

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-4425**
(22) Přihlášeno: **28.05.1999**
(30) Právo přednosti: **28.05.1998 US 1998/87064**
(40) Zveřejněno: **16.05.2001**
(Věstník č. 5/2001)
(47) Uděleno: **15.08.2007**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **26.09.2007**
(Věstník č. 39/2007)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/011924**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/061421**

(11) Číslo dokumentu:

298 413

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07D 207/16 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 98/04913; US 5260277; WO 96/22966.

(73) Majitel patentu:
Biogen Idec MA Inc., Cambridge, MA, US

(72) Původce:
Lee Wen-Cherng, Lexington, MA, US
Gill Alan, Reading, MA, US

(74) Zástupce:
Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
**Beta-Alaninový derivát, farmaceutická
kompozice tento derivát obsahující a použití
tohoto derivátu pro přípravu léčiva**

(57) Anotace:
Řešení se týká β -alaninového derivátu, inhibujícího buněčnou adhezi a zahrnujícího (R)-N-[[4-[[2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl)- β -alanin, jeho farmaceuticky přijatelný derivát a jeho esterový prekurzor, farmaceutická kompozice, která tento derivát obsahuje jako účinnou látku a použití tohoto derivátu pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění souvisejícího s buněčnou adhezí.

CZ 298413 B6

β -Alaninový derivát, farmaceutická kompozice tento derivát obsahující a použití tohoto derivátu pro přípravu léčiva

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález se týká nových sloučenin, které jsou vhodné pro inhibici, změnu nebo prevenci buněčné adheze a onemocnění souvisejících s buněčnou adhezí. Vynález se také týká farmaceutických kompozic obsahujících tyto sloučeniny a způsobu jejich použití pro inhibici a prevenci buněčné adheze a onemocnění souvisejících s buněčnou adhezí. Sloučeniny a farmaceutické kompozice podle vynálezu se mohou použít jako léčebná nebo preventivní činidla. Jsou zvláště vhodná pro léčení mnoha zánětlivých a autoimunních onemocnění.

10

Dosavadní stav techniky

15

Buněčná adheze je proces, pomocí kterého se buňky shlukují k sobě, migrují směrem ke specifickému cíli nebo se lokalizují v mimobuněčné matrici. Buněčná adheze jako taková je jedním ze základních mechanismů účastnících se mnoha biologických jevů. Buněčná adheze je například zodpovědná za adhezi hematopoiетických buněk k buňkám endotelu a za následnou migraci těchto hematopoiетických buněk z cév a na místa poškození. Buněčná adheze jako taková hraje roli při mnoha onemocněních, jako jsou například zánětlivé a imunitní reakce savců.

20

Výzkumy na molekulární úrovni buněčné adheze odhalily, že různé makromolekuly na povrchu buněk – společně známé jako molekuly nebo receptory buněčné adheze – zprostředkují interakce buňka–buňka a buňka–matrice. Například proteiny společně nazývané „integriny“ jsou klíčovým zprostředkovatelem adhezních interakcí mezi hematopoiетickými buňkami a jejich mikroprostředím (M.E. Hemler, „VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions and Their Role on Leukocytes“; Ann. Rev. Immunol. 8, str. 365 ((1990)). Integriny jsou nekovalentními heterodimerními komplexy skládajícími se ze dvou podjednotek nazývaných α a β . Existuje 17 různých podjednotek α ($\alpha 1$ – $\alpha 10$, α -L, α -M, α -D, α -X, α -IIB, α -V a α -E) a nejméně 9 různých podjednotek β ($\beta 1$ – $\beta 9$) které byly dodnes identifikovány. Na základě typu složek podjednotek α a β je možné každou molekulu integrinu zařadit do podskupiny.

25

30

Integrin $\alpha 4$ – $\beta 1$, známý také jako velmi pozdní antigen–4 („VLA–4“) nebo CD49d/CD29, je receptorem na povrchu buňky leukocyty, který se podílí na mnoha různých matricových adhezních interakcích, jak buňka–buňka, tak buňka–matrice (M.E. Hemler, Ann. Rev. Immunol., 8, str. 365 (1990)). Slouží jako receptor pro buňky endotelu povrchového proteinu, který lze vyvolat cytokinem, pro molekulu–1 cévní buněčné adheze („VCAM–1“), stejně jako pro mimobuněčnou matrici proteinu fibronektinu („FN“) (Ruegg a kol., J. Cell. Biol. 177, str. 179 (1991); Wayner a kol., J. Cell. Biol. 105, str. 1873 (1987); Kramer a kol., J. Biol. Chem., 264, str. 4684 (1989); Gehlsen a kol. Science, 24, str. 1228 (1988)). Bylo prokázáno, že anti–VLA–4 monoklonální protilátky („mAb“) inhibují adhezní interakce závislé na VLA–4 jak *in vitro*, tak *in vivo* (Ferguson a kol. Proc. Natl. Acad. Sci., 88, str. 8072 (1991); Ferguson a kol., J. Immunol., 150, str. 1172 (1993)). Výsledky *in vivo* experimentů naznačují, že tato inhibice VLA–4 závislé buněčné a autoimunní choroby (R. L. Lobb a kol., „The Pathophysiology Role of $\alpha 4$ Integrins In Vivo“, J. Clin. Invest., 94, str. 1722–28 (1994)).

35

40

45

Za účelem identifikace minimální aktivní aminokyselinové sekvence potřebné pro vazbu VLA–4 Komoriya a kol. („The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type–Specific Adhesion Site (CS1) Within the Alternatively Spliced Type II Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine–Aspartic Acid–Valine“, J. Biol. Chem., 266 (23), str. 15075–79 (1991)) syntetizovali sadu překrývajících se peptidů založených na aminokyselinové sekvenci CS–1 úseku (VLA–4 vazebná doména) různých druhů fibronektinu. Identifikovali osmiaminokyselinový peptid, Glu–Ile–Leu–Asp–Val–Pro–Ser–Thr, stejně jako dva menší překrývající se peptidy, Glu–Ile–Leu–

50

Asp-Val a Leu-Asp-Val-Pro-Ser, které mají inhibiční aktivitu proti buněčné adhezi závislé na FN. Tyto výsledky naznačují, že tripeptid Leu-Asp-Val je minimální sekvence pro aktivitu k buněčné adhezi. Později bylo prokázáno, že Leu-Asp-Val váže pouze lymfocyty, které vykazují aktivovanou formu VLA-4, a tak se objevila otázka využitelnosti těchto peptidů *in vivo* (E. A. Wayner a kol., „Activation-Dependent Recognition by hematopoietic Cells of the LDV Sequence in the V Region of Fibronectin“, J. Cell. Biol., 116 (2), str. 498-497 (1992)). Určité větší peptidy obsahující LDV postupně prokázaly aktivitu *in vivo* (T. A. Ferguson a kol., „Two Integrin Binding Peptides Abrogate T-cell-Mediator Immune Responses In Vivo“, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, str. 8072-76 (1991); a S.M. Wahl a kol., „Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment“, J. Clin. Invest., 94, str. 655-62 (1994)). Byl popsán cyklický pentapeptid, který může inhibovat adhezi jak VLA-4, tak VLA-5 k FN (D.M. Nowlin a kol., „A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits $\alpha 4\beta 1$ a $\alpha 5\beta 1$ Integrin-mediated Cell Adhesion“, J. Biol. Chem., 268 (27), str. 20352-59 (1993); a PCT přihláška PCT/US91/04862). Tento pentapeptid byl založen na tripeptidové sekvenci Arg-Gly-Asp z FN, která byla známa jako obvyklý motiv v místě rozpoznání pro několik mimobuněčných matricových proteinů.

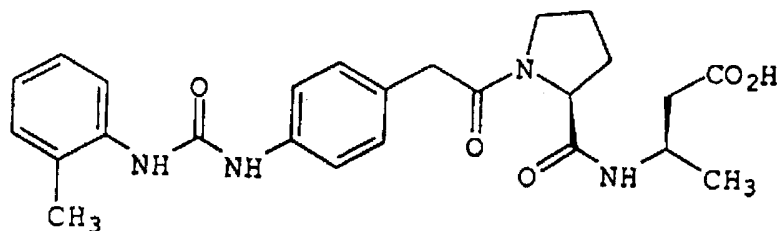
Příklady jiných VLA-4 inhibitorů jsou uvedeny například v další US patentové přihlášce 08/376,372 a v mezinárodní patentové přihlášce WO98/04913, které jsou zde uvedeny jako odkaz. USSN 376 372 popisuje lineární peptidylové sloučeniny obsahující β -aminokyseliny, které mají inhibiční aktivitu k buněčné adhezi. Mezinárodní patentové přihlášce WO 94/15958 a WO 92/00995, které jsou zde uvedeny jako odkazy, popisují cyklický peptid a peptidomimetické sloučeniny, které mají modulační aktivitu vůči buněčné adhezi. Mezinárodní patentové přihlášky WO 93/08823 a WO 92/08464 (uvedeny jako odkaz) popisují sloučeniny modulující buněčnou adhezi obsahující guanidylovou skupinu, močovinovou skupinu a thiomčovinou skupinu. Patent US 5 260 277 popisuje guanidinylové sloučeniny modulující buněčnou adhezi (patent uvedený jako odkaz).

Přes tento pokrok jsou potřebné specifické inhibitory VLA-4-závislé buněčné adheze, které mají lepší farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti, jako je orální biologická využitelnost a dlouhé trvání působení. Tyto sloučeniny by mohly poskytnout vhodná činidla pro léčení, změnu, prevenci nebo potlačování různých onemocnění zprostředkovaných buněčnou adhezí a vazbu VLA-4.

Podstata vynálezu

35

Předmětem vynálezu je derivát inhibující adhezi zahrnující sloučeninu vzorce



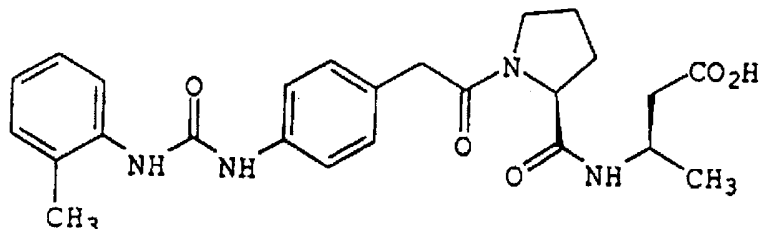
její farmaceuticky přijatelný derivát a její esterový prekurzor.

40 Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje uvedený β -alaninový derivát a farmaceuticky přijatelný nosič.

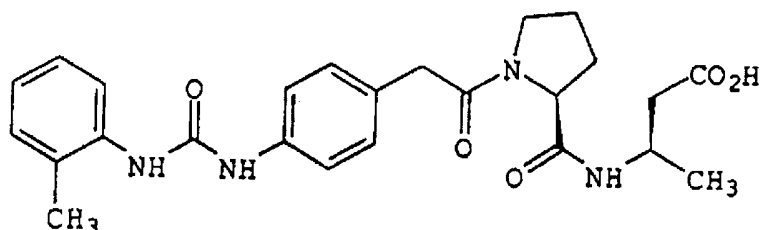
45 Farmaceutická kompozice podle vynálezu výhodně dále obsahuje činidlo zvolené z množiny zahrnující kortikosteroidy, bronchodilatátory, antiastmatika, protizáněťová činidla, antirevmatika, imunosupresiva, antimetabolita, imunomodulátory, antipsoriatika a antidiabetika.

Farmaceutická kompozice podle vynálezu výhodně dále obsahuje alespoň jednu další sloučeninu inhibující buněčnou adhezi, kterou je výhodně inhibitor VLA-4.

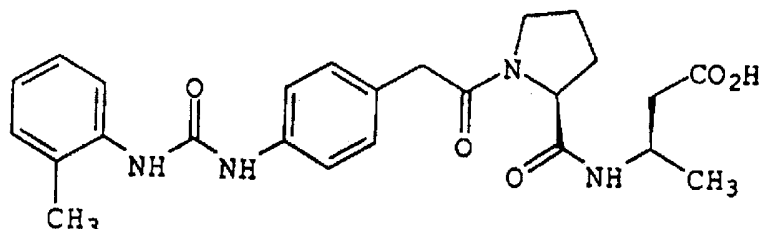
- 5 Výhodně farmaceutická kompozice podle vynálezu jako β -alaninový derivát obsahuje esterový prekurzor sloučeniny vzorce



β -Alaninový derivát podle vynálezu je výhodně tvořen esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce

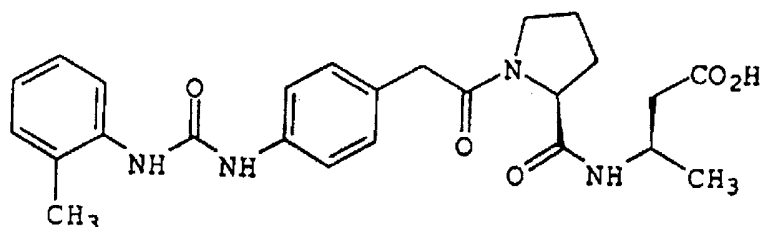


- 10 β -Alaninový derivát podle vynálezu je výhodněji tvořen esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce



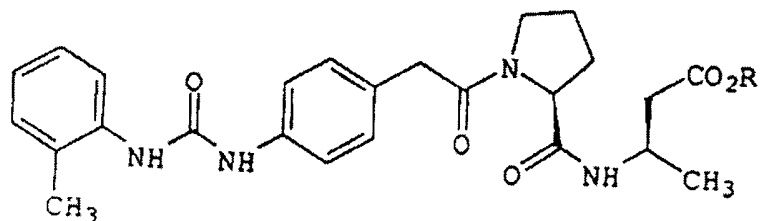
připraveným reakcí sloučeniny uvedeného vzorce s alkoholem obsahujícím 1 až 10 uhlíkových atomů v přímé nebo rozvětveném řetězci.

- 15 Výhodněji je β -Alaninový derivát podle vynálezu tvořen esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce



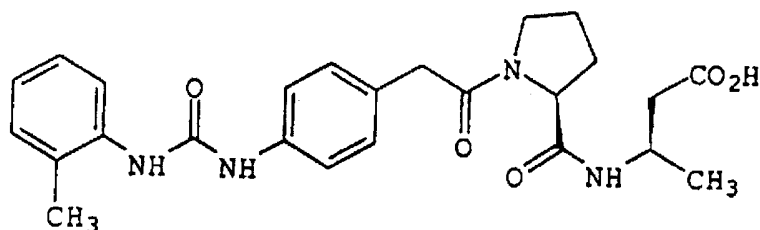
- 20 připraveným reakcí sloučeniny uvedeného vzorce s alkoholem obsahujícím 1 až 4 uhlíkové atomy v přímém nebo rozvětveném řetězci.

Výhodně je β -alaninový derivát tvořen esterovým prekurzorem obecného vzorce

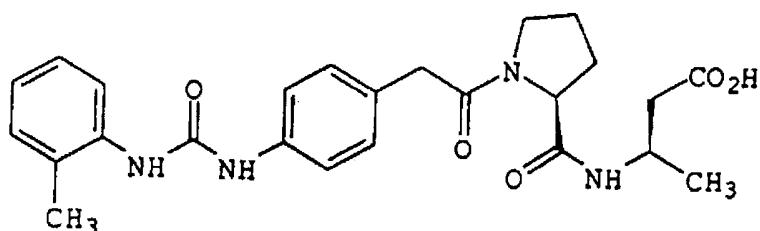


ve kterém R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů, výhodněji 1 až 4 uhlíkové atomy.

- 5 β -Alaninový derivát podle vynálezu je zejména tvořen sloučeninou vzorce



Výhodně farmaceutická kompozice jako β -alaninový derivát obsahuje sloučeninu vzorce



nebo její sůl.

10

Předmětem vynálezu je rovněž použití výše definovaného β -alaninového derivátu pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění souvisejícího s buněčnou adhezí.

15

V rámci tohoto použití je β -alaninový derivát výhodně použit pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění zvoleného z množiny zahrnující astma, mnohočetnou sklerózu, alergickou rinitidu, alergickou konjunktivitidu, zánětové onemocnění plic, revmatoidní artritidu, mnohočetný myelom, septickou artritidu, diabetes typu I, odmítnutí transplantovaného orgánu a zánětové střevní onemocnění, zejména pro přípravu léčiva pro léčení mnohočetné sklerózy nebo zánětového střevního onemocnění.

