

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 018548

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.08.30

(21) Номер заявки
200970178

(22) Дата подачи заявки
2007.08.01

(51) Int. Cl. **C07D 403/12 (2006.01)**
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07D 241/08 (2006.01)
C07H 5/06 (2006.01)
C07K 5/083 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01)

(54) ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) 60/835,428

(56) CA-2523467

(32) 2006.08.04

CA-2417960

(33) US

CA-1257265

(43) 2009.08.28

US-5932579

(86) PCT/CA2007/001357

(87) WO 2008/014613 2008.02.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

МАНУС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
(КАНАДА) ЛТД. (CA)

(72) Изобретатель:

Дейгин Владислав И. (CA)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

018548
B1

(57) Изобретение относится к полифункциональному биологически активному соединению формулы (I), состоящему из иммунорегуляторного фрагмента, связанного с группой стабилизатора, и их фармацевтическим композициям, пригодным для лечения иммунных нарушений и гемопоэтических нарушений, таких как иммунная цитопения, множественная миелома, хронический лимфоидный лейкоз, лимфоцитарная лимфома, лимфосаркома.

B1
—

018548
—

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее соединение относится к соединениям, композициям, способам и применением нового подхода к введению биологически активных соединений пациентам, нуждающимся в этом.

Уровень техники

Лучевая терапия и химиотерапия являются общепризнанными способами лечения злокачественных заболеваний. Клетки, которые быстро растут и делятся, являются наиболее чувствительными к действию облучения и цитотоксических агентов. Среди клеток, которые поражаются, находятся как опухолевые клетки, так и нормальные клетки, включая клетки волос и кишечника, и клетки гемопоэтической и иммунной системы. Часто повреждение нормальных клеток гемопоэтической и иммунной системы под воздействием облучения и цитотоксических агентов имеет угрожающие жизни последствия, и это ограничивает возможность вводить полную терапевтическую дозу.

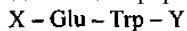
Проводились интенсивные исследования с целью установления средств, которые будут защищать нормальные гемопоэтические и иммунологические клетки от воздействия лучевой терапии и химиотерапии или с целью восстановления клеток, подвергшихся супрессии в результате проведения данных видов лечения. Например, сообщалось, что трансформирующий фактор роста бета-1 является пригодным для защиты гемопоэтических стволовых клеток от миелотоксического воздействия химиотерапевтических препаратов или лучевой терапии (патент США № 5278145, Keller et al.). Также сообщалось, что лиофилизованная композиция, содержащая человеческий альбумин в тимозине альфа-1, проявляет защитную активность в отношении прогрессирования лейкемии у мышей, иммунная система которых сильно поражена под воздействием цитостатиков или лучевой терапии. Гемопоэтические факторы роста, такие как интерлейкин-3 и CSF (КСФ), применяли для потенцирования иммунного ответа или оказания помощи в восстановлении нормальной крови после супрессии гемопоэтических клеток, вызванной облучением или химиотерапией (WO 88/05469, Anderson et al.; патент США 4959455, Ciarletta et al.; патент США 4999291, Souza).

Semina et al. (Radiatsionnaya Biologiya Radioekologiya, 33(3), 1993; WO 89/06134) показали, чтолевовращающий (L) энантиомер дипептида H-Glu-Trp-OH функционирует в качестве иммуностимулятора и может индуцировать пролиферацию клеток. То есть данные дипептиды являются пригодными для восстановления гемопоэтических и иммунных клеток после химиотерапии или лучевой терапии.

Было синтезировано несколько пептидов с иммунорегуляторными свойствами (например, SU 1582393; EP 230052; патент США 4190646; патент США 5008246 и патент США 5013723). Многие научно-исследовательские лаборатории пытались разработать способы получения синтетических производных природных пептидов, которые являются более активными по сравнению с их природными аналогами (например, Европейский патент 136720 и Европейский патент 137904).

В патенте Австралии AU-B-29308/89 (соответствует WO 89/06134) раскрывается получение Glu-Trp и его применение для лечения иммунодефицитных состояний. В WO 93/08815, Khavinson et al. раскрывается пептид Glu-Trp и его циклические мономеры и полимеры для применения при лечении иммуносупрессии.

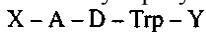
Deigin et al. в патентах США 6051683, выданном 18 апреля 2000, и 6159940, выданном 12 декабря 2002, описывают иммунорегуляторные пептиды общей формулы



которые могут стимулировать иммунный ответ и модулировать гемопоэз;

где X представляет собой атом водорода, глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, N-валин, пролин, тирозин, фенилаланин, триптофан, D-аланин, D-лейцин, D-изолейцин, D-валин, D-N-валин, D-пролин, D-тироzin, D-фенилаланин, D-триптофан, γ -аминомасляную кислоту или ξ -аминокапроновую кислоту; Y представляет собой глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, N-валин, пролин, тирозин, фенилаланин, триптофан, D-аланин, D-лейцин, D-изолейцин, D-валин, D-N-валин, D-пролин, D-тироzin, D-фенилаланин, D-триптофан, γ -аминомасляную кислоту, ξ -аминокапроновую кислоту, -OH, NH₂, N₂H₃ или моно- или дизамещенный амид (C1-C3); и более конкретно H-Ile-Glu-Trp-OH.

Deigin et al. в патентах США 5736519, выданном 7 апреля 1998; 6103699, выданном 15 августа 2000, и 6410515, выданном 25 июня 2003, описывают иммунорегуляторные пептиды общей формулы



для восстановления клеток после лучевой терапии или химиотерапии, для ингибирования пролиферации клеток и для иммуносупрессии, где X представляет собой атом водорода, глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, N-валин, пролин, тирозин, фенилаланин, триптофан, D-аланин, D-лейцин, D-изолейцин, D-валин, D-N-валин, D-пролин, D-тироzin, D-фенилаланин, D-триптофан, γ -аминомасляную кислоту или ξ -аминокапроновую кислоту; A представляет собой D-глутаминовую кислоту или D- γ -глутаминовую кислоту и Y представляет собой глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, N-валин, пролин, тирозин, фенилаланин, триптофан, D-аланин, D-лейцин, D-изолейцин, D-валин, D-N-валин, D-пролин, D-тироzin, D-фенилаланин, D-триптофан, γ -аминомасляную кислоту, ξ -аминокапроновую кислоту, гидроксильную или амидную группу; и более конкретно H- γ -DGLu-Trp-OH.

Deigin et al. в патентах США 6184208, выданном 6 февраля 2001 г., и 6248716, выданном 19 июня

2001 г., описывают иммунорегуляторные пептиды общей формулы



которые снижают стресс, стимулируют прибавление массы тела, зону роста эпителия, заживление ран и репаративные и анаболические процессы; где X представляет собой атом водорода, аргинин, D-аргинин, орнитин, D-орнитин, лизин, D-лизин, гомоаргинин, D-гомоаргинин, цитруллин, D-цитруллин; Тут представляет собой тирозин; Y представляет собой D-аланин, D-валин, D-лейцин, D-изолейцин, D-фенилаланин, D-аспарагин, D-триптофан, D-пролин, D-серин, D-треонин, D-тироzin, D-оксипролин, D-цистеин, D-цистеилцистеин, D-метионин, D-лизин, D-гомоаргинин, D-аргинин, D-гистидин, D-аспарагиновую кислоту, D-глутаминовую кислоту, D-β-аланин или D-орнитин; Phe представляет собой фенилаланин; Z представляет собой аланин, D-аланин, валин, D-валин, лейцин, D-лейцин, изолейцин, D-изолейцин, фенилаланин, D-фенилаланин, аспарагин, D-аспарагин, глицин, глутамин, D-глутамин, триптофан, D-триптофан, пролин, D-пролин, серин, D-серин, треонин, D-треонин, тирозин, D-тироzin, гидроксипролин, D-гидроксипролин, цистеин, D-цистеин, цистеилцистеин, цистеин-D-цистеин, D-цистеилцистеин, D-цистеин-D-цистеин, метионин, D-метионин, лизин, D-лизин, аргинин, D-аргинин, гистидин, D-гистидин, аспарагиновую кислоту, D-аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, D-глутаминовую кислоту, β-аланин, D-β-аланин, орнитин или D-орнитин; и A представляет собой гидроксил или замещенный амид (C1-C3); и более конкретно H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH.

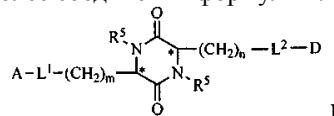
Композиции для доставки, в частности пероральной доставки активных веществ, содержащих систему на основе дикетопиперазина, описаны в нескольких патентах и заявках на патент, принадлежащих Emisphere Technologies, Inc., включая, например, патенты США № 6663898, 6395774, 6331318, 5976569 и 5693338, а также заявки на патент США № 20030198658, 20030155993 и 20030028250. В данных композициях, как правило, дикетопиперазин добавляют в виде отдельного компонента.

Остается потребность в эффективных способах доставки биологически активных соединений в организм, которые можно легко приспособить для любых применений или многочисленных применений.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение представляет новую основу для терапевтической доставки полифункциональных биологически активных соединений. Изобретение относится к молекулам, которые обладают иммунорегуляторным фрагментом, связанным с группой стабилизатора. Группа стабилизатора функционирует в качестве эффективного носителя иммунорегулятора в организме. Кроме того, иммунорегулятор и стабилизатор могут быть необязательно соединены с другой функциональной биологически активной молекулой. Биологически активная молекула обладает либо дополнительной иммунорегуляторной активностью, либо активностью, которая дополняет или действует синергически с иммунорегуляторным фрагментом, либо обладает другой терапевтической активностью.

Следовательно, настоящее изобретение включает полифункциональное биологически активное соединение, выбранное из одного или более соединений формулы I:



где А представляет собой иммунорегуляторную группу, выбранную из группы, состоящей из Trp, Tyr, Phe, His, арила или гетероарила, где арильная и гетероарильная группы могут быть необязательно замещены 1-6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₂₋₆алкенила, C₂₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкил)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила, и где гетероарил представляет собой ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее 5-10 атомов углерода, в котором 1-4 атома углерода заменены гетероатомом, выбранным из одного или более из O, S и N-R¹, где R¹ выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₄алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂-арила, когда атом N sp³-гибридизован, или представляет собой одиночную пару электронов, когда атом N sp²-гибридизован;

L¹ и L², каждый независимо, представляют собой линкер, выбранный из группы, состоящей из простой связи, -C(O)-, C(O)NR², -NR²C(O)-, -NR²-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂, -S- и -O-;

R² выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₄алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂-арила;

R⁵ представляет собой H или C₁₋₆алкил;

* является L- или D-конфигурацией или их смесью;

m равно целому числу от 1 до 50;

n равно целому числу от 0 до 50;

D выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, любой боковой цепи аминокислоты и любой функционально активной молекулы, и

его фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим полифункциональное биологически активное соединение по изобретению и фармацевтически приемлем-

мый носитель.

Также в настоящее изобретение входят способы лечения иммунных нарушений и необязательно других нарушений у одного и того же субъекта, включающие введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Кроме того, изобретение относится к применению полифункционального биологически активного соединения по изобретению для лечения иммунных нарушений и необязательно других нарушений у одного и того же субъекта, а также применению полифункционального биологически активного соединения по изобретению для получения лекарственного средства для лечения иммунных нарушений и необязательно других нарушений у одного и того же субъекта.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из последующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления изобретения, приведены только для иллюстрации, поскольку специалистам в данной области, исходя из подробного описания, станут очевидными различные изменения и модификации, не отступая от сущности и объема изобретения.

Краткое описание чертежей

Далее изобретение будет описано при обращении к чертежам, на которых:

на фиг. 1 представлен ЯМР-спектр цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe), которое является соединением по одному из вариантов осуществления настоящего изобретения;

на фиг. 2 представлен график титрационного разведения OVA+CFA;

на фиг. 3 представлен график титрационного разведения соединений 33a, 33b, 17 и OVA;

на фиг. 4 представлен график, показывающий адьювантную активность соединений 17, 19, 26a, 26b, 33a, 33b и OVA.

Подробное описание изобретения

i. Определения.

