01 do 1000nM. Reakce byla ponechána probíhat po dobu 45 minut, potom byla 96-jamková destička odstředěna (800 xg, 5 min.) a 100 μ l supernatantu bylo odtazeno. Tento supernatant byl přidán na druhou 96-jamkovou destičku, potom byl přidán umělý substrát elastázy (MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Nova Biochem, La Jolla, CA) rozpuštěný ve fosfátovém pufovaném fyziologickém roztoku, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 6 μ g/ml. Okamžitě byla deska vložena do fluorescentního čtecího zařízení pro mikrodestičky (Cytofluor 2350, Milipore, Bedford, MA) a údaje byly shromažďovány v 3 minutových intervalech podle způsobu popsaném v Nakajima a kol., J. Biol. Chem, 254, 4027 (1979). Množství uvolněné elastázy z PMNs bylo vypočteno měřením rychlosti degradace MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC.

Zkouška TNF- α při traumatickém poranění mozku

Tato zkouška poskytuje stanovení exprese nádorového nekrotického faktoru mRNA ve specifických oblastech mozku, která následuje po experimentálně vyvolaném laterálním perkusním traumatickém poškození mozku (traumatic brain injury - TBI) u krys. Dospělé krysy rodu Sprague-Dawley (n=42) byly znecitlivěny pentobarbitalem sodným (60 mg/kg, i.p.) a byly vystaveny poškození mozku poklepem v laterální oblasti o střední síle (2,4 atm.) ve směru přes levý temporoparietální kortex (n=18) nebo „předstíranému“ ošetření (znecitlivění a chirurgický zákrok bez poškození, n=18). Zvířata byla usmrcena dekapitací po 1,6 a po 24 hodinách po poškození, mozek byl vyjmut a byly připraveny vzorky tkání z levého (poškozeného) temenního kortexu (LC), z odpovídající oblasti kontralaterálního pravého kortexu

(RC), z kortexu sousedícího s poškozeným temenním kortexem (LA), z odpovídající sousední oblasti pravého kortexu (RA), z levého hippocampu (LH) a pravého hippocampu (RH). Byla izolována celková RNA a „Northern blot“ hybridizace byla prováděna a kvantifikována relativně k TNF- α pozitivní kontrole RNA (makrofág = 100 %). Patrné zvýšení TNF- α mRNA exprese bylo pozorováno u LH (104 ± 17 % vůči pozitivní kontrole, $p < 0,05$ ve srovnání s předstíraným ošetřením), LC (105 ± 21 %, $p < 0,05$) a LA (69 ± 8 %, $p < 0,01$) v poškozené hemisféře 1 hodinu po poškození. Zvýšená TNF- α mRNA exprese byla také pozorována v LH (46 ± 8 %, $p < 0,05$), LC (30 ± 3 %, $p < 0,01$) a LA (32 ± 3 %, $p < 0,01$) po 6 hodinách, což bylo odlišné od poškození po 24 hodinách. V kontralaterální hemisféře byla exprese TNF- α mRNA zvýšena u RH (46 ± 2 %, $p < 0,01$), RC (4 ± 3 %) a RA (22 ± 8 %) po 1 hodině a u RH (28 ± 11 %), RC (7 ± 5 %) a RA (26 ± 6 %, $p < 0,05$) po 6 hodinách, ale ne 24 hodin po poškození. U předstíraného ošetření (chirurgický zákrok bez poškození) zvířat nebo zvířat bez ošetření nebyly pozorovány žádné odpovídající změny v expresi TNF- α mRNA v žádné ze 6 mozkových oblastí v žádné hemisféře v jakémkoliv čase. Tyto výsledky ukazují, že po pekrušním poškození mozku v parasagittální oblasti je změněna časová exprese TNF- α mRNA ve specifických oblastech mozku, včetně těch v nepoškozené hemisféře. Protože TNF- α je schopen indukovat nervový růstový faktor (GF) a stimulovat uvolnění dalších cytokinů z aktivovaných astrocytů, tato posttraumatická změna v genové expresi TNF- α hraje důležitou úlohu v jak akutní, tak i regenerativní reakci na poranění CNS.