20

Pod pojmem „farmaceuticky přijatelný derivát“ sloučeniny uvedeného vzorce se v rámci vynálezu rozumí farmaceuticky přijatelná sůl, ester, sůl takového esteru, amid nebo sůl takového amidu sloučeniny uvedeného vzorce.

25

Pod pojmem „farmaceuticky přijatelný prekurzor“ sloučeniny uvedeného vzorce se v rámci vynálezu rozumí sloučenina uvedeného vzorce, jejíž karboxylová skupina je esterifikována libovolným alkoholem, zejména alkoholem obsahujícím 1 až 10 uhlíkových atomů v přímém nebo rozvětveném řetězci, výhodně methanolem, ethanolem, propanolem nebo butanolem, za vzniku farmaceuticky přijatelného produktu.

30

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou inhibitory integrinu VLA-4 a blokují tedy vazbu VLA-4 k jeho různým ligandům, jako je VCAM-1 a oblasti fibronektinu. Tyto sloučeniny jsou vhodné pro inhibici procesu buněčné adheze, včetně aktivace migrace, proliferace a diferenciac

buněk. Tyto sloučeniny jsou vhodné pro inhibici, prevenci a potlačení buněčné adheze zprostředkované VLA-4 a onemocnění souvisejících s touto adhezí, jako jsou zánětlivé a imunitní reakce, včetně například mnohočetné sklerózy, astmatu, alergické rinitidy, alergické konjunktivity, zánětlivého onemocnění plic, revmatoidní artritidy, septické artritidy, diabetu typu 1, transplantace orgánu, restenózy, autologní transplantace kostní dřevě, zánětu po virové infekci, myokarditidy, zánětlivého střevního onemocnění, včetně ulcerativní kolitidy a Crohnovy nemoci, určitých typů toxické a imunitní nefritidy, kontaktní dermatální přecitlivělosti, psoriázy, metastáz nádorů, mnohočetného myelomu a atherosklerózy. Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou použít samotné nebo v kombinaci s dalšími terapeutickými nebo profylaktickými činidly pro inhibici, změnu, prevenci nebo potlačení buněčné adheze. Předkládaný vynález také poskytuje farmaceutické kompozice obsahující tyto inhibitory buněčné adheze zprostředkované VLA-4 a způsoby použití sloučenin a kompozic podle vynálezu pro inhibici buněčné adheze.

Popis obrázků na výkresech

15

Obr. 1 uvádí odezvu dýchacích cest ovce po léčení oMePUPA-V. Ovce, přirozeně citlivá na *Ascarin suum*, se stimulují aerosolem alergenu *Ascarin suum*, po dvou hodinách se podá oMePUPA-V v označených dávkách nebo odpovídající množství vehikula. V daných časech se měří činnost plic a zaznamenává se jako změna specifické resistance dýchacích cest vzhledem k hodnotám základní linie před studií (levé panely). Resistance dýchacích cest vzhledem k inhalovanému karbacholu se určí před začátkem studie a 24 hodin po stimulaci alergenem (pravé panely). Odezva dýchacích cest se zaznamená jako poměr PC₄₀₀ (množství karbacholu potřebné pro zvýšení resistance o 400 %) hodnot před stimulací a po stimulaci.

20

Obr. 2: Ovce, přirozeně citlivé na *Ascaris suum* se stimulují podáváním aerosolu oMePUPA-V při daných dávkách pro *Ascaris suum*. Změny resistance dýchacích cest se měří po stimulaci aerosolem a maximální resistance plic (cm H₂/sec) po stimulaci se porovná s hodnotami základní linie. *= $p < 0,05$ porovnáno s PBS kontrolou, jednofaktorová analýza rozptylu, po které následuje Dunnettův test vícenásobného porovnání s kontrolní skupinou. Označuje statisticky významný vzrůst maxima specifické resistance plic ve srovnání s PBS kontrolní skupinou.

30

Obr. 3 Ovce, přirozeně citlivé na *Ascaris suum*, se stimulují podáváním aerosolu *Ascaris suum* 24 hodin po čtyřdenním podávání aerosolu oMePUPA-V (0,03 mg) nebo odpovídajícího množství vehikula (ethanol: normální salin, 1:2, horní panel; Tris: normální salin, 1:499, dolní panel). Činnost plic se měří v daných časech a zaznamená se jako změna specifické resistance plic vzhledem k hodnotě základní linie před studií (levé panely). Resistance dýchacích cest k inhalovanému karbacholu se určí před inhalační studií a 24 hodin po stimulaci alergenem (pravé panely). Odezva dýchacích cest se zaznamená jako poměr PC₄₀₀ (množství karbacholu potřebné pro vzrůst resistance o 400 %) porovnáním hodnot před a po stimulaci.

40

Obr. 4 Myši Balb/c, předem senzitivované na DNFB, se stimulují aplikací DNFB na hřbetní stranu levého ucha a vehikulem na hřbetní stranu pravého ucha. Po 24 hodinách se změní tloušťka ucha mikrometrickým měřidlem. oMePUPA-V se podává v uvedených dávkách 4 hodiny po stimulaci DNFB. Pozitivní kontrolní (+CTFL) sloučenina se podávala v maximální účinné enterální dávce. Hodnoty znamenají průměr \pm směrodatná odchylka průměru po 8 zvířat. Horní panel ukazuje absolutní otok ucha. Dolní panel ukazuje procentuální inhibici otoku ucha v porovnání s kontrolním uchem stimulovaným vehikulem (VEH).

45

Obr. 5. Analýza kompetice mezi oMePUPA-V a známým inhibitorem za různých podmínek aktivace. Jurkatovy buňky ($1,5 \times 10^6$ /ml) v TBS plus 2 mM Mn²⁺, 1 mM Ca²⁺ plus 1 mM Mg²⁺, 1 mM Ca²⁺ plus 10 mM Mg²⁺, 10 mM Mg²⁺ nebo 10 mM Mg²⁺ plus 10 μ g/ml TS2/16 se zpracovávají 5 nM ³H-znáмым inhibitorem samotný nebo 5 nM ³H-znáмым inhibitorem plus 10 nM BIO1591 30 minut při teplotě místnosti. Buňky se potom peletují odstředěním, resuspendují se v 100 μ l TBS plud Mn²⁺ a analyzují se pomocí počítadla scintilace. Počty vazeb za těchto

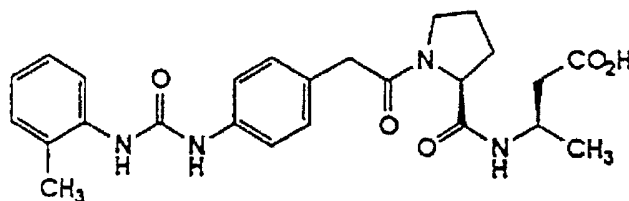
50

podmínek znamenají integrin, který není obsazen testovanou sloučeninou a je tedy volný pro vazbu ^3H -známého inhibitoru.

Podrobný popis vynálezu

5

Předkládaný vynález poskytuje sloučeniny, které jsou schopné inhibovat buněčnou adhezi zprostředkovanou VLA-4, pomocí inhibice vazby ligandů k tomuto receptoru. Výhodnou sloučeninou je (R)-N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl]- β -alanin, který je zde označován jako „OMe-PUPA-V“ a má vzorec I:



oMePUPA-V

10

Předkládaný vynález se také týká farmaceuticky přijatelných derivátů, solí a esterů oMePUPA-V.

15 Sloučeniny vzorce I obsahují jedno nebo více asymetrický center a mohou se tedy vyskytovat ve formě racemických směsí, jednotlivých enantiomerů, diastereomerních směsí a jednotlivých diastereomerů. Předkládaný vynález zahrnuje všechny takové izomerní formy sloučenin vzorce I.

20 Předkládaný vynález také zahrnuje farmaceuticky přijatelné soli sloučenin vzorce I. Termín „farmaceuticky přijatelné soli“ znamená soli připravené z farmaceuticky přijatelných netoxických bází nebo kyselin včetně anorganických bází nebo kyselin včetně anorganických nebo organických bází a anorganických nebo organických kyselin. Soli odvozené od anorganických bází zahrnují amoniové, amonné, vápenaté, měďné, železnaté, železité, lithné, hořečnaté soli, manganité, manganaté, draselné, sodné, zinečnaté a podobné soli. Zvláště výhodné jsou amoniové, vápenaté, hořečnaté, draselné a sodné soli.

25

30 Soli odvozené od farmaceuticky přijatelných organických netoxických bází zahrnují soli primárních, sekundárních a terciárních aminů, substituovaných aminů včetně přírodních substituovaných aminů, cyklických aminů a bazických iontoměníčových kyselin, jako je arginin, betain, kofein, cholin, N,N'-dibenzylethylendiamin, diethylamin, 2-diethylaminoethanol, 2-dimethylaminoethanol, ethanolamin, ethylendiamin, N-ethylmorfolin, N-ethylpiperidin, glukamin, glukosamin, histidin, hydrabamin, izopropylamin, lysin, methylglukamin, morfolin, piperazin, piperidin, polyaminové pryskyřice, prokain, puriny, theobromin, triethylamin, trimethylamin, tripropylamin, tromethamin a podobně.

35 Pokud je sloučenina podle předkládaného vynálezu bazická, mohou se soli připravit z farmaceuticky přijatelných netoxických kyselin, včetně anorganických a organických kyselin. Mezi takové kyseliny patří kyselina octová, kyselina benzensulfonová, kyselina benzoová, kyselina kafrsulfonová, kyselina citronová, kyselina ethansulfonová, kyselina fumarová, kyselina glukonová, kyselina glutamová, kyselina bromovodíková, kyselina chlorovodíková, kyselina isethionová, kyselina mléčná, kyselina maleinová, kyselina jablečná, kyselina mandlová, kyselina methansulfonová, kyselina slizová, kyselina dusičná, kyselina pamoová, kyselina pantotenová, kyselina fosforečná, kyselina jantarová, kyselina sírová, kyselina vinná, kyselina p-toluensulfonová a podobně. Zvláště výhodné jsou kyselina citronová, kyselina bromovodíková, kyselina chlorovodíková, kyselina maleinová, kyselina fosforečná, kyselina sírová a kyselina vinná.

45

Dále předkládaný vynález zahrnuje proléčiva, zejména esterová proléčiva, kde karboxylová skupina:

(R)-N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl]-β-alaninu je esterifikovaná jakýmkoli alkoholem. Mezi výhodné alkoholy patří methanol, ethanol, propanol, butanol nebo alkoholy obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, které mají přímý nebo rozvětvený řetězec.

Schopnost sloučenin vzorce I antagonizovat působení VLA-4 je činí vhodnými pro prevenci, léčení nebo zvrácení symptomů, poruch nebo onemocnění vyvolaných vazbou VLA-4 ke svým ligandům. Tito antagonisté budou tedy inhibovat proces buněčné adheze, včetně aktivace, migrace, proliferace a diferenciac buněk. Dalším předmětem podle předkládaného vynálezu je tedy způsob léčení, prevence, zmírnění nebo potlačení onemocnění nebo poruch zprostředkovaných cestou VLA-4. Mezi taková onemocnění patří například astma, mnohočetná skleróza, alergická rhinitida, alergická konjunktivitida, zánětlivé onemocnění plic, revmatoidní artritida, mnohočetný myelom, septická artritida, diabetes typu I, odmítnutí transplantovaného orgánu, zánětlivé střevní onemocnění a další.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou syntetizovat za použití běžných postupů, přičemž některé z nich jsou zde uvedeny formou příkladů. Tyto sloučeniny se s výhodou chemicky syntetizují ze snadno dostupných výchozích látek, jako jsou α-aminokyseliny a jejich funkční ekvivalenty. Výhodné jsou také modulární a konvergentní způsoby syntézy těchto sloučenin. Při konvergentním přístupu se například velké části konečného produktu v posledních krocích syntézy spojí, spíše než že by se postupně přidávaly malé části k rostoucímu řetězci molekuly.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu se mohou také modifikovat připojením vhodných funkčních skupin za účelem zlepšení jejich selektivních biologických vlastností. Tyto modifikace jsou odborníkům pracujícím v této oblasti známé a patří mezi ně modifikace zvyšující biologickou penetraci do daného biologického systému (například krve, lymfatického systému, centrálního nervového systému), zvyšující orální biologickou využitelnost, zvyšující rozpustnost, aby je bylo možné podávat injekčně, měnící metabolismus a měnící rychlost vylučování. Mezi příklady takových modifikací patří esterifikace polyethylenglykoly, derivatizace pivoláty nebo mastnými kyselinami, konverze na karbamáty, hydroxylace aromatických kruhů a substituce heteroatomů aromatických kruhů, vynález se však neomezuje pouze na tyto příklady.

Podle předkládaného vynálezu znamená termín „pacient“ savce, včetně člověka. A termín „buňka“ znamená jakoukoliv buňku, s výhodou buňku savce, včetně buněk člověka.

Aktivita a specifická připravených sloučenin podle předkládaného vynálezu vzhledem k VLA-4 se může určit pomocí *in vivo* a *in vitro* testů.

Například inhibiční aktivita sloučenin podle předkládaného vynálezu vzhledem k buněčné adhezi se může měřit pomocí určení koncentrace inhibitoru potřebné pro blokování vazby buněk exprimujících VLA-4 k mikrotitračním destičkám potaženým fibronectinem nebo CS1. Při tomto typu testu se jamky mikrotitrační destičky potáhnou buď fibronectinem (obsahujícím CS-1 sekvenci), nebo CS-1. Pokud se použije CS-1, musí se konjugovat k proteinovému nosiči, jako telecí sérový albumin, aby se mohl vázat k jamkám. Když se jamky potáhnou, přidávají se různé koncentrace testované sloučeniny společně s vhodně značenými buňkami exprimujícími VLA-4. Alternativně se může nejprve přidat testovaná sloučenina a nechat se inkubovat s potaženými jamkami před přidáním buněk. Buňky se nechají inkubovat v jamkách nejméně 30 minut. Po inkubaci se jamky vyprázdňují a promývají. Inhibice vazby se měří určením hodnoty fluorescence nebo radioaktivity vázané k destičce pro každou různou koncentraci testované sloučeniny a také pro kontrolní vzorek neobsahující testované sloučeniny.

Buňky exprimující VLA-4, které se mohou použít při tomto testu, zahrnují Ramosovy buňky, Jurkatovy buňky, buňky melanomu A375, a také buňky lymfocytů lidské periferní krve (PBL). Buňky použité při tomto testu se mohou značit jakýmkoli vhodným způsobem, například pomocí fluorescenčních nebo radioaktivních značek.

5

Pro kvantitativní vyhodnocení inhibiční aktivity sloučenin podle vynálezu se může také použít test přímé vazby. Při tomto testu se konjuguje VCAM-IgG fúzní protein obsahující první dvě imunoglobulinové domény VCAM (D1D2) připojené nad stěžejní oblastí molekuly IgG1 („VCAM 2D-IgG“) k značkovacímu enzymu, jako je alkalická fosfatáza („AP“). Syntéza této fúze VCAM-IgG je popsána v mezinárodní patentové přihlášce WO 90/13300, jejíž obsah zde uvádíme jako odkaz. Konjugace této fúze ke značkovacímu enzymu se dosáhne zesítovacími postupy, které jsou odborníkům pracujícím v této oblasti známé.

10

Enzymový konjugát VCAM-IgG se potom umístí do jamek mnohojamkové mikrotitrační destičky, jako je například destička, která je součástí Millipore Multiscreen Assay System (Millipore Corp. Bedford, MA). Potom se do každé jamky přidají různé koncentrace testované inhibiční sloučeniny a potom buňky exprimující VLA-4. Buňky, sloučenina a enzymový konjugát VCAM-IgG se smísí a nechají se inkubovat při teplotě místnosti.

