

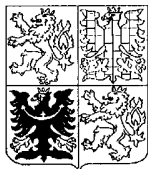
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4760

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **18.06.1999**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.06.1998**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/090016**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)
(86) PCT číslo: **PCT/US99/13897**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/65495**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/535
A 61 K 31/495
A 61 K 31/445
A 61 K 31/40
A 61 K 31/135
A 61 P 39/00

(71) Přihlašovatel:
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION,
Philadelphia, PA, US;

(72) Původce:
Callahan James F., Philadelphia, PA, US;
Chabot-Fletcher Marie C., Phoenixville, PA, US;

(74) Zástupce:
Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Inhibitory transkripčního faktoru NF- KB

(57) Anotace:

Toto řešení poskytuje aminoindanonové inhibitory transkripce faktoru NF-κB a jejich farmaceuticky přijatelné soli, hydráty a solváty, farmaceutické prostředky z takových sloučenin a způsoby pro léčbu onemocnění, u nichž je prokázána aktivace NF-κB. Specifičtěji poskytuje řešení způsoby pro léčbu řady onemocnění spojených s aktivací NF-κB včetně zánětlivých onemocnění, zejména revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střeva a astmatu; kožních onemocnění, zejména psoriasis a atopické dermatitidy; autoimunitních onemocnění; odhojení tkání nebo orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; rakoviny, včetně Hodgkinovy choroby; a určitých virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiectasie, podáváním sloučeniny podle tohoto řešení pacientovi, který to potřebuje.

CZ 2000 - 4760 A3

Inhibitory transkripčního faktoru NF- κ B

Oblast techniky

Tento vynález se týká obecně způsobů inhibice transkripčního faktoru NF- κ B za použití aminoindanonů. Takové sloučeniny jsou vhodné zejména pro léčbu onemocnění, u kterých je prokázána aktivace NF- κ B. Přesněji, tyto sloučeniny inhibují fosforylaci I- κ B a následnou degradaci. Takové sloučeniny jsou vhodné pro léčbu řady onemocnění spojených s aktivací NF- κ B, včetně zánětlivých onemocnění, zejména revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střeva a astmatu; dermatóz, zejména psoriasis a atopické dermatitidy; autoimunitních onemocnění; odhojení tkání nebo orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; rakoviny, včetně Hodgkinovy choroby; a některých virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiektasie.

Dosavadní stav techniky

Poslední pokroky ve vědeckém poznání mediátorů podílejících se na akutních a chronických zánětlivých onemocněních a rakovině vedly k novým strategiím hledání účinných léčiv. Tradiční přístupy zahrnují přímou intervenci na cílové místo, jako je použití specifických protilátek, receptorových antagonistů nebo enzymových inhibitorů. Nedávné průlomy v objasnění regulačních mechanismů podílejících se na transkripci a translaci řady mediátorů vedly ke zvýšenému zájmu o terapeutické přístupy zaměřené na úroveň genové transkripce.

NF- κ B patří do třídy blízce příbuzných dimerních

transkripčních faktorů složených z různých kombinací polypeptidů třídy Rel/NF- κ B. Třída se u savců skládá z pěti jednotlivých genových produktů, RelA (p65), NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p49/p100), c-Rel a RelB, z nichž všechny tvoří hetero- nebo homodimery. Tyto proteiny mají společnou vysoce homologní "Rel homologní doménu" o 300 aminokyselinách, která obsahuje vazby DNA a dimerizační domény. Na ukončení C-konce Rel homologní domény je sekvence jaderné translokace důležitá pro transport NF- κ B z cytoplazmy do jádra. p65 a cRel mají navíc na C-koncích silnou transaktivační doménu.

Aktivita NF- κ B je regulována jeho interakcí s členem inhibitorů ze třídy proteinů NF- κ B. Tato interakce účinně blokuje jadernou lokalizaci sekvence na proteinech NF- κ B, což brání migraci dimeru do jádra. Širokou řadu stimulů, aktivujících NF- κ B jsou patrně početné signální transdukční dráhy. Ty zahrnují bakteriální produkty (lipopolysacharidy), některé viry (HIV-1, HTLV-1), cytokiny zánětu (TNF κ , IL-1) a stres prostředí. Všem stimulům je však zjevně společná fosforylace a následná degradace I κ B. I κ B je pomocí nedávno zjištěných I κ B kináz (IKK- α a IKK- β) fosforylována na dvou N-koncových serinech. Studie mutagenese zaměřené na toto místo naznačují, že fosforylace jsou pro následnou aktivaci NF- κ B klíčové tím, že fosforylovaný protein je označen pro degradaci ve všudypřítomné proteasomové dráze. Aktivní komplexy NF- κ B zbavené I κ B jsou schopny přenosu do jádra, kde se selektivně váží na přednostní genově specifické sekvence enhancerů. Mezi geny regulovanými NF- κ B je řada cytokinů, molekul buněčné adheze a proteinů akutní fáze.

Je dobře známo, že NF- κ B hrají klíčovou roli v regulaci exprese velkého množství prozánětlivých

mediátorů, včetně cytokinů jako jsou IL-6 a IL-8, molekuly buněčné adheze, jako jsou ICAM a VCAM a indukovatelné synthasy oxidu dusnatého (iNOS). Takové mediátory jsou známy tím, že hrají roli při svolávání leukocytů do míst zánětu, a v případě iNOS mohou vést k destrukci orgánů při některých zánětlivých a autoimunitních onemocněních.

Význam NF- κ B u zánětlivých onemocnění dále posilují studie zánětů dýchacích cest včetně astma, u které ukázaly aktivaci NF- κ B. Tato aktivace může být podkladem zvýšené produkce cytokinů a leukocytové infiltrace, charakteristických pro tato onemocnění. Navíc je známo, že inhalované steroidy redukuje hyperreaktivitu dýchacích cest a tlumí zánětlivou reakci v astmatem postižených dýchacích cestách. Ve světle nedávných zjištění vztahujících se k inhibici NF- κ B glukokortikoidy, se lze domnívat, že tyto účinky jsou zprostředkovány prostřednictvím inhibice NF- κ B.

Další důkazy úlohy NF- κ B v zánětlivých onemocněních pochází ze studií revmatické synoviální membrány. Ačkoliv je NF- κ B normálně přítomen jako inaktivní cytoplazmatický komplex, poslední imunohistochemické studie ukázaly, že v buňkách revmatické synoviální membrány je NF- κ B přítomen v jádrech, a tedy aktivní. Navíc se ukázalo, že NF- κ B je v lidských synoviálních buňkách aktivován v odpověď na stimulaci pomocí TNF- κ . Taková distribuce může být podkladem pro zvýšenou produkci cytokinů a eikosanoidů v této tkáni (viz A.K. Roshak a kol., J. Biol. Chem. 271, 31496 až 31501 (1996)).

Proteiny NF- κ B/Rel a I κ B hrají pravděpodobně rovněž roli při neoplastické transformaci. Členové třídy jsou asociovány s buněčnou transformací in vitro a in vivo, jako

výsledek hyperexprese, genových amplifikací, genových přeuspořádání nebo translokací. Navíc přeuspořádání a/nebo amplifikace genů kódujících tyto proteiny lze nalést ve 20 až 25 % určitých lidských lymfoidních tumorů. Navíc popsaná role NF- κ B při regulaci apoptózy posiluje roli tohoto transkripčního faktoru při řízení buněčné proliferace.

Několik inhibitorů NF- κ B popsali C. Wahl a kol., J. Clin. Invest. 101 (5), 1163 až 1174 (1998); R.W. Sullivan a kol., J. Med. Chem. 41, 413 až 419 (1998); J.W. Pierce a kol., J. Biol. Chem. 272, 21096 až 21103 (1997).

Je známo, že mořský přírodní produkt hymenialdisin inhibuje NF- κ B (A. Roshak a kol., JPET 283, 955 až 961 (1997); J.J. Breton a M.C. Chabot-Fletcher, JPET 282, 459 až 466 (1997)).

Aminoindanony jsou známé sloučeniny. Obecně popsali přípravu aminoindanonových analogů G. Maury, E.-M. Wu, N. H. Cromwell v J. Org. Chem. 33, 1900 až 1907 (1968). Syntézu 3-brommeziprojektu popsali B.D. Pearson, R.P. Ayer, N. H. Cromwell, J. Org. Chem. 27, 3038 až 3044 (1962). Syntézu 2-benzalindanonu popsali A. Hassner, a N. H. Cromwell v J. Org. Chem. 80, 893 až 900 (1958).

Původci nyní našli nový způsob inhibice aktivace transkripčního faktoru NF- κ B za použití aminoindanonů.

