

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **203448**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **356171**

(22) Data zgłoszenia: **06.12.2000**

(86) Data i numer zgłoszenia międzynarodowego:
06.12.2000, PCT/US00/33057

(87) Data i numer publikacji zgłoszenia międzynarodowego:
14.06.2001, WO01/42193
PCT Gazette nr 24/01

(51) Int.Cl.

C07C 233/43 (2006.01)

C07C 215/68 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61K 25/00 (2006.01)

(54)

**Pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy
i jej zastosowanie oraz kompozycja farmaceutyczna i jej zastosowanie**

(30) Pierwszeństwo:

08.12.1999,US,09/457,618

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.06.2004 BUP 12/04

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.10.2009 WUP 10/09

(73) Uprawniony z patentu:

THERAVANCE, INC.,South San Francisco,US

(72) Twórca(y) wynalazku:

Edmund J. Moran,San Francisco,US

Seok-Ki Choi,Palo Alto,US

(74) Pełnomocnik:

**Szczepańska Zofia,
Rzecznik Patentowy, PATPOL Sp. z o.o.**

PL 203448 B1

Opis wynalazku

Dziedzina wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy i jej zastosowanie oraz kompozycja farmaceutyczna i jej zastosowanie. Pochodne te stanowią nowe związki (środki) wielowiążące, które są agonistami receptora β 2-adrenergicznego lub częściowymi agonistami. Wielowiążące związki oraz kompozycje farmaceutyczne według wynalazku są użyteczne do leczenia i zapobiegania chorobom dróg oddechowych, takim jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc i przewlekłe zapalenie oskrzeli. Są one również przydatne do leczenia uszkodzeń układu nerwowego i przedwczesnego porodu.

Literatura

W niniejszym opisie jako numery w indeksie górnym cytuje się następujące publikacje

¹J.G. Hardman i in., „The Pharmacological Basis of Therapeutics”, McGraw-Hill, Nowy Jork (1996).

²A.D. Strosberg, „Structure, Function and Regulation of Adrenergic Receptors”, *Protein Sci.* 2, 1198-1209 (1993).

³A.G. Beck-Sickinger, „Structure, Characterization and Binding Sites of G-Protein-coupled Receptors” *DDT.* 1, 502-513 (1996).

⁴L. Hein i B.K. Kobilka, „Adrenergic Receptor Signal Transduction and Regulation” *Neuropharmacol.*, 34, 357-366 (1996).

⁵A.D. Strosberg i F. Pietri-Rouxel „Function and Regulation of β 3-Adrenoceptor” *TIPS*, 17, 373-381 (1996).

⁶P.J. Barnes „Current Therapies for Asthma” *CHEST*, 111:17S-26S (1997).

⁷D.A. Jack „A way of Looking at Agonism and Antagonism: Lessons from Salbutamol, Salmeterol and other β -Adrenoceptor Agonists” *Br. J. Clin. Pharmac.* 31, 501-514 (1991).

⁸Kissei Pharmaceutical Co. Ltd. „2-Amino-1-(4-hydroxy-2-methyl-phenyl)propanol derivatives” JP-10152460 (data publikacji 9 czerwca 1998).

Wszystkie powyższe publikacje wprowadzono tu łącznie jako literaturę, w takim zakresie, w jakim wskazano dla każdej z wymienionych tu konkretnie publikacji.

Stan techniki

Receptor jest strukturą biologiczną z jedną lub więcej domenami wiążącymi, która tworzy odwracalne kompleksy z jednym lub więcej ligandami i skompleksowanie takie ma biologiczne konsekwencje. Receptory mogą występować całkowicie poza komórką (receptory pozakomórkowe), w obrębie błony komórkowej (ale z prezentowaniem segmentów receptora środowisku pozakomórkowemu i cytosolowi), lub całkowicie wewnątrz komórki (receptory wewnątrzkomórkowe). Mogą one również działać niezależnie od komórki (np. tworzenie skrzepów). Receptory w obrębie błony komórkowej umożliwiają komórce komunikowanie się z przestrzenią poza jej granicami (tj. sygnalizowanie), jak również udział w transportowaniu cząsteczek do i poza komórkę.

Ligand jest partnerem wiążącym dla konkretnego receptora lub rodziny receptorów. Dla danego receptora ligandem może być ligand endogenny, lub, alternatywnie, ligand syntetyczny, taki jak lek, kandydat na lek lub czynnik farmakologiczny.

Jedną z najważniejszych klas receptorów związanych z błoną, które komunikują zmiany zachodzące na zewnątrz granic komórki do jej wnętrza, wyzwalając w razie potrzeby odpowiedź komórkową, stanowi nadrodzina siedmiu przezbłonowych białek (7-TM), zwanych również receptorami sprzężonymi z białkami G (GPCR). Po aktywowaniu białka G wpływają zarówno pozytywnie jak i negatywnie na wiele wcześniejszych układów efektorowych (np. kanały jonowe, kaskady kinaz białkowych, transkrypcja, transmigracja białek adhezyjnych, itp.).

Receptory adrenergiczne (AR) są członkami receptorów sprzężonych z białkami G, na które składa się rodzina trzech podtypów receptorów: β 1 (A, B, C), β 2 (A, B, C) i β ($1, 2, 3$)¹⁻⁵. Receptory te są wyrażane w tkankach różnych układów i narządów u ssaków, a stosunek pomiędzy receptorami α i β jest zależny od tkanki. Przykładowo, tkanki mięśni gładkich oskrzeli wyrażają głównie β 2-AR, zaś komórki naczyń krwionośnych skóry zawierają wyłącznie podtypy β -AR.

Stwierdzono, że podtyp β 2-AR jest zaangażowany w choroby dróg oddechowych, takie jak astma⁶, przewlekłe zapalenie oskrzeli, uszkodzenia układu nerwowego i przedwczesne porody⁸. W chwili obecnej do leczenia astmy stosuje się wiele leków, np. albuterol, formoterol, izoprenolol lub salmeterol, o aktywności agonistycznej wobec β 2-AR. Jednakże, leki te mają ograniczone zastosowanie, ponieważ są nieselektywne i tym samym powodują skutki uboczne, takie jak drżenie mięśni, tachykardia,

palpitacje i niepokój⁶, albo mają krótki czas działania i/lub powolny czas rozpoczęcia działania. A zatem, istnieje zapotrzebowanie na selektywnych wobec β_2 agonistów AR, którzy szybko działają i mają zwiększoną moc i/lub dłuższy czas działania.

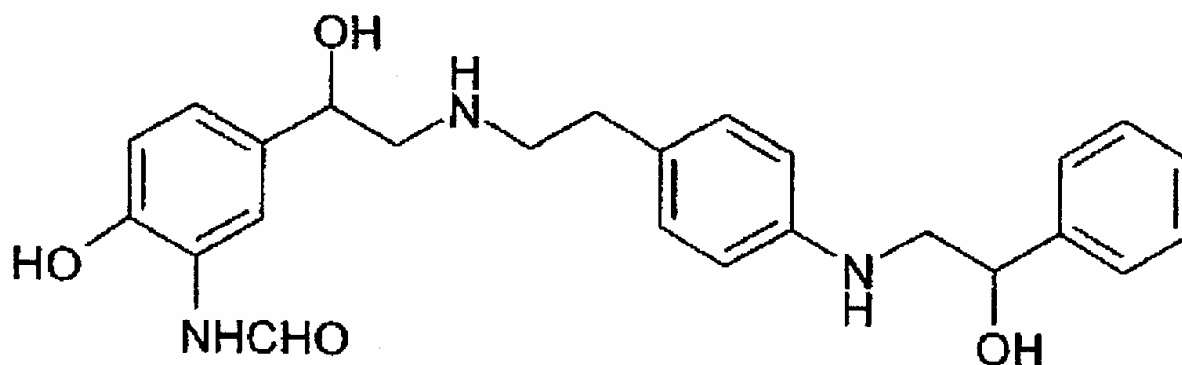
Wielowiążące związki według przedmiotowego wynalazku spełniają to zapotrzebowanie.