15

Po inkubaci se jamky odvodní za vakua a v jamkách zůstanou buňky a veškerý vázaný VCAM. Množství vázaného VCAM se určí přidáním vhodného kolorimetrického substrátu pro enzymový konjugát VCAM-IgG a určí se množství reakčního produktu. Pokles množství reakčního produktu znamená vzrůst vazebné inhibiční aktivity. Postup některých testů je popsán dále:

20

Pro testování inhibiční specifčnosti sloučenin podle předkládaného vynálezu k VLA-4 se provedou testy na hlavní skupiny integrinů, tj. $\beta 2$ a $\beta 3$, a také na další $\beta 1$ integriny, jako jsou VLA-5, VLA-6 a $\alpha 4\beta 7$. Tyto testy mohou být podobné testům inhibice adheze a přímé vazby popsaným výše, přičemž se nahradí příslušné buňky exprimující integrin a odpovídající ligand. Například se použijí polymorfonukleární buňky (PMN) exprimující na svém povrchu integriny $\beta 2$ a vázící ICAM. Integriny $\beta 3$ jsou zahrnuty do shlukování krevních destiček a inhibice se může měřit pomocí standardního testu srážení krevních destiček. VLA-5 se váže specificky k sekvenci Arg-Gly-Asp, zatímco VLA-5 se váže k lamininu. $\alpha 4\beta 7$ je nedávno objevený homolog VLA-4, který také váže fibronektin a VCAM. Specifčnost vzhledem k $\alpha 4\beta 7$ se určí při testu vazby, který využívá výše popsaný značkovací konjugát VCAM-IgG-enzym a buněčný kmen, který exprimuje $\alpha 4\beta 7$, ale ne VLA-4, jako je RPMI-8866 nebo JY buňky.

25

30

35

Když se identifikují VLA-4 specifické inhibitory, mohou se dále charakterizovat pomocí *in vivo* testů. Jeden takový test studuje inhibici kontaktní hypersenzitivity u živočichů a je popsán například v článcích P.L. Chisholm a kol., „Monoclonal Antibodies to the Integrin α -4 Subunit Inhibit the Murine Contact Hypersensitivity Response“, Eur. J. Immunol, 23, strana 682-688 (1993) a v „Current Protocols in Immunology“, J. E. Coligan a kol., Eds., John Wiley and Sons, New York, 1, str. 4.2.1-4.2.5 (1991), jejichž obsah je zde uveden jako odkaz. V tomto testu se senzitivuje pokožka živočicha vystavením dráždivé látce, jako je dinitrofluorobenzen, potom se lehce fyzicky podráždí například lehkým poškrábáním pokožky ostrou hranou. Po zotavení se pomocí stejného postupu živočichové znovu senzitivují. Několik dní po senzitivaci se jedno ucho živočicha vystaví chemickému dráždidlu a druhé ucho se ošetří nedráždivým kontrolním roztokem. Krátce po podráždění uší se zvířatům pomocí podkožní injekce podávají různé dávky inhibitoru VLA-4. *In vivo* inhibice zánětu souvisejícího s buněčnou adhezí se testuje měřením odezvy otoku léčeného ucha oproti otoku neléčeného ucha živočicha. Otok se měří pomocí posuvného měřítka nebo jiného nástroje vhodného pro měření tloušťky ucha. Tímto způsobem je možné zjistit, které inhibitory podle předkládaného vynálezu jsou nejvhodnější pro inhibici zánětu.

40

45

50

Další *in vivo* test, který se může použít pro testování inhibitorů podle vynálezu, je test astmatu ovcí. Tato zkouška se provádí podle postupu, který je popsán v W. M. Abraham a kol.,

„ α -Integrins Mediated Antigen-Induced Late Bronchial Responses and Prolongated Airway Hyperresponsiveness in Sheep“, J. Clin. Invest., 93, str. 776–87 (1994), což je zde uvedeno jako odkaz. Pomocí této zkoušky se měří inhibice pozdní fáze odezvy dýchacích cest a přecitlivělost dýchacích cest vyvolaná antigenem *Ascaris* u alergických ovcí. Sloučeniny podle vynálezu mohou být také testovány při testu shlukování krevních destiček.

Inhibitory VLA-4 podle předkládaného vynálezu jsou překvapivě výhodně aktivní a selektivní. Obecně jsou tyto sloučeniny selektivní vzhledem k VLA-4 (>1000krát oproti $\alpha 4\beta 7$ a $\alpha 5\beta 1$), jsou negativní při běžných testech PanLabs a non-GLP Arnes, čisté při standardních farmakologických testech vedlejších účinků a jsou účinné na ovčím modelu dávkování předpokládaného množství účinného pro člověk 1 mg/den nebo méně jednou denně.

Sloučeniny podle vynálezu mají překvapivě dobrou účinnost ve srovnání se strukturně podobnými inhibitory VLA-4. Například u ovcí citlivých na *Ascaris* léčených jednou denně čtyři dny nebulizovaným léčivem při dávce 0,1 mg/kg a potom stimulovaných antigenem 24 hodin po poslední dávce, dříve testované sloučeniny značně snížily časnou odezvu a blokovaly pozdní fázi bronchokonstrikce a vývoj nespecifické přecitlivělosti. Za předpokladu biologické ekvivalence u člověka by celková dávka pro člověka o hmotnosti 70 kg mohla být 7 mg. Dále léčivo podávané ovcím prostřednictvím endotracheální trubice v daných dávkách je podle odhadu dvakrát vyšší, než se typicky dosáhne u člověka pomocí orálního inhibičního zařízení. Dále je pravděpodobné, že bude potřeba přidat ke konečné pevné kompozici přísady, aby se optimalizovalo plnění pomůcky a dodání léčiva. Podle těchto faktorů lze odhadnout dávku u člověka 14 mg nebo více, což přesahuje technický limit 1 až 5 mg, který lze dodat v jedné dávce pomocí inhalačního zařízení na suchý prášek (DPI). Přestože lze potřebnou dávku dodat pomocí několika dávkování DPI, bude tato skutečnost představovat nevýhodu na trhu s léky proti astmatu, kde je typická dávka inhalovaného steroidu 0,2 až 1,0 mg.

oMePUPA-V snížila včasnou odezvu, blokovala pozdní fázi bronchokonstrikce a normalizovala přecitlivělost při minimální dávce 0,003 mg/kg při podávání ve formě nebulizované dávky 2 hodiny před stimulací antigenem. Dále denní dávka 0,001 mg/kg 4 dny při stimulaci antigenem 24 hodin po poslední dávce poskytla maximální odezvu. Tedy, oMePUPA-V je třicetkrát až stokrát účinnější, než dříve používané sloučeniny, při hladinách dávkování v rozmezí, které je stejné, jako u nejlepších probádaných steroidů pro inhalační použití. oMePUPA-V, stejně jako předposlední syntetický meziprodukt, je vysoce krystalický (viz. obr. 1, tabulka 1).

Dále má oMePUPA-V zlepšený metabolický profil v porovnání se známými sloučeninami inhibujícími VLA-4. Například po podávání aerosolu se nárokové sloučeniny rychle převedou na méně aktivní metabolit, který byl převládajícím produktem získaným z bronchoalveolárního výplachu (BALF) a byl také převládajícím produktem pozorovaným při systémovém oběhu, přičemž vykazoval delší poločas života v plazmě, než mateřská sloučenina. Protože je rychlá metabolická konverze na méně aktivní sloučeniny vhodnou strategií pro dosažení níže expozice systému, sloučeniny, které se metabolizují na vedlejší produkty s malou nebo žádnou vnitřní aktivitou, představují menší obtíže při vyvíjení a jsou výhodné z hlediska hromadění.

Potenciální proteolytické produkty oMePUPA-V jsou neaktivní při VLA-4 vazebném testu a tedy pomocí proteolýzy se budou generovat neaktivní produkty. Přesto *in vitro* metabolické studie a také *in vivo* PK studie krys, psů a ovcí ukazují, že oMePUPA-V je proteolyticky stabilní.

Tabulka 1:

Vlastnosti oMePUPA-V v porovnání se známými inhibitory

	<i>Vlastnost</i>	<i>známá slouč.</i>	<i>oMePUPA-V</i>
5	IC ₅₀ proti vazbě VLA-4-VCAM-Ig	1,5 nM	2,7 nM
	IC ₅₀ proti vazbě α4β7-VCAM-Ig	2,7 μM	> 100 μM
	IC ₅₀ proti adhezi α5β1-FN	> 100 μM	> 100 μM
	Minimální účinná dávka na ovčím modelu		
	– jednotlivá dávka	0,1 mg/kg	0,003 mg/kg
10	– opakovaná dávka	0,03–0,1 mg/kg	0,001 mg/kg
	Krystalinita	NE	Ano
	<i>In vitro</i> pharma screen 85 test	1 slabý zásah	čistý
	ACE aktivita	ACE substrát	čistý
	Glukoronidace	nízké hladiny	plánováno
15	Test Ames (mutagenita)	čistý	čistý
	Ancilární farmakologie (vedlejší účinky)	čistý	
	Systémová expozice, dávka 10 mg aerosolu (ovce)	40 ng/ml x hod	dokončeno
	Metabolický profil	aktivní metabolit	
20	Orální biol. využitelnost	< 1 %	< 1 %
	Stabilita ve velkém (40 °C, 75% rel.vlhkost)	„nestabilní“	stabilní > 4 týdny
	Stabilita ve formulaci (40 °C)	0,2% degradace/den	stabilní > 4 týdny
25	Sloučeniny podle vynálezu mohou být upraveny do farmaceutických prostředků, které mohou být podávány orálně, parenterálně, pomocí inhalačního spreje, místně, rektálně, nasálně, bukálně, vaginálně nebo pomocí implantovaného zásobníku. Termín „parenterální podávání“ zahrnuje podkožní, nitrožilní, mezisvalové, intraartikulární, do kloubu, intrasternální, intratekální, inthahapatikální, intralesionální a intrakraniální injekci nebo infuzní techniku.		
30	Farmaceutické prostředky podle vynálezu obsahují jakoukoli sloučeninu podle vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelný derivát, společně s jakýmkoli farmaceuticky přijatelným nosičem. Termín „nosič“ zahrnuje farmaceuticky přijatelné adjuvanty a vehikula. Farmaceuticky přijatelné nosiče, které mohou být použity ve farmaceutických prostředcích podle vynálezu, zahrnují ionto-		
35	měniče, oxid hlinitý, stearát hlinitý, lecitin, sérové proteiny, jako je lidský sérový albumin, pufrovací látky jako jsou fosfáty, glycin, kyselinu sorbovou, sorban draselný, částečně glyceridované směsi nasycených rostlinných mastných kyselin, vodu, soli nebo elektrolyty, jako je protamin sulfát, hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, soli zinku, koloidní oxid křemičitý, trikřemičitan hořečnatý, polyvinylpyrrolidon, látky založené na celulóze,		
40	polyethylenglykol, sodnou sůl karboxymethylcelulózy, polyakryláty, vosky, blokové polymery polyethylen-polyoxypropylen, polyethylenglykol a lanolin.		
45	Podle vynálezu mohou být farmaceutické prostředky ve formě sterilního roztoku pro injekční podávání, například sterilního vodného roztoku pro injekční podávání nebo olejové suspenze pro injekční podávání. Takové suspenze mohou být připraveny podle technik, které jsou v této oblasti známy, za použití vhodných dispergujících nebo zvlhčujících činidel a suspendujících činidel. Sterilní prostředky pro injekční podávání mohou být sterilní roztoky pro injekční podávání nebo suspenze v netoxických parenterálně přijatelných ředidlech, nebo rozpouštědlech, například jako roztok v 1,3-butandiolu. Mezi přijatelná vehikula a rozpouštědla, která mohou být použita, patří		
50	voda, Ringerův roztok a izotonický roztok chloridu sodného. Dále se jako rozpouštědlo nebo suspendující činidlo používají sterilní, stabilizované oleje. Pro tento účel je možné použít jakýkoli nedráždivý stabilizovaný olej, včetně mono- a diglyceridů. Mastné kyseliny, jako je kyselina olejová a její glyceridové deriváty jsou vhodné při přípravě injektovatelných prostředků, stejně jako farmaceuticky přijatelné přírodní oleje, jako jsou olivový olej nebo ricínový olej,		

zejména v jejich polyoxyethylenových formách. Tyto olejové roztoky nebo suspenze mohou také obsahovat jako ředidlo nebo dispergující látku alkoholy s dlouhým řetězcem.

5 Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou být orálně podávány v jakékoli orálně přijatelné dávkovací formě včetně tobolek, tablet, vodných suspenzí nebo roztoků, vynález se však neomezuje pouze na tyto příklady. V případě tablet pro orální podávání se jako nosiče běžně používají laktóza a kukuřičný škrob. Typicky se také přidávají mazadla, jako je stearát hořečnatý. Pro orální podávání ve formě tobolek jsou vhodnými ředidly laktóza a sušený kukuřičný škrob. Pokud je pro orální použití potřebná vodná suspenze, aktivní složka se smísí s emulgátorem a suspendujícím činidlem. Pokud se to požaduje, může se také přidat určité sladící činidlo, příchut' nebo barvicí činidlo.

15 Alternativně mohou být farmaceutické prostředky podle vynálezu podávány ve formě čípků pro rektální podávání. Čípky se mohou připravovat smísením činidla s vhodnou nedráždivou přísadou, která je pevná při teplotě místnosti, ale kapalná při rektální teplotě, a tak taje v konečniku za uvolnění léčiva. Takovými materiály jsou kakaové máslo, včelí vosk a polyethylenglykoly.

20 Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být podávány místně, zvláště pokud jsou místem léčby místa nebo orgány, které jsou dobře přístupné pro místní aplikaci. Patří mezi ně oční onemocnění, kožní onemocnění nebo onemocnění konečniku. Pro každou z těchto oblastí nebo orgánů se vhodné farmaceutické prostředky snadno připravují.

25 Místní aplikace do spodního intestinálního traktu může být provedena pomocí rektální čípkové formy (viz výše) nebo pomocí vhodného klystýrového prostředku. Mohou být také použity místní transdermální náplasti.

30 Pro místní aplikaci mohou být farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu upraveny do vhodných masť obsahujících aktivní složku suspendovanou nebo rozpouštěnou v jednom nebo více nosičích. Nosiče pro místní podávání sloučenin podle předkládaného vynálezu zahrnují minerální oleje, kapalnou vazelínu z ropy, bílou vazelínu z ropy, propylenglykol, polyoxyethylenové sloučeniny, emulgační vosky a vodu, předkládaný vynález však není omezen pouze na tyto příklady. Alternativně mohou být farmaceutické prostředky připraveny ve vhodném roztoku nebo krému obsahujícím aktivní složky suspendované nebo rozpuštěné v jednom nebo více farmaceutických nosičích. Mezi vhodné nosiče patří minerální olej, sorbitan monostearát, polyserbát

35 60, cetylsterový vosk, cetearylalkohol, 2-oktyldodekanol, benzylalkohol a voda, předkládaný vynález však není omezen pouze na tyto příklady.

40 Pro oční použití mohou být farmaceutické prostředky připraveny jako mikronizované suspenze v izotonickém roztoku, pH upravené pomocí sterilní solanky, nebo, s výhodou jako roztoky v izotoniku, pH upravené pomocí sterilní solanky, buď s, nebo bez konzervačních látek jako je benzylakoniumchlorid. Alternativně mohou být farmaceutické prostředky pro oční použití připraveny ve formě oleje jako je kapalná vazelína z ropy.

45 Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být také podávány pomocí nasálního aerosolu nebo inhalačně pomocí nebulizeru, suché práškové formy pro inhalaci nebo odměřovacího dávkovacího inhalátoru. Takové prostředky se připraví v souladu s technikami, které jsou odborníkům v oblasti farmaceutických prostředků známé a mohou být připraveny jako roztoky v salinu, za využití bezylalkoholu nebo jiných vhodných konzervačních látek, látek podporujících absorpci pro zvýšení biologické využitelnosti, fluorovaných uhlovodíků a/nebo jiných

50 běžných látek podporujících rozpustnost nebo dispergujících činidel. Dále mohou kompozice podle vynálezu obsahovat jakékoli farmaceuticky přijatelné nosiče, jako jsou například laktóza pro suché práškové kompozice.

55 Množství aktivní složky, která může být kombinována s nosičem za vzniku jedné dávkové formy, se bude měnit v závislosti na léčeném pacientovi a konkrétním způsobu podávání. Je zřejmé, že

léčeném pacientovi a konkrétním způsobu podávání. Je zřejmé, že specifická dávka a léčebný režim pro konkrétního pacienta bude závislý na různých faktorech zahrnujících aktivitu využití sloučeniny, věk, tělesnou hmotnost, celkový zdravotní stav, pohlaví, dietu, dobu podávání, rychlost vylučování, kombinaci léčiva, a úsudek lékaře a závažnost choroby, která je léčena.