Podstata vynálezu

Přehled vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je poskytnutí způsobů léčby

onemocnění, která mohou být terapeuticky modifikována změnou aktivity transkripčního faktoru NF- κ B.

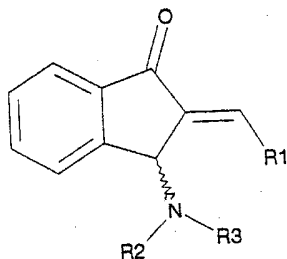
V souladu s tím poskytuje tento vynález v prvním aspektu farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo excipient.

V ještě dalším aspektu poskytuje tento vynález způsob léčby onemocnění, u kterých může být patologie onemocnění terapeuticky modifikována inhibicí NF- κ B.

V určitém aspektu poskytuje tento vynález způsob léčby řady onemocnění spojených s aktivací NF- κ B, včetně zánětlivých onemocnění, zejména revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střeva a astmatu; dermatóz, zejména psoriasy a atopické dermatitidy; autoimunitních onemocnění; odhojení tkání nebo orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; rakoviny, včetně Hodgkinovy choroby; a některých virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiektasie.

Podrobný popis vynálezu

Tento vynález poskytuje způsob léčby onemocnění spojených s aktivací NF- κ B, zahrnující podávání živočichům, zejména savcům, a zvláště člověku, kteří to potřebují, sloučeniny obecného vzorce I:



(I)

ve kterém

R₁ je arylová skupina;

R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylové skupiny;

R₃ je vybrán ze souboru sestávajícího z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a cykloalkylové skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku; a

R₂ a R₃ mohou být spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až 7 atomech vybraných ze souboru sestávajícího z atomu uhlíku, dusíku, kyslíku a síry

a jejich farmaceuticky přijatelných solí, hydrátů a solvátů.

Tento vynález poskytuje zejména způsoby léčby zánětlivých onemocnění, zejména revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střeva a astmatu; dermatóz, zejména psoriasis a atopické dermatitidy; autoimunitních onemocnění; odhojení tkání nebo orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice;

aterosklerózy; restenózy; rakoviny, včetně Hodgkinovy choroby; a některých virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporózy; a ataxie teleangiektasie.

Výhodné pro použití ve způsobech podle tohoto vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I vybrané z následujícího souboru:

3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanon;

3-[(N-cyklohexyl)amino]-2-benzalindanon;

3-morfolinyl-2-benzalindanon; a

3-piperidyl-2-benzalindanon.

Definice

Tento vynález zahrnuje použití všech hydrátů, solvátů, komplexů a prekurzorů léčiva sloučenin podle tohoto vynálezu. Prekurzory jsou jakékoliv kovalentně vázané sloučeniny, které in vivo uvolňují aktivní mateřskou sloučeninu obecného vzorce I. Pokud je ve sloučenině podle tohoto vynálezu přítomno chirální centrum, nebo jiné isomerní centrum, má se namysli, že vynález zahrnuje všechny formy takového isomeru nebo takových isomerů, včetně enantiomerů a diastereomerů. Sloučeniny obsahující chirální centrum mohou být použity jako racemická směs, směs enantiomerně obohacená, nebo může být racemická směs rozdělená za použití dobře známých technik a individuální enantiomer může být použit samotný. V případech, kdy má sloučenina nenasycené dvojně vazby mezi dvěma atomy uhlíku, zahrnuje rozsah tohoto vynálezu jak cis- (Z), tak trans- (E)

isomery. V případech, kdy může sloučenina existovat v tautomerních formách, jako jsou keto-enol tautomery, má se namysli, že vynález zahrnuje každou tautomerní formu, ať již existují v rovnováze nebo převažuje jedna forma.

Význam jakéhokoliv substituentu vyskytujícího se kdekoliv v obecném vzorci I nebo v kterékoliv jeho části je, pokud není uvedeno jinak, nezávislý na jeho významu, nebo na významu kteréhokoliv jiného substituentu, jak se vyskytují kdekoliv jinde.

Pojem "alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku", jak je zde používán, je míněn tak, že zahrnuje substituovanou nebo nesubstituovanou skupinu methylovou, ethylovou, n-propylovou, isopropylovou, n-butylovou, isobutylovou, a terc.-butylovou, pentylovou, n-pentylovou, isopentylovou, neopentylovou a hexylovou a jejich jednoduché alifatické isomery. Kterákoliv alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku může být popřípadě substituovaná nezávisle jedním nebo dvěma atomy halogenu, skupinou obecného vzorce SR' , skupinou obecného vzorce OR' , skupinou obecného vzorce $N(R')_2$, skupinou obecného vzorce $C(O)N(R')_2$, karbamylovou skupinou nebo alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, kde R' je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku.

Pojem "cykloalkylová skupina s 3 až 8 atomy uhlíku", jak je zde používán, je míněn tak, že zahrnuje substituovanou nebo nesubstituovanou skupinu cyklopropylovou, cyklobutylovou, cyklopentylovou, cyklohexylovou, cykloheptylovou a cyklooktylovou a jejich jednoduché alifatické isomery. Kterákoliv cykloalkylová skupina s 3 až 8 atomy uhlíku může být popřípadě substituovaná nezávisle jedním nebo dvěma atomy halogenu,

skupinou obecného vzorce SR' , skupinou obecného vzorce OR' , skupinou obecného vzorce $N(R')_2$, skupinou obecného vzorce $C(O)N(R')_2$, karbamylovou skupinou nebo alkylovou skupinou s 1 až 4 atomy uhlíku, kde R' je alkylová skupina s 1 až 6 atomy uhlíku.

Pojem "halogen" znamená atom fluoru, chloru, bromu a jodu

Pojem "Ar" nebo "arylová skupina" znamená skupinu fenylovou nebo naftylovou, popřípadě nezávisle substituovaně jednou nebo více fenyl- C_{0-6} alkylovou skupinou, heterocyklus- C_{0-6} alkylovou skupinou, alkylovou skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxykupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, fenyl- C_{0-6} alkoxykupinou, heterocyklus- C_{0-6} alkoxykupinou, hydroxykupinou, kyanoskupinou, skupinou obecného vzorce CO_2R' nebo atomem halogenu. C_0 alkylová skupina znamená, že v části není přítomna žádná alkylová část. Takto aryl- C_0 alkylová skupina je stejná jako arylová skupina. Dvě alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku mohou být kombinovány tak, že tvoří 5- až 7-členný kruh, nasycený nebo nenasycený, kondenzovaný na arylový kruh. Fenylová skupina může být popřípadě substituovaná jednou nebo více alkylovou skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxykupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxykupinou, skupinou obecného vzorce CO_2R' nebo atomem halogenu.

Pojem "heterocyklus" nebo "heterocyklická", jak je zde používán, znamená stabilní 5- až 7-členný monocyklický kruh, který je buď nasycený nebo nenasycený, a který se stává z atomů uhlíku a jednoho až třech heteroatomů vybraných ze skupiny sestávající z atomu dusíku, kyslíku a síry, a ve kterém heteroatomy dusíku nebo síry mohou být popřípadě

oxidované a heteroatom dusíku může být popřípadě kvaternizovaný, a zahrnuje jakoukoliv bicyklickou skupinu, ve které je kterýkoliv z výše definovaných heterocyklických kruhů kondenzován k benzenovému kruhu. Heterocyklický kruh může být připojen ke kterémukoliv heteroatomu nebo atomu uhlíku, tak že to vede k vytvoření stabilní struktury, a může být popřípadě substituován jednou nebo více skupinami vybranými ze souboru sestávajícího z fenyl-C₀₋₆ alkylové skupinou, heterocyklus-C₀₋₆ alkylové skupiny, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku, fenyl-C₀₋₆ alkoxy skupiny, heterocyklus-C₀₋₆ alkoxy skupiny, hydroxy skupiny nebo kyanoskupiny. Dvě alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku mohou být kombinovány tak, že tvoří 5- až 7-členný kruh, nasycený nebo nenasycený, kondenzovaný na heterocyklický kruh. Fenylová skupina může být popřípadě substituovaná jednou nebo vícekrát alkylovou skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, alkoxy skupinou s 1 až 6 atomy uhlíku, hydroxy skupinou, skupinou obecného vzorce CO₂R' nebo atomem halogenu. Příklady takových heterocyklů zahrnují piperidinový, piperazinový, 2-oxopiperazinový, 2-oxopiperidinový, 2-oxopyrrolodinový, 2-oxoazepinový, azepinový, pyrrolový, 4-piperidonový, pyrrolidinový, pyrazolový, pyrazolidinový, imidazolový, pyridylový, pyrazonový, oxazolidinový, oxazolinový, oxazolový, isoxazolový, morfolinový, thiazolidinový, thiazolinový, thiazolový, chinuklidinový, indolový, chinolinový, isochinolový, benzimidazolový, benzpyranový, benzoxazolový, furanový, pyranový, tetrahydrofuranový, tetrahydropyranový, thienový, benzoxazolový, thiamorfolinsufoxidový, thiamorfolinsulfonový a oxadiazolový kruh.