Znani są różni agoniści lub częściowi agoniści receptorów β_2 -adrenergicznych. W dokumencie WO 98/21175 został ujawniony sposób wytwarzania optycznie czystych izomerów formoterolu, agonisty dającego długi trwały skutek rozszerzający oskrzela, gdy jest on wdychany. Dokument GB-A-1 394 542 odnosi się do optycznie czynnych izomerów pewnych fenylohydroksyamin, wykazujących selektywne działanie na receptorach β_2 . Dokument GB-A-1 040 724 ujawnia nowe związki aminoalkoholowe, wartościowe w leczeniu chorób serca lub krążenia; ujawniono także sposób wytwarzania tych związków.

STRESZCZENIE WYNALAZKU

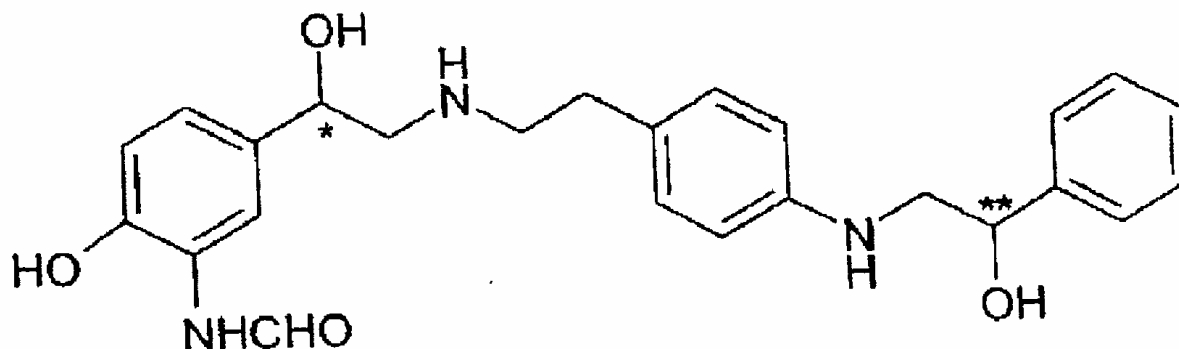
Wynalazek niniejszy skierowany jest nowe wielowiążące związki (środki), które są agonistami lub częściowymi agonistami receptora β_2 -adrenergicznego, a zatem są użyteczne do leczenia i zapobiegania chorobom dróg oddechowych, takim jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc i przewlekłe zapalenie oskrzeli. Są one również przydatne do leczenia uszkodzeń układu nerwowego i przedwczesnego porodu.

Pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy, zgodnie z wynalazkiem charakteryzuje się tym, że przedstawia ją wzór:



lub jej farmaceutycznie dopuszczalna sól.

Pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy, zgodnie z wynalazkiem charakteryzuje się także tym, że przedstawia ją wzór:



w którym stereochemia przy *C i **C jest (RS) i (RS), (R) i (R), (R) i (S), (S) i (R) lub (S) i (S); lub jej farmaceutycznie dopuszczalna sól.

Korzystnie, w związku określonym powyżej stereochemia przy *C jest (R), a stereochemia przy **C jest (R).

Korzystnie, w związku określonym powyżej stereochemia przy *C jest (R) i stereochemia przy **C jest (S).

Kompozycja farmaceutyczna, zgodnie z wynalazkiem charakteryzuje się tym, że zawiera farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i terapeutycznie skuteczną ilość związku określonego wcześniej.

Korzystnie, kompozycja farmaceutyczna zawiera ponadto terapeutycznie skuteczną ilość steroidowego leku przeciwzapalnego.

Związek określony wcześniej albo kompozycja farmaceutyczna określona wcześniej, służy do zastosowania jako lek, zwłaszcza jako lek do leczenia choroby, w której pośredniczy receptor β 2-adrenergiczny u ssaków.

Związek określony wcześniej albo kompozycję farmaceutyczną określoną wcześniej, stosuje się do wytwarzania leku do leczenia choroby, w której pośredniczy receptor β 2-adrenergiczny u ssaków.

Korzystnie, lek jest przeznaczony do leczenia choroby dróg oddechowych, a zwłaszcza astmy lub przewlekłej obturacyjnej choroby płuc.

KRÓTKI OPIS RYSUNKU

Na Fig. 1 zilustrowano syntezę związku według wynalazku.

SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNALAZKU

Przedmiotem wynalazku są wielowiązujące związki, które są agonistami receptora β 2 adrenergicznego, kompozycje farmaceutyczne zawierające takie związki oraz sposoby leczenia chorób u ssaków, w które zaangażowany jest receptor β 2 adrenergiczny. Jeśli nie wskazano inaczej, określenia stosowane w opisie związków, kompozycji i sposobów mają następujące znaczenia. Określenia niezdefiniowane mają znaczenia znane w stanie techniki.

Określenie „farmaceutycznie dopuszczalne sole” odnosi się do soli, które utrzymują biologiczną skuteczność i własności wielowiązujących związków według wynalazku i które nie są niepożądane z biologicznego lub innego punktu widzenia.

Farmaceutycznie dopuszczalne sole addycyjne z zasadami można wytworzyć z nieorganicznych i organicznych zasad. Sole utworzone z nieorganicznymi zasadami obejmują, na przykład, sole sodu, potasu, litu, sole amonowe, sole wapnia i magnezu. Sole utworzone z organicznymi zasadami obejmują, ale nie wyłącznie, sole pierwszorzędowych, drugorzędowych i trzeciorzędowych amin, takich jak alkiloaminy, dialkiloaminy, trialkiloaminy, podstawione alkiloaminy, di(podstawione alkilo)aminy, tri(podstawione alkilo)aminy, alkenyloaminy, dialkenyloaminy, trialkenyloaminy, podstawione alkenyloaminy, di(podstawione alkenylo)aminy, tri(podstawione alkenylo)aminy, cykloalkiloaminy, di(cykloalkilo)aminy, tri(cykloalkilo)aminy, podstawione cykloalkiloaminy, dipodstawione cykloalkiloaminy, tripodstawione cykloalkiloaminy, cykloalkenyloaminy, di(cykloalkenylo)aminy, tri(cykloalkenylo)aminy, podstawione cykloalkenyloaminy, dipodstawione cykloalkenyloaminy, tripodstawione cykloalkenyloaminy, aryloaminy, diaryloaminy, triaryloaminy, heteroaryloaminy, diheteroaryloaminy, triheteroaryloaminy, heterocykliczne aminy, diheterocykliczne aminy, triheterocykliczne aminy, mieszane di- i tri-aminy, w których co najmniej dwa podstawniki w części aminowej są różne i są wybrane z grupy obejmującej alkil, podstawiony alkil, alkenyl, podstawiony alkenyl, cykloalkil, podstawiony cykloalkil, cykloalkenyl, podstawiony cykloalkenyl, aryl, heteroaryl, grupę heterocykliczną, itp. W zakres ten wchodzi również aminy, w których dwa lub trzy podstawniki, razem z aminowym atomem azotu, tworzą grupę heterocykliczną lub heteroarylową. Przykłady odpowiednich amin obejmują, ale nie wyłącznie, izopropyloaminę, trimetyloaminę, dietyloaminę, tri(izopropylo)aminę, tri(n-propylo)aminę, etanoloaminę, 2-dimetyloamino- etanol, trometaminę, lizynę, argininę, histydynę, kafeinę, prokainę, hydrabaminę, cholinę, betainę, etylenodiaminę, glukozaminę, N-alkiloglukaminy, teobrominę, puryny, piperazynę, piperydynę, morfolinę, N-etylopiperydynę, itp.