5 Množství aktivní složky může také záviset na léčebném nebo profylaktickém činidle, se kterým je složka podávána.

Dávkování a četnost dávek sloučenin podle předkládaného vynálezu účinné při prevenci, potlačení nebo inhibici buněčné adheze, bude záviset na různých faktorech, jako je povaha inhibitoru, velikost pacienta, cíl léčby, povaha onemocnění, které je léčeno, konkrétní použitý farmaceutický prostředek, a úsudek lékaře. Vhodné je dávkování množství mezi 0,001 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti za den, s výhodou mezi 0,01 až 50 mg/kg tělesné hmotnosti za den a výhodněji asi 10 mg/kg tělesné hmotnosti za den aktivní složky sloučeniny podle předkládaného vynálezu.

10

Pro použití jako prostředku pro nitrožilní podávání je vhodné dávkování 0,001 mg až 25 mg/kg, výhodněji asi 0,01 mg/kg až 1 mg/kg.

15

V souladu s jiným provedením, prostředky, které obsahují sloučeninu podle předkládaného vynálezu, mohou také obsahovat další činidla vybraná ze skupiny obsahující kortikosteroidy, bronchodilatátory, antiastmatika (buněčné stabilizátory), protizánětlivé látky, antirevmatika, imunosupresiva, antimetabolita, imunomodulátory, antipsoriatika a antidiabetika. Specifické sloučeniny z těchto tříd mohou být vybrány ze sloučenin, uvedených pod vhodným názvem v „Comprehensive Medicinal Chemistry“, Pergamon Press, Oxford, England, str. 970–985 (1991), což je zde uvedeno jako odkaz. Kromě této skupiny mohou prostředky obsahovat sloučeniny jako jsou theofylin, sulfasalazin a aminosalicyláty (protizánětlivé látky); cyklosporin, FK–506, a rampamycin (imunosuprasivum); cyklofosamid a methotrexát (antimetabolita); steroidy (inhalační, orální a místní podávání), a interferony (imunomodulátory). Dále se sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou podávat společně s dalšími inhibitory buněčné adheze. Když se v kombinaci s nárokovanými inhibitory VLA–4 podává jedno nebo více dalších činidel, aktivní složky mohou být formulovány společně nebo alternativně mohou být podávány v kombinaci.

20

Podávání jednoho nebo více aktivních činidel v kombinaci s inhibitory VLA–4 podle vynálezu může být v podstatě současné nebo postupné. Odborník pracující v této oblasti může snadno určit nejvhodnější způsob aplikace v závislosti na činidle, které se má podávat, požadovaném výsledku a pacientovi a onemocnění, které se má léčit.

25

30

V souladu s jinými provedeními, předkládaný vynález poskytuje způsob prevence, inhibice nebo potlačení zánětů spojených s buněčnou adhezí a imunitními nebo autoimunitními reakcemi spojenými s buněčnou adhezí. Buněčná adheze spojená s VLA–4 hraje klíčovou roli při různých zánětech, imunitních a autoimunitních onemocněních. Tedy, inhibice buněčné adheze pomocí sloučenin podle předkládaného vynálezu může být využitelná při způsobech léčení nebo prevence zánětlivých, imunitních a autoimunitních onemocnění. S výhodou jsou onemocnění, která se budou léčit pomocí způsobů podle předkládaného vynálezu vybrána ze skupiny, která obsahuje astma, artritidu, alergie, syndrom dýchacího stresu u dospělých, kardiovaskulární onemocnění, trombózu nebo škodlivou agregaci krevních destiček, odmítnutí transplantátu, neoplastická onemocnění, psoriázu, mnohočetnou sklerózu, diabetes a zánětlivé střevní onemocnění.

35

40

Tyto způsoby mohou využít sloučenin podle předkládaného vynálezu při monoterapii nebo ve spojení s protizánětlivými nebo imunosupresivními činidly. Takové kombinované léčení zahrnuje podávání činidla v jednotlivé dávkové formě nebo ve vícenásobných dávkových formách podávaných ve stejném čase nebo v různých časech.

45

50

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava oMePUPA–V

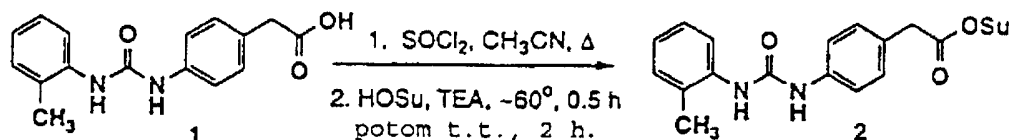
- oMePUPA-V, což je (R)-N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl]- β -alanin, se připraví pomocí postupné syntézy z komerčně vyráběného Boc-(L)-prolinu (Boc-Pro-OSu; Bachem) a hemisulfátu (R)-benzyl-3-aminobutyrátu (Celgene Corp.).
- 5 Výchozí látky se kondenzují v dichlormethanu v přítomnosti triethylaminu, potom se pomocí 4N roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu hydrolyzuje skupina Boc a získá se hydrochlorid, který se rekrystalizuje ze směsi dichlormethan a diethyletheru. Pomocí kondenzace hydrochloridu se sukcinimidyl-2-[4-[2-(methylfenylaminokarbonyl)]aminofenyl]acetátem (MPUPA-OSu),
- 10 připraveným z odpovídající kyseliny, MPUPA-OH (Ricerca, Inc.), se získá krystalický oMePUPA-V-benzylester, který se katalyticky hydrogenuje (10% pallaciem na uhlík) ve směsi tetrahydrofuranu a vody (9:1) a získá se oMePUPA-V. Konečný produkt se po rekrystalizaci z 20% vodného acetonu získá ve formě bílé pevné látky.

Souhrn fyzikálních vlastností:

- 15 Chemický název: (R)-N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl]- β -alanin,
 Souhrn vzorce: $C_{25}H_{30}N_4O_5$
 Molární hmotnost: 466,53
 Vzhled: Čistě bílý prášek
- 20 Teplota tání: 153,6 až 154,4 °C.

Schéma 1:

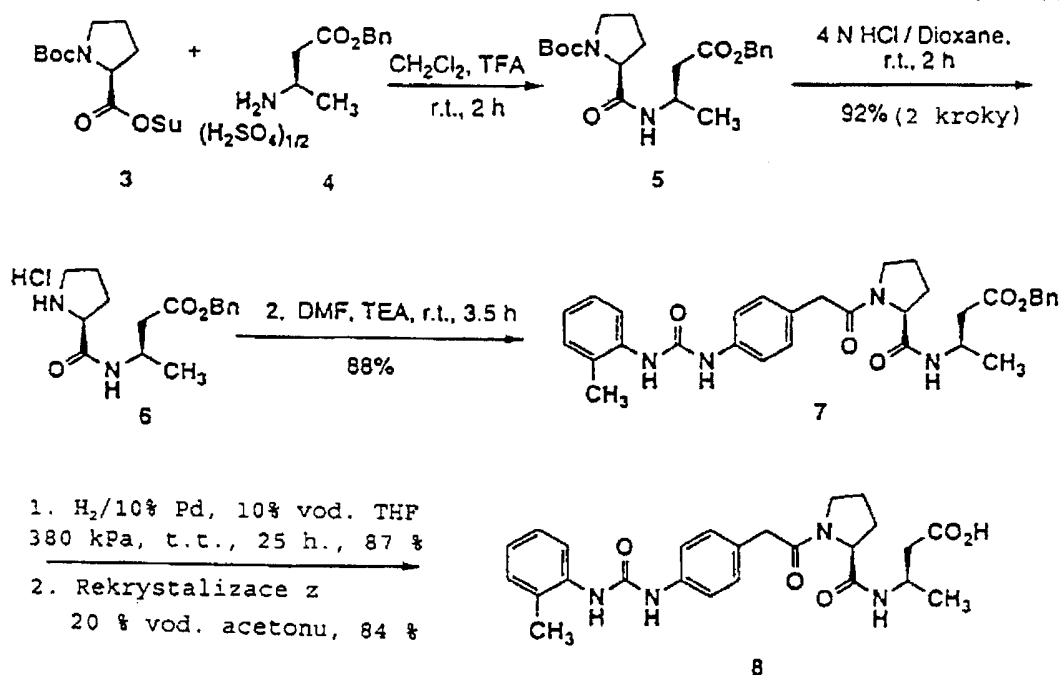
Příprava MPUPA-OSu (2) z MPUPA-OH (1)



25

Schéma 2:

Syntéza oMePUPA-V (8) z Boc-(L)-Pro-OSu (3) a hemisulfátu benzyl-(R)-3-aminobutyrátu (4)



Syntéza oMePUPA-V

Syntetický postup, který se použije pro přípravu oMePUPA-V, je popsán ve schématech 1 a 2. Výchozí látky se získají z komerčně dostupných látek: sloučenina (1) se připraví ve velkém množství společností Ricarca, Inc., Painesville, OH; sloučenina (3) se získá od společnosti Bachem Bioscience, Inc., King Of Prussia, PA a sloučenina (4) od společnosti Calgene Corp., Warren, NJ.

Příprava oMePUPA-V:

Obecné analytické postupy (^1H NMR, ^{13}C NMR, HS, IČ a HPLC)

^1H NMR se měří buď na přístroji Bruker, AC 300, nebo Varian 50 nebo Varian 600 a vzorky se analyzují buď v perdeuterodimethylsulfoxidu a referencují se vzhledem k perdeuterodimethylsulfoxidu (δ 2,49 ppm), nebo v deuteriochloroformu a referencují se vzhledem ke zbytkovému chloroformu (δ 7,24 ppm).

^{13}C NMR se měří buď na přístroji Varian 500, nebo Varian 600 a vzorky se měří buď v perdeuterodimethylsulfoxidu a referencují se vzhledem k perdeuterodimethylsulfoxidu (δ 40,5 ppm), nebo v deuteriochloroformu a referencují se vzhledem k deuteriochloroformu (δ 77,0 ppm).

Hmotová spektra se měří na spektrometru VG Platform, LC-MS-DS Mass Spectrometer System se automatickým samplerem Hewlett Packard Model 1500 AutoSampler a data se zpracují pomocí Fisons VG MassLynx Mass Spectrometer Workstation. HRMS se provádí na M-San (PA) za použití ostřelování rychlými atomy (FAB) na hmotovém spektrometru VG Analytical ZAB 2SE vzhledem k SOP#MS-002, MS-006, MS-012 a MS-023. Pro generování iontů pro získání hmotového spektra, které se zaznamená pomocí přístroje PDP-11-250J, se použije ostřelování ionty cesia.

IČ spektra se měří na přístroji Perkin Elmer 1600 Series FTIR.

Analytická vysokotlaká chromatografie (HPLC) se provádí následujícím způsobem:

1. Chromatogramy za použití programu 1 (Equilibrate @ 20 % B, nástřik vzorce, 20 % B (1 min), 20 až 70 % B (24 min), 70 až 100 % B (70 min) se získají pomocí autosamplu Perkin Elmer Series 200 HPLC s detektorem Perkin Elmer 785A UV (nastaveno na 214 nm) a detektorem Applied Biosystems 783A UV (nastaveno na 25 nm) s PE Nelson 1020 integrátorem. Uvádí se pouze údaje o procentech plochy.

2. Chromatogramy za použití programu 8 (Equilibrate @ 15 % B, nástřik vzorku, 15 % B (1 min), 15 až 40 % B (25 min), 40 % B (10 min) se získají pomocí Applied Biosystems 400 Solvent Delivery System při vlnové délce 783A na UV detektoru za použití autosamplu Waters 717. Data se zpracují pomocí integrátoru Hewlett Packard 3396 Series II. Integrátor se nastaví na následující parametr: tlumení = 8, základní linie = 5, odmítnutá plocha = 10000, šířka píku = 0,04, rychlost záznamu = 2.

Každá HPLC se provádí za použití kolony Vydac C-18 (velikost pórů 5 μ , 4,5 mm x 25 cm, kat., #2186TP54).

Rozpouštědlo A (voda + 0,1 % kyseliny trifluoroctové)

Rozpouštědlo B (acetonitril + 0,1 % kyseliny trifluoroctové)

Průtok = 1 ml/min

Použijí se následující gradienty:

Program 1: Equilibrate @ 20 % B, nástřik vzorku, 20 % B (2 min). 20 až 70 % B (25 minut), 100 % B (5 minut).

Fyzikální údaje pro 4-[[[(2-methylfenyl)amino]karbonyl]amino]fenyl]octovou kyselinu (1, MPUPA-OH: látka vyrobená společností Ricerca Inc.):

teplota tání 210 až 215 °C (rozklad);

5 IČ (KBr) 3295 (široký pás), 3034 (široký pás), 1707, 1637, 1603, 1551, 1516, 1457, 1414, 1302, 1241, 1189, 1118 cm^{-1} ;

^1H NMR (600 MHz, perdeuterodimethylsulfoxid) δ 12,28 (šs, 1H), 9,0 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,88 (d, $J = 7,8\text{Hz}$, 1H), 7,43 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 2H), 7,19 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 2H), 7,16 (m, 2H), 6,94 (dd, $J = 7,8, 8,4\text{Hz}$, 1H), 3,51 (s, 2H), 2,25 (s, 3H);

10 ^{13}C NMR (150 MHz, perdeuterodimethylsulfoxid) δ 173,0 (C), 152,7 (C), 138,5 (C), 137,5 (C), 130,2 (CH), 129,8 (CH), 128,3 (CH), 127,5 (CH), 126,2 (CH), 122,7 (CH), 121,0 (CH), 118,1 (CH), 40,1 (CH_2), 17,9 (CH_3);

HS (EI) m/z 285 ($\text{M}+1$)⁺, 193, 152, 134, 132, 109, 108, 106, 93, 91, 57;

Elementární analýza pro $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: vypočteno C, 67,59; H, 5,67; N, 9,85; nalezeno: C, 67,60; H, 5,70; N, 10,01.

15

Příprava sukcinimidyl [4-[[[(2-methylfenyl)amino]karbonyl]amino]fenyl]acetátu (2, MPUPA-OSu)

20 K vroucí suspenzi 150 g o-methylfenylureafenyloctové kyseliny (1, MPUPA-OH; 0,501 mol; od Ricarca, Inc.) v 600 ml acetonitrilu (600 ml) se během 10 minut za energického míchání přidá 41 ml (0,558 mol) thionylchloridu. Uvolní se velké množství chlorovodíku. Reakční směs se za neustálého míchání během 1,5 hodiny ochladí na teplotu místnosti. Reakční směs přejde na různou suspenzi, ke které se najednou přidá 75,5 g (0,636 mol) N-hydroxysukcinimidu (HOSu). K této směsi se během 30 minut při teplotě, která se pomocí vodní lázně udržuje pod 60 °C, 25 přikape 174 ml triethylaminu. Míchání pokračuje 2 hodiny a potom se k reakční směsi přidá destilovaná voda. Pevná látka se odfiltruje a promyje 2 litry destilované vody a dvakrát 200 ml acetonitrilu, suší se na vzduchu a potom se suší nad P_2O_5 za vakua (asi 13,3 Pa) a získá se 175 g (výtěžek 97 %) surového produktu ve formě béžového prášku. 174 g surového produktu se rekrytalizuje z 3,5 litru acetonitrilu s 10 g aktivního uhlí a získá se 121 g MPUPA-OSu (2; výtěžek 68 %) ve formě bílého prášku (čistota více než 99 %).