Způsoby přípravy

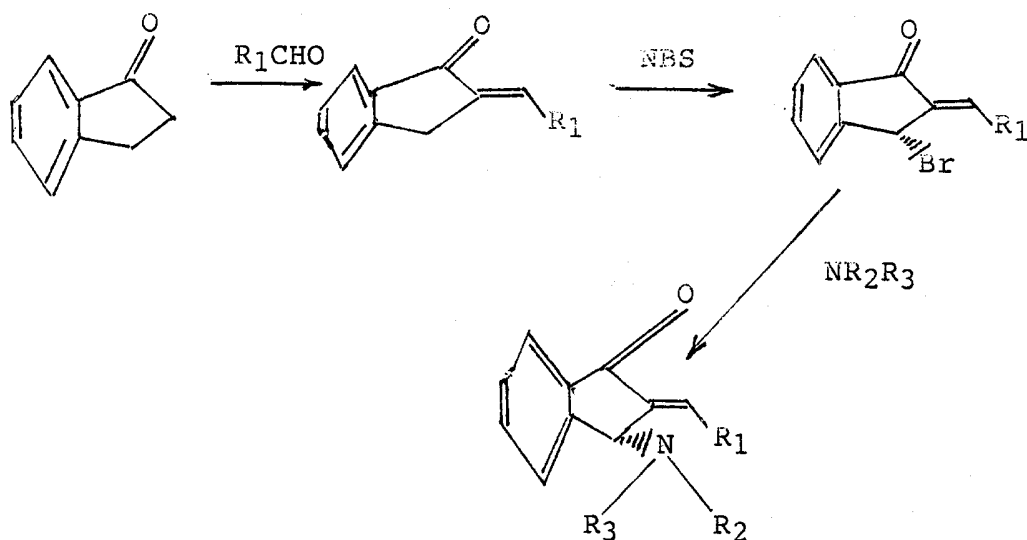
Sloučeniny použité při způsobech podle tohoto vynálezu mohou být běžně připraveny způsoby uvedenými níže ve schématu 1.

Obecnou přípravu aminoindanonových analogů popsali G. Maury, E.-M. Wu, N. H. Cromwell, J. Org. Chem. 33, 1900 až 1907 (1968). Syntézu 3-brommeziproductu popsali B.D. Pearson, R.P. Ayer, N. H. Cromwell, J. Org. Chem. 27, 3038 až 3044 (1962). Syntézu 2-benzalindanonu popsali A. Hassner, N. H. Cromwell, J. Org. Chem. 80, 893 až 900 (1958).

Obecná příprava

Obecná příprava je ukázána na schématu 1. Indanon se zpracuje s benzaldehydem v přítomnosti báze, čím se získá 2-benzalindanon. Bromací 2-benzalindanonu pomocí NBS v tetrachlormethanu se dostane 3-brom-2-benzalindanon. Zpracováním 3-brom-2-benzalindanonu s alkyl(primární nebo sekundární)aminem v benzenu se získá 3-alkylamino-2-benzalindanon.

Schéma 1



Ve vztahu ke způsobům přípravy sloučeniny obecného vzorce I výše uvedeným ve schématu 1, odborník v oboru ocení, že tento vynález zahrnuje všechny nové meziprodukty potřebné k přípravě sloučenin obecného vzorce I.

Zde použité výchozí materiály jsou dostupné na trhu nebo se připraví rutinními způsoby dobře známými odborníky v oboru a mohou být vyhledány ve standardních referenčních knihách, jako je COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS, sv. 1 až 4 (nakladatelství Wiley-Interscience).

Adiční soli sloučeniny obecného vzorce I s kyselinami se připraví standardním způsobem ve vhodném rozpouštědle z mateřské sloučeniny a přebytku kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, fluorovodíková, sírová, fosforečná, octová, trifluoroctová, maleinová, jantarová nebo methansulfonová. Některé sloučeniny tvoří intra-molekulární soli nebo obojetné ionty, které mohou být přijatelné. Kationtové soli se připraví zpracováním mateřské sloučeniny s přebytkem alkalického činidla, jako je hydroxid, uhličitan nebo alkoxid, které obsahují příslušný kation; nebo s příslušným organickým aminem. Specifickými příklady kationtů přítomných ve farmaceuticky přijatelných solích jsou kationty, jako jsou kation lithný, sodný, draselný, vápenatý, hořečnatý a amoniový. Halogenidy, sulfat, fosfat, alkanoáty (jako je acetat a trifluoracetat), benzoaty a sulfonaty (jako je mesylat) jsou příklady aniontů přítomných ve farmaceuticky přijatelných solích.

Tento vynález poskytuje farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo excipient. V souladu s tím může být sloučenina obecného vzorce I použita při výrobě

léku. Farmaceutický prostředek sloučeniny obecného vzorce I připravený jak bylo popsáno výše, může být formulován jako roztok nebo lyofilizované prášky pro parenterální podání. Prášky mohou být před použitím rekonstituovány přidáním vhodného ředidla nebo jiného farmaceuticky přijatelného nosiče. Tekutým přípravkem může být pufrovaný, izotonický, vodný roztok. Příklady vhodných ředidel jsou fyziologický roztok, standardní 5% roztok glukózy ve vodě nebo pufrovaný roztok octanu sodného nebo amonného. Takovéto přípravky jsou obzvláště vhodné pro parenterální podávání, mohou však být rovněž použity pro orální podávání nebo mohou být obsaženy v dávkovacím inhaleru nebo nebulizéru ke vdechování. Může být žádoucí přidání excipientů jako jsou polyvinylpyrrolidon, želatina, hydroxycelulóza, arabská guma, polyethylenglykol, manitol, chlorid sodný nebo citrat sodný.

Tyto sloučeniny mohou být popřípadě enkapsulovány, tabletovány nebo připraveny jako emulze nebo sirup pro orální podání. Mohou být přidány farmaceuticky přijatelné pevné nebo kapalné nosiče k zesílení nebo stabilizaci prostředku, nebo k usnadnění přípravy prostředku. Pevné nosiče zahrnují škrob, laktózu, dihydrát síranu vápenatého, bílou hlinku, stearat hořečnatý nebo kyselinu stearovou, mastek, pektin, agar-agar nebo želatinu. Kapalné nosiče zahrnují sirup, arašídový olej, olivový olej, fyziologický roztok a vodu. Nosič může rovněž zahrnovat materiál s pozvolným uvolňováním, jako je glycerylmonostearat nebo glyceryldistearat, samotný nebo s voskem. Množství pevného nosiče je proměnlivé, výhodně však bude mezi asi 20 mg a asi 1 g na jednotku dávky. Farmaceutické přípravky se vyrábí podle konvenčních technik farmaceutické vědy, které zahrnují pro tabletové formy pokud je nutné mletí, míchání, granulování a lisování; nebo pro formy tvrdých želatinových

kapslí mletí, míchání a plnění. Pokud se použije kapalný nosič, přípravek bude ve formě sirupu, elixíru, emulze nebo vodné či bezvodé suspenze. Takové kapalně přípravky mohou být podávány přímo per os nebo plněny do měkkých želatinových kapslí.

Pro rektální podávání se může sloučenina obecného vzorce I také kombinovat s excipienty jako je kakaové máslo, glycerin, želatina nebo polyethylenglykoly a tvarovat do čípků.

Způsoby podle tohoto vynálezu zahrnují topické podávání sloučeniny obecného vzorce I. Topickým podáváním se má namysli podávání nikoli systémové, včetně podávání sloučeniny podle tohoto vynálezu zevně na kůži, do bukalní dutiny a instilace takové sloučeniny do ucha, oka nebo nosu, kdy sloučenina významně nepřechází do krevního řečiště. Systémovým podáváním se míní orální, intravenózní, intraperitoneální a intramuskulární podávání. Množství sloučeniny obecného vzorce I (dále jen "aktivní složka") požadované pro terapeutický nebo profylaktický účinek při topickém podáváním se bude samozřejmě pohybovat v závislosti na vybrané sloučenině, podstatě a závažnosti léčeného stavu a léčbě prodělané živočichem, a závisí výhradně na rozhodnutí lékaře.