Model poškození CNS pro IL- β mRNA

Tato zkouška charakterizuje regionální expresi interleukinu - 1 β (IL-1 β) mRNA ve specifických oblastech mozku po experimentálně vyvolaném perkusním traumatickém poškození mozku v laterální oblasti u krys. Dospělé krysy rodu Sprague-Dawley (n=42) byly znecitlivěny pentobarbitalem sodným (60 mg/kg, i.p.) a byly vystaveny poškození mozku poklepem v laterální oblasti o střední síle (2,4 atm.) ve směru přes levý temporoparietální kortex (n=18) nebo „předstíranému“ ošetření (znecitlivění a chirurgický zákrok bez poškození, n = 18). Zvířata byla usmrcena po 1,6 a po 24 hodinách po poškození, mozek byl vyjmut a byly připraveny vzorky tkání z levého (poškozeného) temenního kortexu (LC), z odpovídající oblasti kontralaterálního pravého kortexu (RC), z kortexu sousedícího s poškozeným temenním kortexem (LA), z odpovídající sousední oblasti pravého kortexu (RA), z levého hippocampu (LH) a pravého hippocampu (RH). Byla izolována celková RNA a „Northern blot“ hybridizace byla prováděna a množství mozkové tkáně (IL-1 β)mRNA bylo prezentováno jako procentická relativní radioaktivita (IL-1 β)pozitivní makrofágové mRNA, která byla dávkována na stejný gel. Jednu hodinu po poškození mozku bylo pozorováno patrné a významné zvýšení exprese (IL-1 β)mRNA u LC ($20,0 \pm 0,7\%$ vůči pozitivní kontrole, n = 6, p < 0,05 ve srovnání s předstíraným ošetřením), LH ($24,5 \pm 0,9\%$, p < 0,05) a LA ($21,5 \pm 3,1\%$, p < 0,05) v poškozené hemisféře, která zůstala zvýšena až 6 hodin po poškození u LC ($4,0 \pm 0,4\%$, n=6, p < 0,05) a LH ($5,0 \pm 1,3\%$, p < 0,05). U předstíraného ošetření zvířat nebo zvířat bez ošetření nebyly pozorovány žádné odpovídající změny v expresi (IL-1 β)mRNA v kterékoliv mozkové oblasti. Tyto výsledky ukazují, že po TBI je dočasná exprese (IL-1 β)mRNA

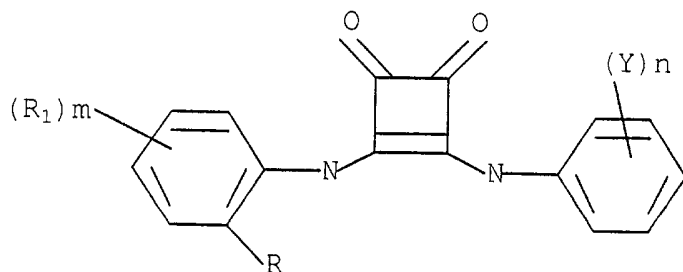
regionálně stimulovaná ve specifických oblastech mozku. Tyto regionální změny u cytokinů, jako je IL-1 β , hrají úlohu v posttraumatickém změně.

Na všechny publikace, které zahrnují, ale nejsou omezeny na patenty a patentové přihlášky, které byly citovány v popisu, se tímto odkazuje v rozsahu, jako by každá z těchto publikací byla specificky a individuálně uvedena.

Popis uvedený výše úplně popisuje tento vynález včetně jeho výhodných provedení. Modifikace a zlepšení těchto uspořádání výslovně uvedené v tomto textu jsou v rozsahu následujících patentových nároků. Předpokládá se, že bez dalšího rozpracování je odborník schopen za využití předcházejícího popisu využít tento vynález v jeho nejširším rozsahu. Z tohoto důvodu mají být příklady chápány pouze jako ilustrativní, které neomezují rozsah tohoto vynálezu v žádném směru. Provedení tohoto vynálezu, které představují nároky na ochranu jsou uvedeny dále.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučeniny vzorce:



(I)

kde:

R je vybrána ze skupiny sestávající z OH , SH a $NHSO_2R_d$;

R_d je vybrána ze skupiny sestávající z NR_6R_7 , alkyly, aryl C_{1-4} alkyly, aryl C_{2-4} alkenyly, heteroaryly, heteroaryl- C_{1-4} alkyly, heteroaryl C_{2-4} alkenyly, heterocyklu a heterocykl C_{1-4} alkyly, kde arylové, heteroarylové a heterocyklické kruhy jsou všechny případně substituovány;