30 teplota tání: 211,2 až 211,8 °C;

IČ (KBr): 3905–3203 (široký pás), 1816, 1783, 1654, 1368, 1304, 1244, 1116, 1021 cm^{-1} ;

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9,04 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,44 (d, $J = 8,5\text{Hz}$, 2H), 7,24 (d, $J = 8,5\text{Hz}$, 2H), 7,15 (m, 2H), 6,93 (dd, $J = 7,4, 7,3\text{Hz}$, 1H), 4,02 (s, 2H), 2,80 (s, 4H), 2,23 (s, 3H);

35 HS (EI, ES^+) m/z 382 [$\text{M}+1$]⁺, 239, 108, 106.

Fyzikální údaje pro sukcinimidyl Boc-(L)-prolin (Boc-Pro-OSu; 3; látka získaná od Bachem Bioscience):

teplota tání: 132 až 136 °C;

40 IČ (KBr) 3456, 2940, 1731, 1619, 1561, 1541, 1497, 1454, 1395, 1337, 1259, 1202, 1118, 1060 cm^{-1} ;

^1H NMR (300 MHz, deuteriochloroform) δ 4,51 (dd, $J = 3,8, 8,7\text{Hz}$, 1H), 3,56 (m, 1H), 3,44 (m, 1H), 2,80 (s, 4H), 2,32 (m, 1H), 2,27 (m, 1H), 1,94 (m, 2H), 1,43 (s, 9H);

HS (EI) m/z 335 ($\text{M}+\text{N}_2$)⁺, 279, 213, 138, 114, 86;

45 HPLC 97,1 %.

Fyzikální údaje pro hemisulfát benzyl-(R)-3-aminobutyátu (4; látka získaná od Celgene Corp.):
teplota tání 249,4 až 249,8 °C;

IČ (KBr) 3515, 3383, 2989, 2945, 2880, 1821, 1788, 1744, 1701, 1476, 1454, 1421, 1394, 1368, 1260, 1241, 1202, 1159, 1077 cm⁻¹;

5 ¹H NMR (300 MHz, deuteriochloroform) δ 7,85 (šs, 2 H), 7,26 (s, 5H), 5,06 (ABkv, J = 12,3 Hz, 2H), 4,35 (m, 2H), 3,73 (m, 1H), 2,92 (dd, J = 6,4, 17,1 Hz, 1H), 2,66 (dd, J = 6,4, 17,0 Hz, 1H), 1,35 (d, J = 6,5 Hz, 3H);

HS (EI) m/z 195 (M+3)⁺, 194 (M+2)⁺, 106, 92, 91;

HPLC 99,0%.

10

Příprava benzylesteru N-(terc.butoxylkarbonyl)-L-prolyl-3-methyl-(R)-β-alaninu (5)

K dobře míchané suspenzi 66,7 g hemisulfátu benzyl-R-3-amibutyátu (4; 213 mmol) v 200 ml dichlormethanu se přidá 53,9 g Boc-(L)-Pro-Osu (3; 222 mmol) a 95 ml (681 mol) triethyl-
15 aminu. Reakční směs se nechá míchat 2 hodiny při teplotě místnosti. Reakční směs se extrahuje mezi 1,5 litru ethylacetátu a 250 ml vody a organická vrstva se promyje třikrát 250 ml 10% kyseliny citronové, 250 ml vody, 250 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 250 ml vody a třikrát 250 ml solanky, suší se na síranem sodným a odpaří se nejprve na rotační vakuové odparce (40 °C, 10,7 kPa) a potom za vysokého vakua (teplota místnosti, 16 hodin; 26,7 Pa) a získá se 88,1 g meziproductu 5 ve formě viskózního oleje, který obsahuje zbytky ethylacetátu a dichlormethanu (podle NMR) a má čistotu vyšší než 98 % (HPLC). Tato látka se
20 použije bez čištění v další reakci.

25 ¹H NMR (300 MHz, deuteriochloroform) δ 7,30 (m, 5 H), 6,44 (šs, 1H), 5,10 (dd, J = 12,3, 14,1 Hz, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 3,34 (šs, 2H), 2,48 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 2,1 (m, 2H), 1,75 (šs, 2H), 1,40 (s, 9H), 1,17 (d, J = 6,0 Hz, 3H);

HS (EI): m/z 413 [M+Na]⁺, 313, 291, 191, 194, 165, 91.

Příprava hydrochloridu benzylesteru L-prolyl-3-methyl-(R)-β-alaninu (6)

30 K meziproductu 5 z předchozí reakce se postupně přidá 240 ml roztoku 4N kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Dochází k silnému uvolňování plynu (pozor exotermní). Reakční směs se nechá míchat 2 hodiny při teplotě místnosti a potom se odpaří nejprve na rotační odparce (45 °C, 10,7 kPa) a potom přes noc za vysokého vakua (teplota místnosti, 14 hodin, 26,7 Pa) a získá se mimořádně viskózní látka, která se krystalizuje ze směsi dichlormethanu a etheru (600 ml/700 ml) a získá se 64,0 g (celkový výtěžek po dvou krocích 92 %) hydrochloridu 6 ve formě bílé
35 pevné látky (HPLC čistota 99,6 %).

teplota tání: 119,8 až 120,5 °C

IČ (KBr): 3217, 3072, 2904, 2756, 1736, 1681, 1560, 1446, 1387, 1352, 1295, 1244, 1178, 1096 cm⁻¹;

40 ¹H NMR (500 MHz, deuteriochloroform) δ 10,21 (šs, 1 H), 8,71 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,77 (šs, 1H), 7,24 (m, 5H), 5,00 (s, 2H), 4,52 (šs, 1H), 4,22 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 3,33 (šs, 2 H), 2,67 (dd, J = 5,5, 15,5 Hz, 1H), 2,44 (m, 2H), 1,89 (m, 3H), 1,15 (d, J = 6,5 Hz, 3H);

¹³C NMR (125 MHz, deuteriochloroform) δ 171,03 (C=O), 167,67 (C=O), 135,58 (C), 128,43 (CH), 128,13 (CH), 128,06 (CH), 66,34 (CH₂), 59,71 (CH), 46,55 (CH₂), 43,34 (CH), 40,42 (CH₂), 30,50 (CH₂), 24,23 (CH₂), 19,92 (CH₃);

45 HS (EI) m/z 291 [M-Cl]⁺, 199, 194, 160, 139, 92, 91;

Elementární analýza pro C₁₆H₂₃N₂O₃Cl: vypočteno C, 58,80; H, 7,094; N, 8,57; nalezeno: C, 58,95; H, 6,99; N, 8,46.

Příprava benzylesteru N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl)-(R)-β-alaninu (7)

K roztoku 61,77 g hydrochloridu 6 (189 mmol) ve 125 ml dimethylformamidu se přidá 69,39 g MPUPA-Osu (2; 181,9 mmol) a potom 90 ml triethylaminu (pH 10). Reakční směs se nechá míchat 3,5 hodiny a potom se zředí 1 litrem ethylacetátu a třikrát se extrahuje 250 ml vody. Nyní se začne srážet produkt. K organické vrstvě se přidá 250 ml 10% roztoku kyseliny citronové (pozor exotermní) a po protřepání vznikne velké množství sraženiny. Pevná látka se odfiltruje na fritě (2 L, M). Pevná látka se promyje dvakrát 250 ml 10% kyseliny citronové, 250 ml vody, dvakrát 250 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 250 ml vody a třikrát 250 ml solanky a potom se za sání suší na nálevce (asi 10,7 kPa) přes noc (asi 14 hodin) a získá se bělavá pevná látka, která se rekrystalizuje ze směsi tetrahydrofuranu a diethyletheru (1 litr/1,4 litru) a získá se 83,3 g sloučeniny 7 (HPLC čistota 99,6 %) ve formě bílé pevné látky.

Filtrát se potom třikrát promyje 250 ml 10% kyseliny citronové, 250 ml vody, dvakrát 250 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, 250 ml vody a třikrát 250 ml solanky. Při každé dalším promytí vodným roztokem se sráží další sloučenina; promývání pokračovalo a dávalo se pozor, aby se neztrácela sraženina. Po filtraci se získá 4,02 g produktu ve formě bílé pevné látky. Filtrát se nakonec zředí 1 l etheru, filtruje se a přemyje se třikrát 100 ml diethyletheru a získá se dalších 1,67 g bílé pevné látky. Celkový výtěžek této reakce je 88 %.

teplota tání: 153 až 153,5 °C

IČ (KBr) 3342, 3307, 3119, 2966, 13737, 1702, 1643, 1590, 1543, 1514, 1455, 1414, 1308, 1238, 1179 cm^{-1} ;

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): směs rotamerů 3:2 (píky převládající konformace): δ 9,00 (šs, 1H), 7,91 (šs, 1H), 7,84 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,68 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,40 – 7,28 (m, 7H), 7,13 (3h), 7,06 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 5,06 (ABkv, $J = 12,2$ Hz, $D_n = 8,9$ Hz, 2H), 4,18 (dd, $J = 3,4, 8,8$, Hz, 1H), 4,10 (kvintet, $J = 6,8$ Hz, 1H), 3,57 (m, 2H), 3,50 – 3,22 (m, 3h), 2,62 – 2,37 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,18 – 1,68 (m, 3H), 1,05 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H) a (píky minoritní konformace): δ 9,00 (šs, 1H), 7,91 (šs, 1H), 7,84 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 8,15 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,40 – 7,28 (m, 7H), 7,13 (3H), 7,06 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 5,01 (ABkv, $J = 12,2$ Hz, $D_n = 19,0$ Hz, 2H), 4,32 (dd, $J = 2,4, 8,8$ Hz, 1H), 4,22 (kvintet, $J = 6,8$ Hz, 1H); 3,57 (m, 2H), 3,50 – 3,22 (m, 3H), 2,62 – 2,37 (m, 2H), 2,23 (s, 3H), 2,18 – 1,68 (m, 3H), 1,10 (d, $J = 6,8$, 3H);

^{13}C MR (125 MHz, DMSO- d_6): směs rotamerů, (píky převládající konformace): δ 170,0 (C=O), 170,52 (C=O), 169,18 (C=O), 152,61 (C=O), 138,10 (C), 137,38 (C), 136,04 (C), 130,05 (CH), 129,63 (CH), 129,47 (CH), 128,58 (C), 128,28 (CH), 127,89 (CH), 127,85 (C), 126,02 (CH), 122,50 (CH), 117,90 (CH), 117,81 (CH), 65,4,4 (CH₂), 59,61 (CH), 47,04 (CH₂), 41,75 (CH), 40,41 (CH₂), 40,00 (CH₂), 29,29 (CH₂), 24,13 (CH₂), 19,88 (CH₃), 17,78 (CH₃) a (píky minoritní konformace): δ 170,94 (C=O), 170, 52' (C=O), 169,31 (C=O), 152,61 (C=O), 138,10 (C), 137,38 (C), 136,04 (C), 130,05 (CH), 129,63 (CH), 129,47 (CH), 128,65 (C), 128,28 (CH), 127,89 (CH), 127,85 (C), 126,02 (CH), 120,940 (CH), 117,90 (CH), 117,81 (CH), 65,44 (CH₂), 59,91 (CH), 46,51 (CH₂), 42,01 (CH), 40,13 (CH₂), 39,84 (CH₂), 31,75 (CH₂), 22,11 (CH₂), 20,05 (CH₃), 17,78 (CH₃);

HS (EI) m/z 579 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 557, 454, 426, 357, 336, 293, 267, 201;

Elementární analýza pro $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5$: vypočteno C, 69,05; H, 6,52; N, 10,07; nalezeno: C, 68,87; H, 6,52; N, 9,93.

Příprava N-[[4-[[[(2-methylfenylamino)karbonyl]amino]fenyl]acetyl]-L-prolyl-3-methyl)-(R)-β-alanin (8; oMePUPA-V)

Roztok 80,18 g OMePUPA-V-OBn (7) v 800 ml směsi tetrahydrofuranu a vody (9:1) se hydrogenuje při tlaku vodíku 0,38 MPa v přítomnosti 2,44 g 10% palladia na uhlí. Po 25 hodinách se

reakční směs filtruje přes Solka Floc^(R) (144 g; Fiber Sales & Development Corp.) na nálevce s fritou. Filtrát se potom znovu filtruje přes další lůžko z Solka Floc^(R) (115 g), odpaří se asi na 250 ml a postupně se nalije do 3 litrů dobře míchaného toluenu. Suspenze se nechá míchat 0,5 hodiny, filtruje se přes 21 nálevku s křemelinou a získaný bílý prášek se nechá sušit nejprve na
 5 nálevce za sání (10,7 kPa; 0,5 hodiny) a potom se vakuově sušárně (14 hodin; 45 °C; tlak upraven na 3,33 kPa za průtoku dusíku). Bílé hrudky a rozdrť (třecí miska s tloučkem) na jemný prášek a získá se 58,3 g (výťažek 87 %) oMePUPA-V ve formě bílé pevné látky. Produkt se rekrytalizuje ze směsi acetonu a vody (320 ml/75 ml). Krystaly se odfiltrují a suší se nejprve na nálevce s fritou za sání (1 hodina, 107 kPa) potom ve vakuově sušárně (25 hodin; 45 °C, tlak upraven na 3,33 kPa pomocí průtoku dusíku) a získá se 47,0 g (84 % po krystalizaci) oMePUPA-V ve formě bílé pevné látky (HPLC čistota 99,1 %), teplota tání 153,6 až 154,4 °C;

IR (KBr) 3354, 3307, 1719, 1643, 1590, 1543, 1514, 1449, 1414, 1308, 1237 cm⁻¹;

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆): směs rotamerů 3:2 (píky pro převládající konformaci): δ 12,21 (šs, 1H), 8,99 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,68 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,40 (d, J=8,6Hz, 2H), 7,17 (d, J=5,9Hz, 2H), 7,15 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 7,9, 8,2 Hz, 1H), 6,94 (dd, J = 7,3, 7,3 Hz, 1H), 4,22 (dd, J = 3,3, 8,8 Hz, 1H), 4,06 (m, J = 6,6 Hz, 1H), 3,47 (dd, 1H), 3,44 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 3,37 (dd, 1H), 3,29 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 2,46 (dd, 1H), 2,27 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 1,99 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,07 (d, J = 6,6 Hz, 3H) a (píky pro minoritní konformaci): δ 12,21 (šs, 1H), 8,99 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 8,12 (d, J=8,2Hz, 1H), 7,40 (d, J=8,6Hz, 2H), 7,16 (d, J=5,9Hz, 2H), 7,15 (d, J=7,6 Hz, 1H), 7,12 (dd, J = 7,9, 8,2 Hz, 1H), 6,94 (dd, J = 7,3, 7,3 Hz, 1H), 4,34 (dd, J = 1,8, 8,4 Hz, 1H), 4,18 (m, J = 6,6 Hz, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,59 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 2,47 (dd, J = 6,6, 15,4 Hz, 1H), 2,40 (dd, J = 6,6, 15,4, Hz, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,15 (m, 1H), 1,83 (m, 1H), 1,91 (m, 1H), 1,77 (m, 1H), 1,12 (d, J = 6,6 Hz, 3 H);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) (píky pro převládající konformaci): δ 172,4 (C=O), 170,9 (C=O), 169,3 (C=O), 152,6 (C=O), 138,2 (C), 138,5 (C), 130,2 (CH), 129,8 (CH), 129,6 (CH), 128,7 (C), 127,4 (C), 126,1 (CH), 122,6 (CH), 120,9 (CH), 118,0 (CH), 117,9 (CH), 59,7 (CH), 46,6 (CH₂), 41,7 (CH₂), 40,6 (CH₂), 40,2 (CH₂), 29,4 (CH₂), 22,2 (CH₂), 19,9 (CH₃), 17,9 (CH₃) a píky pro minoritní konformaci): δ 172,5 (C=O), 171,0 (C=O), 160,5 (C=O), 152,7 (C=O), 138,19 (C), 137,5 (C), 130,2 (CH), 129,8 (CH), 129,6 (CH), 128,8 (C), 127,4 (C), 126,1 (CH), 122,6 (CH), 120,9 (CH), 118,0 (CH), 117,9 (CH), 59,9 (CH), 47,1 (CH₂) 42,0 (CH₂), 39,8 (CH₂), 40,3 (CH₂), 31,8 (CH₂), 24,2 (CH₂), 20,2 (CH₃), 17,9 (CH₃);

HS (EI) m/z 468 [M+H]⁺, 336, 267, 137;

Elementární analýza pro C₂₅H₃₀N₄O₅: vypočteno C, 64,36; H, 6,48; n, 12,01; nalezeno: C, 64,07; H, 6,40; N, 11,85.

Příklad 2

Aktivita na ovčím modelu alergického zánětu plic

Použijí se alergické ovce o hmotnosti 27 až 50 kg. U všech ovcí se nejprve prokázal vývoj jak časné, tak pozdní bronchiální odezvy na nebulizovaný alergen *Ascaris suum*. Ovce byly při vědomí a byly drženy v upraveném nákupním vozíku v poloze vleže s imobilizovanou hlavou. Po místní anestézii nosní dutiny 2% lidokainem se přes nozdry zavede balónový katétr do dolní části jícnu. Zvířata se intubují upevněnou endotracheální trubicí přes druhou nozdu za použití flexi-
 45 bilního bronchoskopu z optických vláken jako vodiče. Všechny postupy použité při této studii jsou odsouhlaseny Mount Sinai Medical Center Animal Research Committe, který je zodpovědný za zajištění humánního zacházení a použití pokusných zvířat. Pleurální tlak se upraví za použití esofagiálního balónového katétru (naplněného 1 ml vzduchu), který se umístí 5 až 10 cm od gastroesofageálního spojení. V této poloze se koncový expirační pleurální tlak pohybuje mezi -2 až
 50 -5 cm H₂O. Jakmile se balón umístí, zajistí se, aby zůstal ve stejné poloze během celého pokusu. Laterální tlak v dýchací trubicí se měří katétre s postranním otvorem (vnitřním průměr 2,5 mm) zavedeným přes endotracheální trubicí a umístěným distálně ke konci endotracheální trubice.