Ačkoliv je možné, aby byla aktivní složka podávána samotná jako surová chemikálie, je výhodné podávat ji jako farmaceutický přípravek. Aktivní složka může tvořit u topického podáváním od 0,01 do 5,0 % hmotnostních přípravku.

Topické přípravky tohoto vynálezu, jak pro veterinární

použití tak pro použití v humánní medicíně, obsahují aktivní složky spolu s jedním nebo více přijatelnými nosiči a popřípadě s jinou léčivou složkou. Nosič musí být "přijatelný", ve smyslu kompatibility s jinými složkami přípravku a nesmí být škodlivý jeho příjemci.

Přípravky vhodné pro topické podávání zahrnují kapalně nebo polokapalně přípravky vhodné pro proniknutí přes kůži na místě žádoucí léčby, jako jsou mazání, roztoky, krémy, masti nebo pasty a kapky vhodné pro podávání do očí, uší nebo nosu.

Kapky podle tohoto vynálezu mohou zahrnovat sterilní vodné nebo olejové roztoky nebo suspenze a mohou být připraveny rozpuštěním aktivní složky ve vhodném vodném roztoku baktericidního a/nebo fungicidního činidla a/nebo v jiném vhodném konzervačním prostředku, včetně výhodně povrchově aktivních látek. Výsledný roztok může být poté vyčištěn filtrací, převeden do vhodného zásobníku, který se poté uzavře a steriluje se autoklavováním nebo udržováním půl hodiny při teplotě 90 až 100 °C. Roztok může být popřípadě sterilován filtrováním a převedením do zásobníku za použití aseptických technik. Příklady baktericidních a fungicidních činidel vhodných k přidání do kapek jsou dusičnan nebo octan fenylrtuti (0,002 %), benzalkoniumchlorid (0,01 %) a chlorhexidinacetat (0,01%). Vhodnými rozpouštědly pro přípravu olejového roztoku, zahrnují glycerol, zředěný alkohol a propylenglykol.

Roztoky podle tohoto vynálezu zahrnují takové roztoky, které jsou vhodné k aplikaci na kůži nebo od oka. Oční roztok může obsahovat sterilní vodné roztoky popřípadě obsahující baktericidní činidlo a může být připraven způsobem

podobnými těm, které slouží k přípravě kapek. Roztoky a mazání pro aplikaci na kůži mohou rovněž obsahovat činidlo urychlující vysychání a ochlazující kůži, jako je alkohol nebo aceton, a/nebo zvlhčovač jako je glycerol nebo olej jako je ricinový nebo arašídový olej.

Krémy, masti nebo pasty podle tohoto vynálezu jsou polopevné přípravky aktivní složky pro vnější aplikaci. Mohou být vyrobeny smícháním aktivní složky v jemně rozmělněné nebo práškové formě, samotné nebo v roztoku nebo v suspenzi ve vodné nebo bezvodé tekutině, za pomoci vhodné strojní techniky, s mastným nebo nemastným základem. Základ může obsahovat uhlovodíky jako je tvrdý, měkký nebo tekutý parafin, glycerol, včelí vosk, metalické mýdlo; rostlinný sliz; olej přírodního původu, jako je mandlový, kukuřičný, arašídový, ricinový nebo olivový olej; lanolin nebo jeho deriváty; nebo mastné kyseliny, jako je kyselina stearová nebo kyselina olejová, spolu s alkoholem, jako jsou propylenglykol nebo makrogoly. Přípravky mohou obsahovat kteroukoliv vhodnou povrchově aktivní látku jako je anionická, kationická nebo neionická povrchově aktivní látka, jako jsou estery sorbitanu nebo jejich polyoxyethylenové deriváty. Obsaženy mohou být rovněž suspenzační činidla jako jsou přírodní gummy, deriváty celulózy nebo anorganické materiály jako křemičité silikáty, a jiné složky, jako je lanolin.

Využitelnost tohoto vynálezu

Sloučeniny obecného vzorce I jsou vhodné jako inhibitory NF- κ B. Tento vynález poskytuje vhodné prostředky a přípravky uvedené sloučeniny, včetně farmaceutických prostředků a přípravků uvedené sloučeniny.

Tento vynález poskytuje rovněž způsoby léčby onemocnění spojených s aktivací NF- κ B, kde způsoby zahrnují podávání živočichům, zejména savcům, a zvláště člověku, kteří to potřebují, sloučeniny obecného vzorce I. Tento vynález poskytuje zejména způsoby pro léčbu zánětlivých onemocnění: zejména revmatoidní artritidy, zánětlivých onemocnění střeva a astmatu; dermatóz, včetně psoriasis a atopické dermatitidy; autoimunitních onemocnění; odhojení tkání nebo orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; rakoviny, včetně Hodgkinovy choroby; a některých virových infekcí, včetně AIDS; osteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiektasie.

Pro akutní terapii je výhodné parenterální podávání sloučeniny obecného vzorce I. Nejúčinnější jsou intravenózní infúze sloučeniny v 5% roztoku glukózy ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku, nebo podobné přípravky s vhodnými excipienty, avšak vhodný je rovněž intramuskulární injekční bolus. Parenterální dávka bude typicky asi 0,01 až asi 50 mg/kg; výhodně mezi 0,1 a 20 mg/kg tak, aby se udržela koncentrace léku v plazmě na koncentraci účinné k inhibici aktivace NF- κ B. Sloučeniny se podávají jedenkrát až čtyřikrát denně v množství, aby bylo dosaženo celkové denní dávky asi 0,4 až asi 80 mg/kg za den. Přesné množství sloučeniny podle tohoto vynálezu, které je terapeuticky účinné, a cestu, kterou je nejlepší sloučeninu podávat, snadno určí odborník v oboru porovnáním hladiny látky v krvi a koncentrace požadované k dosažení terapeutického účinku.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou být pacientovi podávány rovněž orálně takovým způsobem tak, že koncentrace

léku bude dostatečná k inhibování NF-κB nebo k dosažení kterékoliv jiné terapeutické indikace, jak jsou zde popsány. Typicky se farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu podává v orální dávce mezi asi 0,1 a asi 50 mg/kg způsobem, který odpovídá stavu pacienta. Výhodná by byla orální dávka asi 0,5 až asi 20 mg/kg.

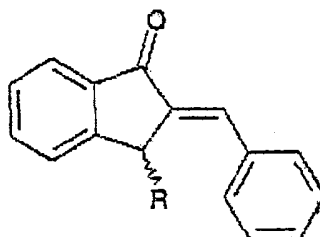
Sloučeniny obecného vzorce I mohou být pacientovi podávány rovněž topicky tak, že koncentrace léku bude dostatečná k inhibování NF-κB nebo k dosažení kterékoliv jiné terapeutické indikace, jak jsou zde popsány. Typicky se farmaceutický prostředek obsahující sloučeninu podává v topickém přípravku v koncentraci asi 0,01 až asi 5 % hmotnostních.

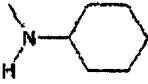
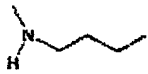
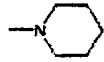
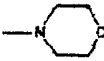
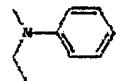
Pokud jsou sloučeniny podle tohoto vynálezu podávány v souladu s tímto vynálezem, neočekávají se žádné nepřijatelné toxikologické účinky.

Schopnost zde popsaných sloučenin inhibovat aktivaci NF-κB je jasně prokázána jejich schopností inhibovat aktivitu reporterového genu řízeného NF-κB. (viz tabulka 1). Využitelnost těchto inhibitorů NF-κB při terapii onemocnění je slibná, vzhledem k významu aktivace NF-κB u řady onemocnění.

Tabulka 1

Inhibice aktivity reporterového genu řízeného NF-κB



| sloučenina číslo | R | test reporterového genu IC ₅₀ μM |
|---------------------|--|---|
| 1 |  | 2,2, 1,0 |
| 2 |  | 1,7 |
| 3 |  | 1,9 |
| 4 |  | 3,0 |
| 5 |  | 14 % @ 5 μM |
| 6 | H | inaktivní |

NF-κB hraje klíčovou úlohu při regulované expresi velkého množství prozánětlivých mediátorů včetně cytokinů, jako jsou IL-6 a IL-8 (Mukaida a kol. (1990); Liberman a Baltimore (1990); Matsusaka a kol. (1993)), molekul buněčné adheze, jako jsou ICAM a VCAM (Marui a kol. (1993); Kawai a kol. (1995); Ledebur a Parks (1995)) a indukovatelné synthasy oxidu dusnatého (iNOS) (Xie a kol., (1994); Adcock a kol. (1994)). (Plné citace odkazů jsou uvedeny na konci této části). Je známo, že takové mediátory hrají úlohu při svolávání leukocytů do míst zánětu a v případě iNOS mohou vést k destrukci orgánů u některých zánětlivých a autoimunitních onemocnění (McCartney-Francis a kol. (1993); Kleemann a kol. (1993)). Významné je, že zde popsané sloučeniny inhibují syntézu IL-8 a produkci oxidu dusnatého,

produktu aktivity iNOS (viz tabulka 2).