Farmaceutycznie dopuszczalne sole addycyjne z kwasem można wytworzyć z nieorganicznymi lub organicznymi kwasami. Sole pochodzące od nieorganicznych kwasów obejmują sole z kwasem solnym, bromowodorowym, siarkowym, azotowym, fosforowym, itp. Kwasy organiczne, z którymi można tworzyć sole, obejmują kwas octowy, kwas propionowy, kwas glikolowy, kwas pirogronowy, kwas szczawiowy, kwas jabłkowy, kwas malonowy, kwas bursztynowy, kwas maleinowy, kwas fumarowy, kwas winowy, kwas cytrynowy, kwas benzoesowy, kwas cynamonowy, kwas migdałowy, kwas metanosulfonowy, kwas etanosulfonowy, kwas p-tolueno-sulfonowy, kwas salicylowy, kwas naftoesowy, kwas 2-hydroksynaftoesowy, itp.

Określenie „farmaceutycznie dopuszczalny kation” odnosi się do kationu farmaceutycznie dopuszczalnej soli.

Określenie „grupa ochronna” lub „grupa blokująca” odnosi się do każdej grupy, która, gdy jest związana z jedną lub więcej grupą aminową związku (łącznie z jego związkami pośrednimi), chroni te grupy przed reakcją, która mogłaby wystąpić, przy czym grupę ochronną można usunąć konwencjonalnymi metodami chemicznymi lub enzymatycznymi, przywracając grupę aminową (Patrz. T.W. Greene i P.G.H. Wuts, „*Protective Groups in Organic Synthesis*”, wyd. 2). Stosowanie konkretnych usuwalnych grup blokujących nie jest krytyczne.

Korzystne usuwalne grupy blokujące grupę aminową obejmują konwencjonalne podstawniki, takie jak t-butoksykarbonyl (t-BOC), benzyloksykarbonyl (CBZ), fluorenylometoksykarbonyl (Fmoc), aliloksykarbonyl (ALOC), itp., które można usunąć w konwencjonalnych warunkach zgodnych z charakterem produktu.

Określenie „leczenie” odnosi się do leczenia stanu patologicznego u ssaka, a zwłaszcza u człowieka, które obejmuje:

(i) zapobieganie wystąpieniu stanu patologicznego u pacjenta, na który pacjent może być narażony, ale którego jeszcze nie zdiagnozowano, a zatem leczenie takie obejmuje leczenie profilaktyczne danego stanu chorobowego;

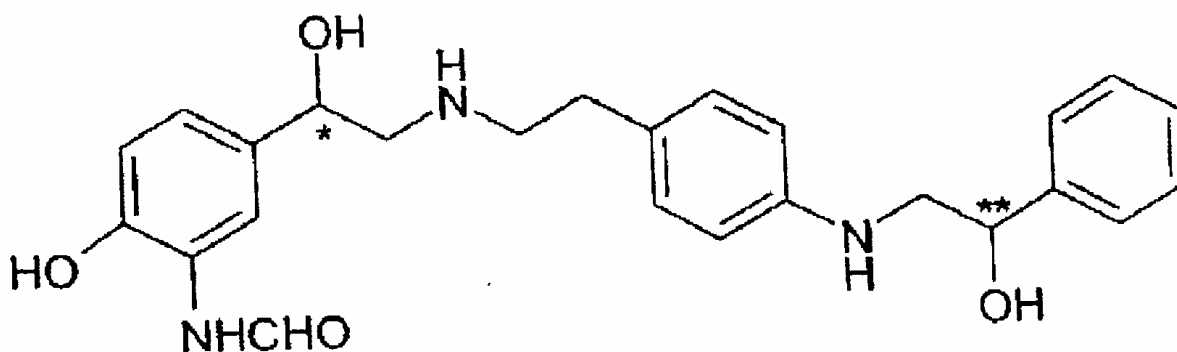
(ii) hamowanie stanu patologicznego, tzn. powstrzymanie jego rozwoju;

(iii) łagodzenie stanu patologicznego, tj. spowodowanie regresji stanu patologicznego; lub

(iv) łagodzenie stanów związanych ze stanem patologicznym.

Określenie „terapeutycznie skuteczna ilość” odnosi się do ilości wielowiązującego związku, która przy podawaniu potrzebującym tego ssakom jest skuteczna w leczeniu opisanych powyżej stanów. Terapeutycznie skuteczna ilość zmienia się w zależności od pacjenta i leczonego stanu chorobowego, ciężaru ciała i wieku pacjenta, zaawansowania leczonego stanu, sposobu podawania itp., i będzie łatwa do określenia dla specjalisty w tej dziedzinie techniki.

Związki według wynalazku istnieją w postaci stereoizomerycznej:



Typowo zatem, stereochemia przy *C jest (RS) i stereochemia przy **C jest (RS), lub stereochemia przy *C jest (R) i stereochemia przy **C jest (R), lub stereochemia przy *C jest (S) i stereochemia przy **C jest (S), lub stereochemia przy *C jest (R) i stereochemia przy **C jest (S), lub stereochemia przy *C jest (S) i stereochemia przy **C jest (R).

OGÓLNY SCHEMAT SYNTEZY

Związki według wynalazku można wytworzyć sposobem przedstawionym na poniższym schemacie reakcji.

Stosowane do wytwarzania tych związków substancje wyjściowe i reagenty są dostępne u dostawców, takich jak Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA), Bachem (Torrance, Kalifornia, USA), Emka-Chemie lub Sigma (St. Louis, Missouri, USA) lub można je wytworzyć sposobami znanymi specjalistom w tej dziedzinie techniki, opisanymi w publikacjach takich jak Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, Vol. 1-15 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Vol. 1-5 and Supplementals (Elsevier Science Publishers, 1989), Organic Reactions, Vol. 1-40 (John Wiley and Sons, 1991), March's Advanced Organic Chemistry (John Wiley and Sons, wyd. 4) i Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989).

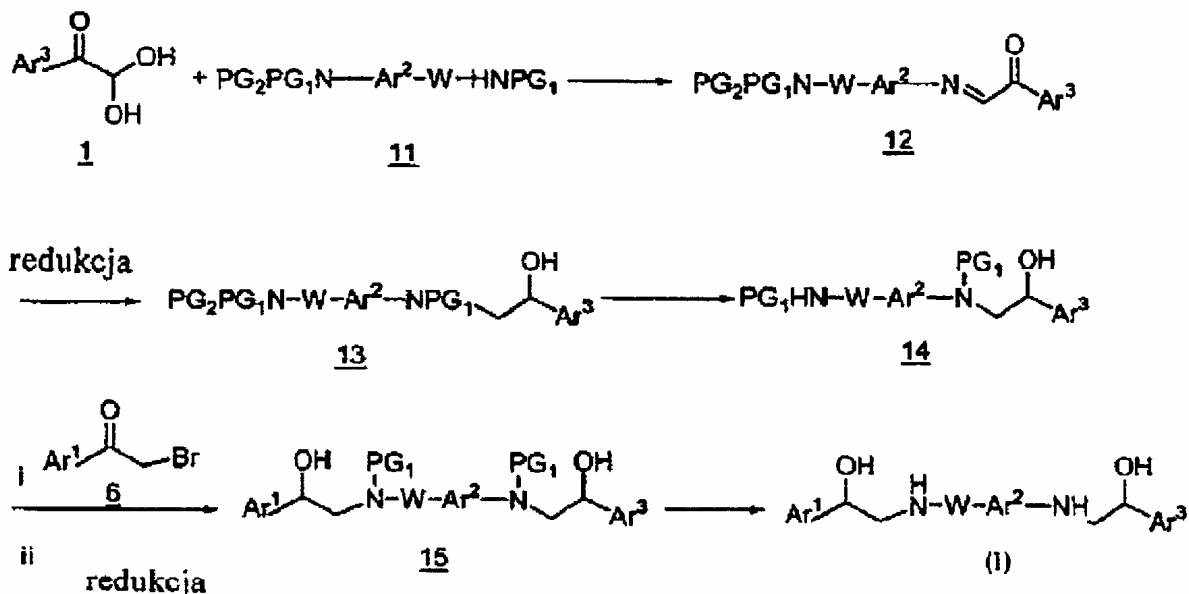
Substancje wyjściowe i związki pośrednie w reakcji w razie potrzeby można wyodrębnić i oczyścić konwencjonalnymi sposobami, obejmującymi, ale nie wyłącznie, sączenie, destylację, krystalizację, chromatografię, itp. Substancje takie można scharakteryzować konwencjonalnymi metodami, obejmującymi parametry fizyczne i dane spektralne.