Tracheální a pleurální tlakové katétry se připojí k diferenciálnímu měniči tlaku (MP45, Validyne, Northridge, CA) pro měření transpulmonárního tlaku, který se definuje jako rozdíl mezi tracheálním a pleurálním tlakem. Průtok vzduchu se měří připojením proximálního konce endotracheální trubice k pneumotachografu (Fleisch, Dyna Sciences, Inc., Blue Bell, PA). Signály transpulmonárního tlaku a průtoku se zaznamenávají na multikanálovém fyziologickém záznamovém zařízení, které je připojeno na osobní počítač 80–386 DOS pro *on line* výpočet střední resistance průtoku plicemi (R_L) pomocí dělení změny transpulmonárního tlaku změnou toku středního objemu nádechu (získaném digitální integrací). Pro získání R_L v $\text{cmH}_2\text{O/l}/\text{se}$ se použije průměr nejméně 5 dechů, bez polykání artefaktu. Okamžitě po měření R_L se měří hrudní objem plynu (V_{tg}) v tělním plethysmografu s konstantním objemem za získání specifické resistance plic ($SR_L = R_L \times V_{tg}$) v $L \times \text{cmH}_2\text{O/l}/\text{sec}$.

Všechny kapalně dávkované aerosoly se generují za použití lékařského vzduchového nebulizéru (Raindrop^(R), Puritan Bennett, Lenexa, KS), který poskytuje aerosol se středním aerodynamickým průměrem 3,2 μm , což se určí pomocí Andersenova kaskádového impaktoru. Nebulizér se připojí k dozimetrickému systému, skládajícímu se ze solenoidového ventilu a zdroje stlačeného vzduchu (137,09 kPa). Výstup z nebulizéru vede do plastového kusu ve tvaru 5, jehož jeden konec je připojen k vdechovému portu pístového respirátoru (Harvard Apparatus, S. Natic, MA), Solenoidový ventil se aktivuje na jednu sekundu na začátku vdechovacího cyklu respirátoru. Aerosol se doručuje v tidálním objemu 500 ml a při četnosti 20 vdechů za minutu. Pro hodnocení bronchiální citlivosti se vytvoří kumulativní křivky odezvy na koncentraci karbacholu pomocí měření SR_L okamžitě po vdechnutí pufru a po každém následném podání 10 vdechů zvyšující se koncentrace karbacholu (0,25, 0,5, 1,0 2,0 a 4,0 % hmotnost/objem v purovaném salínu). Test dráždivosti se ukončí, když SR_L vzroste nad 400 % vzhledem k hodnotě po podání salínu nebo po podání nejvyšší koncentrace karbacholu. Bronchiální citlivosti se hodnotí určením kumulativní koncentrace karbacholu (v dechové jednotce), která zvýší SR_L o 400 % vzhledem k hodnotě po podání salínu (PC_{400}) pomocí interpolace křivky odezvy na dávku. Jedna dechová jednotka (BU) se definuje jako jeden vdech 1% (hmotn./obj.) nebulizovaného roztoku karbacholu.

Dávky oMePUPA–V se rozpustí buď ve směsi ethanolu a normálního salínu 1:2, ve směsi ethanolu a 200 mM fosforečnanu sodného 1:5, nebo pufru Tris. Když se použije Tris, připraví se jakékoli požadované zředění za použití normálního salínu. Dávky se připraví v celkovém objemu 3 až 5 ml.

Při všech studiích se základní linie citlivosti dýchacích cest (tj. PC_{400}) určí tři až čtyři dny před začátkem studie. Při předběžné studii s jednou dávkou se změří SR_L a zvířata se léčí sloučeninou nebo vehikulem. SR_L se měří 2 hodiny po léčbě (těsně před stimulací) a potom se zvířata stimulují alergenem. Při studii s mnoha dávkami, začínající 4 dny před stimulací alergenem, se zvířata léčí jedno denně po dobu 4 dní a stimulují se alergenem 24 hodin po poslední dávce. SR_L se měří přes a po poslední dávce sloučeniny nebo vehikula. Při všech studiích se SR_L přeměruje okamžitě po stimulaci alergenem, po hodině 1 až 6 hodin po stimulaci a po půl hodině 6,5 až 8 hodin po stimulaci alergenem. Určení citlivosti dýchacích cest (PC_{400}) po stimulaci se provede 24 hodin po stimulaci alergenem.

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka průměru. Změna SR_L se vypočte pro každou ovci jako rozdíl vzhledem k základní linii SR_L před testem. Změny SR_L po stimulaci se charakterizují pomocí časné odezvy dýchacích cest (EAR), která se vyvine v období mezi 0 až 4 hodinami. Potom následuje pozdní odezva dýchacích cest (LAR), která se vyvine asi 4 až 8 hodin po stimulaci alergenem. Plochy pod EAR a LAR křivkami se vypočtou pro každé zvíře za použití lichoběžníkového pravidla. Významné snížení plochy pod křivkami EAR a LAR vzhledem ke kontrole placebem se považuje za terapeutický účinek za změnu SR_L vyvolanou alergenem. Citlivost dýchacích cest na karbachol (PC_{400}) testovaná před a 24 hodin po stimulaci alergenem se vyjádří jako poměr PC_{400} po/před stimulací pro každou ovci. Významné zvýšení poměru PC_{400} vzhledem ke kontrole placebem se považuje za terapeutický účinek. Porovnání

s kontrolou placebem se provádělo za použití jednofaktové analýzy rozptylu, po které následoval Dunnettův test (jednostranný) pro vícenásobné srovnání s kontrolou. Porovnání, která vedou k $p < 0,05$ se považují za statisticky významná.

- 5 Obr. 1 ukazuje inhibiční odezvu na dávku oMePUPA-V ve formě aerosolu z ovcí senzitivovaných *Ascaris suum* 2 hodiny po dávkování. Levý panel ukazuje změnu specifické resistance plic SR_L , cm H_2O /sec. Pravé panely ukazují citlivost dýchacích cest k inhalovanému karbacholu (poměr PC_{400} , před/po stimulaci) určenou 24 hodin po stimulaci. oMePUPA-V při dávkách 0,01 až 0,03 mg nevykazuje časnou nebo pozdní odezvu dýchacích cest nebo nemění přecitlivělost ke karbacholu 24 hodin po čelenzování alergenem. Dávky 0,1, 1 a 3 mg inhibují časnou odezvu dýchacích cest a maximálně inhibují pozdní odezvu dýchacích cest. Tyto dávky také inhibují přecitlivělost ke karbacholu 24 hodin po stimulaci alergenem. Statistická analýza těchto údajů je uvedena v tabulce 2.

15 Tabulka 2

Léčba	Dávka (mg)	Vehikulum	n	EAR ($\Delta SR_L \times h$)	LAR ($\Delta SR_L \times h$)	PC_{400} (po/před)
Dávka 2 hodiny před stimulaci alergenem						
PBS			12	5,85±0,62	4,85±0,69	0,49±0,03
oMePUPA-V	0,01	EtOH:NS	2	6,87±0,05	5,11±1,46	0,44±0,04
	0,03	EtOH:NS	2	10,62±3,91	3,98±0,23	0,43±0,00
	0,10	EtOH:NS	4	2,54±0,74*	0,67±0,17*	0,18±0,11*
	1,00	EtOH:PBS	2	2,14±0,70	0,27±0,34*	1,05±0,11*
	3,00	EtOH:PBS	2	2,47±0,62	0,68±0,07*	1,07±0,08*

Ovce přirozeně citlivé na *Ascaris suum* se stimulují aerosolem alergenu *Ascaris suum* 2 hodiny po podání aerosolu oMePUPA-V v uvedených dávkách nebo 24 hodin po poslední dávce oMePUPA-V při opakovaném denním podávání po dobu 4 dnů, která je nižší, než je základní linie nebo ekvivalentního množství PBS. Činnost plic, označená jako změna specifické resistance dýchacích cest vzhledem k hodnotě základní linie před studií, se měří 8 hodin po stimulaci alergenem. Časná odezva dýchacích cest (0–4 hodiny, EAR) a pozdní odezva dýchacích cest (4–8 hodin, LAR), se vyjádří jako průměrná plocha pod Δ křivky specifické resistance plic vzhledem k času \pm směrodatná odchylka průměru. Resistance dýchacích cest k inhalovanému karbacholu se určí před začátkem studie a 24 hodin po stimulaci alergenem. Citlivost dýchacích cest se uvádí jako poměr PC_{400} (množství karbacholu potřebného ke zvýšení resistance o 400 %) porovnáním hodnot před a po stimulaci.

* = $p < 0,05$ ve srovnání s PBS kontrolou, jednofaktorová analýza rozptylu, následovaná Dunnettovým testem pro vícenásobné porovnání s kontrolní skupinou. Ukazuje statisticky významný pokles EAR nebo LAR nebo významný vzrůst poměru PC_{400} vzhledem ke kontrolní skupině PBS.

Dráždivost při jedné dávce

35 Žádná z dávek oMePUPA-V použitých ve výše uvedené studii nemá dráždivý účinek, což je zřejmé z toho, že nedochází ke změně resistance dýchacích cest vzhledem k základní linii resistance po stimulaci alergenem *Ascaris suum*. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 2.

Studie při opakovaných dávkách

40 Obr. 3 ilustruje, že 0,03mg dávka oMePUPA-V, která se ukázala jako neúčinná, když se použije při jednodávkovém předběžném léčení, je však účinná, když se podává jednou denně po dobu 4 dní, když se stimulace antigenem provede 24 hodin po poslední dávce. Horní a dolní levé panely ukazují, že tento účinek byl zřejmý při použití dvou různých formulací. Přecitlivělost ke karbacholu po dalších 24 hodinách byla také maximálně inhibovaná, což je zřejmé z horního a

dolního pravého panelu na obrázku 3. Ochranný účinek oMePUPA-V byl významný proti EAR a LAR a proti přecitlivělosti ke karbacholu a kvantitativní analýza je uvedena v tabulce 3.

Výsledky této studie ukazují, že jednotlivé předběžné léčení malou molekulou inhibitoru VLA, oMePUPA-V, ve formě aerosolu může chránit proti časně a pozdní odezvě dýchacích cest vyvolané alergenem a ARH po dráždění alergenem na modelu alergických ovcí. Při jakýchkoli dávkách oMePUPA-V podávaných jednotlivě při předběžném léčení nedochází k žádnému dráždivému účinku na dýchací cesty. Výsledky také ukázaly, že účinná dávka oMePUPA-V se může snížit při vícečetné léčbě. Společně tyto údaje poskytují jasný důkaz toho, že adhezní dráhy VLA-4 hraje rozhodující úlohu v patofyziologických indikátorech (LAR a AHR) delších zánětlivých stavů, které jsou vyvolány v dýchacích cestách alergických ovcí po podráždění alergenem.

Tabulka 3

Léčba	Dávka (mg)	Vehikulum	n	EAR ($\Delta SR_L \times h$)	LAR ($\Delta SR_L \times h$)	PC ₄₀₀ (po/před)
Dávka jednou denně po dobu 4 dní, stimulace alergenem 24 hodin po poslední dávce						
PBS			8	4,33±0,81	4,96±0,40	0,38±0,03
oMePUPA-V	0,03	EtOH:NS	4	1,53±0,34*	0,59±0,16*	1,06±0,04*
	0,03	Tris:NS	4	1,40±0,35*	0,02±0,06*	1,04±0,04*

Ovce, přirozeně citlivé na *Ascaris suum*, se stimulují aerosolem alergenu *Ascaris suum* 24 hodin po poslední dávce při opakovaném denním podávání oMePUPA-V při dávce nižší, než je základní linie, nebo ekvivalentního množství PBS po dobu 4 dnů. Plicní mechanika, označená jako změna specifické resistance dýchacích cest vzhledem k hodnotě základní linie před studií, se měří 8 hodin po stimulaci alergenem. Časná odezva dýchacích cest (0–4 hodiny, EAR) a pozdní odezva dýchacích cest (4–8 hodin, LAR) se vyjádří jako průměrná plocha pod křivkou specifické resistance plic vzhledem k času ± směrodatná odchylka průměru. Resistance dýchacích cest k inhalovanému karbacholu se určí před začátkem studie a 24 hodin po stimulaci alergenem. Citlivost dýchacích cest se uvádí jako poměr PC₄₀₀ (množství karbacholu potřebného ke zvýšení resistance o 400 %) porovnáním hodnot před a po stimulaci.

* = $p < 0,05$ ve srovnání s PBS kontrolou, jednofaktorová analýza rozptylu, následovaná Dunnettovým testem pro vícenásobné porovnání s kontrolní skupinou. Ukazuje statisticky významný pokles EAR nebo LAR nebo významný vzrůst poměru PC₄₀₀ vzhledem ke kontrolní skupině PBS.

30 Příklad 3

Aktivita na modelu přecitlivělosti zpožděného typu

Studie na modelu červených krvinek ovcí

Pro všechny pokusy se použijí samice specifického druhu myši Balb/c prosté patogenu ve věku 8 až 10 týdnů od Jackson Labs. Zvířata se krmí a napájí podle libosti. Buňky červených krvinek ovcí (sRBC) v roztoku Alsever ze stejné ovce se získávají týdně z Charles River Pharm. Services (Southbridge, MA). sRBC se peletují odstředěním při 1000g po dobu 10 minut při 4 °C a jakýkoli viditelný povlak buňkami „buffy“ se odstraní. Buňky se potom promyjí salinem. Buněčná peleta se suspenduje v salinu a odečte se za použití hemocytometru. Buňky se zředí ve fosfátovém pufovaném salinu (PBS) na 2×10^8 sRBC na ml. Ve dni 0 se myši senzitivizují pomocí s.c. injekce 2×10^7 sRBC ve 100 μ l PBS. Ve dni 5 se sRBC připraví stejně, jako je uvedeno výše, ale zředí se v PBS na konečnou koncentraci 4×10^9 sRBC na ml. Z tohoto preparátu se 25 μ l injektoru s.c. do chodidla pravé zadní končetiny.

Pro enterální podávání sloučeniny se oMePUPA-V (Lot# 2770-029) formuluje ve vehikulu obsahujícím 60 % PEG 400 v 0,02M Tris za získání zásobního roztoku o koncentraci 5 mg/ml.

Ve vehikulu obsahujícím PEG/TRIS se připraví vhodná zředění a podávají se enterálně v objemu 100 μ l. Anti-VLA-4 protilátka (PS/2) se zředí v salinu při koncentraci 4,3 mg/kg a podává se intraperitoneálně v objemu 100 μ l. Všechny léčiva se podávají okamžitě po stimulaci sRBC.

5 Otok nestimulované (levé) kontrolní končetiny a stimulované (pravé) zadní končetiny se měří za použití posuvného měřítka od Mitutoyo (Model #304-196, Dyer, Lancaster, PA) 20 hodin po stimulaci končetiny. Údaje jsou vyjádřeny jako změna tloušťky chodidla, která se určí odečtením tloušťky levé zadní končetiny a pravé zadní končetiny. Změny v tloušťce chodidla se porovnají za použití oboustranného Studentova t-testu.

10 Anti-VLA-4 protilátka PB/S při dávce 4,3 mg/kg intraperitoneálně inhibuje otok asi z 30 %, zatímco oMePUPA-V podávání enterálně při dávce 20 mg/kg je na tomto modelu bez účinku (údaje nejsou uvedeny). Studovala se účinnost oMePUPA-V podávané při dávce 20 mg/kg enterálním způsobem na DTH modelu indukovaném sRBC u myši a nebyl zjištěn žádný účinek.