По тексту описания использовали следующие обычные сокращения аминокислотных остатков: Ala - аланин; Arg - аргинин; Asn - аспарагин; Asp - аспарагиновая кислота; Cys -цистеин; Glu - глутаминовая кислота; iGlu - изоглутаминовая кислота; Gln - глутамин; His - гистидин; Lys - лизин; Met -метионин; Ser - серин; Thr - треонин; Phe - фенилаланин; Gly - глицин; Пе - изолейцин; Leu - лейцин; Pro - пролин; Val - валин; Nval - N-валин; Trp - триптофан и Туг - тирозин.

Термин "Ph" означает фенил.

Термин "Bn" означает бензил.

Термин "Me" означает метил.

Как использовано в данном описании, термин "алкил" означает алкильные группы с прямой и/или разветвленной цепью, содержащие от 1 до 6 атомов углерода, и включает метил, этил, пропил, изопропил, трет-бутил, пентил, гексил и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "алcoxси" означает алcoxсигруппы с прямой и/или разветвленной цепью, содержащие от 1 до 6 атомов углерода, и включает метокси, этокси, пропилокси, изопропилокси, трет-бутокси, гексилокси и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "алкенил" означает алкенильные группы с прямой и/или разветвленной цепью, содержащие от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 двойных связей, и включает винил, аллил, 1-бутенил, 2-гексенил и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "алкенилокси" означает алкенилоксигруппы с прямой и/или разветвленной цепью, содержащие от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 двойных связей, и включает винилокси, аллилокси, пропенилокси, бутенилокси, гексенилокси и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "алкилен" означает бифункциональные алкильные группы с прямой и/или разветвленной цепью, содержащие определенное количество атомов углерода.

Как использовано в данном описании, термин "галоген" означает атом галогена и включает атомы хлора, фтора, брома, йода и т.п.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает совместимый с лечением животных, в частности людей.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" означает аддитивную соль кислоты или аддитивную соль основания, которая является подходящей для или совместимой с лечением животных, в частности людей.

Как использовано в данном описании, термин "фармацевтически приемлемая аддитивная соль кислоты" означает нетоксичную органическую или неорганическую соль любого основного соединения по изобретению или любого из его промежуточных соединений. Основные соединения по изобретению, которые могут образовывать аддитивную соль кислоты, включают соединения с основным атомом азота, например NH₂ и NHC₁₋₄алкил. Иллюстративные неорганические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают хлористо-водородную, бромисто-водородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как моногидроортфосфат натрия и гидросульфат калия. Иллюстративные органические кислоты, которые образуют подходящие соли, включают моно-, ди- или трикарбоновые кислоты, такие как гликоловая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблоч-

ная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, циннамовая и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут образоваться соли одно- или двухосновных кислот, и такие соли могут находиться в гидратированной, сольватированной или, по существу, безводной форме. В основном аддитивные соли кислоты соединений по изобретению являются более растворимыми в воде и различных гидрофильных органических растворителях и обычно имеют более высокие значения точки плавления по сравнению с соответствующими свободными основаниями. Специалист в данной области сможет выбрать подходящую соль. Можно использовать другие нефармацевтически приемлемые соли, например оксалаты, например, при выделении соединений по изобретению для применения в лабораторных условиях или для последующего преобразования в фармацевтически приемлемые аддитивные соли кислоты.

Как использовано в данном описании, термин "фармацевтически приемлемая аддитивная соль основания" означает любую нетоксичную аддитивную соль органического или неорганического основания любого кислого соединения по изобретению. Иллюстративные неорганические основания, которые образуют подходящие соли, включают гидроксид лития, натрия, калия, кальция, магния или бария. Иллюстративные органические основания, которые образуют подходящие соли, включают алифатические, алициклические или ароматические органические амины, такие как метиламин, триэтиламин и пиколин, или аммиак. Специалист в данной области сможет выбрать подходящую соль.

Как использовано в данном описании, термин "сольват" означает соединение по изобретению или фармацевтически приемлемую соль соединения по изобретению, в которых молекулы подходящего растворителя входят в состав кристаллической решетки. Подходящим растворителем является физиологически переносимый во вводимых дозах. Примерами подходящих растворителей являются этанол, вода и т.п. В том случае, когда растворителем является вода, то молекула относится к "гидрату".

Как использовано в данном описании, термин "соединение(я) по изобретению" означает соединение(я) формулы I и/или его (их) фармацевтически приемлемые соли, сольваты и/или пролекарства.

Следует понимать, что настоящее изобретение включает фармацевтически приемлемые соли, сольваты и/или пролекарства соединений по изобретению и смеси, содержащие два или более соединений по изобретению, фармацевтически приемлемых солей соединений по изобретению (в тех случаях, когда они применимы), фармацевтически приемлемых сольватов соединений по изобретению и пролекарств соединений по изобретению.

Как использовано в данном описании, термины "эффективное количество" или "достаточное количество" средства означают такое количество, которое достаточно для обеспечения целебного или желаемого эффекта, включая клинические эффекты, и тогда "эффективное количество" зависит от контекста, в котором термин используется. Например, в контексте введения средства, которое функционирует в качестве иммуномодулятора, эффективным количеством средства является, например, количество, достаточное для обеспечения модуляции иммунного ответа по сравнению с ответом, полученным без введения средства.

Как использовано в данном описании и хорошо понимается в данной области, термин "лечение" означает подход для получения целебного или желаемого эффекта, включая клинические эффекты. Целевые или желаемые клинические эффекты могут включать, например, но не ограничиваются ими, ослабление или уменьшение одного или более симптомов или состояний, снижение выраженности заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) заболевания, профилактику распространения заболевания, снижение или замедление прогрессирования заболевания, ослабление или облегчение заболевания и ремиссию (частичную или полную), детектируемую или не детектируемую. "Лечение" также может означать пролонгацию выживаемости по сравнению с предполагаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

"Облегчение" заболевания или нарушения означает, что степень и/или нежелательные клинические проявления нарушения или заболевания ослабляются, и/или замедляется или удлиняется время их прогрессирования по сравнению с отсутствием лечения нарушения.

Как использовано в данном описании, термин "модулировать" включает подавление или супрессию функции или активности (такой как иммунный ответ), а также повышение функции или активности.

"Ингибировать" или "супрессировать", или "снижать" функцию или активность, такую как иммунный ответ, означает снижать функцию или активность по сравнению с такими же состояниями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другими состояниями.

"Усиливать" или "увеличивать", или "стимулировать" функцию или активность, такую как иммунный ответ, означает повышать функцию или активность по сравнению с такими же состояниями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другими состояниями.

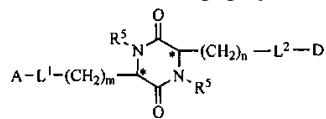
Как использовано в данном описании, термин "субъект" включает всех членов животного мира, включая человека. Предпочтительно субъектом является человек.

ii. Соединения по изобретению.

Настоящее изобретение относится к соединениям, содержащим иммунорегуляторный фрагмент,

группу стабилизатора и необязательно дополнительный функционально активный фрагмент. Фрагменты соединяются вместе посредством различных линкеров с обеспечением полифункционального соединения, которое можно использовать для лечения многих нарушений у одного и того же субъекта.

Следовательно, настоящее изобретение включает полифункциональное биологически активное соединение, выбранное из одного или более соединений формулы I



I

где А представляет собой иммунорегуляторную группу, выбранную из группы, состоящей из Тгр, Туг, Phe, His, арила или гетероарила, где арильная и гетероарильная группы могут быть необязательно замещены 1-6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₂₋₆алкенила, C₂₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкил)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила, и где гетероарил представляет собой ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее 5-10 атомов углерода, в котором 1-4 атома углерода заменены гетероатомом, выбранным из одного или более из O, S и N-R¹, где R¹ выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₄алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂-арила, когда атом N sp³-гибридизован, или представляет собой одиночную пару электронов, когда атом N sp²-гибридизован;

L¹ и L², каждый независимо, представляют собой линкер, выбранный из группы, состоящей из простой связи, -C(O)-, C(O)NR²-, -NR²C(O)-, -NR²-, -C(O)-O-, -OC(O)-, -S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂, -S- и -O-;

R² выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂-арила;

R⁵ представляет собой H или C₁₋₆алкил;

* является L- или D-конфигурацией или их смесь;

m равно целому числу от 1 до 50;

n равно целому числу от 0 до 50;

D выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, любой боковой цепи аминокислоты и любой функционально активной молекулы,

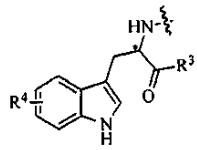
и его фармацевтически приемлемые соли, сольваты и пролекарства.

В соединениях по настоящему изобретению А представляет собой иммунорегуляторную группу. Термин "иммунорегуляторная группа" относится к любой ароматической или гетероароматической группе, обладающей иммуно- или гемосупрессорной активностью или иммуно- или гемостимулирующей активностью. В частности, А выбирают из группы, состоящей из Тгр, Туг, Phe, His, арила или гетероарила, где арильная и гетероарильная группы могут быть необязательно замещены 1-6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₂₋₆алкенила, C₂₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкил)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила, и где гетероарил представляет собой ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее 5-10 атомов углерода, в котором 1-4 атома углерода заменены гетероатомом, выбранным из одного или более из O, S и N-R¹, где R¹ выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂-арила, когда атом N sp³-гибридизован, или представляет собой одиночную пару электронов, когда атом N sp²-гибридизован. В вариантах осуществления изобретения А выбирают из группы, состоящей из Тгр, Туг, Phe, His, арила или гетероарила, где арильная и гетероарильная группы могут быть необязательно замещены 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из атома галогена, OH, OC₁₋₄алкокси, C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, C₂₋₄алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкил)(C₁₋₄алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₄алкила, C(O)OC₁₋₄алкила, SO₂C₁₋₄алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₄алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила, и где гетероарил представляет собой ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее 5-10 атомов углерода, в котором 1-3 атома углерода заменены гетероатомом, выбранным из одного или более из O, S и N-R¹, где R¹ выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₄алкила, C₁₋₂алкиленарила, C(O)C₁₋₄алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₄алкила и SO₂-арила, когда атом N sp³-гибридизован, или представляет собой одиночную пару электронов, когда атом N sp²-гибридизован. В дополнительных вариантах осуществления А выбирают из группы, состоящей из Тгр, арила и гетероарила, где арил представляет собой фенил или нафтил, и гетероарил представляет собой пиридинил, имидазолил, тиенил, фуранил, индолил, изохинолинил, хинолинил,ベンゾтиенил,ベンゾフуранил,ベンゾтиазолил,тиазоло,ベンзооксазолил,ベンзоизотиазолил или тому подобное, при этом индольное кольцо Тгр, арил и гетероарил являются незамещенными или замещены 1-2 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из атома галогена, OH, OC₁₋₄алкокси, C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, C₂₋₄алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкил)(C₁₋₄алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₄алкила, C(O)OC₁₋₄алкила, SO₂C₁₋₄алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₄алкила, фенила и C₁₋₄алкиленфенила.

В том случае, когда А выбирают из Тгр, Туг, Phe или His, данная группа может быть соединена с

линкером посредством аминогруппы или карбоксильной группы. При отсутствии связи с линкером свободная аминогруппа или карбоксильная группа может быть преобразована в производное. Например, аминогруппа может быть моно- или диалкилирована C₁₋₆алкилом, ацилирована C(O)C₁₋₆алкилом или преобразована в NH₃⁺ добавлением фармацевтически приемлемой кислоты. Кроме того, карбоксильную группу можно подвергнуть этерификации, например, с образованием C₁₋₆алкилового эфира, преобразовать в соответствующий амид, который также может быть моно- или диэтерифицирован C₁₋₆алкилом, преобразован в его соответствующий гидразин или в его соответствующую аддитивную соль основания. В другом аспекте настоящего изобретения было обнаружено, что когда А является Trp, то иммуно- или гемомодулирующую активность данной группы можно контролировать стереохимией α -углерода. Например, когда стереохимия представляет собой D-конфигурацию, то данная группа может обладать иммуно- или гемосупрессорной активностью, и когда она представляет собой L-конфигурацию, она может обладать иммуно- или гемостимулирующей активностью. Следовательно, иммуномодулирующую активность молекул по настоящему изобретению можно контролировать и приспособливать для конкретных применений и комбинированной терапии.

В варианте осуществления изобретения А представляет собой группу формулы II



Trp II

где R³ выбирают из группы, состоящей из H, OC₁₋₆алкила, NH₂, NHC₁₋₆алкила, N(C₁₋₆алкила)₂, NHNH₂ и OY, где Y представляет собой фармацевтически приемлемый катион; R⁴ представляет собой 1-4 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкенила, C₁₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкила)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила; и

* является L- или D-конфигурацией или их смесью.