Tabulka 2

Protizánětlivá aktivita sloučeniny č. 2 v tabulce 1

| | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| In vitro | |
| IL-1 indukovaná produkce PGE2 v RSF | IC50 = 1 μ M |
| In vivo | |
| ušní zánět indukovaný forbol-esterem | |
| výtok z ucha | 85% inhibice @ 1 mg/ucho |
| zánětlivá buněčná infiltrace | 29% inhibice @ 1 mg/ucho |

Důkaz významné úlohy NF- κ B při zánětlivých onemocněních byl získán na studiích astmatických pacientů. Bronchiální biopsie odebrané mírným atopickým astmatikům ukazují významný vzestup počtu buněk v submukóze barvených na aktivovaný NF- κ B, celkový NF- κ B a prostřednictvím NF- κ B regulované cytokiny jako jsou GM-CSF a TNF α ve srovnání s biopsiemi z normálních neatopických kontrol (Wilson kol. (1998)). Navíc procentuální zastoupení cév exprimujících imunoreaktivitu NF- κ B je zvýšeno, stejně jako IL-8 imunoreaktivita v epitelu biopsií vzorků (Wilson kol. (1998)). Předpokládá se, že inhibice produkce IL-8 prostřednictvím inhibice NF- κ B jako taková, jak byla

demonstrována těmito sloučeninami, bude přínosnou u zánětu dýchacích cest.

Poslední studie naznačují, že NF- κ B může hrát rovněž zásadní úlohu v patogenezi zánětlivých onemocnění střeva (IBD). Aktivovaný NF- κ B se nalézá v biopsiích vzorků tlustého střeva u pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerativní kolitidou (Ardite a kol. (1998); Rogler a kol. (1998); Schreiber a kol. (1998)). Aktivace je průkazná v zánětem postižené mukóze, nikoliv však v mukóze nezanícené (Ardite a kol. (1998); Rogler a kol. (1998)) a je provázána zvýšenou expresí IL-8 mRNA ve stejných místech (Ardite a kol. (1998)). Léčba kortikosteroidy navíc silně inhibuje aktivaci NF- κ B ve střevě a redukuje zánět tlustého střeva (Ardite a kol. (1998); Schreiber a kol. (1998)). Opět se předpokládá, že inhibice produkce IL-8 prostřednictvím inhibice NF- κ B jako taková, jak byla demonstrována těmito výsledky, bude přínosnou u zánětlivých onemocnění střeva.

Zvířecí modely zánětu gastrointestinální soustavy poskytují další podporu teorii, že NF- κ B je klíčový regulátor zánětu tlustého střeva. Zvýšená aktivita NF- κ B byla nalezena v makrofázích v lamina propria u myší s kolitidou indukovanou kyselinou 2,4,6,-trinitrobenzen-sulfonovou (TNBS), kde hlavní komponentou aktivovaných komplexů je p65 (Neurath a kol. (1996); Neurath a Pettersson (1997)). Lokální podání inhibitorů p65 ruší projevy vzniklé kolitidy u léčených zvířat, bez jakýchkoliv projevů toxicity (Neurath a kol. (1996); Neurath a Pettersson (1997)). Proto se předpokládá, že inhibitory NF- κ B o malých molekulách, by byly vhodné k léčbě zánětlivých onemocnění střeva.

Další důkazy úlohy NF- κ B u zánětlivých onemocnění pochází ze studií revmatoidní synoviální membrány. Ačkoliv je NF- κ B normálně přítomen jako inaktivní cytoplazmatický komplex, poslední imunohistochemické studie ukázaly, že NF- κ B je přítomen v jádrech, a tedy aktivní v buňkách lidské revmatické synoviální membrány (Handel a kol. (1995); Marok a kol. (1996); Sioud a kol. (1998)) a na zvířecích modelech onemocnění (Tsao a kol. (1997)). Obarvení je spojeno se synoviocyty typu A a s vaskulárním endotelem (Marok a kol. (1996)). Navíc, byla výrazná aktivace NF- κ B nalezena v kultivovaných synoviocytech (Roshak a kol. (1996); Miyazawa a kol. (1998)) a v kulturách synoviálních buněk stimulovaných IL-1 β nebo TNF α (Roshak a kol. (1996); Fujisawa a kol. (1996); Roshak a kol. (1997)). Proto může být aktivace NF- κ B podkladem zvýšené produkce cytokinů a leukocytové infiltrace, charakteristických pro zánět synoviální membrány. Schopnost těchto sloučenin inhibovat produkci eikosanoidů těmito buňkami, by byla předpokladem přínosu u revmatoidní artritidy (viz tabulka 2).

Literatura

N. Mukaida, Y. Mahe, K. Matsushima, Cooperative interaction of nuklear factor- κ B and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines, J. Biol. Chem. 265, 21128 až 21133 (1990).

T.A. Liberman, D. Baltimore, Activation of interleukin-6 gene expression through NF- κ B transcription factor, Moll. Cell Biol. 10, 2327 až 2334 (1990).

T. Matsusaka, K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K.

Matsushima, T. Kishimoto, S. Akira, Transcription factors NF-IL6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines interleukin 6 a interleukin 8, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10193 až 10197 (1993).

N. Marui, M.K. Offerman, R. Swerlick, C. Kunsch, C.A. Rosen, M. Ahmad, R.W. Alexander, R.M. Medford, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expresion are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells, J. Clin. Invest. 92, 1866 až 1874 (1993).

M. Kawai, R. Nishikomori, E.-Y. Zung, G. Tai, C. Yamanak, M. Mayumi, T. Heike, Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits intercellular adhesion molecule-1 biosynthesis induced by cytokines in human fibroblasts, J. Immunol. 154, 2333 až 2341 (1995).

H.C. Ledebur, T.P. Parks, Transcriptional regulation of the intracellular adhesion molecule-1 by inflammatory cytokines in human endotellian cells, J. Biol. Chem. 270, 933 až 943 (1995).

Q. Xie, Y. Kashiwabara, C. Nathan, Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase, J. Biol. Chem. 269, 4705 až 4708 (1994).

I.M. Adcock, C.R. Brown, O. Kwon, P.J. Barnes, Oxidative stress induced NF- κ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 199, 518 až 524 (1994).

N. McCartney-Francis, J.B. Allen, D.E. Mizel, J.E.

Albina, Q. Xie, C.F. Nathan, S.M. Wahl, Supression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, J. Exp. Med. 178, 749 až 754 (1993).

R. Kleemann, H. Rothe, V. Kolb-Bachofen, Q. Xie, C.F. Nathan, S. Martin, H. Kolb, Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats, FEBS Lett. 328, 9 až 12 (1993).

S.J. Wilson, A. Wallin, T. Sandstrom, P.H. Howarth, S.T. Holgate, Expression of NF-kappa-B and associated adhesion molecules in mild asthmatic a and normal controls, J. Allergy Clin. Immunol. 101, 616 (1998).

E. Ardite, J. panes, M. miranda, A. salas, J.I. Elizalde, M. sams, Y. Arce, J.M. Bordas, J.C. Fernandez-Checa, J.M. Pique, Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor κB in patients with inflamatory bowel disease, Br. J. Pharmacol. 124, 431 až 433 (1998).

G. Rogler, K. Brand, D. Vogl, S. Page, R. Hofmeister, T. Andus, R. knuechel, P.A. Baeuerle, J. Scholmerich, V. Gross, Nuclear factor κB is activated in macrophage and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa, Gastroenterol. 115, 357 až 369 (1998).

S. Schreiber, S. Nicolaus, J. Hampe, Activation of nuclear factor κB in inflamatory bowel disease, Gut 42, 477 až 484 (1998).

M.F. Neurath, S. Pettersson, K-H. Meyer zum Buschenfelde, W. Strobel, local administration of antisense phosphorothiotate oliginucleotides to the p65 subunits of

NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice, Nature Med. 2, 998 až 1004 (1996).

M.F. Neurath, S. Pettersson, Predominant role of NF- κ B p65 in pathogenesis of chronic intestinal inflammation, Immunobiol. 198, 91 až 98 (1997).