R_6 a R_7 jsou nezávisle vodík nebo C_{1-4} alkylová skupina nebo R_6 a R_7 společně s dusíkem, ke kterému jsou připojeny, tvoří 5- až 7-členný kruh, přičemž tento kruh případně obsahuje další heteroatom, který je vybrán z kyslíku, dusíku nebo síry, a tento kruh může být případně substituován;

R_1 je nezávisle vybrána ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, nitroskupiny, kyanoskupiny, halogensubstituovaného C_{1-10} alkyly, C_{1-10} alkyly, C_{2-10} alkenyly, C_{1-10} alkoxykupiny, halogensubstituované C_{1-10} alkoxykupiny, azidu, $(CR_8R_8)_qS(O)_tR_4$, hydroxyskupiny, hydroxy C_{1-4} alkyly, arylu, aryl C_{1-4} alkyly, aryloxyskupiny, aryl C_{1-4} alkyloxyskupiny, heteroaryly, heteroarylalkyly, heterocyklu, heterocykl C_{1-4} alkyly,; heteroaryl C_{1-4} alkyloxyskupiny, aryl C_{2-10} alkenyly, heteroaryl C_{2-10} alkenyly, heterocykl C_{2-10} alkenyly, $(CR_8R_8)_qNR_4R_5$, C_{2-10} alkenyl $C(O)NR_4R_5$,

$(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_{10}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{H}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{R}_8$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenyl-}$
 $\text{C}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{OR}_{12}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{OC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_{17}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_4\text{R}_5$; nebo dvě jednotky R_1
 společně tvoří $\text{O}-(\text{CH}_2)_5\text{O}-$ nebo 5- až 6-členný nenasycený
 kruh;

q je 0 nebo celé číslo nabývající hodnotu 1 až 10;

t je 0 nebo celé číslo nabývající hodnotu 1 nebo 2;

s je celé číslo nabývající hodnotu 1 až 3;

R_4 a R_5 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z
 vodíku, případně substituovaného C_{1-4} alkylu, případně
 substituovaného arylu, případně substituovaného
 aryl C_{1-4} alkylu, případně substituovaného heteroarylu,
 případně substituovaného heteroaryl C_{1-4} alkylu, heterocyklu a
 heterocykl C_{1-4} alkylu, nebo R_4 a R_5 společně s dusíkem, ke
 kterému jsou připojeny, tvoří 5- až 7-členný kruh, který
 případně obsahuje další heteroatom vybraný z kyslíku,
 dusíku nebo síry;

Y je nezávisle vybraná ze skupiny sestávající z vodíku,
 halogenu, nitroskupiny, kyanoskupiny,
 halogensubstituovaného C_{1-10} alkylu, C_{1-10} alkylu, C_{2-10} alkenylu,
 C_{1-10} alkoxyskupiny, halogensubstituované C_{1-10} alkoxyskupiny,
 azidu, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_t\text{R}_4$, hydroxyskupiny, hydroxy C_{1-4} alkylu,
 arylu, aryl C_{1-4} alkylu, aryloxyskupiny, aryl C_{1-4}
 alkyloxyskupiny, heteroarylu, heteroarylalkylu,
 heteroaryl C_{1-4} alkyloxyskupiny, heterocyklu,
 heterocykl C_{1-4} alkylu; aryl C_{2-10} alkenylu,
 heteroaryl C_{2-10} alkenylu, heterocykl C_{2-10} alkenylu,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{R}_5$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_5$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{NR}_4\text{R}_{10}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{H}$, $\text{S}(\text{O})_3\text{R}_8$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $\text{C}_{2-10}\text{alkenylC}(\text{O})\text{OR}_{11}$, $\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{C}(\text{O})\text{OR}_{12}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{OC}(\text{O})\text{R}_{11}$, $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NR}_4\text{C}(\text{O})\text{R}_{11}$,
 $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}_d$, a $(\text{CR}_8\text{R}_8)_q\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_4\text{R}_5$; nebo dvě jednotky Y

společně tvoří O-(CH₂)_sO- nebo 5- až 6-členný nenasycený kruh;

n je celé číslo nabývající hodnot 1 až 5;

m je celé číslo nabývající hodnot 1 až 4;