Настоящее изобретение включает соединения формулы I, где R³ выбирают из группы, состоящей из H, OC₁₋₆алкила, NH₂, NHC₁₋₆алкила, N(C₁₋₆алкила)₂, NHNH₂ и OY, где Y представляет собой фармацевтически приемлемый катион. В вариантах осуществления R³ выбирают из группы, состоящей из H, OC₁₋₄алкила, NH₂, NHC₁₋₄алкила, N(C₁₋₄алкила)₂, NHNH₂ и OY. В дополнительных вариантах осуществления изобретения R³ выбирают из группы, состоящей из H, Me, NH₂, NHMe, NMe₂, NHNH₂ и OY. Катион "Y" может представлять любой фармацевтически приемлемый катион, например Na⁺, K⁺ и Zn⁺.

Соединения формулы I также включают соединения, где R⁴ представляет собой 1-4 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкенила, C₁₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкила)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила. В вариантах осуществления изобретения R⁴ представляет собой 1-3 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OC₁₋₄алкокси, C₁₋₄алкила, C₂₋₄алкенила, C₂₋₄алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₄алкила), N(C₁₋₄алкила)(C₁₋₄алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₄алкила, C(O)OC₁₋₄алкила, SO₂C₁₋₄алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₄алкила, фенила и C₁₋₄алкиленфенила. В других вариантах осуществления R⁴ представляет собой 1-3 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OMe, Me, винила, винилокси, NH₂, NHMe, NMe₂, CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)Me, C(O)OMe, SO₂Me, SO₂NH₂, SO₂NHMe, фенила и бензила. В еще одних дополнительных вариантах осуществления изобретения R⁴ является заместителем, выбранным из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OMe, Me, винила, винилокси, NH₂, NHMe, NMe₂, CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)Me, C(O)OMe, SO₂Me, SO₂NH₂, SO₂NHMe, фенила и бензила. В еще одних дополнительных вариантах осуществления изобретения R⁴ является H.

В полифункциональных биологически активных соединениях по настоящему изобретению каждый из L¹ и L² является линкером, независимо выбранным из группы, состоящей из простой связи, C(O)-, -C(O)NR²- , -NR²C(O)-, -NR²- , -C(O)-O-, -OC(O)-, -S-S-, SO₂NR²-, NR²SO₂, -S- и -O-, где R² выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, C₁₋₆алкиленарила, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)арила, SO₂C₁₋₆алкила и SO₂арила. В вариантах осуществления изобретения каждый L¹ и L² независимо выбирают из группы, состоящей из простой связи, -C(O)-, -C(O)NR²- , -NR²C(O)-, -NR²- , -C(O)-O-, -OC(O)- и -O-. В дополнительных вариантах осуществления изобретения каждый из L¹ и L² независимо выбирают из группы, состоящей из -C(O)-, -NR²- , -C(O)NR²- и -NR²C(O)-. В других вариантах осуществления R² выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₄алкила, C₁₋₄алкиленарила, C(O)C₁₋₄алкила, C(O)Ph, SO₂C₁₋₄алкила и SO₂Ph. В еще одних вариантах осуществления изобретения R² выбирают из группы, состоящей из H, Me, Bn, C(O)Me, C(O)Ph, SO₂Me и SO₂Ph. В еще одних дополнительных вариантах осуществления изобретения R² является H.

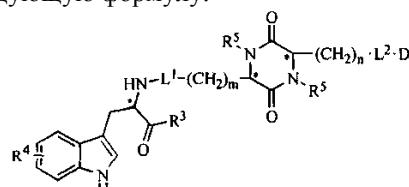
В биологически активных соединениях по изобретению т равно целому числу от 1 до 50. В вариантах осуществления изобретения т равно целому числу от 1 до 25. В других вариантах осуществления изобретения т равно целому числу от 1 до 10. В еще одних вариантах осуществления изобретения т равно целому числу от 1 до 6.

Полифункциональные биологически активные соединения по изобретению включают соединения, где т равно целому числу от 0 до 50. В вариантах осуществления изобретения т равно целому числу от 0 до 25. В других вариантах осуществления изобретения т равно целому числу от 0 до 10.

Соединения формулы I включают соединения, где R⁵ выбирают из группы, состоящей из H и C₁₋₆алкила, и * является D- и L-конфигурацией или их смесью. В вариантах осуществления изобретения R⁵ выбирают из группы, состоящей из H и C₁₋₄алкила, конкретно H и Me. В других вариантах осуществления изобретения обе *, по существу, находятся в D-конфигурации или обе находятся, по существу, в L-конфигурации.

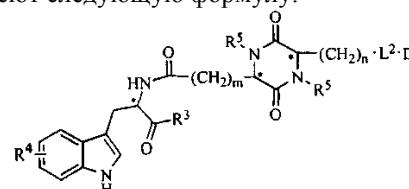
Полифункциональные биологически активные соединения по изобретению также включают соединения, где D выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₆алкила, любой боковой цепи аминокислоты и любой функциональной биологически активной молекулы. В вариантах осуществления изобретения D выбирают из группы, состоящей из H, C₁₋₄алкила, любой боковой цепи аминокислоты и любой функциональной биологически активной молекулы. Под функциональной биологически активной молекулой понимается любая молекула, оказывающая фармакологическое воздействие на субъекта. Данное фармакологическое воздействие может представлять воздействие, которое дополняет, повышает или действует синергически с иммунорегуляторной группой А, или оно может обеспечивать другое терапевтическое действие таким образом, что когда биологически активные соединения по изобретению вводят субъекту, обеспечивается комбинированная терапия. Можно использовать более чем одну функциональную биологически активную молекулу. Примеры функциональных биологически активных молекул включают, но не ограничиваются ими, адьюванты, такие как пальмитоил; анальгетики, такие как пептидные анальгетики; опиаты и антидоты, такие как дерморфин, морфин, налоксон и их производные; синтетические вакцины, такие как антигенные детерминанты - Т- и В-эпипотопы; антибиотики, такие как фусидовые кислоты, фармацевтические фармакофоры, включая малые молекулы, такие как метотрексат, диклофенак, ибупрофен, индометацин, напроксен, кетопрофен; сахара; липиды и нуклеотиды.

В варианте осуществления настоящего изобретения полифункциональные биологически активные соединения формулы I имеют следующую формулу:



где L¹, L², D, R³, R⁴, R⁵, m, n и * имеют значения, определенные выше.

В дополнительном варианте осуществления изобретения полифункциональные биологически активные соединения формулы I имеют следующую формулу:



где L², D, R³, R⁴, R⁵, m, n и * имеют значения, определенные выше.

Примеры полифункциональных биологически активных соединений и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов и пролекарств, представляющих конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены в табл. 1 и 9.

Все соединения по изобретению содержат более чем один асимметричный центр. В тех случаях, когда соединения по изобретению обладают более чем одним асимметричным центром, они могут находиться в виде диастереоизомеров. Следует понимать, что все такие изомеры и их смеси в любом соотношении входят в объем настоящего изобретения. Следует понимать, что, хотя, относительная стереохимия соединений по изобретению может быть показана в любом конкретном соединении, представленном в данном описании, такие соединения по изобретению также могут содержать определенные количества (например, менее чем 20%, предпочтительно менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5%) соединений по изобретению с альтернативной стереохимией.

Соединения по изобретению можно получить из известных исходных соединений с использованием способов, известных в данной области. Как правило, соединения получают сочетанием двух или более молекул вместе, например, с использованием обычной химии сочетания (например, образования пептидных связей, амидных связей, дисульфидных связей, сложноэфирных связей и т.п.). Дикетопиперазино-

вую группу можно получить с использованием известной химии. Например, дикетопиперазины можно получить циклодимеризацией эфиров аминокислот, как описано Katchalski et al. в J. Amer. Chem. Soc, 68, 879-880 (1946), циклизацией дипептидных сложноэфирных производных или термической дегидратацией аминокислотных производных и высококипящих растворителей, как описано Kopple et al. в J. Org. Chem., 33(2), 862-864 (1968).

В некоторых случаях химические способы получения соединений по изобретению можно модифицировать, например, с использованием защитных групп для предотвращения протекания побочных реакций за счет присутствия реакционноспособных групп, таких как реакционноспособные группы, присоединенные в качестве заместителей. Этого можно достичь с помощью использования обычных защитных групп, например, описанных в "Protective Groups in Organic Chemistry" McOmie, J.F.W. Ed., Plenum Press, 1973 и у Greene T.W. and Wuts P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 3rd Edition, 1999.

Желаемую соль соединения получают с использованием стандартных способов. Например, нейтральное соединение обрабатывают кислотой или основанием в подходящем растворителе и образовавшуюся соль выделяют фильтрованием, экстракцией или любым другим подходящим способом.

Получение сольватов соединений по изобретению будет варьировать в зависимости от соединения и сольваты. Как правило, сольваты образуются при растворении соединения в соответствующем растворителе и выделении сольватов при охлаждении или использовании антирастворителя. Обычно сольват сушат или подвергают азеотропной отгонке в условиях окружающей среды.

Настоящее изобретение включает в свой объем пролекарства соединений по изобретению. В основном такие пролекарства представляют собой функциональные производные соединения по изобретению, которые легко превращаются в условиях *in vivo* в соединение, из которого его обычно получают. Пролекарства соединений по изобретению могут представлять собой обычные сложные эфиры, образованные имеющейся гидроксильной, тиольной, аминогруппой или карбоксильной группой. Например, доступные группы OH и NH₂ в соединении по изобретению можно ацилировать с использованием активированной кислоты в присутствии основания и необязательно в инертном растворителе (например, хлорангидрид кислоты в пиридине). Некоторые обычные сложные эфиры, которые используют в качестве пролекарств, представляют собой сложные фениловые эфиры, (C₈-C₂₄) алифатические эфиры, ацилоксиметиловые эфиры, карбаматы и эфиры аминокислот. В других вариантах осуществления пролекарства соединений по изобретению являются соединениями, где одна или более гидроксильных групп "замаскированы" в виде групп, которые можно преобразовывать в гидроксигруппы в условиях *in vivo*. Обычные методы выбора и получения подходящих пролекарств описаны, например, в "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Настоящее изобретение включает радиоактивно меченные соединения по изобретению, например соединения по изобретению, меченные включением в их структуру ³H или ¹⁴C, или радиоактивного атома галогена, такого как ¹²⁵I. Радиоактивно мечено соединение по изобретению можно получить с использованием обычных способов, известных в данной области. Например, в соединение по изобретению можно включить тритий с использованием обычных методов, например, гидрированием подходящего предшественника в соединение по изобретению с использованием газообразного трития и катализатора.

Альтернативно, соединение по изобретению, содержащее радиоактивный йод, можно получить из соответствующего производного триалкилолова (соответственно триметилолова) с использованием условий стандартного йодирования, таких как использование [¹²⁵I]йодида натрия в присутствии хлорамина-T в подходящем растворителе, таком как диметилформамид. Производное триалкилолова можно получить из соответствующего нерадиоактивного галогенсодержащего, соответственно йодсодержащего, соединения с использованием обычного станилирования с катализатором палладием, например, гексаметилдиолова в присутствии тетракис(трифенилфосфин)палладия(0) в инертном растворителе, таком как диоксан, и при повышенной температуре, соответственно в пределах примерно от 50 до 100°C.

iii. Применения.

Настоящее изобретение относится к новым соединениям формулы I. Следовательно, настоящее изобретение включает все применения соединений по изобретению, включая их применение в терапевтических способах и фармацевтических композициях, их применение в диагностических тестах и их применение в качестве исследовательских инструментов.

Настоящее изобретение, в частности, относится к фармацевтическим композициям, содержащим полифункциональное биологически активное соединение по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Также в настоящее изобретение входят способы лечения иммунных нарушений и необязательно других нарушений у одного и того же субъекта, включающие введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Кроме того, предлагается применение полифункционального биологически активного соединения по изобретению для лечения иммунных нарушений и необязательно других нарушений у одного и того же субъекта, а также применение полифункционального биологически активного соединения по изобретению для получения лекарственного средства для лечения иммунных нарушений и необязательно других

нарушений у одного и того же субъекта.