Należy ponadto rozumieć, że gdy podano typowe lub korzystne warunki sposobu (tj. temperatury reakcji, czasy, stosunki molowe reagentów, rozpuszczalniki, ciśnienia, itd.), jeśli wyraźnie nie wskazano inaczej, można również stosować inne warunki. Optymalne warunki reakcji mogą zmieniać się w zależności od konkretnych stosowanych reagentów lub rozpuszczalników, ale będą one łatwe do określenia dla specjalisty w tej dziedzinie techniki na drodze rutynowej optymalizacji.

Dla specjalistów w tej dziedzinie techniki oczywiste również będzie, że w celu zabezpieczenia niektórych grup funkcyjnych przed niepożądanymi reakcjami, konieczne może być stosowanie

konwencjonalnych grup ochronnych. Wybór odpowiedniej grupy ochronnej dla konkretnej grupy funkcyjnej, jak również warunki ochrony i odblokowania są dobrze znane w technice. Przykładowo, wiele grupy ochronnych oraz ich wprowadzanie i usuwanie opisano np. w publikacji T.W. Greene i G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, wydanie drugie, Wiley, Nowy Jork, 1991, i w cytowanej tam literaturze.

Przedstawiony schemat stanowi jedynie ilustrację niektórych sposobów, którymi można zsyntetyzować związki według wynalazku. Do schematu tego można wprowadzać różne modyfikacje które będą oczywiste dla specjalisty w tej dziedzinie techniki na podstawie przedstawionego ujawnienia.



Na schemacie tym Ar^1 oznacza 4-hydroksy-3-formyloaminofenyl, Ar^2 oznacza 1,4-fenylen, Ar^3 oznacza fenyl, a W oznacza $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$.

Diaminę o wzorze 11 (w którym PG_1 i PG_2 oznaczają odpowiednie grupy ochronne dla grupy aminowej, które można selektywnie usunąć) kondensuje się z glioksałem o wzorze 2, a następnie wytworzoną iminę o wzorze 12 redukuje się odpowiednim czynnikiem redukującym, takim jak diboran, w odpowiednich rozpuszczalnikach reakcyjnych, takich jak tetrahydrofuran, i uzyskuje się związek o wzorze 13. Związki o wzorze 11 można wytworzyć sposobami przedstawionymi na fig. 14.

Związek 15 poddaje się reakcji z alfa-bromoacetofenonem o wzorze 6, a następnie grupę ketonową redukuje się, uzyskując związek o wzorze 16. Reakcję tę prowadzi się w warunkach dobrze znanych w technice. Następnie, po usunięciu grupy ochronnej dla grupy aminowej uzyskuje się związek o wzorze (I). Warunki usuwania grupy ochronnej zależą od charakteru stosowanej grupy ochronnej. Przykładowo, jeśli grupą ochronną jest grupa benzyłowa, usuwa się ją w warunkach reakcji katalizycznego uwodornienia.

Zastosowanie, badanie i podawanie

Zastosowanie

Związki wielowiążące według wynalazku są agonistami lub częściowymi agonistami receptora β_2 adrenergicznego. A zatem związki wielowiążące i kompozycje farmaceutyczne według wynalazku są przydatne do leczenia i zapobiegania chorobom, w których pośredniczy receptor β_2 adrenergiczny, takim jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc, zapalenie oskrzeli, itp. Są one także użyteczne do leczenia urazów układu nerwowego i przedwczesnego porodu. Uważa się również, że związki według wynalazku są przydatne do leczenia zaburzeń metabolicznych, takich jak otyłość, cukrzyca, itp.

Badanie

Aktywność agonistyczną związków o wzorze (I) wobec receptora β_2 adrenergicznego można wykazać w różnych badaniach *in vitro* znanych specjalistom w tej dziedzinie techniki, takich jak badania biologiczne opisane w przykładach 1 i 2. Związki można również badać *ex vivo*, jak opisali D. Ball i in., w „Salmeterol a Novel, Long-acting beta 2-Adrenergic Agonist: Characterization of Pharmacological Activity *in Vitro* and *in Vivo*”, Br. J. Pharmacol., 104, 665-671 (1991); A. Linden i in., „Salmeterol, Formoterol and Salbutamol in the Isolated Guinea-Pig Trachea: Differences in Maximum Relaxant Effect

and Potency but not in Functional Atagonism. *Thorax*, 48, 547-553 (1993); i A.T. Bials i in., Investigations into Factors Determining the Durations of Action of the Beta 2-Adrenoceptor Agonist, Salmeterol. *Br. J. Pharmacol.*, 108, 505-515 (1993); lub w badaniach *in vivo*, jak opisali D.I. Ball i in., w „Salmeterol a Novel, Long-acting beta 2-Adrenergic Agonist: Characterization of Pharmacological Activity *in Vitro and in Vivo*”, *Br. J. Pharmacol.*, 104, 665-671 (1991); H. Kikkawa i in., „TA-2005, a Novel, Long-acting and Selective Beta 2-Adrenoceptor Agonist: Characterization of its *in vivo* Bronchodilating Action in Guinea Pigs and Cats in Comparison with other Beta 2-Agonists”, *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1047-1052, (1994); oraz G.P. Anderson, „Formoterol: Pharmacology, Molecular basis of Agonism and Mechanism of Long Duration of a Highly Potent and Selective Beta 2-Adrenoceptor Agonist Bronchodilator”, *Life Sciences*, 52, 2145-2160, (1993).

Kompozycje farmaceutyczne

Gdy związki według wynalazku stosuje się jako środki farmaceutyczne, na ogół podaje się je w postaci kompozycji farmaceutycznych. Związki te można podawać różnymi drogami, obejmującymi podawania doustne, doodbytnicze, przezskórne, podskórne, dożylnie, domięśniowe i przez inhalację (np. donosową lub doustną). Związki te są skuteczne jako kompozycje do wstrzykiwania, do inhalacji i do podawania doustnego. Kompozycje takie wytwarza się sposobami znanymi specjalistom w tej dziedzinie techniki i zawierają one co najmniej jeden związek aktywny. Korzystnym sposobem podawania związków według wynalazku jest inhalacja. Jest to skuteczny środek dostarczania środka leczniczego bezpośrednio do dróg oddechowych w leczeniu chorób takich jak astma i inne podobne lub pokrewne zaburzenia dróg oddechowych (patrz, patent USA nr 5,607,915). Wynalazek obejmuje również kompozycję farmaceutyczną, która jako składnik aktywny zawiera terapeutycznie skuteczną ilość związku według wynalazku w połączeniu z farmaceutycznie dopuszczalnymi nośnikami. Przy wytwarzaniu kompozycji według wynalazku składnik aktywny zwykle miesza się z substancją pomocniczą, rozcieńcza się substancją pomocniczą, albo zamyka wewnątrz nośnika, który może być w postaci kapsułki, saszetki, bibuły lub innego pojemnika. Gdy substancja pomocnicza pełni funkcję rozcieńczalnika, może to być substancja stała, półstała lub ciekła, która jest nośnikiem lub ośrodkiem dla składnika aktywnego. Tak więc, kompozycje mogą być w postaci tabletek, pigułek, proszków, pastylek, saszetek, kołaczyków, eliksirów, zawiesin, emulsji, roztworów, syropów, aerozoli (w postaci stałej lub w ciekłym ośrodku), maści, zawierających, na przykład, do 10% wagowych związku aktywnego, miękkich i twardych kapsułek żelatynowych, czopków, sterylnych roztworów do wstrzykiwania i sterylne opakowanych proszków.