15

Příklad 4

Aktivita na modelu přecitlivělosti zpožděného typu

20 Pro všechny studie se použijí dvacetigramové samice myši Balb/c prosté viru (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) umístěné po čtyřech na jednu klec v mikrolizovaných klecích v zařízení prostém virů Biogen a dostávají podle libosti krmivo pro myši a mají k dispozici kohoutek s vodou. Myši se anestetizují směsí ketamin:xylazin (90:10 mg/kg, i.p.). 3 cm² kůže na břicho se oholí a kůže se omyje 70% ethanolem. Na holé místo se jednotně aplikuje 25 μ l 0,5% DNFB ve směsi 4:1 objemově acetonu a olivového oleje jako vehikula. Kůže se lehce poškrábe koncem pipety, čímž se vyvolá lehký zánět. Myš se položí naznak do své klece a nechá se vzpamatovat z anestézie. O 24 hodin později po úvodní senzitivizaci se myši znovu senzitivizují 25 μ l 0,5% DNFB ve vehikulu na stejném místě na kůži na břicho, znovu následuje lehké poškrábání na špičkou pipety. Při druhé senzitivizaci se myši neanestetizují. Ve dni 5 (asi 120 hodin po první senzitivizaci) se po stimulaci imunitní odezvy použije podiritující dávka senzitivizéru (0,2% DNFB ve směsi 4:1 (objemově) acetonu a olivového oleje jako vehikulu). Myši se anestetizují směsí 30 90:10 mg/kg ketaminu:xylazinu i.p. a na hřbetní stranu levého ucha se aplikuje 10 μ l 0,2% DNFB. Na pravé ucho se stejným způsobem aplikuje směs 4:1 objemově acetonu a olivového oleje jako vehikula. Během následujících 24 hodin se vyvine dvoufázová odezva otoku ucha, což je uvedeno na obrázku 4. 24 hodin po stimulaci se myši znovu anestetizují směsí ketaminu a 35 xylazinu a změří se jim pomocí posuvného měřítka tloušťka obou uší s přesností na 10⁻⁴ palce (0,000254 cm).

Orálně se pomocí sondy 4 hodiny po stimulaci imunitní odezvy ve dni 5 podávají sloučeniny (100 μ l) nebo vhodné vehikulum (dimethylsulfoxid [DMSO] v izotonickém fosfátem pufovaném salinu [PBS], 100 μ l). Pro každý test se použije skupina 8 myši. oMePUPA-V (číslo šarže 40 2044-076) se rozpustí v destilované vodě přidáním 0,5% fosforečnanu sodného jako pufru, pH 8,8 a 3 % dimethylsulfoxidu. Otok ucha pro každou myš se vypočte jako rozdíl mezi tloušťkou ucha stimulovaného vehikulem a DNFB 24 hodin po stimulaci. Typický otok ucha indukovaný DNFB je 65-75x10⁻⁴ palce. Inhibice otoku ucha se určí i porovnáním léčené skupiny se skupinou 45 ošetřenou vehikulem. Statistický význam rozdílu mezi léčenými skupinami se hodnotí za použití jednofaktorové analýzy rozptylu, po které následuje Dennettův test pro mnohočetné porovnání s kontrolní skupinou (Systat, SPSS Inc.) za použití P<0,05. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka průměru (SEM).

50 Obr. 4 porovnává otok ucha měřený 24 hodin po stimulaci DNFB u myši, které dostaly vehikulum (DMSO, PBS), pozitivní kontrolní sloučeninu (podávanou při 0,03 μ g/kg) nebo 0,03 nebo 0,3 mg/kg oMePUPA-V, podávané enterálně 4 hodiny po DNFB stimulaci (horní panel). Procentuální inhibice způsobená léčbou je uvedena na dolním panelu. Obě dávky oMePUPA-V významně inhibují otok ucha v podobném rozsahu, jako je tomu u pozitivní kontrolní sloučeniny.

Jedna enterální dávka 0,03 nebo 0,3 mg/kg oMePUPA-V podaná 4 hodiny po stimulaci DNFB může významně inhibovat otok ucha na modelu kontaktní přecitlivělosti u myší.

5 Příklad 5
Biochemie

5.1 Afinita receptoru oMePUPA-V měřená pomocí konjugátu VCAM-Ig alkalické fosfatázy při testu přímé vazby VCAM-Ig (DBA)

10 VCAM-Ig se připraví a čistí podle postupu popsaného v Jakubowski, A., a kol. Cell Adhesion and Communication 3:131-142, (1995). Konjugace k telecí intestinální fosfatáze (pro účely štěpení chromogenního substrátu) se provede podle postupu popsaného v Lobb R.R. a kol., Cell Adhesion and Communication 3:385-397, 1995). Vazba k VLA se testuje na buněčném kmeni lidských buněk T, Jurkat ($\alpha 4\beta 1$). VCAM-Ig-AP a oMePUPA-V soutěží o vazbu k $\alpha 4\beta 1$ na povrchu těchto buněk v přítomnosti 1 mM Mn^{2+} .

15 Při testu přímé vazby VCAM-Ig oMePUPA-V soutěž s VCAM-Ig-AP o vazbu k Jurkatových buňkách v přítomnosti 1 mM chloridu manganatého v závislosti na koncentraci při $IC_{50} 8 \pm 1$ nM (n=9). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

5.2 Afinita receptoru oMePUPA-V měřená pomocí konjugátu VCAM-Ig alkalické fosfatázy při purifikovaném VLA-4 protein/proteinovém testu

25 VLA-4 se purifikuje z detergentního extraktu vysoce exprimujícího subklonu buněk K562 transfekovaných $\alpha 4$ pomocí protilátkové afinitní chromatografie a imobilizuje se na mikrotitrační jamky, čímž se připraví test kompetitivní vazby protein/protein. VCAM-Ig-AP se váže k čištěné destičce potažené VLA-4 v nepřítomnosti nebo přítomnosti oMePUPA-V (Lot #2) a 1 mM $MnCl_2$. Destičky se odečtou při 405 nm a údaje se analyzují za použití software SoftMax v 2,32.

30 Vazba konjugátu VCAM-Ig k čištěnému VLA-4 se úplně blokuje specifickou neutralizací anti- $\alpha 4$ monoklonální protilátky (HP1/2). Dvě IC_{50} získané pro oMePUPA-V při testu VLA-4 protein/protein jsou uvedeny v tabulce 4 stejně jako hodnoty IC_{50} získané na Jurkatových buňkách z testu kompetitivní vazby VCAM-Ig-AP a testu buněčné adheze CS1.

35 5.3 Afinita receptoru oMePUPA-V testovaná při testu adheze buněk CS-1

a. Adheze Jurkatových buněk ke konjugátu CS1/BSA

40 Peptid NH_2 -cystein-tyrosin-CS-1 se syntetizuje a kondenzuje k BSA-SMCC (SMCC je heterobifunkčně zesíťovadlo, které reaguje s volnými aminoskupinami na BSA a samotném cysteinu syntetického peptidu) na CS1/BSA v poměru 10:1. Jamky se přes noc potáhnou 100 μ l konjugátu zředěného na konečnou koncentraci 1 μ g/ml. Další den se jamky blokují BSA v PBS jednu hodinu a potom se třikrát promyjí.

45 Buněčný kmen lidských buněk T, Jurkatovy buňky, se značí 2 μ M BCECF-AM (fluorescenční barvivo (2',7'-bis(2-karboxyethyl)-5 a 6)karboxyfluoresceinacetoxymethylester (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon; katal. číslo #B-1150)), které se zabuduje a deesterifikuje tak místa vazby barviva živými buňkami. Jurkatovy buňky (1×10^5 buněk/jamka) v pufru obsahujícím 1 mM Mn^{2+} se přidají k potaženým destičkám v přítomnosti trojnásobných sériových zředění inhibitoru. Každá koncentrace se testuje duplicitně. Po 30 minutách při teplotě místnosti se destičky převrátí a promyjí se třikrát nebo dokud na kontrolních jamkách potažených samotným BSA nejsou přilepeny žádné buňky. CS1-adherentní buňky se kvantifikují ve fluorescenčním

zařízení Cytofluor pro odečítání destiček za použití excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnové délky 530 nm.

5 Buňky přilnuté k CS1/BSA v nepřítomnosti sloučeniny slouží jako kontrola s inhibicí 0 %, zatímco buňky přilnuté k samotnému BSA slouží jako kontrola se 100 % inhibice. IC₅₀ se vypočítou za použití software Deltagraph, verze 5.

10 Adheze značených Jurkatových buněk v přítomnosti Mn²⁺ se úplně blokuje EDTA a neutralizuje anti- α 4 β 1 mAb, HP1/2, což potvrzuje, že vazba je specifická. Tabulka 4 obsahuje aktivitu oMePUPA-V při testu adheze CS1/BSA a také výsledky testu vazby.

15 oMePUPA-V je účinným antagonistou VLA-4 v pufru obsahujícím Mn²⁺. Při testu vaznosti je osmdesátkrát účinnější, když se testuje v přítomnosti Mn²⁺ na izolovaných VLA-4, než se Jurkatových buňkách. oMePUPA-V je funkčním antagonistou, což je zjevné z jeho schopnosti blokovat adhezi Jurkatových buněk k CS1 v závislosti na dávce a úplně. Absolutní hodnoty při adhezním testu jsou vyšší, než hodnoty pozorované při testu vaznosti. Toto může být způsobeno multivalentní povahou adheze. Při jakémkoli formátu testu inhibice vazby EDTA a HP1/2 demonstruje specifickou vazbu k VLA-4.

20 Tabulka 4

Afinita receptoru oMePUPA-V v přítomnosti 1 mN MnCl₂ podle kompetitivního vazebného testu VCAM-Ig, testu buněčné adheze CS1 a testu purifikovaného VLA-4 proteinu/proteinu

	IC ₅₀ \pm SD [nM]
Test	oMePUPA-V
Vazba Jurkatovy buňky VCAM-Ig	8 \pm 1 (n=9)
Adheze Jurkatovy buňky CS1	22 \pm 2 (n=4)
Vazba purif. VLA-4 VCAM-Ig	0,1 (n=1) (0,1, 0,1)

25 5.4 Specifičnost inhibice oMePUPA-V

a. Specifičnost oMePUPA-V se testuje pomocí buněk JY při testu přímé vazby VCAM-Ig a adhezním testu CS1

30 Vazba α 4 β 7 se testuje na buňkách JY v přítomnosti Mn²⁺. Při vazebném testu VCAM-Ig a oMePUPA-V soutěží o vazbu k α 4 β 7 na buňkách JY (postup testu viz. oddíl 4.1.1). Při testu adheze buněk se testuje schopnost oMePUPA-V blokovat JY (α 4 β 7) vazbu buněk ke konjugátu CS1/BSA.

35 oMePUPA-V neblokuje vazbu α 4 β 7 k VCAM-Ig nebo CS1/BSA. Anti- β Mab, Fib27 (Pharmingen), inhibuje tyto interakce úplně, což naznačuje, že vazba byla α 4 β 7 specifická. Proto oMePUPA-V je specifickým inhibitorem VLA-4. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

b. Specifičnost oMePUPA-V, která se testuje pomocí adheze buněk K562 k jamkám potaženým Fn-120

Neošetřené 96jamkové polystyrenové destičky s plochým dnem se přes noc při 4 °C potáhnout 5 µg/ml Fn-120. Destičky se dvakrát promyjí fosfátem pufovaným salinem (PBS) a blokují se 1 hodinu při teplotě místnosti 1% bovinním sérovým albuminem (BSA). Destičky se dvakrát
 5 promyjí puftrem TBS obsahujícím 1 mM MnCl²⁺ (testovaný pufr). Buňky K562 se značí 2 µM fluorescenčního barviva, BCECF-AM (viz. oddíl 4.1.3) a 30 minut se při teplotě místnosti váží k destičce. Destičky se převrátí a třikrát se promyjí a v fluorescenčním zařízení pro odečítání destiček Cytofluor se kvantifikují adherentní buňky za použití excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnové délky 530 nm.

Adheze K562 k Fn-120 se úplně blokuje neutralizací anti-α5 protilátky, IIA1 (Pharmingen), což naznačuje specifickou vazbu přes VLA-5. K inhibici vazby buněk K562 k Fn 120K fragmentu oMePUPA-V nedochází při dávkách 100 µM. Viz. tabulka 5 níže.

c. Test shlukování pomocí kterého se zjišťuje specifčnost oMePUPA-V

Způsoby

Aktivita proti gpIIb/IIIa se testuje pomocí standardního shlukování krevních destiček za použití plazmy bohaté na krevní destičky. Pro vyvolání shlukování se použije ADP v přítomnosti plazmy, kde jsou Ca²⁺ a Mg²⁺ hlavními dvouvalnými kationty. Jako pozitivní kontrola se použije
 20 GRGDSP @ 100 µg/ml.

Výsledky

oMePUPA-V se testuje při třech dávkách 1, 10 až 100 µm. Neinhibuje shlukování krevních destiček vyvolané ADP v žádné dávce. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. oMePUPA-V je
 25 velice (>10 000krát) specifický pro VLA-4. Nevyskytuje se žádná měřitelná aktivita (>100 µM) proti příbuzným integrinům α4β7 a VLA-5 nebo proti integrinu β3, gpIIb/IIIa.

Tabulka 5

Inhibiční aktivita oMePUPA-V podle testu kompetitivní vazby α4β7 VCAM-Ig, adhezních testů
 30 α4β a VLA-5 a studie shlukování krevních destiček

Buněčný kmen	Ligand	Dvouvalný kation	oMePUPA-V IC ₅₀ ± SD [nM]
JY α4β7	VCAM-Ig DBA	Mn ²⁺	3% inhibice @ 100 µM (n=3)
JY α4β7	CS1/BSA adheze	Mn ²⁺	žádná inhibice @ 100 µM (n=4)
K562 (VLA-5)	Fn-120 adheze	Mn ²⁺	žádná inhibice @ 100 µM (n=3)
destičky (IIb/IIIa)	shlukování fibrinogenu	Ca ²⁺ /Mn ²⁺	žádná inhibice @ 100 µM (n=1)

Příklad 6

Test oMePUPA-V pro LIBS indukci

6.1 Měření na Jurkatových buňkách za použití LIBS protilátky 9EG7

a. Indukce LIBS pomocí antagonistů $\alpha 4\beta 1$ se testuje *in vitro* pomocí analýzy FACS. Jurkatovy buňky (2×10^5 /jamka) se preinkubují při 37 °C 20 minut se salinem pufrovaným TRIS obsahujícím 2 mM $MgCl_2$ (Mg^{2+} -TBS) samotného nebo se sérií zředění testované sloučeniny. Vzorky se převedou do ledové lázně a doplní se LIBS protilátkou, 9EG7, při konečné koncentraci 10 $\mu g/ml$. Buňky se dvakrát promyjí Mg^{2+} -TBS a suspendují se ve zředění 1:200 kozího anti-potkaního IgG konjugovaného s FITC v Mg^{2+} -TBS a inkubují se 30 minut při 4 °C. Buňky se dvakrát promyjí a resuspendují se v Mg^{2+} -TBS. Pomocí FACS analýzy (Becton Dickinson FACSScan) se určí průměrná intenzita fluorescence (MFI). Výsledky jsou vyjádřeny jako MFI. Údaje se analyzují pomocí software Microsoft Excel verze 5.0 a Deltagraph verze 4.0.

Obr. 5 ukazují, že oMePUPA-V indukoval expozici epitopu LIBS v porovnání s pufrem 2 mM Mg^{2+} (panel B). Indukce byla závislá na koncentraci a měla podobnou magnitudu, jako indukce pozorování s 1 mM Mn^{2+} (panel A). Vynechání LIBS protilátky a detekce protilátky nebo vynechání detekce protilátky samotné eliminuje značení (panel B). Hodnoty ED50 odezvy byly 20 mM.

Závěr

Tyto údaje ukazují, že oMePUPA-V indukuje stejnou konformační změnu u VLA-4, jako je možné pozorovat s nativními ligandy. Hodnoty LIBS obecně spadají do rozmezí definovaného testy vazby a adheze, které jsou 8 nM a 22 nM, v tomto pořadí, pro oMePUPA-V.

6.2 Panel receptorů z různých druhů

a. Afinita receptoru oMePUPA-V podle testu přímé vazby VCAM-Ig za použití konjugátu VCAM-Ig alkalické fosfatázy a lymfocytů periferní krve nebo buněk sleziny od různých druhů

PBL se izolují z periferní krve člověka, ovci a psů pomocí způsobu popsaných pro PBL ovci (Abraham W.M. a kol., J. Clin. Invest., 93: 776-787, 1991). Pro porovnání vazby oMePUPA-V k těmto různým typům buněk se použije kompetitivní vazebný test VCAM-Ig-AP.