В одном аспекте изобретение относится к способу модуляции иммунной системы и/или гемопоэза у животного, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В варианте осуществления изобретение относится к способу стимуляции иммунной системы, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В другом варианте осуществления изобретение относится к способу восстановления гемопоэза у животного с нарушенным гемопоэзом, например, вызванным облучением или цитостатическими средствами, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения гемопоэтических нарушений, например, но не ограничиваясь ими, иммунной цитопении, множественной миеломы, хронического лимфоидного лейкоза, лимфоцитарной лимфомы, лимфосаркомы и, в частности, В-клеточного лимфоидного лейкоза, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения иммунных и/или гемопоэтических нарушений, таких как рак, у животных, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, возможно в комбинации с цитостатическим средством. Цитостатическое средство может представлять, например, оксимочевину или гипертермию.

В еще одном варианте осуществления изобретение также относится к способу иммуносупрессии иммунной системы у животного, включающему введение эффективного количества полифункционального биологически активного соединения по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления соединение можно вводить перед трансплантацией органа или костного мозга. Иммунорегуляторные свойства соединений по изобретению можно контролировать, например, стереохимией фрагмента "A" или "*" в соединении.

Соединения по изобретению можно использовать в виде свободного основания, свободной кислоты, в виде солей, сольватов и/или пролекарств. Все формы входят в объем изобретения.

Согласно способам по изобретению описанные соединения, их соли, пролекарства или сольваты можно вводить пациенту в различных формах в зависимости от выбранного пути введения, как это понятно специалистам в данной области. Композиции по изобретению можно вводить, например, пероральным, парентеральным, буккальным, сублингвальным, внутриназальным, ректальным путем, в виде пластиря, насосного устройства или трансдермально (местно) и с использованием соответствующим образом формулированных фармацевтических композиций. Парентеральное введение включает внутриенный, внутрибрюшинный, подкожный, внутримышечный, трансепителиальный, внутриназальный, внутрипульмонарный, интратекальный, ректальный и местный пути введения. Парентеральное введение можно проводить непрерывной инфузией в течение выбранного периода времени.

Соединение по изобретению можно вводить перорально, например, с использованием инертного разбавителя или подвергающегося деградации пищевого носителя, или его можно включить в твердые или мягкие желатиновые капсулы, или его можно прессовать в таблетки, или его можно включить непосредственно в пищевые продукты рациона. Для перорального введения соединение по изобретению можно включить с эксципиентом и использовать в виде принимаемых внутрь таблеток, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, супензий, сиропов, облаток и т.п.

Соединение по изобретению также можно вводить парентерально. Растворы соединения по изобретению можно изготовить в воде, соответствующим образом смешав с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно изготовить дисперсии в глицерине, жидких полизиленгликолях, ДМСО и их смесях с или без спирта, и в маслах. Для хранения и применения в обычных условиях данные препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Специалистам в данной области известно, каким образом получить подходящие композиции. Обычные методы и ингредиенты для выбора и получения подходящих композиций описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (2003-20th edition) и в The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19), опубликованной в 1999 г.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для изготовления экстemporальных стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях формы должны быть стерильными и текучими до такой степени, чтобы их можно было легко набирать шприцом. Ампулы представляют удобные единичные дозированные формы.

Композиции для интраназального введения можно соответственно формулировать в виде аэрозолей, капель, гелей и порошков. Как правило, аэрозольные композиции содержат раствор или мелкую супензию активного вещества в физиологически приемлемом водном или неводном растворителе, и обычно они находятся в виде единичной или в виде множественной дозы в стерильной форме в запаян-

ном контейнере, который может иметь форму картриджа или для применения с помощью распыляющего устройства. Альтернативно, запаянный контейнер может представлять собой единичное распределительное устройство, такое как ингалятор для носа с одной дозой, или аэрозольное распределительное устройство, снабженное дозирующим клапаном, который предназначен для распределения после нажатия на него. В том случае, когда дозированная форма содержит аэрозольное распределительное устройство, она будет содержать пропеллент, который может представлять собой находящийся под давлением газ, такой как находящийся под давлением воздух или органический пропеллент, такой как фторхлоруглерод. Аэрозольные дозированные формы также могут находиться в форме распылителя с насосом.

Композиции, подходящие для буккального или сублигвального введения, включают таблетки, таблетки неправильной формы и пастилки, в которых активный ингредиент формулирован с носителем, таким как сахар, аравийская камедь, трагакант или желатин и глицерин. Композиции для ректального введения соответственно находятся в форме суппозиториев, содержащих обычную для суппозиториев основу, такую как какао-масло.

Композиции для местного применения могут включать, например, пропиленгликоль, изопропиловый спирт, минеральное масло и глицерин. Препараты, подходящие для местного применения, включают жидкые или полужидкие препараты, такие как линименты, лосьоны, аппликанты, эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, такие как кремы, мази или пасты; или растворы или суспензии, такие как капли. В дополнении к указанным выше ингредиентам препараты для местного применения могут включать один или несколько дополнительных ингредиентов, таких как разбавители, буферы, вкусовые вещества, связующие вещества, поверхностно-активные вещества, загустители, лубриканты, консерванты, например метилоксибензоат (включая антиоксиданты), эмульгаторы и т.п.

Можно формулировать композиции с замедленным или прямым высвобождением, например липосомы, или композиции, в которых активное вещество защищено оболочками, способными разрушаться дифференцированно, как полученные с использованием микроинкапсулирования, множественных оболочек и т.п. Также можно подвергнуть соединения по изобретению сушке вымораживанием и использовать полученные лиофилизаты, например, для получения продуктов для инъекций.

Соединения по изобретению можно вводить субъекту как таковые или в комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями, которые указаны выше, содержание которых определяется растворимостью и химической природой соединения, выбранным путем введения и стандартной фармацевтической практикой.

Дозировка соединений и/или композиций по изобретению может варьировать в зависимости от многих факторов, таких как фармакодинамические свойства соединения, способ введения, возраст, состояние здоровья и масса реципиента, природа и степень проявления симптомов, частота лечения и тип сопутствующего лечения, если таковое имеется, и клиренса соединения у субъекта, который подвергается лечению. Специалист в данной области может определить соответствующую дозировку с учетом указанных выше факторов. Например, при местном применении можно наносить мази, кремы или лосьоны, содержащие 1-1000 мкг/г соединения по изобретению. Препараты для перорального введения можно формулировать, предпочтительно в виде таблеток, капсул или капель, содержащих 0,5-1000 мкг соединения по изобретению на единичную дозу. Соединения по изобретению можно первоначально вводить в подходящей дозе, которую можно скорректировать при необходимости в зависимости от клинического ответа. Для обработки клеток *ex vivo* в течение короткого периода времени, например от 30 мин до 1 ч или более, можно использовать более высокие дозы по сравнению с длительной терапией *in vivo*.

В дополнение к указанным выше терапевтическим применениям соединения по изобретению полезны для постановки диагностических тестов, скрининговых тестов и в качестве исследовательских инструментов.

В диагностических тестах соединения по изобретению могут быть полезны для идентификации или детектирования иммунного нарушения. В таком варианте осуществления соединения по изобретению могут быть радиоактивно меченными (как описано выше) и контактировать с популяцией клеток. Присутствие радиоактивной метки в клетках может указывать на наличие иммунного нарушения.

В скрининговых тестах соединения по изобретению можно использовать для идентификации других соединений, которые модулируют иммунные ответы. В таких тестах соединения также могут содержать радиоактивную метку.

Последующие, неограничивающие примеры иллюстрируют настоящее изобретение.

Примеры

Материалы и методы.

ЯМР-спектры записывали на спектрометре Bruker Avance DRX 500. Спектры снимали в 0,6 мкл ($CD_3)_2SO$ при 30°C (99,95% дейтерия, Deiton, Санкт-Петербург). Использовали замедление релаксации, составляющее 5,0 с. 1H химические сдвиги определяли относительно сдвигов (выбранные произвольно как 2,5 м.д. при 30°C) сигнала ($CH_3)_2SO$.

ВЭЖХ анализ проводили на аналитическом хроматографе с градиентом System Gold Beckman. Колонка Ultrasphere-ODS, 5 мк, 205×4,6 мм. Детектирование - УФ-спектрофотометр, $\lambda=214$ нм. Комнатная температура. Градиент 0,02 М триэтиламмоний фосфат (рН 3,0) в ацетонитриле (от 0% буфера A до

100% буфера В). Буфер А - 15% 0,02 М триэтиламмоний фосфат в ацетонитриле. Буфер В - 50% 0,02 М триэтиламмоний фосфат в ацетонитриле.

Масс-спектры снимали на масс-спектрометре VISION 2000 MALDI.

Пример 1. Получение цикло-L-Ala-L-Glu(OH).

а. Получение Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)OH.

Boc-L-Ala-ONSu (56,5 г, 0,1 моль) и 26,1 г (0,11 моль) H-L-Glu(OBzl)OH смешивали с 500 мл смеси диоксин/вода (1:1) и N-метилморфоролином (11,7 мл) до тех пор, пока pH смеси не становился равным примерно 9-9,2. Суспензия растворялась после 12-18 ч выдерживания при комнатной температуре. Растворители выпаривали в вакууме и остаточное масло растворяли в 500 мл EtOAc, которое затем переносили в делительную воронку и промывали 3×200 мл 5% H₂SO₄ в воде до нейтрального pH. Органический слой отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. После сушки EtOAc выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт представлял собой масло, и выход составлял 40,5 г (~100%). R_f=0,6 (CHCl₃:EtOAc:MeOH=6:3:1).

б. Получение Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-Onp.

Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)OH (40,5 г, 0,1 моль) растворяли в 300 мл EtOAc и объединяли с 17 г (0,12 моль) п-нитрофенола. Реакцию проводили при 0°C в течение 1 ч. Затем добавляли DCC (24,7 г, 0,12 моль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0°C и в течение 4 ч при комнатной температуре. Осадок DCU отфильтровывали и растворитель выпаривали в вакууме. Остаточное масло растворяли в диэтиловом эфире. Осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром и гексаном. Выход составлял 35 г (64%). R_f=0,7 (CHCl₃:EtOAc:MeOH=6:3:1).

с. Получение цикло-L-Ala-L-Glu(OBzl).

Boc-L-Ala-L-Glu(OBzl)-Onp (56,0 г, 0,1 моль) растворяли и охлаждали до -15°C. Добавляли TFA, смесь перемешивали в течение 1 ч и постепенно нагревали до комнатной температуры. Ход реакции отслеживали по данным TCX с использованием системы CHCl₃:EtOAc:MeOH=6:3:1. После окончания реакции смесь упаривали в вакууме, затем дважды упаривали с изопропанолом и растворяли в 500 мл EtOAc. Добавляли N-метилморфоролин до тех пор, пока pH смеси не становился равным 9-9,5. Через 12 ч цикло-L-Ala-L-Glu(OBzl) выпадал в осадок. Осадок отфильтровывали, промывали EtOAc, диэтиловым эфиром и гексаном. Выход составлял 21,0 г (70%).

R_f=0,55 (CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH=6:3:1:0,1); данные ВЭЖХ: время удерживания 15,9 мин.

д. Получение цикло-L-Ala-L-Glu(OH).

Цикло-L-Ala-L-Glu(OBzl) (14,4 г, 0,05 моль) растворяли в 200 мл трифторметанола и затем добавляли 1,5 г палладиевой черни. Через суспензию барботировали водород и смесь перемешивали в течение 48 ч. Ход реакции отслеживали по данным TCX. После окончания реакции катализатор отфильтровывали и растворитель выпаривали в вакууме. Остаточный пептид растворяли в 200 мл дистиллированной воды и примеси экстрагировали 3×100 мл EtOAc. Водную фазу объединяли и выпаривали в вакууме. Осадок промывали диэтиловым эфиром и гексаном и затем сушили на воздухе. Выход составлял 10,2 г (94%).

R_f=0,2 (CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH=6:3:1:0,1);

R_f=0,5 (CHCl₃:EtOAc:MeOH:32%AcOH=6:3:1:0,1);

данные ВЭЖХ: время удерживания 6,7 мин.

Пример 2. Получение цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH).

а. Получение цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe).