Przy wytwarzaniu kompozycji konieczne może być zmielenie związku aktywnego w celu uzyskania cząstek o odpowiedniej wielkości przed połączeniem z innymi składnikami. Gdy związek aktywny jest zasadniczo nierozpuszczalny, na ogół miele się go na cząstki o wielkości poniżej 200 mesh. Gdy związek aktywny jest zasadniczo rozpuszczalny w wodzie, w celu zapewnienia równomiernego rozkładu w kompozycji, związek miele się na cząstki o wielkości np. około 40 mesh.

Przykłady odpowiednich substancji pomocniczych obejmują laktozę, dekstrozę, sacharozę, sorbitol, mannitol, skrobie, gumę arabską, fosforan wapnia, alginiany, żywicę tragakantową, żelatynę, krzemian wapnia, mikrokrystaliczną celulozę, poliwinylpirolidon, celulozę, sterylną wodę, syrop i metylocelulozę. Kompozycje mogą ponadto zawierać: środki poślizgowe, takie jak talk, stearynian magnezu i olej mineralny; środki zwilżające; substancje emulgujące i zawieszające; środki konserwujące, takie benzoesan metylu i hydroksypropylu; substancje słodzące; oraz substancje smakowo-zapachowe. Kompozycje według wynalazku można formułować sposobami znanymi w technice tak, aby uzyskać szybkie, przedłużone lub opóźnione uwalnianie składnika aktywnego po podaniu go pacjentowi.

Kompozycje korzystnie formułuje się w postaci dawek jednostkowych. Określenie „postać dawki jednostkowej” odnosi się do fizycznie odrębnych jednostek odpowiednich jako pojedyncze dawki dla ludzi i innych ssaków, przy czym każda z takich dawek zawiera ustaloną ilość składnika czynnego, odpowiednią do uzyskaniażądanego skutku leczniczego, w połączeniu z odpowiednią farmaceutyczną substancją pomocniczą. Korzystnie, związek o wzorze (I) stosuje się w ilości nie większej niż około 20% wagowych, bardziej korzystnie nie więcej niż około 15% wagowych kompozycji farmaceutycznej, zaś uzupełnienie stanowi(a) farmaceutycznie obojętny(e) nośnik(i).

Związek aktywny jest skuteczny w szerokim zakresie dawek i na ogół podaje się go w farmaceutycznie skutecznej ilości. Przykładowo, gdy lek podaje się przez inhalację, każda dawka zawiera od około 1 µg do około 1000 µg, korzystnie około 2 µg do około 500 µg, bardziej korzystnie około 5 µg do około 100 µg, a jeszcze korzystniej około 5 µg do około 60 µg składnika aktywnego. Należy jednakże rozumieć, że ilość związku podawanego pacjentowi ustalona będzie przez lekarza prowadzącego na

podstawie towarzyszących okoliczności obejmujących stan, który ma być leczony, wybraną drogę podawania, konkretny podawany związek i stopień jego aktywności, wiek, ciężar i reakcję konkretnego pacjenta, zaawansowanie objawów choroby, itp. Ponadto, związek według wynalazku można również podawać profilaktycznie, na przykład kompozycję farmaceutyczną zawierającą związek według wynalazku można podawać przed rozpoczęciem się skurczu oskrzeli przy ataku astmy w celu zapobieżenia jego wystąpieniu lub zmniejszenia jego nasilenia.

Przy wytwarzaniu stałych kompozycji, takich jak tabletki, główny składnik aktywny miesza się z farmaceutyczną substancją pomocniczą i uzyskuje się kompozycję wstępną zawierającą homogeniczną mieszaninę związku według wynalazku. Gdy kompozycję określa się mianem „homogenicznej”, rozumieć przez to należy, że składnik aktywny jest zdyspergowany w jednorodny sposób w całej kompozycji, a zatem kompozycję można łatwo podzielić na równie skuteczne dawki jednostkowe, takie jak tabletki, pigułki i kapsułki. Następnie stałą kompozycję wstępną dzieli się na dawki jednostkowe, jak opisane powyżej, zawierające składnik aktywny według wynalazku.

Tabletki lub pigułki według wynalazku można pokrywać powłoczką lub preparować w inny sposób, uzyskując postać użytkową o korzystnym przedłużonym działaniu. Przykładowo, tabletki lub pigułki mogą obejmować składnik wewnętrzny i zewnętrzny, z których ten ostatni stanowi osłonę dla tego pierwszego. Dwa wymienione składniki można oddzielić warstwą rozpuszczającą się w jelitach, która służy jako ochrona przed rozkładem w żołądku i pozwala składnikowi wewnętrznemu na dotarcie w nienaruszonym stanie do dwunastnicy lub na opóźnione uwolnienie. Na rozpuszczające się w jelitach warstwy lub powłoczki można stosować różne materiały, które obejmują wiele kwasów polimerowych oraz mieszaniny kwasów polimerowych z materiałami takimi jak szelak, alkohol cetylowy i octan celulozy.

Ciekłe postaci do podawania doustnego i do wstrzykiwania, obejmujące nowe kompozycje według wynalazku, obejmują wodne roztwory, syropy zawierające odpowiednie substancje smakowo-zapachowe, wodne lub olejowe zawiesiny, aromatyzowane emulsje z jadalnymi olejami, takimi jak olej kukurydziany, olej z nasion bawełny, olej sezamowy, olej kokosowy lub olej arachidowy, jak również eliksiry i podobne farmaceutyczne rozcieńczalniki.

Kompozycje do inhalacji lub wdmuchiwania obejmują roztwory i zawiesiny w farmaceutycznie dopuszczalnych wodnych lub organicznych rozpuszczalnikach, lub ich mieszaninach, oraz proszki (patrz patent USA nr 5,983,956). Ciekłe lub stałe kompozycje mogą zawierać odpowiednie farmaceutycznie dopuszczalne substancje pomocnicze, jak opisano powyżej. W celu działania miejscowego lub ogólnoustrojowego korzystnie kompozycje podaje się doustnie lub donosowo do dróg oddechowych. Kompozycje w odpowiednich do stosowania farmaceutycznych rozpuszczalnikach można rozpylać stosując obojętne gazy. Roztwory do rozpylania można wdychać bezpośrednio z urządzenia do rozpylania, lub do urządzenia może być dołączony namiot z maską na twarz, lub aparat do sztucznego oddychania przy dodatnim ciśnieniu z przerwami. Roztwory, zawiesiny lub kompozycje proszkowe można podawać, korzystnie doustnie lub donosowo, z urządzeń dostarczających takie kompozycje w odpowiedni sposób (patrz patenty USA nr nr 5,919,827 i 5,972,919).

Ponadto, przy leczeniu chorób dróg oddechowych kompozycje farmaceutyczne według wynalazku, zawierające jeden lub więcej związków według wynalazku, można podawać w kombinacji z innym odpowiednim lekiem, na przykład z odpowiednim steroidowym lekiem przeciwzapalnym, takim jak na przykład budesonid, flukazon, beklametazon. Gdy stosuje się terapię skojarzoną, kompozycję według wynalazku zawierającą związek(ki) według wynalazku oraz steroidowy lek przeciwzapalny można podawać jednocześnie, kolejno lub oddzielnie. Każdy ze stosowanych w terapii skojarzonej składników stosuje się w ilości wystarczającej dla zamierzonego celu. Przykładowo, steroidowe leki przeciwzapalne stosuje się w ilościach wystarczających do zmniejszenia zapalenia *in vivo*. Związki będące agonistami /częściowymi agonistami receptora β_2 adrenergicznego według wynalazku stosuje się w ilości wystarczającej do wywołania zwiótczenia tkanki mięśni gładkich, np. w oskrzelach.

Korzystnie, dawki związków według wynalazku mieszczą się w zakresie od około 1 μg do około 1000 μg , bardziej korzystnie od około 2 μg do około 500 μg , jeszcze bardziej korzystnie od około 5 μg do około 100 μg , a najkorzystniej od około 5 μg do około 60 μm na dawkę. Dawki steroidowego leku przeciwzapalnego korzystnie mieszczą się w zakresie od około 50 do 4800 μg , a bardziej korzystnie około 100 μg do około 1600 μg . Jak poprzednio, konkretna dawka będzie zależeć od pacjenta (wiek, ciężar ciała itd.) i zaawansowania choroby (łagodna, średnia, poważna). Kompozycję farmaceutyczną zawierającą dwa składniki aktywne można wytworzyć tak, aby leki podawane były jednocześnie.