M.L. Handel, L.B. McMorrow, E.M. Gravallesse, Nuclear factor - κ B in rheumatoid synovium: localization of p50 and p65, Arthritis Rheumatism 38, 1762 až 1770 (1995).

R. Marok, P.G. Winyard, A. Coumbe, M.L. Kus, K. Gaffney, S. Blades, P.I. Mapp, C.J. Morris, D.R. Blake, C. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue, Arthritis Rheumatism 39, 583 až 591 (1996).

M. Sioud, O. Mellbye, O. Forre, Analysis of the NF- κ B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2-related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA, Clin. Exp. Rheumatol. 16, 125 až 134 (1998).

P.W. Tsao, T. Suzuki, R. Totsuka, T. Murata, T. Takagi, Y Ohmachi, H. Fujimura, I. Takata, The effect of dexamethasone on the expression of activated NF- κ B in adjuvant arthritis. Clin. Immunol. Immunopathol. 83, 173 až 178 (1997).

A.K. Roshak, J.R. Jackson, K. McGough, M. Chabot-Fletcher, E. Mochan, L. Marshall, Manipulation of distinct NF κ B proteins alters interleukin- 1β -induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation, J. Biol. Chem. 271, 31496 až 31501 (1996).

K. Miyazawa, A. Mori, K. Yamamoto, H. Okudaira, Constutive transkription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes; spontaneous activation of NF- κ B and CBF1, J. Am. Pathol. 152, 793 až 803 (1998).

K. Fujisawa, H. Aono, T. Hasunuma, K Yamamoto, S. Mita, K. Nishiola, Activation of transkription factor NF- κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor α , Arthritis Rheumatism 39, 197 až 203 (1996).

A.K. Roshak, J.R. Jackson, M. Chabot-Fletcher, L. Marshall, Inhibition of NF- κ B-mediated interleukin-1 β -stimulated prostaglandin E2 formation by the marine natural product hymenialdisin, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 283, 955 až 961 (1997).

Biologické testy

Za účelem určení koncentrace sloučeniny, která je nutná k dosažení farmakologického účinku mohou být sloučeniny podle tohoto vynálezu testovány v jednom nebo několika biologických testech.

Testy aktivity NF- κ B se provádí za použití buněk, na principu testů luciferázových reportérů, jak je popsali J.J. Breton, M.C. Chabot-Fletcher, JPET 282, 459 až 466 (1997). Stručně vyjádřeno, buňky lidského histiocytárního lymfomu linie U937 trvale transfektované NF- κ B reporterovými plazmidy (viz níže) se kultivují ve výše uvedeném médiu s přidavkem 250 μ g/ml Geneticinu (G418 sulfate, Life Technologies, Grand Island, New York). Test luciferázového reportéru se provede na transfektovaných klonech U937. Ty se

dvakrát odstředí 5 minut při frekvenci otáček 300 x g a resuspendují v RPMI 1640 s 10 % fetálního bovinního séra (FBS) na hustotu 1×10^6 buněk/ml. 1ml alikvoty se přidají do jamek plotny o 24 jamkách. Do příslušných jamek se přidá 1 μ l sloučeniny nebo dimethylsulfoxidového (DMSO) nosiče a plotny se 30 minut inkubují v atmosféře 5% oxidu uhličitého při 37 °C. Poté se jako stimulant přidá 5 ng/ml TNF α , 100 ng/ml lipopoly-sacharidu nebo 0,1 μ M PMA a vzorky se inkubují 5 hodin v atmosféře 5% oxidu uhličitého při 37 °C, převedou se do polypropylenových zkumavek a odstřeďují se 5 minut při frekvenci otáček 200 x g. Buněčné pelety se dvakrát promyjí v 1 ml PBS bez vápenatých nebo hořečnatých kationtů a odstředí se jak bylo výše uvedeno. Výsledné buněčné pelety lysují v 50 μ l lysujícího pufru (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) protřepou a inkubují 15 minut za teploty místnosti. 20 μ l alikvót z každého lysátu se převede do neprůhledné bílé plotny s 96 jamkami (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) a testují se na produkci luciferázy na luminometru MicroLumat LB 96 P (EG&G Berthold, Bad Wilbald, Německo). Luminometr přidělí jamky 100 μ l reagentia k testování luciferázy (Promega Corporation, Madison, Wisconsin) a po dobu 20 sekund je zaznamenáván integrovaný světelný výdej. Světelný výdej se měří v relativních jednotkách světla (RLUs).

Aktivita NF- κ B se může měřit rovněž v testu posunu elektroforézní mobility (EMSA), čímž se vyhodnotí přítomnost proteinu NF- κ B v jádře. Předmětné buňky se kultivují na hustotu 1×10^6 buněk/ml. Buňky se sklídí odstředěním, promyjí se PBS bez přítomnosti vápenatých a hořečnatých kationtů a resuspendují se v PBS s vápenatými a hořečnatými kationty na hustotu 1×10^7 buněk/ml. Za účelem zkoumání účinku sloučeniny na aktivaci NF- κ B se k buněčným suspenzím

přidají na 30 minut při 37 °C různé koncentrace léku nebo vehikula (0,1% dimethylsulfoxid), poté dalších 15 minut stimulují 5,0 ng/ml TNF α . Buněčné a jaderné extrakty se připraví, jak je stručně vysvětleno, na konci doby inkubace buněk (1 x 10⁷ buněk) a dvakrát se promyjí v PBS bez přítomnosti vápenatých a hořečnatých kationtů. Výsledné buněčné pelety se resuspendují ve 20 μ l pufru A (10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM chloridu draselného, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 0,5 mM dithiothreitolu (DTT) a 0,1 % NP-40) a inkubují se 10 minut na ledu. Jádra se peletují mikrocentrifugací při frekvenci otáček 3500 za minutu a teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Výsledný supernatant se odebere jako buněčný extrakt a jaderné pelety se resuspendují v 15 μ l pufru C (20 mM HEPES (pH 7,9), 0,42 M chloridu sodného, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 25 % glycerolu, 0,2 mM kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA), 0,5 mM dithiothreitolu (DTT) a 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF)). Suspenze se jemně míchá 20 minut při 4 °C, poté se 10 minut při 4 °C mikrocentrifuguje při frekvenci otáček 14000 za minutu. Supernatant se odebere a naředí se 60 μ l pufru D (20 mM HEPES (pH 7,9), 50 mM chloridu draselného, 20 % glycerolu, 0,2 mM kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA), 0,5 mM dithiothreitolu (DTT) a 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF)). Všechny vzorky se do analýzy uskladní při teplotě -80 °C. Koncentrace proteinů v extraktech se určí jak popsal Bradford (Bradford, 1976) pomocí reagentia BioRad.

Účinek sloučeniny na aktivaci transkripčního faktoru se vyhodnotí analýzou posunu elektroforézní mobility (EMSA) za použití jaderných extraktů z buněk zpracovaných, jak je uvedeno výše. Dvojvláknové shodné oligonukleotidy NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3') se označí T₄-polynukleo-

tidkinázou a [γ - ^{32}P]ATP. 25 μl směsi pro navázání obsahuje 10 mM HEPES-OH (pH 7,9), 4 mM Tris-HCl (pH 7,9), 60 mM chloridu draselného, 1 mM kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA), 1 mM dithiothreitolu (DTT), 10 % glycerolu, 0,3 mg/ml albuminu bovinního séra a 1 μg poly(dI-dC)•poly(dI-dC). Směsi pro navázání (10 μg proteinu jaderného extraktu) se inkubují 20 minut za teploty místnosti s 0,5 ng oligonukleotidu značeného ^{32}P (3 až 6 MBq) za přítomnosti nebo absence neznačeného kompetitoru, poté se směs zavede na 4 polyakrylamidový gel připravený v 1X směsi Tris kyseliny borité a kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA) a elektroforézuje se při rozdílu potenciálů 200 V po dobu 2 hodin. po elektroforéze se gely vysuší a přiloží na film k detekci vazebné reakce.

Účinek sloučeniny na fosforylaci I κ B může být sledován pomocí Western-blotové analýzy. Buněčné extrakty se podrobí elektroforéze v gelu dodecylsulfatpolyakrylamidu sodného (SDS-PAGE) na 10% gelech (BioRad, Hercules, Kalifornie) a proteiny se převedou na nitrocelulóзовé blány (HybondTM-ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, Illionis). Imunoblotová analýza se provede za použití polyklonálních králičích protilátek proti I κ B α nebo I κ B β následně oslích sekundárních protilátek proti králičím protilátkám (Amersham Corp., Arlington Heights, Illionis). Imunoreaktivní pásy se detekují za použití systému Enhanced Chemiluminescence (ECL) testu (Amersham Corp., Arlington Heights, Illionis).