Цикло-L-Ala-L-Glu-(OH) (2,2 г, 0,01 моль) растворяли в 50 мл ДМФА и затем нагревали до 60°C. После растворения пептида смесь охлаждали до -15°C. Добавляли охлажденный до -15°C изобутилхлорформиат (1,5 мл, 0,012 моль) с последующим добавлением 1,4 мл (0,012 моль) N-метилморфоролина. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при -15°C и добавляли раствор 2,8 г (0,011 моль) HCl-N-L-Trp-OMe в 20 мл ДМФА и 1,4 мл (0,012 моль) N-метилморфоролина, оба охлажденные до -15°C. Через 1 ч перемешивания при 0°C реакционную смесь постепенно нагревали до комнатной температуры в течение 4 ч. Осадок отфильтровывали и растворитель выпаривали в вакууме. Остаточное масло растворяли в 100 мл смеси н-бутанол/вода и переносили в делительную воронку. Органический слой отделяли и промывали 3×50 мл 5% H₂SO₄ и 3×50 мл 5% NaHCO₃ в воде. н-Бутанол выпаривали в вакууме и к остаточному маслу добавляли диэтиловый эфир. Осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром и гексаном. Выход составлял 3,4 г (80%).

R_f=0,7 (CHCl₃:EtOAc:MeOH:AcOH=6:3:1:0,1); данные ВЭЖХ: время удерживания 16,6 мин. Спектр цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe) приведен на фиг. 1.

б. Получение цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH).

Цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe) (1,1 г, 0,0025 моль) суспендировали в 50 мл EtOH и добавляли 15 г NaOH (0,0075 моль) в 25 мл воды. Смесь перемешивали в течение приблизительно 2 ч. После окончания реакции добавляли HCl до тех пор, пока pH смеси не становился равным примерно 7. Растворитель выпаривали в вакууме. Остаточную смесь переносили в делительную воронку и добавляли 50 мл смеси н-бутанол-вода с pH 3. Органический слой отделяли, промывали водой до нейтрального pH и затем выпаривали в вакууме. Остаток выпаривали дважды с изопропанолом и затем добавляли диэтиловый эфир.

Осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром и гексаном. Выход составлял 0,9 г (82%).

$R_f=0,5$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=6:3:1:0,1$);

данные ВЭЖХ: время удерживания 9,3 мин;

данные масс-спектра: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=407,7$.

Аналогичным образом получали следующие дополнительные соединения. Масс-спектры некоторых из данных соединений приведены ниже:

цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OMe);

цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=407,7$;

цикло-D-Ala-D-Glu-(D-Trp-OMe);

цикло-D-Ala-D-Glu-(D-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=407,9$;

цикло-L-Ala-L-Glu-(D-Trp-OMe);

цикло-L-Ala-L-Glu-(D-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=408,1$;

цикло-D-Ala-D-Glu-(L-Trp-OMe);

цикло-D-Ala-D-Glu-(L-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=407,6$;

цикло-D-Ala-D-Asp-(D-Trp-OMe);

цикло-D-Ala-D-Asp-(D-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=394,1$;

цикло-D-Ala-D-Asp-(L-Trp-OMe);

цикло-D-Ala-D-Asp-(L-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=394,7$;

цикло-L-Ala-L-Asp-(D-Trp-OMe);

цикло-L-Ala-L-Asp-(D-Trp-OH);

цикло-L-Ala-L-Asp-(L-Trp-OMe);

цикло-L-Ala-L-Asp-(L-Trp-OH): масс-спектр: $[\text{M}+\text{H}^++\text{Na}]=395,3$.

Пример 3. Получение цикло-L-Lys (H_2N)-L-Glu(L-Trp-NH₂).

а. Получение Fmoc-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)OH.

Fmoc-L-Lys(Boc)ONSu (56,5 г, 0,1 моль) и 26,1 г (0,11 моль) H-L-Glu(OBzl)OH смешивали с 500 мл смеси диоксин/вода (1:1) и N-метилморфолином (11,7 мл) до тех пор, пока pH смеси не становился равным примерно 9-9,2. Суспензия растворялась после 12-18 ч выдерживания при комнатной температуре. Растворители выпаривали в вакууме. Остаточное масло растворяли в 500 мл EtOAc, которое затем переносили в делительную воронку и промывали 3×200 мл 5% H_2SO_4 в воде до нейтрального pH. Органический слой отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия. После сушки EtOAc выпаривали в вакууме. Неочищенный продукт представлял собой масло, и выход составлял 69,0 г ($\approx 100\%$). $R_f=0,8$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}=6:3:1$).

б. Получение H-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)OH.

Fmoc-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)OH (69,0 г, 0,1 моль) растворяли в 300 мл 20% пиперицина в диоксане и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Растворитель выпаривали в вакууме и остаточное масло растворяли в 0,1% AcOH. Осадок отфильтровывали и промывали 0,1% AcOH и водой до нейтрального pH. Выход составлял 43,7 г (94%). $R_f=0,5$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:32\%\text{AcOH}=5:3:1$).

с. Получение цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl).

H-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl)OH (23,0 г, 0,05 моль) растворяли в 100 мл пиридина и кипятили с обратным холодильником в течение приблизительно 4 ч. Ход реакции отслеживали по данным TCX с использованием системы $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:32\%\text{AcOH}=5:3:1$. После окончания реакции смесь упаривали в вакууме и добавляли 500 мл 0,1% AcOH. Цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl) выпадал в осадок. Осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40°C. Выход составлял 20,9 г (86%). $R_f=0,75$ ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:32\%\text{AcOH}=5:3:1$); данные ВЭЖХ: время удерживания 19,2 мин.

д. Получение цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu(OH).

Цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu(OBzl) (22,2 г, 0,05 моль) растворяли в 200 мл трифтогоретанола и затем добавляли 1,5 г палладиевой черни. Через суспензию барботировали водород при перемешивании в течение 48 ч. Ход реакции отслеживали по данным TCX. После окончания реакции катализатор отфильтровывали и растворитель выпаривали в вакууме. Остаточный пептид растворяли в 200 мл дистиллированной воды и примеси экстрагировали 3×100 мл EtOAc. Водную фазу объединяли и выпаривали в вакууме. Осадок промывали диэтиловым эфиром и гексаном и затем сушили на воздухе. Выход составлял 16,7 г (90%).

$R_f=0,4$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:32\%\text{AcOH}=6:3:1:0,1$); данные ВЭЖХ: время удерживания 12,7 мин.

е. Получение цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu-(L-Trp-NH₂).

Цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu-(OH) (3,7 г, 0,01 моль) растворяли в 50 мл пиридина и добавляли 0,012 моль TBTU с последующим добавлением 1,4 мл (0,012 моль) N-метилморфолина. Реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и добавляли раствор 2,8 г (0,011 моль) HCl-H-L-Trp-NH₂ в 20 мл пиридина и 1,4 мл (0,012 моль) N-метилморфолина. Ход реакции отслеживали по данным TCX. Через 4 ч перемешивания растворитель выпаривали в вакууме, остаточное масло растворяли в 100 мл смеси н-бутанол/вода и переносили в делительную воронку. Органический слой отделяли и промывали 3×50 мл 5% H_2SO_4 и 3×50 мл 5% NaHCO_3 в воде. н-Бутанол выпаривали в вакууме и к оста-

точному маслу добавляли диэтиловый эфир. Осадок отфильтровывали и промывали диэтиловым эфиром и гексаном. Выход составлял 5,0 г (88%).

$R_f=0,6$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:32\%\text{AcOH}=6:3:1:0,1$); данные ВЭЖХ: время удерживания 18,6 мин.

f. Получение цикло-L-Lys(H_2N)-L-Glu-(L-Trp-NH₂).

Цикло-L-Lys(Boc)-L-Glu-(L-Trp-NH₂) (2,9 г, 0,005 моль) растворяли в 50 мл смеси 50% TFA/ CH_2Cl_2 с 0,1% дитиотреитола. Смесь перемешивали в течение приблизительно 1 ч. После окончания реакции растворители выпаривали в вакууме. Остаточное масло растворяли в 50 мл воды и переносили в деликатную воронку. Добавляли этилацетат (50 мл). Остаточные примеси экстрагировали. Органический слой отделяли и затем отбрасывали. Воду выпаривали в вакууме, масло растворяли в 50 мл дистиллированной воды и лиофилизировали. Выход составлял 2,7 г (92% в виде трифторацетата).

$R_f=0,35$ ($\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}:\text{MeOH}:\text{AcOH}=6:3:1:0,1$); данные ВЭЖХ: время удерживания 7,9 мин.

Пример 4. Действие иммуносупрессоров в условиях *in vivo*.

В условиях *in vivo* оценивали действие тестируемых соединений на интактный костный мозг. Пептиды вводили мышам различным образом: подкожно, внутрибрюшинно (в/б) и через рот интактным мышам-донорам в дозах 10-1000 мкг/кг. Через 2 суток после введения препаратов мышей подвергали эвтаназии. Готовили суспензию костного мозга и вводили внутривенно мышам, получившим летальную дозу облучения. На 8 сутки оценивали колониеобразующую активность. Опытными животными были мыши (CBAxC57B1) F1 (30 мышей на опыт, в среднем из 3 опытов).

Как следует из данных табл. 2, было обнаружено, что введение тимодепрессина и новых циклических пептидов по настоящему изобретению интактным мышам приводило к снижению популяции КОЕ-С в костном мозге.

Сравнительный анализ данных по активности новых циклических пептидов по настоящему изобретению и тимодепрессина в отношении супрессии популяции КОЕ-С в костном мозге приведен в табл. 3.

Пример 5. Действие иммуностимуляторов в условиях *in vivo*.

Проводили исследование с целью сравнения активности неогена и новых циклических пептидов по настоящему изобретению в отношении ослабления отрицательного действия ионизирующего облучения.

В данном опыте применяли метод экзогенных колоний селезенки. Суспензию интактных клеток костного мозга облучали *ex vivo* в дозе 1 г. Неоген или циклические пептиды вводили в различных дозах в/б, в/м, подкожно или перорально реципиентам, получившим летальную дозу облучения, в течение 1 ч после введения облученных клеток костного мозга. Колонии подсчитывали на 8 сутки. Все данные в каждой группе выражены в виде средних значений по трем опытам.

Данные, приведенные в табл. 4, показывают, что неоген может стимулировать регенерацию после разрушительного действия облучения на гемопоэтические клетки-предшественники. Было показано, что данный процесс более эффективен при в/м или в/б введении, но не при введении через рот. Новые циклические пептиды, которые подвергались исследованию, обладали аналогичным уровнем активности при системном введении и были активными при пероральном применении в диапазоне доз 10-100 мкг/кг.

Пример 6. Адьюванная активность цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa).

Адьюванную активность оценивали на 5 группах мышей (C57B16). Каждая группа состояла из 5 животных. Проводили три иммунизации.

Первая иммунизация.

1. Группа с введением полного адьюванта Фрейнда (CFA).
2. Группа с введением овальбумина (яичный OVA) (25 мкг/мышь).
3. Группа с введением CFA+овальбумина (25 мкг/мышь).
4. Группа с введением овальбумина (25 мкг/мышь)+пептид 1 мкг/мышь.
5. Группа с введением овальбумина (25 мкг/мышь)+пептид 10 мкг/мышь.

Вторая иммунизация.

Введение по той же схеме через 21 сутки после первой иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь животным групп 2-5.

Третья иммунизация.

Введение по той же схеме через 35 суток после второй иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь животным групп 2-5.

На 42 сутки отбирали образцы крови от каждой мыши. Кровь от мышей каждой группы объединяли. Сравнивали значения индекса стимуляции для каждой группы. Индекс стимуляции рассчитывали в виде соотношения оптической плотности (OD=1) разведенных пульвров групп 3-5 к оптической плотности (OD=1) разведенных пульвров группы 2 (контрольная без адьюванта).

Как следует из данных табл. 5, результаты данного опыта показывают, что один циклический пептид цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa), даже без дополнительной модификации сочетанием сахара или пальмитоила, обладает адьюванной активностью и приводит к повышению титров антител к овальбумину на 74%.

Пример 7. Адьюванная активность цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединение 17).

Адьюванную активность оценивали на 6 группах мышей. Каждая группа состояла из 5 животных. Проводили три иммунизации следующим образом.

Первая иммунизация.

1. Мыши 1-5 - введение полного адьюванта Фрейнда (CFA=контроль).
2. Мыши 6-10 - введение овальбумина (яичного OVA) 25 мкг/животное+адьюvant 100 мкг/животное.
3. Мыши 11-15 - введение овальбумина 25 мкг/животное+CFA.
4. Мыши 16-20 - введение овальбумина 25 мкг/животное.
5. Мыши 21-25 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant 1 мкг/животное.
6. Мыши 26-30 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant 10 мкг/животное.