PRZYKŁADY

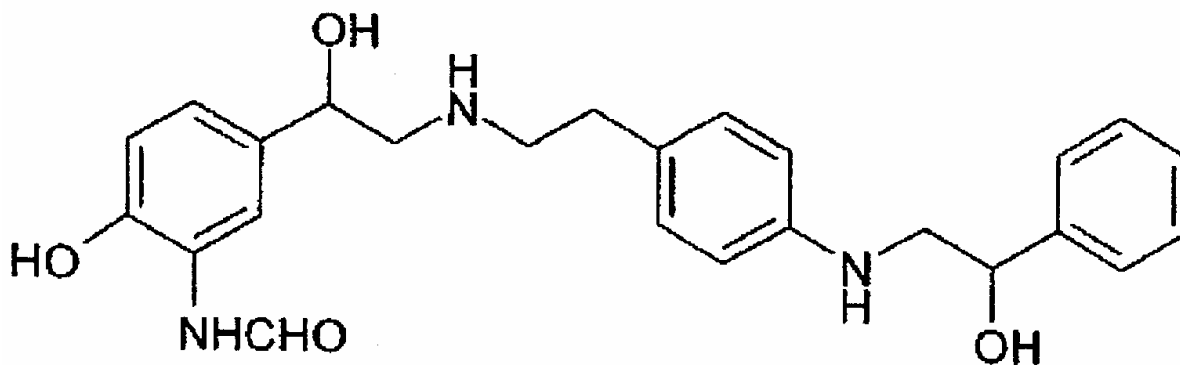
W celu lepszego zrozumienia wynalazku i możliwości jego przeprowadzenia zamieszczono następujące przykłady. Przykłady te podano jedynie w celach ilustracyjnych i w żaden sposób nie ograniczają one zakresu wynalazku.

Stosowane w poniższych przykładach skróty mają następujące znaczenia. Jeśli nie zaznaczono inaczej, wszystkie temperatury podano w stopniach Celsjusza. Gdy nie podano określenia danego skrótu, ma on ogólnie przyjęte znaczenie.

A	=	Angstremy
cm	=	Centymetr
DCC	=	Dicykloheksylokarbodiimid
DMF	=	N,N-dimetyloformamid
DMSO	=	sulfotlenek dimetylu
g	=	Gram
HPLC	=	wysokosprawna chromatografia cieczowa
MEM	=	Minimalna pożywka podstawowa
mg	=	Miligram
MIC	=	Minimalne stężenie hamujące
min.	=	Minuta
ml	=	Mililitr
mm	=	Milimetr
mmol	=	Milimol
N	=	Normalny
THF	=	Tetrahydrofuran
μl	=	Mikrolity
μm	=	mikrometry
rt	=	Temperatura pokojowa
R _f	=	współczynnik opóźnienia
NMR	=	Magnetyczny rezonans jądrowy
ESMS	=	widmo mas z elektrorozpylaniem
ppm	=	części na milion

Przykład syntezy

Synteza 1-{2-[N-2-(4-hydroksy-3-formyloaminofenylo)-2-(RS)-hydroksyetylo]aminoetylo}-4-[N-(2-fenylo-2-(RS)-hydroksyetylo)amino]fenylo (zgodnie z Fig. 1)

**Etap 1**

Roztwór 2-(4-aminofenylo)etyloaminy **25** (4,70 ml, 36,7 mmola), benzaldehydu (7,46 ml, 73,4 mmola) i 4 A sit molekularnych (18 g) w toluenie (180 ml) ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny. Mieszaninę reakcyjną oziębiono i przesączono. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymano związek **58** (95% wydajności).

Etap 2

Do oziębionego roztworu 1-(4-benzyliminofenylo)-2-benzyliminoetanu (2,00 g, 6,40 mmola) w etanolu (150 ml) w łaźni lodowej w atmosferze azotu powoli dodano borowodorku sodu (361 mg, 9,50 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0°C, po czym powoli ogrzano do temperatury pokojowej. Reakcję przerwano przez powolne dodanie układu 50% metanol/TFA (5 ml),

a następnie mieszaninę zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymaną pozostałość rozpuszczono w EtOAc i przemyto 0,1M NaOH. Po wysuszeniu nad Na_2SO_4 fazę organiczną zatężono pod próżnią i pozostałość oczyszczono metodą szybkiej chromatografii na żelu krzemionkowym, stosując układ octan etylu/heksany jako eluent. Otrzymano związek **59** (80% wydajności).

Etap 3

Do roztworu związku **59** (3,4 g, 10,8 mmola) w dimetyloformamidzie (150 ml) w temperaturze pokojowej dodano 1-benzyloksy-4-bromoacetylo-2-nitrobenzenu **66** (3,76 g, 10,8 mmola) [wytworzony sposobem opisanym w Chem. Bull., 25, 1368-1377 (1997)]. Po 28 godzinach mieszaninę reakcyjną rozcieńczono eterem i przemyto rozcieńczonym roztworem wodnego chlorku sodu. Warstwę organiczną oddzielono i wysuszono nad siarczanem sodu, przesączono i zatężono, uzyskując surowy olej. Po oczyszczeniu metodą chromatografii kolumnowej, z układem heksan:octan etylu jako eluentem, otrzymano związek **67** (95% wydajności).

Etap 4

Do roztworu związku **67** (4,0 g, 6,80 mmola) w etanolu (500 ml) powoli w porcjach w ciągu 30 minut w atmosferze azotu dodano borowodorku sodu (1 g, 26,50 mmola). Po 6 godzinach mieszaninę reakcyjną wygaszono powoli dodając nasyconego wodnego roztworu chlorku amonu. Roztwór rozcieńczono 1N roztworem wodorotlenku sodu, octanem etylu i heksanami. Warstwę organiczną oddzielono, wysuszono nad siarczanem sodu, przesączono i zatężono, uzyskując związek **68** w postaci oleju, który stosowano w następnym etapie bez dalszego oczyszczania.

Etap 5

Do mieszaniny związku **68** (3,6 g, 6,1 mmola) i węglanu potasu (3,0 g, 9,2 mmola) w dimetyloformamidzie (100 ml) w porcjach dodano alfa-bromoacetofenonu (1,28 g, 6,4 mmola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano przez noc w temperaturze 65°C. Dodano jeszcze porcję alfa-bromoacetofenonu (0,25 g, 1,25 mmola) i ogrzewano dalej. Po 18 godzinach mieszaninę reakcyjną oziębiono do temperatury pokojowej i dodano etanolu (50 ml). Dodano borowodorku sodu (1,0 g, 26,5 mmola) i mieszano jeszcze przez 2,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono, a następnie dodano metanolu i nadmiar wodoru wygaszono dodatkiem nasyconego roztworu chlorku amonu. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu i eterem. Warstwę organiczną oddzielono, wysuszono nad siarczanem sodu, przesączono i zatężono. Surowy olej oczyszczono metodą chromatografii, eluując mieszaniną octan etylu/heksany, i otrzymano związek **69**.

Etap 6

Do roztworu związku **69** (0,73 g, 1,0 mmola) w mieszaninie metanolu (20 ml), 6N kwasu solnego (1 ml) i wody (2 ml) dodano sproszkowanego żelaza (0,56 g, 10,0 mmola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 90°C przez 1,5 godziny, następnie oziębiono do temperatury pokojowej i pozostawiono do odstania przez noc. Dodano metanolu i brązowy osad i nieprzereagowane żelazo odsączono. Przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymano związek **70** w postaci brązowej substancji stałej, którą stosowano w następnym etapie bez dalszego oczyszczania.