Účinky na produkci eikosanoidů fibroblasty lidské synoviální membrány (RSF) se vyhodnocuje za použití primárních kultur fibroblastů lidské synoviální membrány (RSF). Ty se získají enzymatickým natrávením synoviální membrány od dospělých pacientů s revmatismem. Buňky se

kultivují při teplotě 37 °C v 5% atmosféře oxidu uhličitého v Earlově minimálním esenciálním médiu (EMEM) obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 100 jednotek/ml penicilinu, a 100 µg/ml streptomycinu (GIBCO, Grand Island, New York). Použijí se čtvrtá až devátá pasáž kultury tak, aby se získala co nejjednodušší typ I populace fibroblastů. Pro některé studie se fibroblasty umístí na plotny o 24 jamkách o průměru 16 mm (Costar, Cambridge, Maryland) v koncentraci 10⁴ buněk/ml. K buňkám se přidá optimální dávka IL-1β pro určený čas (1 ng/ml Roshak a kol., 1996) (Genzyme, Cambridge, Maryland). Léky ve vehikulu dimethylsulfoxidu (DMSO) se přidají k buněčným kulturám 15 minut před přidáním IL-1. Za použití kitů enzymové imunoanalýzy (EIA) zakoupených od Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) se přímo změří hladiny prostaglandinu E₂ v médiu prostém buněk odebraném na konci kultivačního období. Vzorek nebo standardní ředění jsou připraveny s experimentálním médiem.

Protizánětlivá aktivita in vivo se zhodnotí za použití myšího modelu forboesterem indukovaného zánětu ucha. 4 µg acetatu forbolmyristatu ve 20 µl acetonu se aplikují na vnitřní a vnější povrch levého ucha myši kmene Male Balb/c (6/skupina) (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Maryland). O čtyři hodiny později se do stejného ucha aplikuje sloučenina rozpuštěná ve 25 µl acetonu. po 20 hodinách se tloušťka obou uší měří mikrometrem s měřítkem (Mitutoyo, Japonsko) a aplikuje se druhá topická dávka sloučeniny. O 24 hodin později se provedou měření tloušťky uší a údaje se vyjádří jako změna tloušťky (x 10⁻³ cm) mezi léčeným a neléčeným uchem. Poté se zanícené levé ucho odoperuje a uskladní se při teplotě -70 °C dokud se nevyhodnotí aktivita myeloperoxidázy, jako míra zánětlivé

buněčné infiltrace.

Zánětlivá buněčná infiltrace se vyhodnotí prostřednictvím měření myeloperoxidázové aktivity přítomné v zanícené ušní tkáni. Částečně rozmrazená ušní tkáň se rozele a poté se homogenizuje na 10 % hmotnostně objemových pomocí homogenizéru tkání Tissumizer (Tekmar Co., Cincinnati, Ohio) v 50 mM fosfátového pufru (pH 6,6) obsahujícího 0,5 % HTAB. Homogenizovaná tkáň se nechá ve třech cyklech zmrazit a rozmrazit a následně se krátce vystaví na 10 s ultrazvuku. Aktivita myeloperoxidázy (MPO) se stanoví následujícím způsobem. Při 460 nm se spektrofotometricky měří výskyt barevného produktu na myeloperoxidáze (MPO) dependentní reakce o-dianisidinu v koncentraci 0,167 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, Montana) s peroxidem vodíku (0,0005% roztok). Supernatant myeloperoxidázové (MPO) aktivity se kvantifikuje kineticky (změna absorbance měřená po 3 minuty, vzorkování v 15-sekundových intervalech) za použití spektrofotometru Beckmann DU-7 a balení pro analýzu kinetiky (Beckman Instruments, Inc., Sommerset, New Jersey). Jedna jednotka myeloperoxidázové (MPO) aktivity je definována tak, že degraduje při teplotě 25 °C jeden mikromol peroxidu za minutu.

Účinek na zánětem zprostředkovaný rozpad chrupavky se in vitro měří na systému explantované chrupavky. Na tomto modelu se explantáty bovinní kloubní chrupavky inkubují čtyři dny/96 hodin s nebo bez rHuIL-1 alfa, což stimuluje v přítomnosti nebo bez přítomnosti testované sloučeniny rozpad chrupavky. Supernatanty se odeberou na analýzu oxidu dusnatého. Oxid dusnatý se měří pomocí Greissovy reakce a čítá spektrofotometricky při 530 nm. Tato reakce měří oxid

dusičitý, který je stabilním konečným produktem oxidu dusnatého.

Obecně

Spektra nukleární magnetické rezonance jsou zaznamenány při buď 250, 300 nebo 400 MHz za použití spektrometru Bruker AM 250, Bruker, Bruker ARX 300 nebo Bruker AC 400. CDCl_3 je deuteriochloroform, DMSO-d_6 je hexadeuteriodimethylsulfoxid, a CD_3OD je tetradeuteriomethanol. Chemické posuny jsou uváděny v částech na jeden milion (δ) odvozeno od vnitřního standardu tetramethylsilkanu. Zkratky pro data NMR jsou následující: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet, dd = doublet doubletů, dt = doublet tripletů, app = zjevný, br = široky. J znamená kondenzační konstantu měřenou v Hz. Kontinuální vlny infračerveného (IR) spektra jsou zaznamenány na infračerveném spektrometru Perkin-Elmer 683 a Fourierovy transformace infračervených spekter (FTIR) jsou zaznamenány na infračerveném spektrometru Nicolet Inpact 400 D. Infračervená spektra a FTIR spektra jsou zaznamenána v transmisním modu a polohy pásů jsou uváděny jako převrácená hodnota vlnové délky (cm^{-1}). Hmotnostní spektra jsou zaznamenána buď na přístroji VG 70 FE, PE Syx API III nebo VG ZAB HF, za použití rychlého bombardování atomy (FAB) nebo technik elektrosprejové ionizace (ES). Elementární analýzy jsou provedeny za použití elementárního analyzáru Perkin-Elmer 240C. Teploty tání jsou zjištěny na zařízení ke zjišťování teplot tání Thomas-Hoover a jsou nekorigované. Všechny teploty jsou uvedeny ve stupních celsia ($^{\circ}\text{C}$).

pro chromatografii na tenké vrstvě jsou použity plotny s tenkou vrstvou Analtech Silika Gel GF a E. Merck Silika

Gel 60 F-254. Jak velmi rychlá, tak hmotnostní chromatografie jsou provedeny na silikagelu E. Merck Kieselgel 60 o rozměru částic 38 až 66 μm .

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech syntéz je teplota uváděna ve stupních celsia ($^{\circ}\text{C}$). Pokud není uvedeno jinak, všechny výchozí materiály jsou získány na trhu. Bez dalšího rozpracování se věří, že odborník v oboru je schopen za použití předcházejícího popisu vynálezu, využít vynález v jeho plném rozsahu. Tyto příklady jsou uvedeny pro ilustraci vynálezu a neomezují jeho rozsah. Je uveden odkaz na patentové nároky, které si původci vyhrazují níže.

Příklad 1

Příprava 3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanonu

a) 2-Benzalindanon

Podle postupu, který popsali A. Hassner a N.H. Cromwell v J. Org. Chem. 80, 893 až 90 (1958), se při teplotě 0°C přidá 6,05 ml (53,6 mmol) benzaldehydu do roztoku 7,08 g (53,6 mmol) indanonu (Aldrich) v ethanolu a 600 mg (10,6 mmol) hydroxidu draselného a reakční směs se nechá přes noc v chladicím zařízení. Reakční směs se zfiltruje, promyje 50% vodným roztokem ethanolu a poté rekrystaluje z horkého ethanolu, čímž se získá 5,84 g 2-benzalindanonu.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,93 (d, 1H, $J = 7,7$), 7,75 až 7,35 (m, 8H), 4,08 (s, 2H).

b) 3-Brom-2-benzalindanon

Podle postupu, který popsali B.D. Pearson, R.P. Ayer a N. H. Cromwell v J. Org. Chem. 27, 3038 až 3044 (1962) se k 1,0 g (4,55 mmol) sloučeniny z příkladu 1 (a) v 15 ml tetrachlormethanu přidá 810 mg (4,55 mmol) NBS a 50 mg benzoylperoxidu a směs se zahřívá pod zpětným chladičem pomocí ohřívací lampy po dobu 1 hodiny. Reakční směs se ochladí, filtruje a filtrát se odpaří, čímž se získá 3-brom-2-benzalindanon, který se použije bez dalšího čištění.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,1 až 7,2 (m, 10H), 6,40 (s, 2H)

b) 3-[(N-Butyl)amino]-2-benzalindanon

Podle postupu, který popsali G. Maury, E.-M. Wu a N. H. Cromwell, J. Org. Chem. 33, 1900 až 1907 (1968) se ke sloučenině z příkladu 1 (b) v benzenu přidá 300 μl (3,04 mmol) n-butylaminu a roztok se míchá při teplotě místnosti po 24 hodin. Reakční směs se odpaří a odparek se čistí velmi rychlou chromatografií (silikagel, 10% ethylacetat v hexanu), čímž se získá 353 mg 3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanonu. K části volné baze v etheru se přidá 1N roztok HCl v etheru, čímž se získá hydrochloridová sůl v podobě pevné látky.