Вторая иммунизация.

Введение по той же схеме через 21 сутки после первой иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь мышам 6-30.

Третья иммунизация.

Введение по той же схеме через 35 суток после второй иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь мышам 6-30.

На 42 сутки отбирали образцы крови от каждой мыши. Сравнивали значения индекса стимуляции для каждой группы. Индекс стимуляции рассчитывали делением разведения тестированной объединенной сыворотки с получением OD=1 (оптическая плотность) на разведение объединенной сыворотки от мыши, иммунизированной без адьюванта, с получением OD=1. Результаты приведены в табл. 6.

Пример 8. Адьювантная активность цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 17), цикло[L-Lys(пальмитоил)-L-Glu-(D-Trp-OH) (соединения 26a), цикло[D-Lys(пальмитоил)-D-Glu-(D-Trp-OH) (соединения 26b), цикло-L-Lys(N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил)-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 33a) и цикло-D-Lys(H-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил)-D-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 33b).

Стадия 1.

Адьювантную активность оценивали на 11 группах мышей Balb/c (полученных из питомника Stolbovaya Breeding Station). Каждая группа состояла из 7 животных. Проводили три иммунизации следующим образом.

Первая иммунизация.

Группа 1 - введение овальбумина 25 мкг/животное (мыши 1-7);

группа 2 - введение овальбумина 25 мкг/животное+CFA (полный адьювант Фрейнда) (мыши 8-14);

группа 3 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33a 100 мкг/животное (мыши 15-21);

группа 4 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33a 10 мкг/животное (мыши 22-27);

группа 5 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33a 1 мкг/животное (мыши 28-35);

группа 6 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33b 100 мкг/животное (мыши 36-42);

группа 7 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33b 10 мкг/животное (мыши 43-49);

группа 8 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 33b 1 мкг/животное (мыши 50-56);

группа 9 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 17 100 мкг/животное (мыши 57-63);

группа 10 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 17 10 мкг/животное (мыши 64-70);

группа 11 - введение овальбумина 25 мкг/животное+адьюvant соединение 17 1 мкг/животное (мыши 71-77).

Вторая иммунизация.

Введение по той же схеме через 14 суток после первой иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь мышам 1-77.

Третья иммунизация.

Введение по той же схеме через 28 суток после второй иммунизации при введении 12,5 мкг овальбумина/мышь мышам 1-77.

На 35 сутки после первой иммунизации отбирали пробы крови от каждой мыши.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

Раствор OVA (10 мкг/мл) в 0,05 М натриевом карбонатном буфере (рН 9,5) вносили в лунки планшета из расчета 0,1 мл на лунку и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. Затем раствор OVA удаляли и планшет промывали 4 раза PBS с 0,05% твина-20. Такое промывание проводили после каждой стадии инкубации. Серийные двукратные разведения сыворотки крови (начиная от 1:100 или 1:1000) вносили в лунки из расчета 0,1 мл на лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 ч с последующей инкубацией (1 ч, 37°C) с HRP-конъюгированными козьими антимышинными IgG-антителами (0,1 мл, 1 мг/мл в PBS) и затем с 0,1 мл раствора субстрата - 0,05% H₂O₂ и 0,05% о-фенилендиамин в 0,05 М натриевом цитратном

буфере с pH 4,5. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 12,5% H₂SO₄. Поглощение определяли при длине волны 492 нм с использованием Multiscan Plus MKII (Flow Laboratories, Великобритания). Высокий титр антител против белка (для отдельных сывороток) определяли в виде разведения сыворотки при поглощении более чем 0,1 ODU, и минимальное значение превышало контрольный уровень в 3 раза. Представлен титр антител и -log разведения (фиг. 2 и 3). Индекс стимуляции для объединенной сыворотки рассчитывали делением разведения тестированной объединенной сыворотки с получением OD=1 на разведение объединенной сыворотки от мыши, иммунизированной без адьюванта, с получением OD=1. Результаты по оценке адьюванантной активности цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 17), цикло-L-Lys(N-ацетилглюказамин-N-ацетилмурамил)-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 33a) и цикло-D-Lys(N-ацетилглюказамин-N-ацетилмурамил)-D-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 33b) приведены в табл. 7 и по оценке адьюванантной активности цикло[L-Lys(пальмитоил)-L-Glu-(D-Trp-OH)] (соединения 26a) и цикло[D-Lys(пальмитоил)-D-Glu-(D-Trp-OH)] (соединения 26b) приведены в табл. 8, а также на фиг. 4, на которой также представлены результаты оценки адьюванантной активности цикло-L-Lys-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 19). Следует отметить, что пептиды соединения 26a и 26b растворяли в 0,1% NH₄OH в концентрации 1 мг на 1-2 мл. Пептиды оставались растворимыми при титровании 0,1% AcOH до pH 8,4-8,5. Как следует из результатов оценки адьюванантной активности соединений, представленных на фиг. 4, соединение 17 является активным в дозе 1, 10 и 100 мкг/кг; соединение 19 активно в дозе 100 мкг/кг; соединение 33a активно в дозе 100 мкг/кг; соединение 33b не является активным соединением; соединение 26a активно в дозе 10 мкг/кг и соединение 26b не является активным соединением.

Пример 9. Исследование новых аналогов дерморфина.

i. Оценка периферической опиоидной активности.

Периферическую опиоидную активность пептидов определяли по их способности ингибировать индуцированные электрическими импульсами сокращения изолированной подвздошной кишки морской свинки (GPI) (Kosterlitz H.W. et al. "The effect of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibition a-and b-adrenoreceptors in the longitudinal muscle of the guinea pig ileum", Brit. J. Pharmacol., vol. 39, p. 398-413, 1970).

Отрезок GPI длиной примерно 1 см помещали в баню для органов емкостью 10 мл с раствором Кребса при 34°C. Состав раствора Кребса был следующим (мМ): NaCl - 118; KCl - 4,70; CaCl₂ - 2,52; KH₂PO₄ - 0,93; MgSO₄ - 1,27; NaHCO₃ - 25; глюкоза - 11,0. Напряжение покоя органа равнялось 1 г. Отрезок GPI стимулировали одиночными импульсами продолжительностью 1 мс с 0,1 Гц при 80 В. Раствор изолированных органов постоянно аэрировали. Сокращения регистрировали в изометрическом режиме с помощью датчика K 30 (Hugo Sachs Elektronic KG) с использованием бумажного самописца Rikadenki-series (Япония).

Тестируемые соединения растворяли в дистиллированной воде и вносили кумулятивно в баню для органов в объеме 5-30 мкл. Каждое следующее соединение добавляли после того, как изолированные органы промывали 3-4 раза в течение 12-15 мин. На основе полученных данных строили кривые зависимости доза-эффект и активность соединений выражали в виде IC₅₀ или pD₂. Показатель pD₂ равнялся отрицательному десятичному логарифму концентрации соединения, вызывающего 50% максимальный эффект.

Статистическую обработку данных проводили с использованием t-теста Стьюдента.

Новые аналоги дерморфина тестировали на стандартной модели теста связывания на изолированной подвздошной кишке морской свинки. Для каждой молекулы определяли значение EC₅₀ в виде концентрации соединения, вызывающего снижение амплитуды сокращения на 50% по сравнению с исходным значением.

Стандартом во всех опытах был дерморфин. Для подтверждения опиоидной активности использовали специфический антигонист налоксон в концентрации 10⁻⁵ М. Каждую молекулу тестировали в 5 независимых параллелях и относительную активность рассчитывали в виде отрицательного логарифма EC₅₀ (pD₂).

Как можно видеть из данных табл. 9, все тестированные пептиды обладали различной опиоидной активностью в пределах от 10⁻⁹ до 10⁻⁵ М, за исключением пептидов H-Tyr-Tyr-Pro-Ser-NH₂ (соединения 51) и D-Ala-D-Glu-(D-Trp)OH (соединения 54).

ii. Аналгетическая активность новых опиоидных пептидных аналогов.

220 мышей F1 (CBA× C57D16) первого поколения гибридов использовали для тестирования анальгетической активности с использованием теста "отдергивание хвоста". Температура воды равнялась 48°C. Максимальный эффект продолжался в течение 30 с. Все пептиды вводили внутрибрюшинно в дозах 5, 10 или 20 мг/кг. Аналгетическое действие определяли через 15-20 мин после введения пептида. Для статистической обработки данных использовали тест Стьюдента с t-критерием. Статическая значимость была на уровне p<0,05. Результаты тестов приведены в табл. 10.

iii. Аналгетическая активность дерморфина и аналогов после перорального введения и внутрибрюшинного введения.

Для установления активности новых циклических пептидов по настоящему изобретению при пероральном введении использовали тест "отдергивания хвоста". Результаты сравнивали с результатами, по-

лученными с использованием внутрибрюшинного введения.

Антиноцицептивную активность пептидов по настоящему изобретению определяли в опытах на мышах BALB/c с массой тела 22-24 г. Пептиды растворяли в физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно или в желудок.

Тест "отдергивания хвоста" (D'Amour F.E. et al. "A Method for Determining Loss of Pain Sensation", J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 72, p. 74-79, 1941) проводили на анальгезиметре типа 812, Hugo Sachs Electronic KG. Антиноцицептивную активность определяли в виде отсутствия отдергивания хвоста в ответ на стимуляцию сфокусированным пучком теплового излучения продолжительностью 6 с по сравнению с фоновой реакцией продолжительностью 2,0-3,0 с.

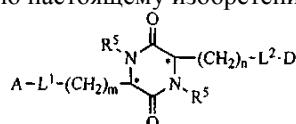
Статистическую обработку данных проводили с использованием парного t-теста Стьюдента. Результаты данных тестов приведены в табл. 11 и 12. Как следует из результатов опытов, только циклические аналоги нейропептидов проявляли активность при пероральном (в желудок) введении.

Не смотря на то что настоящее изобретение было описано со ссылкой на представленные в данном описании предпочтительные примеры, следует понимать, что изобретение не ограничивается раскрытыми примерами. В противоположность, изобретение предназначено для включения различных модификаций, и эквивалентные схемы входят в изобретение, не отступая от сущности и объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации, патенты и заявки на патент включены в данное описание в полном объеме в той степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально или индивидуально включены для сведения в полном объеме. В тех случаях, когда термин в настоящем описании определен иначе чем в ссылке, включенной для сведения, то приводится определение, которое служит для определения термина.

Таблица 1

Примеры полифункциональных биологически активных соединений и их фармацевтически приемлемых солей, сольватов и пролекарств по настоящему изобретению



a. Тестируемые иммуно- и гемосупрессоры.

Соед.	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
1	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
2	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
3	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
4	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
5	D-Trp-ONH ₂	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
6	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
7	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
8	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
9	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	4	связь	H ₂ N	H
10	L-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
11	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
12	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
13	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
14	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
15	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H

b. Тестируемые иммуно- и гемостимуляторы.

Соед.	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
16	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	1	связь	H	H
17	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	1	связь	H	H
18	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
19	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
20	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
21	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
22	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
23	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
24	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H

с. Тестированные адъюванты.

Соед.	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
25	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm*	H
26a	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm	H
26b	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Palm	H
27	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm	H
28	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
29	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
30	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
31	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
32	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил	H
33a	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил	H
33b	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил	H

*Palm=пальмитоил (гексадеканоил)

d. Пептидные анальгетики+иммунологически активные производные.