Etap 7

Związek **70** w temperaturze pokojowej rozpuszczono w przygotowanym uprzednio roztworze bezwodnika octowego (5 ml) i kwasu mrówkowego (3 ml). Po 3 godzinach mieszaninę reakcyjną rozcieńczono octanem etylu i odparowano do suchości. Dodano metanolowego roztworu 0,5M wodorotlenku sodu i mieszaninę reakcyjną mieszano przez 6 godzin w temperaturze pokojowej. Mieszaninę reakcyjną potraktowano 1N roztworem kwasu solnego w metanolu, po czym zatężono do suchości. Pozostałość ponownie rozpuszczono w metanolu i przesączono. Przesącz zatężono i otrzymano związek **71** w postaci brązowej pozostałości, którą stosowano w następnym etapie bez dalszego oczyszczania.

Etap 8

Do zawiesiny związku **71** w metanolu (120 ml) i dimetyloformamidzie (80 ml) dodano palladu na węglu (10%, 0,5 g). Mieszaninę reakcyjną przedmuchano gazowym azotem i mieszano przez noc w atmosferze wodoru (1 atmosfera) w temperaturze pokojowej. Mieszaninę przesączono, przesącz zatężono i otrzymano surowy produkt, który oczyszczono metodą HPLC (acetonitryl/woda/1% TFA). Otrzymany surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej z układem metanol/chlorek metylenu/1% izopropylaminy jako eluentem i otrzymano żądany związek 1-{2-[N-2-(4-hydroksy-3-formyloaminofenilo)-2-(RS)-hydroksyetylo]-aminoetylo}-4-[N-(2-fenilo-2-(RS)-hydroksyetylo)amino]fenyl **72**.

Przykłady kompozycjiP r z y k ł a d 1

Wytworzono twarde kapsułki żelatynowe zawierające następujące składniki:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość (mg/kapsułkę)</u>
Składnik aktywny	30,0
Skrobia	305,0
Stearynian magnezu	5,0

Powyższe składniki mieszano i napełniono twarde kapsułki żelatynowe ilością 340 mg.

P r z y k ł a d 2

Kompozycję w postaci tabletki wytworzono z poniższych składników:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość (mg/tabletkę)</u>
Składnik aktywny	25,0
Celuloza, mikrokryształiczna	200,0
Koloidalny ditlenek krzemu	10,0
Kwas stearynowy	5,0

Składniki mieszano i sprasowano na tabletki, z których każda miała ciężar 240 mg.

P r z y k ł a d 3

Wytworzono kompozycję w postaci suchego proszku do inhalacji zawierającą następujące składniki:

<u>Składnik</u>	<u>% wagowy</u>
Składnik aktywny	5
Laktoza	95

Składnik aktywny zmieszano z laktozą i mieszaninę wprowadzono do aparatu do inhalacji suchego proszku.

P r z y k ł a d 4

Tabletki, z których każda zawierała 30 mg składnika aktywnego, wytworzono w następujący sposób:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość (mg/tabletkę)</u>
Składnik aktywny	30,0 mg
Skrobia	45,0 mg
Mikrokryształiczna celuloza	35,0 mg
Poliwinylopirolidon	4,0 mg
(jako 10% roztwór w sterylnej wodzie)	
Sól sodowa karboksymetyloskrobi	4,5 mg
Stearynian magnezu	0,5 mg
Talk	1,0 mg
Łącznie	120,0 mg

Składnik aktywny, skrobię i celulozę przepuszczono przez sito Nr 20 mesh U.S. i dokładnie zmieszano. Z wytworzonym proszkiem mieszano roztwór poliwinylpirolidonu, a następnie przepuszczono przez sito 16 mesh U.S. Tak wytworzone granulki wysuszono w temperaturze 50°C do 60°C i przepuszczano przez sito 16 mesh U.S. Sól sodową karboksymetyloskrobi, stearynian magnezu i talk przepuszczono przez sito Nr 30 mesh, a następnie dodano do granulek, które po wymieszanu sprasowano w tabletkarce i otrzymano tabletki, z których każda miała ciężar 120 mg.

P r z y k ł a d 5

Kapsułki, z których każda zawierała 40 mg leku, wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość (mg/kapsułkę)</u>
Składnik aktywny	40,0 mg
Skrobia	109,0 mg
Stearynian magnezu	1,0 mg
Łącznie	150,0 mg

Składnik aktywny, skrobię i stearynian magnezu zmielono, przepuszczono przez sito Nr 20 mesh i napełniono twarde kapsułki żelatynowe, z których każda miała ciężar 150 mg.

P r z y k ł a d 6

Czopki, z których każdy zawierał 25 mg składnika aktywnego, wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość</u>
Składnik aktywny	25 mg

Glicerydy nasyconych kwasów tłuszczowych do 2000 mg

Składnik aktywny przepuszczono przez sito Nr 60 mesh U.S. i zawieszono w glicerydach nasyconych kwasów tłuszczowych, uprzednio stopionych, przy użyciu minimalnej ilości koniecznego ciepła. Następnie mieszaninę przelano do formy czopkowej o nominalnej pojemności 2,0 g i pozostawiono do oziębienia.

P r z y k ł a d 7

Zawiesiny, z których każda zawierała 50 mg leku na dawkę 5,0 ml, wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość</u>
Składnik aktywny	50,0 mg
Żywica ksantanowa	4,0 mg
Sól sodowa karboksymetylocelulozy (11%),	50,0 mg
Mikrokrystaliczna celuloza (89%)	
Sacharoza	1,75 mg
Benzoesan sodu	10,0 mg
Substancje smakowo-zapachowe i koloryzujące	w razie potrzeby
Oczyszczona woda	do 5 ml

Składnik aktywny, sacharozę i żywicę ksantanową zmieszano, przepuszczono przez sito Nr 10 mesh U.S., a następnie z mieszaną z wytworzonym uprzednio roztworem mikrokrystalicznej celulozy i soli sodowej karboksymetylocelulozy w wodzie. Następnie podczas mieszania dodano benzoesan sodu, substancje smakowo-zapachowe i koloryzujące i rozcieńczono niewielką ilością wody. Następnie dodano wody w ilości wystarczającej do żądanej objętości.

P r z y k ł a d 8

Kompozycję wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość (mg/kapsułkę)</u>
Składnik aktywny	15,0 mg
Skrobia	407,0 mg
Stearynian magnezu	3,0 mg
Łącznie	425,0 mg

Składnik aktywny, skrobię i stearynian magnezu zmieszano, przepuszczono przez sito Nr 20 mesh U.S. i napełniono twarde kapsułki żelatynowe, z których każda miała ciężar 425 mg.

P r z y k ł a d 9

Kompozycję wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość</u>
Składnik aktywny	5,0 mg
Olej kukurydziany	1,0 ml

P r z y k ł a d 10

Kompozycję do podawania miejscowego wytworzono, jak następuje:

<u>Składnik</u>	<u>Ilość</u>
Składnik aktywny	1-10 g
Emulgujący воск	30 g
Ciekła parafina	20 g
Biała wazelina	do 100 g

Białą wazelinę ogrzewano aż do stopienia. Następnie wprowadzono ciekłą parafinę i emulgujący воск i mieszano aż do rozpuszczenia. Dodano składnik aktywny i mieszano aż do zdyspergowania. Następnie mieszaninę oziębiano, aż do uzyskania substancji stałej.

Inną korzystną kompozycją stosowaną w sposobach według wynalazku są środki do przezskórnego dostarczania („plastry”). Takie przezskórne plastry można stosować do ciągłej lub nieciągłej infuzji związku według wynalazku w kontrolowanych ilościach. Budowa i zastosowanie przezskórnych plastrów do dostarczania środków farmaceutycznych są dobrze znane w technice, patrz np. patent USA nr 5,023,252, wydany 11 czerwca 1991, który wprowadza się tu w całości jako stan techniki. Plastry takie mogą służyć do ciągłego i pulsacyjnego dostarczania lub do dostarczania środków farmaceutycznych na żądanie.

Inne odpowiednie kompozycje do stosowania w niniejszym wynalazku można znaleźć w *Remington's Pharmaceutical Sciences*, wyd. przez E.M. Martin (Mack Publishing Company, wyd. 18, 1990).