R₈ je vodík nebo C₁₋₄alkyl;

R₁₀ je C₁₋₁₀alkylC(O)₂R₈;

R₁₁ je vybrána ze skupiny sestávající z vodíku, C₁₋₄alkylu, případně substituovaného arylu, případně substituovaného arylC₁₋₄alkylu, případně substituovaného heteroarylu, případně substituovaného heteroarylC₁₋₄alkylu, případně substituovaného heterocyklu a případně substituovaného heterocyklC₁₋₄alkylu;

R₁₂ je vybrána z vodíku, C₁₋₁₀alkylu, případně substituovaného arylu a případně substituovaného arylalkylu; a

R₁₇ je vybrána ze skupiny sestávající z C₁₋₄alkylu, arylu, arylalkylu, heteroarylu, heteroarylC₁₋₄alkylu, heterocyklu a heterocyklC₁₋₄alkylu, kde arylové, heteroarylové a heterocyklické kruhy jsou všechny případně substituovány.

2. Sloučenina podle nároku 1, vybraná ze skupiny sestávající z:

- 1) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 2) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2-chloranilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 3) 3-(4-kyan-2-hydroxyanilino)-4-(2,3-dichloranilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu;
- 4) 3-(4-nitro-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu; a

5) 3-(4-chlor-2-hydroxyanilino)-4-(2-bromanilino)-cyklobut-3-en-1,2-dionu.

3. Farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že obsahuje účinné množství sloučeniny podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo.

4. Způsob léčby onemocnění zprostředkovaných chemokiny, kde chemokin se váže na receptor IL-8 α nebo β u savců, přičemž tento způsob zahrnuje podávání tomuto savci účinného množství sloučeniny mající vzorec podle nároku 1.

5. Způsob podle nároku 4, kdy savec je postižen následujícími onemocněními zprostředkovanými chemokiny, vybranými ze skupiny sestávající z lupénky, atopické dermatitidy, osteoartritidy, revmatické artritidy, astmatu, chronického obstruktivního onemocnění plic, syndromu respirační úzkosti dospělých, zánětlivého střevního onemocnění, Crohnovy choroby, vředovitého zánětu tlustého střeva, mrtvice, septického šoku, roztroušené sklerózy, endotoxického šoku, gramnegativní sepse, syndromu toxického šoku, srdečního a ledvinového reperfuzního poškození, glomerulární nefritidy, trombózy, reakce mezi příjemcem a štěpem, Alzheimerovy choroby, odhojení aloimplantátu, malárie, restenózy, angiogeneze, aterosklerózy, osteoporózy, zánětu dásní a nežádoucího uvolnění hematopoietických kmenových buněk a onemocnění způsobených respiračními viry, herpetickými viry a epidemickou hepatitidou, meningitidy, cystické fibrózy, předčasného porodu, kašle, svědění, dysfunkce více orgánů, traumatu, namožení, podvrknutí, zhmoždění, lupénkové artritidy, oparu, encefalitidy, vaskulitidy CNS, traumatického poškození mozku, nádorů CNS, subarachnoidálního krvácení, postchirurgického traumatu, intersticiálního zánětu plic,

hypersenzitivity, artritidy vyvolaná krystaly, akutní a chronické pankreatitidy, akutní alkoholové hepatitidy, nekrotizující enterokolitidy, chronické sinusitidy, uveitidy, polymyozitidy, vaskulitidy, akné, žaludečních a dvanáctníkových vředů, celiakie, ezofagitidy, glositidy, neprůchodnosti dýchacích cest, přecitlivělosti dýchacích cest, bronchiolitidy obliterans vyvolávající zapal plic, bronchiektázie, bronchiolitidy, bronchiolitidy obliterans, chronické bronchitidy, cor pulmonae, dušnosti, rozedmy, hyperkapnie, hyperinflace, hypoxémie, zánětů vyvolaných hyperoxií, hypoxie, chirurgického snížení plicního objemu, plicní fibrózy, plicní hypertenze, hypertrofie pravé komory, sarkoidózy, drobného onemocnění dýchacích cest, nesouladu mezi ventilací a perfuzí, sípání, nachlazení a lupu.