Соед.	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
34	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
35	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
36	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
37	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
38	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
39	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
40	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
41	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
42	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
43	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H

Таблица 2

Образование колоний селезенки клетками костного мозга у мышей, обработанных новыми пептидами

Обработка донора и способ введения	Количество колоний КОЕ-8-C на 10 ⁵ клеток М [±] м	% супрессии
Контроль	11,2±0,4	-
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-ONa) (в/б)	5,0±0,3*	70
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-ONa) (через рот)	6,0±0,7*	58
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) (п/к)	6,8±0,4*	47
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) (через рот)	7,4±0,4*	40
цикло-LAla-LGlu-(LTrp-ONa) (в/б)	11,7±0,8	0
цикло-LAla-LGlu-(DTrp-ONa) (i/p)	8,8±0,2*	20
цикло-DAla-DAsp-(DTrp-OH) (через рот)	9,0±0,2	26,5
цикло-DPhe-DGlu-(DTrp-ONa) (через рот)	8,1±0,4*	28
цикло-DTyr-DGlu-(DTrp-OH) (через рот)	6,3±0,9*	44
γDGlu-DTrp (тимодепрессин) (в/б)	6,3±0,6*	55

*P<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 3

Сравнение активности новых соединений по изобретению и тимодепрессина на суппрессию КОЕ-С популяции в костном мозге

Соединение (доза - мкг/мышь)	Количество колоний КОЕ-С на 10 ⁵ клеток Мім	% супрессии
Контроль	9,9±0,7	-
γDGl-DTrp (тимодепрессин) 200,0 (через рот)	5,1±0,2*	52
γDGl-DTrp (тимодепрессин) 20,0 (через рот)	6,4±0,5*	41
γDGl-DTrp (тимодепрессин) 2,0 (через рот)	8,0±0,5	33
γDGl-DTrp (тимодепрессин) 0,2 (через рот)	10,2±0,3	0
γDGl-DTrp (тимодепрессин) 0,2 (в/б)	5,7±0,4*	51
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (через рот)	5,3±0,6*	59
цикло-DAla-DGlu-(DTrp-OMe) 0,2 (через рот)	6,5±0,5*	42
цикло-DAla-DAsp-(DTrp-OMe) 0,2 (через рот)	8,4±0,6*	28
цикло-DAla-DAsp-(DTrp-ONa) 0,2 (через рот)	6,8±0,8*	55
цикло-DPhe-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (через рот)	8,1±0,4*	28
цикло-DTyr-DGlu-(DTrp-ONa) 0,2 (через рот)	6,3±0,9*	44

*P<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 4

Влияние неогена или новых циклических пептидов по изобретению на образование экзогенных колоний селезенки под действием облучения 1 г костного мозга в условиях *in vitro*

Доза облучения	Пептид	Доза пептида, мкг/кг	Путь введения	Колич-во колоний	% стимуляции
-	-	-	-	11,9±0,4	100
1 Gy	-	-	-	6,2±0,6**	0
1 Gy	Неоген	10	в/б	9,7±0,4*	81,5
1 Gy	Неоген	100	в/б	9,2±0,7*	77,3
1 Gy	Неоген	10	в/м	11,6±0,8*	97,5
1 Gy	Неоген	100	в/м	11,8±0,9*	99,1
1 Gy	Неоген	100	через рот	6,7±0,5	0
1 Gy	Неоген	1000	через рот	6,1±0,3	0
1 Gy	Цикло-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	100	в/б	9,6±0,7*	80,7
1 Gy	Цикло-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	10	в/б	8,0±0,4*	67,2
1 Gy	Цикло-LAla-LGlu-(LTrp-ONa)	100	через рот	11,7±0,6*	98,3
1 Gy	Цикло-LAla-LGlu-(LTrp-OMe)	100	через рот	8,9±0,5*	74,8
1 Gy	Цикло-LAla-LGlu-(LTrp-OMe)	100	п/к	8,0±0,5*	67,2

Таблица 5

Адьюванная активность цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa)

Тестированный продукт	Индекс стимуляции
CFA (группа 1)	-
Контроль (группа 2)	1,00
Группа с введением CFA+овальбумин (25 мкг/мышь) (группа 3)	2,40
Цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa) 1 мкг/мышь (группа 4)	1,18
Цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-ONa) 10 мкг/мышь (группа 5)	1,74

Таблица 6
Адьювантная активность цикло-L-Ala-L-Glu-(L-Trp-OH) (соединения 17)

Адьювант	Индекс стимуляции
Соединение 17 в дозе 100 мкг	1,14
Соединение 17 в дозе 10 мкг	1,74
Соединение 17 в дозе 1 мкг	1,18
Полный адьювант Фрейнда	2,40
Мыши 6-20 - овальбумин в дозе 25 мкг на животное	1,0

Таблица 7
Титры антител против OVA после иммунизации белком-адьювантом и соответствующие индексы стимуляции

Иммуноген	Адьювант	Доза, мкг на животное	Титр антител против белка (для отдельных проб сыворотки)	Титр антител против белка (для объединенных проб сыворотки)	Индекс стимуляции
Овальбумин	Соед. 33a	100	4,8 4,8 5,4 5,1 6,4 5,1 5,7	5,5	6,8
		10	4,4 5,7 4,7 5,7 5,7 5,7 5,4	5,1	3,5
		1	5,1 4,2 5,4 4,1 5,1 5,4 5,4	4,8	2,9
	Соед. 33b	100	4,8 5,4 4,2 5,1 5,1 5,4 5,4	4,8	2,9
		10	4,8 4,5 5,2 5,1 5,4 4,3 5,4	5,4	4,1
		1	5,2 4,8 4,8 4,8 4,9 5,1 4,8	5,1	3,5
	Соед. 17	100	4,5 4,2 4,2 4,2 5,1 5,1 4,8	4,8	2,3
		10	4,8 4,2 4,1 4,5 5,4 4,5 3,9	4,5	1,9
		1	5,1 4,2 4,5 5,1 5,4 5,1 4,5	4,8	2,6
	CFA		5,3 6,8 6,2 5,3 6,2 6,8 5,9	6,2	13
	Без адьюванта		4,2 4,5 4,2 4,5 4,8 4,5 3,9	4,5	1

Таблица 8

Индексы стимуляции для адьювантов соединений 26а и 26б

Иммуноген	Адьювант	Доза, мкг на животное	Титр антител против белка (для отдельных проб сыворотки)	Титр антител против белка (для объединенных проб сыворотки)	Индекс стимуляции
Овальбумин	Соед. 26b	100	15 16 17 18 19 20 21	4,8	2,6
		10	4,5 4,5 4,8 4,8 4,2 4,8	4,8	2,7
		1	4,7 5,1 4,7 4,8 4,7 - 4,8	5,1	4,9
	Соед. 26a	36	37 38 39 40 41	5,1	3,3
		100	22 23 24 25 26 27 28	5,7	6,5
		10	4,8 4,4 4,8 5,1 4,8 4,8 5,4	4,4	2,0
		1	49 50 51 21 53 54 55	6,2	18
	CFA	8	9 10 11 12 13 14	3,9	1
		6,2	5,9 6,2 6,2 6,2 6,2 5,9	3,9	
	Без адьюванта	1	2 3 4 5 6 7	3,9	
	Без адьюванта	4,1	4,2 4,2 3,9 4,5 3,9 3,5	3,9	

Таблица 9

Результаты тестов оценки в условиях *in vitro* (по активности связывания с μ -рецептором GPI) опиоидной активности пептидов

Соединение	Аналоги деморфина	Среднее значение EC ₅₀ в М	Значение pD ₂ (Mtm)	Антагонизм с налоксоном
44	Цикло-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala)-L-Glu(OH)]	5,7×10 ⁻⁷	6,15±0,10	+
45	Цикло-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala)-L-Glu(L-Trp-OMe)]	2×10 ⁻⁶	5,68±0,09	+
46	Цикло-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	1,1×10 ⁻⁸	7,96±0,02	+
47	Цикло-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	3,3×10 ⁻⁸	7,52±0,07	+
48	(Дерморфин) H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	2,5×10 ⁻⁹	8,56±0,12	+
49	H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	3×10 ⁻⁸	7,55±0,11	+
50	H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-NH-CH ₃	9,5×10 ⁻⁹	7,95±0,07	+
51	H-Tyr-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	---	---	---
52	Arg-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH	3×10 ⁻⁶	5,50±0,07	+
53	H-Arg-Tyr-D-Ala-Phe-D-AlaOH	1×10 ⁻⁶	6,06±0,12	+
54	D-Ala-D-Glu-(D-Trp)-OH	---	---	---
55	H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH	1×10 ⁻⁶	5,81±0,16	+
56	H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH	5×10 ⁻⁹ (1×10 ⁻⁸)	7,53±0,22	+

Таблица 10

Анальгетическая активность аналогов опиоидных пептидов

Структура	Доза (мг/кг)	Номер мыши	Уровень первоначальной чувствительности (сек)	Время после введения пептида (мин)					
				15	30	45	60	90	120
Продолжительность действия (сек)									
Дерморфин: Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂	5 10	8 10	3,6±0,2 4,4±0,3	11,0±1,0 11,7±1,0	14,4±3,0 16,6±2,2	17,2±2,4 17,0±2,3	13,2±3,2 10,2±1,2	4,7±0,3 3,9±0,2	- -
Опилон: Tyr-DAla-Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMe	5 10	10	3,0±0,1 2,9±0,2	9,0±1,7 5,9±0,7	10,3±2,6 10,7±0,8	14,3±3,7 12,2±2,6	10,8±1,9 7,2±1,2	6,4±1,5 6,9±1,4	3,5±0,2 3,7±0,4
Цикло-L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	10 20	15 10	3,7±0,2 3,4±0,2	6,8±0,6 7,8±0,5	6,3±0,7 8,3±0,8	8,4±1,4 8,7±1,2	7,7±1,7 9,5±1,2	6,7±1,0 9,7±1,3	4,6±0,3 8,2±1,7
Цикло-[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	10 20	10	3,2±0,3 3,0±0,2	11,6±1,7 1,4±1,6	15,5±1,6 18,1±2,3	15,7±1,2 16,8±2,2	13,0±1,5 12,7±1,8	9,9±1,5 11,7±1,2	6,8±0,5 6,3±0,6

Статистически достоверные данные (Р<0,05) показаны жирным шрифтом.

Таблица 11

Анальгетическая активность дерморфина и аналогов после перорального введения по данным теста "отдергивания хвоста"

Структура	Доза (мг/кг)	Номер мыши	Уровень первоначальной чувствительности (сек)	Время после введения пептида (мин)					
				15	30	60	90	120	Продолжительность действия (сек)
Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂ Дерморфин									
Tyr-DAla-Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMe Опилон	50	7	2,6±0,1	3,3±0,6	2,3±0,1	-	4,3±0,6		
Цикло[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	50	8	2,2±0,1	3,7±0,5	3,9±0,5	4,1±0,5	4,0±0,5		
Цикло[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	50	6	2,7±0,1	4,5±0,1	4,1±0,5	5,5±0,5	5,5±0,4	5,5±0,5	
Трамадол	50	6	2,6±0,1	2,6±0,1	4,6±0,5	4,4±0,5	4,4±0,6	4,4±0,5	

Статистически достоверные данные (Р<0,05) показаны жирным шрифтом.

Таблица 12

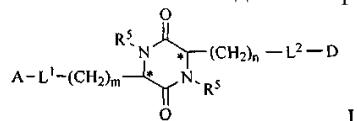
Анальгетическая активность дерморфина и аналогов после внутрибрюшинного введения

Структура	Доза (мг/кг)	Номер мыши	Уровень первоначальной чувствительности (сек)	Время после введения пептида (мин)					
				15	30	45	60	90	120
Продолжительность действия (сек)									
Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂ Дерморфин	10	8	2,2±0,2	5,6±0,4	6,0±0				
Tyr-DAla-Phe-DAla-Tyr-Pro-Ser-NHMe Опилон	10	6	2,0±0,1	3,6±0,7	5,6±0,4	5,5±0,6	5,2±0,6	-	-
Цикло[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-OH)]	10	9	2,1±0,1	4,1±0,4	5,6±0,4	4,8±0,6	-	-	-
Цикло[L-Lys(H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser)-L-Glu(L-Trp-NH ₂)]	10	5	2,1±0,1	3,9±0,8	5,3±0,7	5,2±0,6	-	-	-
Arg-Tyr-DAla-Phe-DAla-OH	10	9	2,4±0,1	2,7±0,1					

Статистически достоверные данные (Р<0,05) показаны жирным шрифтом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полифункциональное биологически активное соединение формулы I



где А представляет собой иммунорегуляторную группу, выбранную из группы, состоящей из Тгр, Тут, Phe, His, арила и гетероарила, где арильные и гетероарильные группы могут быть необязательно замещены 1-6 заместителями, независимо выбранными из группы, включающей галоген, OH,