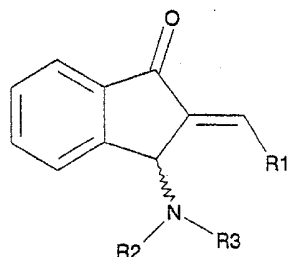
ES-MS (M+H)⁺ m/e 292;

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8,2 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 8,03 (s, 1H), 7,98 (d, 1H, J = 6 Hz), 7,84 (t, 1H, J = 6 Hz), 7,75 až 7,50 (m, 7H), 6,7 (široký s, 1H), 2,48 (široký s, 1H), 2,28 (široký s, 1H), 1,6 až 1,3 (m, 2H), 0,95 až 0,8 (m, 2H), 0,65 (t, 3H, J = 6,5 Hz).

Výše uvedený popis a příklady plně popisují, jak vyrobit a použít sloučeniny podle tohoto vynálezu. Přesto není tento vynález omezen na určitá provedení výše popsána, ale zahrnuje všechny jeho modifikace v rozsahu následujících patentových nároků. Různé odkazy na časopisy, patentové a jiné publikace, které jsou zde cytovány shrnují stav techniky a jsou zde zařazeny v plném rozsahu podle odkazů.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že obsahuje sloučeninu obecného vzorce I:



(I)

ve kterém

R₁ je arylová skupina;

R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylové skupiny;

R₃ je vybrán ze souboru sestávajícího z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a cykloalkylové skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku; a

R₂ a R₃ mohou být spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až 7 atomech vybraných ze souboru sestávajícího z atomu uhlíku, dusíku, kyslíku a síry;

a farmaceuticky přijatelný nosič, ředidlo nebo excipient.

2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_2 je atom vodíku.

3. Farmaceutický prostředek podle nároku 2,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_3 je vybrán ze
souboru sestávajícího z butylové a cyklohexylové skupiny.

4. Farmaceutický prostředek podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_2 a R_3 mohou být
spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až
7 atomech vybraných ze souboru sestávajícího z atomu uhlíku,
dusíku, kyslíku a síry.

5. Farmaceutický prostředek podle nároku 4,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_3 je vybrán ze
souboru sestávajícího z morfolynylové a piperidylové
skupiny.

6. Farmaceutický prostředek podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená sloučenina je
vybrána ze souboru sestávajícího z:

3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanonu;

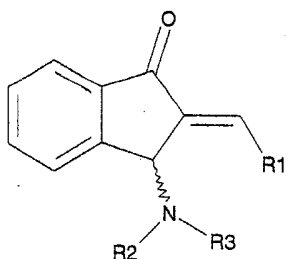
3-[(N-cyklohexyl)amino]-2-benzalindanonu;

3-morfolinyl-2-benzalindanonu; a

3-piperidyl-2-benzalindanonu.

7. Způsob inhibice NF- κ B v y z n a č u j í c í s e
t í m, že zahrnuje podávání pacientovi, který to potřebuje,

účinného množství sloučeniny obecného vzorce I:



(I)

ve kterém

R₁ je arylová skupina;

R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylové skupiny;

R₃ je vybrán ze souboru sestávajícího z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a cykloalkylové skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku; a

R₂ a R₃ mohou být spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až 7 atomech vybraných ze souboru sestávajícího z atomu uhlíku, dusíku, kyslíku a síry.

8. Způsob podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená sloučenina je vybrána ze souboru sestávajícího z:

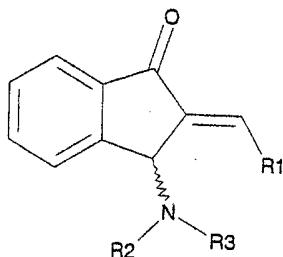
3-[(N-butyl) amino]-2-benzalindanonu;

3-[(N-cyklohexyl) amino]-2-benzalindanonu;

3-morfolinyl-2-benzalindanonu; a

3-piperidyl-2-benzalindanonu.

9. Způsob léčby onemocnění charakterizovaného excesivní aktivací NF- κ B, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje inhibování uvedené excesivní aktivace podáváním pacientovi, který to potřebuje, účinného množství sloučeniny obecného vzorce I:



(I)

ve kterém

R₁ je arylová skupina;

R₂ je vybrán ze skupiny sestávající z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylové skupiny;

R₃ je vybrán ze skupiny sestávající z alkylové skupiny s

1 až 6 atomy uhlíku a cykloalkylové skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku; a

R₂ a R₃ mohou být spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až 7 atomech vybraných ze skupiny sestávající z atomu uhlíku, dusíku, kyslíku a síry;

a jejich farmaceuticky přijatelných solí, hydrátů a solvátů.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená sloučenina je vybrána ze souboru sestávajícího z:

3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanonu;

3-[(N-cyklohexyl)amino]-2-benzalindanonu;

3-morfolinyl-2-benzalindanonu; a

3-piperidyl-2-benzalindanonu.

11. Způsob podle nároku 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným onemocněním je zánětlivé onemocnění.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z revmatoidní artritidy, zánětlivého onemocnění střeva a astmatu.

13. Způsob podle nároku 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným onemocněním je dermatóza.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z psoriázy a atopické dermatitidy.

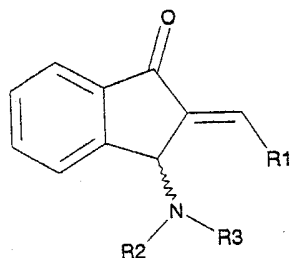
15. Způsob podle nároku 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z autoimunitních onemocnění; odhojení tkání a orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; asteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiiektasie.

16. Způsob podle nároku 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným onemocněním je rakovina.

17. Způsob podle nároku 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou rakovinou je Hodgkinova choroba.

18. Způsob podle nároku 9 a 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným onemocněním je AIDS.

19. Použití sloučeniny obecného vzorce I:



(I)

ve kterém

R₁ je arylová skupina;

R₂ je vybrán ze souboru sestávajícího z atomu vodíku, alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a arylové skupiny;

R₃ je vybrán ze souboru sestávajícího z alkylové skupiny s 1 až 6 atomy uhlíku a cykloalkylové skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku; a

R₂ a R₃ mohou být spolu spojeny dohromady a tvořit heterocyklický kruh o 5 až 7 atomech vybraných ze souboru sestávajícího z atomu uhlíku, dusíku, kyslíku a síry;

a její farmaceuticky přijatelný é soli, hydrátu a solvátu pro výrobu léku pro inhibici onemocnění charakterizovaného excesivní aktivací NF- κ B.

20. Použití podle nároku 19, kde sloučenina je vybrána ze souboru sestávajícího z:

3-[(N-butyl)amino]-2-benzalindanonu;

3-[(N-cyklohexyl)amino]-2-benzalindanonu;

3-morfolinyl-2-benzalindanonu; a

3-piperidyl-2-benzalindanonu.

21. Použití podle nároků 19 nebo 20, kde uvedeným onemocněním je zánětlivé onemocnění.

22. Použití podle nároku 21, kde uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z revmatoidní artritidy, zánětlivého onemocnění střeva a astmatu.

23. Použití podle nároků 19 a 20, kde uvedeným onemocněním je dermatóza.

24. Použití podle nároku 23, kde uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z psoriázy a atopické dermatitidy.

25. Použití podle nároků 19 a 20, kde uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny sestávající z autoimunitních onemocnění; odhojení tkání a orgánů; Alzheimerovy choroby; mrtvice; aterosklerózy; restenózy; asteoartritidy; osteoporózy a ataxie teleangiektasie.

26. Použití podle nároků 19 a 20, kde uvedeným

onemocněním je rakovina.

27. Použití podle nároku 26, kde uvedenou rakovinou je Hodgkinova choroba.

28. Použití podle nároků 19 a 20, kde uvedeným onemocněním je AIDS.