Przykłady biologicznePrzykład 1Badanie funkcji receptora β 2-adrenergicznego *in vitro*

Aktywność czynnościową związków według wynalazku wobec receptora β 2-adrenergicznego badano w następujący sposób.

Posiew i hodowla komórek:

Komórki pierwotne mięśni gładkich oskrzeli, pobrane od 21-letniego mężczyzny (Clonetics, San Diego, CA) posiano na 24-studzienkowej płytce do hodowli tkankowej przy 50 000 komórek/studzienkę. Jako pożywkę stosowano pożywkę Clonetics SmBM-2 uzupełnioną hEGF, insuliną, hFGF i płodową surowicą bydlęcą. Komórki hodowano dwa dni w temperaturze 37°C, aż do stanu zlewających się monowarstw.

Stymulowanie komórek agonistą

Z każdej studzienki odciągnięto pożywkę i zastąpiono 250 ml świeżej pożywki zawierającej 1 mM IBMX, inhibitora fosfodiesterazy (Sigma, St. Louis, MO). Komórki inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C, a następnie dodano 250 ml agonisty w odpowiednim stężeniu. Następnie komórki inkubowano jeszcze przez 10 minut. Pożywkę odciągnięto i do komórek dodano 500 μ l zimnego 70% EtOH, po czym po około 5 minutach usunięto i przeniesiono na pustą 96-studzienkową płytkę z głębokimi studzienkami. Etap ten powtórzono. Głębokostudzienkową płytkę wirowano w warunkach szybkiej próżni, aż do wyparowania EtOH i uzyskania suchych osadów. cAMP (pmol/studzienkę) obliczono stosując zestaw cAMP ELISA z firmy Stratagene (La Jolla, CA). Krzywe EC₅₀ uzyskano stosując 4-parametrowe równanie dopasowania:

$$y = (a-d)/(1 + (x/c)^b) + d, \text{ w którym}$$

$$y = \text{cpm}$$

$$a = \text{całkowite wiązanie}$$

$$c = \text{IC}_{50}$$

$$x = [\text{związek}]$$

$$d = \text{wiązanie NS}$$

$$p = \text{nachylenie}$$

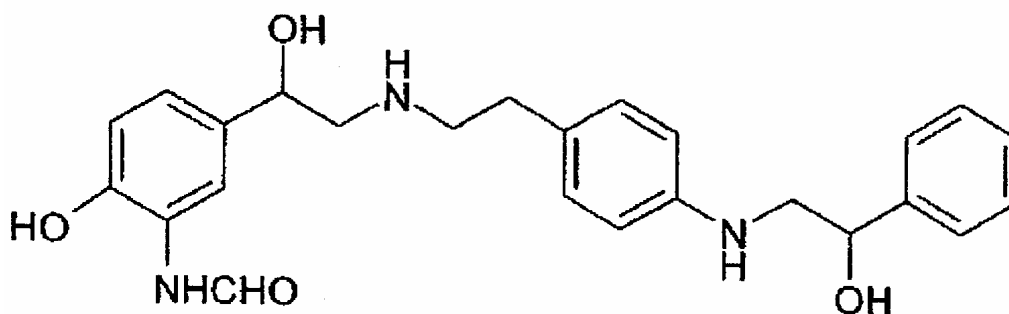
Ustala się wiązania NS i dopuszcza się zmienność pozostałych parametrów.

Przykład 2Badanie wiązania receptora β 2-adrenergicznego z radioligandem *in vitro*

Aktywność związków według wynalazku wiążącą receptor β 1/2-adrenergiczny badano w następujący sposób. Błony komórek SF19, zawierające receptor β 1- lub β 2-adrenergiczny (NEN, Boston, MA) inkubowano na 96-studzienkowych płytkach z 0,07 nM ¹²⁵I-jodocyjanopindolem (NEN, Boston, MA) w buforze wiążącym zawierającym 75 mM Tris HCl (pH 7,4), 12,5 mM MgCl₂ i 2 mM EDTA oraz zmieniające się stężenia badanych związków lub samego buforu (kontrola). Płytki inkubowano w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem przez 1 godzinę. Radioligand związany z receptorem zebrano przez przesączenie 96-studzienkowych płytek przez filtr GF/B (Packard, Meriden, CT), wstępnie zablokowanych 0,3% polietylenoiminą i przemyty dwukrotnie 200 μ l PBS przy użyciu urządzenia do zbierania komórek. Filtry przemyto trzy razy 200 μ l PBS, stosując urządzenie do zbierania komórek, a następnie ponownie zawieszono w 40 μ l koktajlu scyntylacyjnego. Radioaktywność związaną z filtrem zmierzono przy użyciu licznika scyntylacyjnego i stosując opisane powyżej 4-parametrowe równanie uzyskano krzywe IC₅₀.

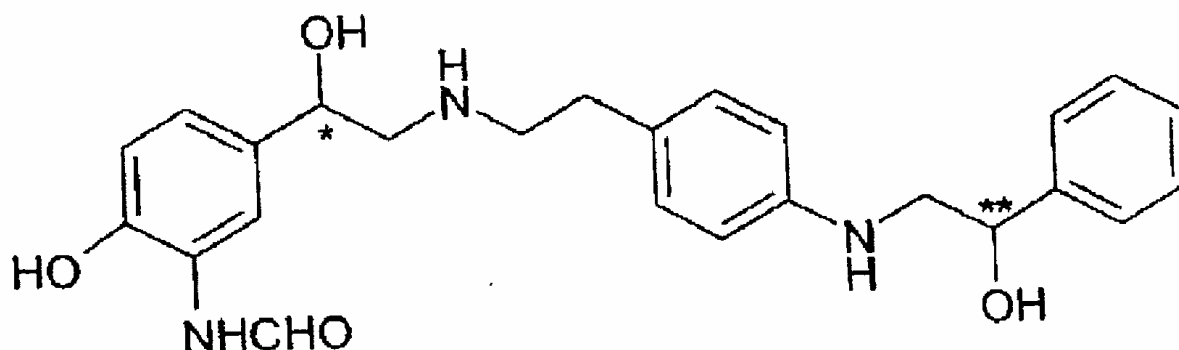
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy o wzorze:



lub jej farmaceutycznie dopuszczalna sól.

2. Pochodna 2-(4-hydroksy-3-formyloamino)fenylo-2-hydroksyetyloaminy o wzorze:



w którym stereochemia przy *C i **C jest (RS) i (RS), (R) i (R), (R) i (S), (S) i (R) lub (S) i (S); lub jej farmaceutycznie dopuszczalna sól.

3. Związek według zastrz. 2, w którym stereochemia przy *C jest (R), a stereochemia przy **C jest (R).

4. Związek według zastrz. 2, w którym stereochemia przy *C jest (R) i stereochemia przy **C jest (S).

5. Kompozycja farmaceutyczna, **znamienna tym**, że zawiera farmaceutycznie dopuszczalny nośnik i terapeutycznie skuteczną ilość związku określonego w zastrz. 1-4.

6. Kompozycja farmaceutyczna według zastrz. 5, **znamienna tym**, że zawiera ponadto terapeutycznie skuteczną ilość steroidowego leku przeciwzapalnego.

7. Związek określony w zastrz. 1 do 4 do zastosowania jako lek.

8. Kompozycja farmaceutyczna określona w zastrz. 5 albo 6 do zastosowania jako lek.

9. Zastosowanie związku określonego w zastrz. 1 do 4 do wytwarzania leku do leczenia choroby dróg oddechowych.

10. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamiennie tym**, że chorobą dróg oddechowych jest astma lub przewlekła obturacyjna choroba płuc.

11. Zastosowanie kompozycji farmaceutycznej określonej w zastrz. 5 albo 6, do wytwarzania leku do leczenia choroby dróg oddechowych.

12. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że chorobą dróg oddechowych jest astma lub przewlekła obturacyjna choroba płuc.

Rysunek

FIG. 1