$\text{OC}_{1\text{-}6}\text{алкокси}$, $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, $\text{C}_{2\text{-}6}\text{алкенил}$, $\text{C}_{2\text{-}6}\text{алкенилокси}$, NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил})$, $\text{N}(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил})(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил})$, CN , CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, фенил и $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкиленфенил}$, и где гетероарил представляет собой ароматическое карбоциклическое кольцо, содержащее от 5 до 10 атомов углерода, в котором от 1 до 4 атомов углерода заменены на гетероатом, выбранный из одного или более O , S и $\text{N}-\text{R}^1$, где R^1 выбран из группы, включающей H , $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, $\text{C}_{1\text{-}4}\text{алкиленарил}$, $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$, $\text{C}(\text{O})\text{арил}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$ и $\text{SO}_2\text{-арил}$, когда атом N sp^3 -гибридизован, или представляет одиночную пару электронов, когда атом N sp^2 -гибридизован;

L^1 выбирают из группы, состоящей из $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{-O}-$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{S-S-}$, SO_2NR^2 , NR^2SO_2 , $-\text{S-}$ и $-\text{O-}$;

L^2 выбирают из группы, состоящей из простой связи, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^2$, $-\text{NR}^2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^2-$, $-\text{C}(\text{O})\text{-O-}$, $-\text{OC}(\text{O})-$, $-\text{S-S-}$, SO_2NR^2 , NR^2SO_2 , $-\text{S-}$ и $-\text{O-}$;

R^2 выбирают из группы, состоящей из H , $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкиленарила}$, $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{C}(\text{O})\text{арила}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$ и $\text{SO}_2\text{-арила}$;

R^5 представляет собой H или $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил}$;

* означает L- или D-конфигурацию или их смесь;

m равно целому числу от 1 до 50;

n равно целому числу от 0 до 50;

D выбирают из группы, состоящей из H , $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, любой боковой цепи аминокислоты и любой функционально активной молекулы, которую выбирают из группы, состоящей из адьювантов, анальгетиков, опиатов, антидотов, синтетических вакцин, фармацевтических фармакофоров, сахаров; липидов и нуклеотидов, и когда A представляет собой иммунорегуляторную группу, выбранную из арила и гетероарила, D представляет собой функционально активную молекулу, которую выбирают из группы, состоящей из адьювантов, анальгетиков, опиатов, антидотов, синтетических вакцин, фармацевтических фармакофоров, сахаров; липидов и нуклеотидов;

или его фармацевтически приемлемые соли или сольваты либо сложные эфиры или амиды, при условии, что соединение не представляет собой:

цикло[Asp(TyrOBn)Asp(TyrOBn)];

цикло[Asp(TyrOH)Asp(TyrOH)];

цикло[Asp(PheOBn)Asp(PheOBn)];

цикло[Asp(PheOH)Asp(PheOH)];

цикло[Glu(PheOBn)Glu(PheOBn)];

цикло[Glu(PheOH)Glu(PheOH)];

цикло[Asp(PheOH)Arg];

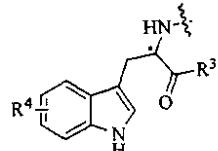
цикло[Asp(TyrOH)Asp(TyrOH)];

цикло[Asp(PhenH₂)Leu] или

цикло[Asp[PheN(Me)(Bn)]Phe].

2. Соединение по п.1, где сложные эфиры или амиды представляют собой алифатический сложный эфир, фениловый сложный эфир, ацилосиметиловый сложный эфир, карбамат или сложный эфир аминокислоты.

3. Соединение по п.1, где А представляет собой группу формулы II



Trp II

где R^3 выбирают из группы, состоящей из H , $\text{OC}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, NH_2 , $\text{NHC}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{N}(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила})_2$, NNHNH_2 и OY , где Y представляет собой фармацевтически приемлемый катион; R^4 представляет собой 1-4 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H , атома галогена, OH , $\text{OC}_{1\text{-}6}\text{алкокси}$, $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{C}_{2\text{-}6}\text{алкенила}$, $\text{C}_{2\text{-}6}\text{алкенилокси}$, NH_2 , $\text{NH}(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила})$, $\text{N}(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкил})(\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила})$, CN , CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, $\text{SO}_2\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, SO_2NH_2 , $\text{SO}_2\text{NHC}_{1\text{-}6}\text{алкила}$, фенила и $\text{C}_{1\text{-}6}\text{алкиленфенила}$; и

* означает L- или D-конфигурацию или их смесь.

4. Соединение по п.3, где R^3 выбирают из группы, состоящей из H , Me , NH_2 , NHMe , NMe_2 , NNHNH_2 и OY .

5. Соединение по любому из пп.3, 4, где Y выбирают из группы, состоящей из Na^+ , K^+ и Zn^+ .

6. Соединение по любому из пп.3-5, где R^4 представляет собой заместитель, выбранный из группы, состоящей из H , атома галогена, OH , OMe , Me , винила, винилокси, NH_2 , NHMe , NMe_2 , CN , CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $\text{C}(\text{O})\text{Me}$, $\text{C}(\text{O})\text{OMe}$, SO_2Me , SO_2NH_2 , SO_2NHMe , фенила и бензила.

7. Соединение по п.6, где R^4 является H .

8. Соединение по любому из пп.1-7, где каждый из L^1 и L^2 независимо выбирают из группы, состоящей из $-C(O)-$, $-NR^2-$, $-C(O)NR^2-$ и $-NR^2C(O)-$.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где R^2 выбирают из группы, состоящей из H, Me, Bn, C(O)Me, C(O)Ph, SO₂Me и SO₂Ph.

10. Соединение по п.9, где R^2 является H.

11. Соединение по любому из пп.1-10, где n равно целому числу от 1 до 6.

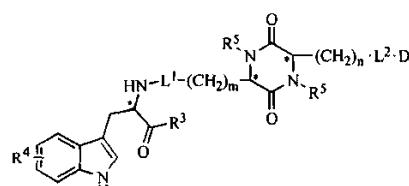
12. Соединение по любому из пп.1-11, где n равно целому числу от 0 до 10.

13. Соединение по любому из пп.1-12, где R^5 представляет собой H и Me.

14. Соединение по любому из пп.1-13, где обе * в дикетопиперазиновом кольце находятся, по существу, в D-конфигурации или обе * находятся, по существу, в L-конфигурации.

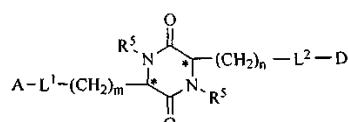
15. Соединение по любому из пп.1-14, где функционально активную молекулу выбирают из группы, состоящей из адьювантов, таких как пальмитоил; анальгетиков, таких как пептидные анальгетики; опиатов и антидотов, таких как дерморфин, морфин, налоксон и их производные; синтетических вакцин, таких как антигенные детерминанты - Т- и В-эпитопы; фармацевтических фармакофоров, включая малые молекулы, такие как метотрексат, диклофенак, ибупрофен, индометацин, напроксен и кетопрофен; сахараев; липидов и нуклеотидов.

16. Полифункциональное биологически активное соединение формулы I по п.1, имеющее следующую формулу:



где R^3 выбирают из группы, состоящей из H, OC₁₋₆алкила, NH₂, NHC₁₋₆алкила, N(C₁₋₆алкила)₂, NHNH₂ и OY, где Y представляет собой фармацевтически приемлемый катион; R^4 представляет собой 1-4 заместителя, которые независимо выбирают из группы, состоящей из H, атома галогена, OH, OC₁₋₆алкокси, C₁₋₆алкила, C₂₋₆алкенила, C₂₋₆алкенилокси, NH₂, NH(C₁₋₆алкила), N(C₁₋₆алкил)(C₁₋₆алкила), CN, CF₃, OCF₃, NO₂, C(O)C₁₋₆алкила, C(O)OC₁₋₆алкила, SO₂C₁₋₆алкила, SO₂NH₂, SO₂NHC₁₋₆алкила, фенила и C₁₋₆алкиленфенила.

17. Полифункциональное биологически активное соединение по п.1, выбранное из соединений, представленных ниже



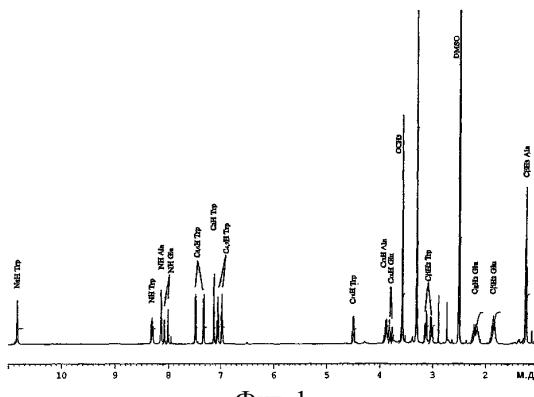
Соед.	A	L^1	m	*	n	L^2	D	R^5
1	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
2	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
3	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
4	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
5	D-Trp-ONH ₂	-CO-	2	D-D	1	связь	Bz	H
6	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
7	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
8	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	1	связь	Ph	H
9	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	4	связь	H ₂ N	H
10	L-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
11	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	1	связь	H	H
12	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
13	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
14	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
15	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	1	связь	H	H
16	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	1	связь	H	H
17	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	1	связь	H	H
18	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
19	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
20	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	связь	H ₂ N	H
21	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
22	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
23	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H
24	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	1	связь	H	H

Соед.	A	L ¹	m	*	n	L ²	D	R ⁵
25	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm*	H
26а	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm	H
26б	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Palm	H
27	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Palm	H
28	D-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
29	D-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
30	L-Trp-OMe	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
31	L-Trp-OH	-CO-	1	L-L	4	-NH-	Palm	H
32	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил-	H
33а	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил-	H
33б	L-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	N-ацетилглюкозамин(1-4)-N-ацетилмурамил-	H
34	D-Trp-OMe	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
35	D-Trp-OH	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
36	D-Trp-NH ₂	-CO-	2	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
37	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
38	L-Trp-OH	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
39	L-Trp-NH ₂	-CO-	2	L-L	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
40	D-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
41	D-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
42	L-Trp-OMe	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
43	L-Trp-OH	-CO-	1	D-D	4	-NH-	Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala-Tyr-Pro-Ser-	H
45	L-Trp-OMe	-CO-	2	L-L	4	-NH-	H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Ala	H

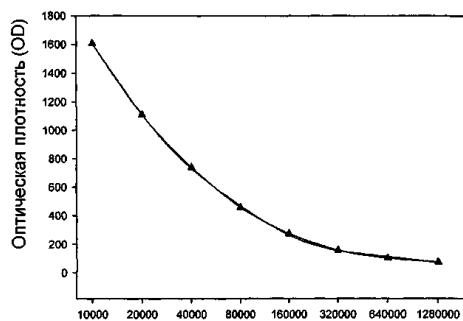
18. Фармацевтическая композиция, содержащая полифункциональное биологически активное соединение по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Применение соединения по любому из пп.1-17 в качестве лекарственного средства для лечения иммунных нарушений.

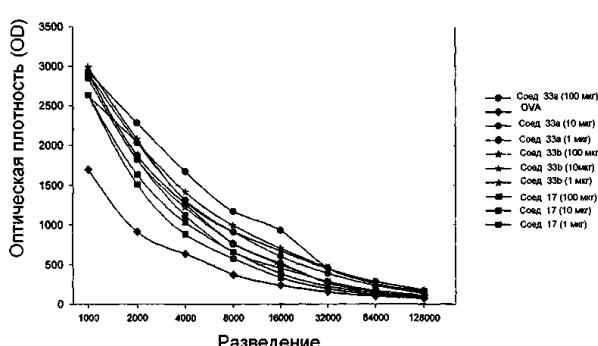
20. Применение соединения по любому из пп.1-17 для лечения иммунных нарушений.



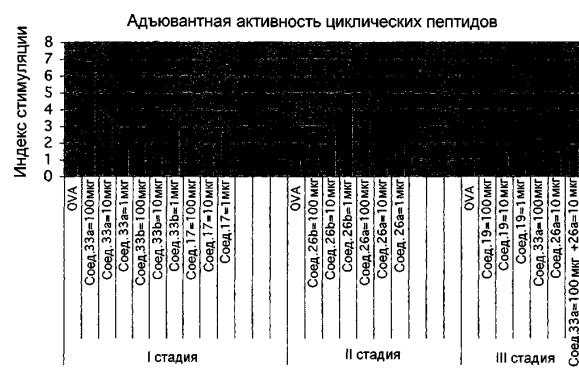
OVA + CFA



Фиг. 2



Фиг. 3



Тестируемые пептиды

OVA - бывчий овалбумин

Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2