Hodnoty IC_{50} získané pro oMePUPA-V na lymfocytech periferní krve neb buňkách sleziny odrazných druhů v přítomnosti Mn^{2+} jsou uvedeny v tabulce 6. V přítomnosti Mn^{2+} inhibuje oMePUPA-V při podobném IC_{50} vazbu VCAM-Ig v lymfocytům získaným od člověka, krys, psů, ovci a myši. Neexistuje tedy žádný důkaz specifčnosti k druhům. Tento výsledek souhlasí s vysokým stupněm konzervace sekvence pozorovaným mezi druhy pro VLA-4 a jeho přirozené ligandy, CS-1 a VCAM.

Tabulka 6

Afinita receptoru oMePUPA-V podle kompetitivního vazebného testu VCAM-Ig za použití konjugátu VCAM-Ig alkalického fosfatázy a lymfocytů periferní krve nebo buněk sleziny od různých druhů

Druhy	Zdroj	Dvouvalný kation	IC_{50} [nM]
Člověk	PBL	Mn^{2+}	6 ± 1 (n=3)
Ovce	PBL	Mn^{2+}	3 ± 1 (n=3)
Prase	PBL	Mn^{2+}	13 ± 2 (n=3)
Myš	splenocyty	Mn^{2+}	4 ± 2 (n=4)
Krysa	splenocyty	Mn^{2+}	5 ± 1 (n=3)

Příklad 7

Kinetika receptoru oMePUPA-V

7.1 Kompetiční test pomocí ^3H -známého inhibitoru jako sondy

5

Jurkatovy buňky se udržují v médiu RPMI-1640 plus 10% fetálním bovinním séru při 37 °C v tkáňovém kultivačním inkubátoru. Pro vazebné studie se buňky peletují odstředěním, dvakrát se promyjí TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1% bovinní sérový albumin, 2 mM glukózy, 10 mM HEPES pH 7,4), suspendují se asi při 2×10^6 buněk/ml v TBS a spočítají se za použití Neubauerova hemocytometru. Buňky se dále zředí v označených pufrech na $1,5 \times 10^6$ /ml a podrobí se zpracování, které je popsáno pro každý pokus. Buňky se potom peletují odstředěním, resuspendují se v 100 μl testového pufru a převedou se do scintilační víalky obsahující 2,9 ml ScintiVerse II (Fisher Scientific). Radioaktivita související s buňkami se kvantifikuje pomocí scintilačního počítadla. Počet vazeb za těchto podmínek měří integrin, který není obsazen testovanou sloučeninou a je proto volný, aby se vázal k ^3H známému inhibitoru. Všechny studie se provádějí v silikonizované 1,5ml eppendorfově zkumavce při standardním objemu vzorku 1 ml. Nespecifická vazba ^3H -známého inhibitoru k buňkám (pozadí) se definuje měřením vazby inhibitoru v nepřítomnosti iontu kovu. Počet specifických vazeb se vypočte odečtením nespecifických vazeb od celkového počtu vazeb.

20

Série kompetitivních studií se provádí pro ověření toho, zda oMePUPA-V a známý inhibitor soutěží o stejné místo na VLA-4. Nejprve se ^3H -známý inhibitor smísí s ekvimolárním množstvím oMePUPA-V, desetinásobným přebytkem a stonásobným přebytkem, inkubuje se s Jurkatovými buňkami a určí se schopnost studeného (neznačeného) inhibitoru soutěžit o vazbu známého inhibitoru. Ošetření oMePUPA-V poskytuje inhibici vazby ^3H -známého inhibitoru závislou na dávce. Koncentrace oMePUPA-V, která byla nutná pro kompetici vazby ^3H -známého inhibitoru, byla desetkrát vyšší, než ta, která byla potřeba, když se použil studený inhibitor jako kompetitor, což odpovídá jeho nižší afinitě k VLA-4 aktivovanému Mn^{2+} . Za druhé se Jurkatovy buňky aktivované Mn^{2+} zpracují s ^3H -známým inhibitem, aby se první obsadil VLA-4 radioaktivní sondou a potom se přidá přebytek studeného oMePUPA-V. Při následném zpracování přebytkem studeného oMePUPA-V nebo známého inhibitoru nebylo možné rozlišit, schopnost nahradit radioaktivní sondu. Za třetí se Jurkatovy buňky aktivované Mn^{2+} zpracují saturační množství oMePUPA-V a měří se míra, při které disociuje oMePUPA-V. Na rozdíl od prodlouženého poločasu života známého inhibitoru pro VLA-4 aktivovaného Mn^{2+} , se oMePUPA-V rychle uvolní z oMePUPA-V-VLA-4 při $t_{1/2}$ kratším, než 10 minut. Velký rozdíl v $t_{1/2}$ pro oMePUPA-V a známý inhibitor naznačuje, že nižší afinita oMePUPA-V k VLA-4 je výsledkem jeho vyšší rychlosti uvolnění.

Údaje o disociaci ukazují, že vazba oMePUPA-V k VLA-4 je velice závislá na aktivačním stavu VLA-4 a že vykazuje stejnou selektivitu pro aktivaci, jako je tomu u známého inhibitoru. Jako u Mn^{2+} -aktivovaného VLA-4, byl $t_{1/2}$ disociace oMePUPA-V z Mn^{2+} -aktivovaného VLA-4 kratší, než 10 minut, což je nejkratší časový úsek, který lze vyhodnotit při kompetitivním fosfátu. Na druhou stranu v přítomnosti Mg^{2+} plus aktivační protilátky, TS2/16, byl $t_{1/2}$ delší (20 minut). Všechny možné aktivační stavy nebyly testovány podrobně, byl však proveden jednoduchý přehledný test, který může rychle objasnit rozdíly. Při tomto testu se daná koncentrace oMePUPA-V (10 nM) smísí s 5 nM ^3H -známého inhibitoru a provede se vazba za těchto podmínek při různých stavech aktivace. Když má oMePUPA-V mimořádně vysokou nebo nízkou afinitu pro VLA-4, lze tento stav zjistit rozdílem v množství ^3H -známého inhibitoru. Procentuální rozdíly ve vazbě ^3H -známého inhibitoru za různých podmínek aktivace napovídají, co lze odhadnout na základě známých vlastností inhibitoru.

Vazebné studie potvrzují, že oMePUPA-V soutěží se známým inhibitem o vazbu k VLA-4 při koncentracích, které odpovídají jeho afinitě a demonstrují, že dvě sloučeniny soutěží o stejné místo na integrinu. Podobnost vazby oMePUPA-V a známého inhibitoru při různých stavech aktivace VLA-4 napovídá, že mechanismus vazby je podobný.

55

7.2 Test oMePUPA-V na panelech Panlabs a Cerep

5 oMePUPA-V se testuje na panelech radioligandů, enzymů a funkčních testech pomocí testovací soupravy Panlabs Profiling-Screen, DiscoveryScreen a Immunoscreen a pomocí testovací soupravy na panelu membránového receptoru Cerep. Pro oMePUPA-V nebyla při 10 μM pozorována žádná významná aktivita při jakémkoli testu zahrnujícím test receptoru NK1, zatímco známé inhibitory vykazují určitou aktivitu.

10 Cerep také ukazuje, že oMePUPA-V neinhibuje aktivitu lidské ACE proteázy. Zdrojem ACE proteáz byly buňky lidského endotelu (HUVEC). ³H-HGG, přidaný k HUVEC, se pomocí ACE převede na ³H-hipurovou kyselinu a glycyglycin. Captopril, což je silný inhibitor ACE, blokuje konverzi při IC₅₀ 990 ppm, zatímco oMePUPA-V ji při 10 μM neblokuje.

15 Farmaceutické vlastnosti:

oMePUPA-V je bělavý krystalický prášek. Je rozpustný v dimethylsulfoxidu a má rozpustnost ve vodě 0,120 mg/ml. Chování oMePUPA-V za tepla se studovalo pomocí DSC, TGA a mikroskopie v horkém stavu a zjistilo se, že látka taje asi při 160 °C. Podle DSC a TGA analýzy bylo zjištěno, že asi při 136 °C oMePUPA-V ztrácí těkavé nečistoty a pravděpodobně dochází k dehydrataci monohydrátu.

Formulace

Nebulizační formulace

25 Dále se popisuje výroba vedoucí ke 100 ml nebulizační formulce obsahující 5 mg/ml oMePUPA-V.

Připraví se 200 ml zásobního pufrovacího roztoku:

- 30
1. Do vhodné nádoby se naváží 0,286 g Tromethaminu, USP.
 2. Do vhodné nádoby se naváží 1,676 g chloridu sodného, USP.
 3. Přidá se 200 ml vody pro injekce, USP.

Směs se promíchá tak, aby byla homogenní.

- 35
1. Do vhodné nádoby se naváží 0,500 g oMePUPA-V.
 2. Přidá se 100 ml pufrovacího roztoku připraveného v kroku 1.
 3. Směs se promíchá, dokud není homogenní.
 4. Proveďte se sterilní filtrace do vhodné nádoby.
 - 40 5. Uzavře se vhodným uzávěrem.

Typické vlastnosti formulace:

pH: 7,4, osmolalita: 290 mOsm

45

Příklad 9

Postup testu stability pomocí HPLC

Kolona: Zorbax^(R) SB-C18, částice 3 μm, 4,6x150 mm

50 Ochranná kolona: Zorbax^(R) SB-C18, částice 5 μm, 4,6x2,5 mm

Průtok: 1 ml/min

Teplota na koloně: 40 °C

Teplota autosampleru: 4 °C

Mobilní fáze A: 0,1 % (hmotn./objem) kyseliny trifluoroctové (TFA) ve vodě
B: 0,1 % (hmotn./objem) kyseliny trifluoroctové (TFA) v 90 %
(objem/objem) acetonitrilu, 10 % (objem/objem) vody

5 Gradient:

Čas (min)	% B
0–3	15
3–18	15 až 100
18–21	100
10 21–28	15

Nástřik: 10 µl 0,2 mg/ml roztoku v Tris/NaCl/voda (meziprodukt) nebo v 0,1 TFA/45 % acetonitril (konečný produkt)

Detekce: UV 254 nm (primární) a 215 nm

15 Kontrola: oMePUPA–V, zahřívá se ve vroucí vodě 20 minut.

Provedla se předběžně kvalifikace.

Stabilita léčebné látky:

20 Při skladování meziproduktu ve velkém objemu po dobu dvou týdnů za následujících podmínek se neprojevila žádná degradace: při 40 °C v uzavřené víálce; při 50 °C v uzavřené víálce; při 25 °C, relativní vlhkosti 60 %; a při 40 °C, relativní vlhkosti 75 %. Ve čtvrtém týdnu se objevil jeden nebo dva detekovatelné degradační píky při 40 °C a 50 °C, ale hladina nečistot byla stále nižší, než 0,02 %.

25 Stabilita roztoku

a) Nebulizační formulace, 5 mg/ml v Tris/NaCl, skladovaná při teplotě místnosti dva měsíce vykazala časné eluované degradační píky v celkovém množství 1% (při 254 nm) a 2 až 3 % (při 215 nm).

30 b) Zahřívání nebulizační formy ve vroucí vodě 20 minut snížilo čistotu z 99,9 na 98,7 % při 254 nm a z 100 až 93,6% při 215 nm.

c) Roztok o koncentraci 0,2 mg/ml v Tris/NaCl/vodě při neutrálním pH je stabilní při 2 až 8 °C nejméně jeden týden.

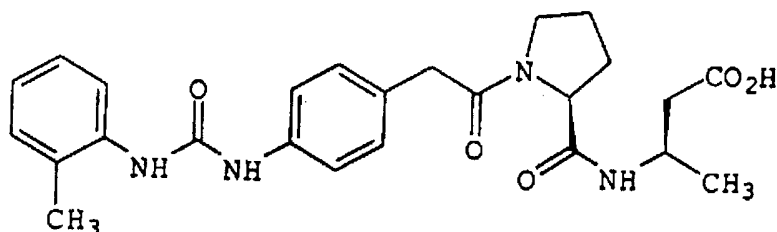
35 Odborníkům pracujícím v této oblasti bude zřejmé, že je možné provést různé modifikace a změny v nárokovaném vynálezu, aniž by došlo k odchýlení se od obsahu vynálezu. Předpokládá se tedy, že vynález zahrnuje modifikace a variace podle vynálezu pod podmínkou, že spadají do rozsahu připojených patentových nároků a jejich ekvivalentů.

40

PATENTOVÉ NÁROKY

5

1. β -Alaninový derivát inhibující buněčnou adhezi zahrnující sloučeninu vzorce



její farmaceuticky přijatelný derivát a její farmaceuticky přijatelný esterový prekurzor.

10

2. Farmaceutická kompozice, **v y z n a ě n á t í m**, že obsahuje β -alaninový derivát podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

3. Farmaceutická kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že dále obsahuje činidlo zvolené z množiny zahrnující kortikosteroidy, bronchodilatátory, antiastmatika, protizáněťová činidla, antirevmatika, imunosupresiva, antimetabolita, imunomodulátory, antipsoriatika a anti-diabetika.

15

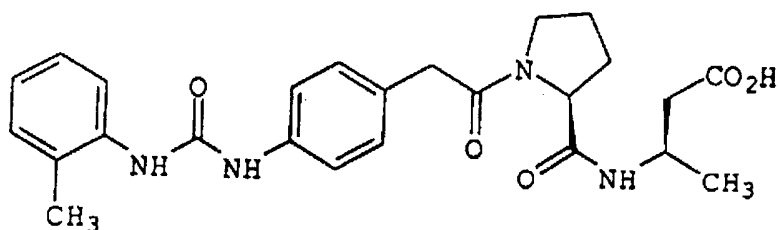
4. Farmaceutická kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že dále obsahuje alespoň jednu další sloučeninu inhibující buněčnou adhezi.

20

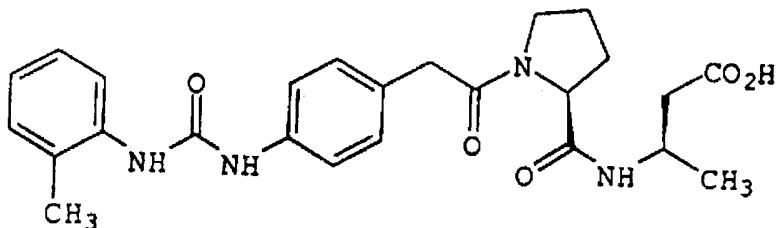
5. Farmaceutická kompozice podle nároku 4, **v y z n a ě n á t í m**, že alespoň jednou další sloučeninou inhibující buněčnou adhezi je inhibitor VLA-4.

6. Farmaceutická kompozice podle nároku 2, **v y z n a ě n á t í m**, že jako β -alaninový derivát obsahuje esterový prekurzor sloučeniny vzorce

25

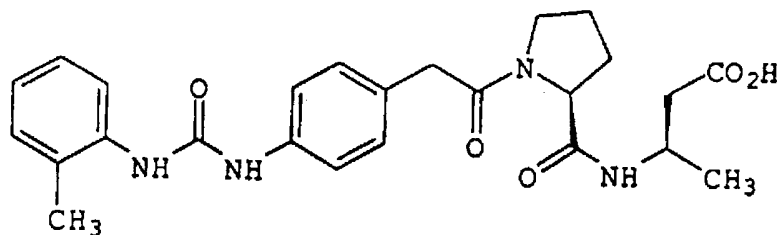


7. β -Alaninový derivát podle nároku 1, tvořený esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce



30

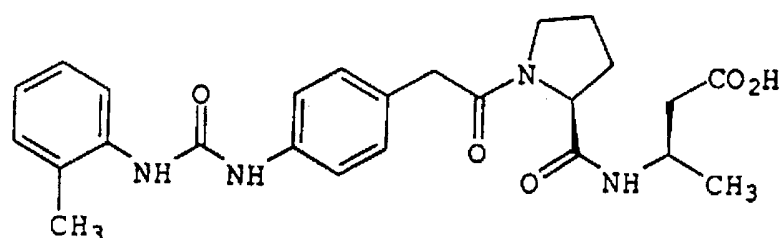
8. β -alaninový derivát podle nároku 7, tvořený esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce



připraveným reakcí sloučeniny uvedeného vzorce s alkoholem obsahujícím 1 až 10 uhlíkových atomů v přímém nebo rozvětveném řetězci.

5

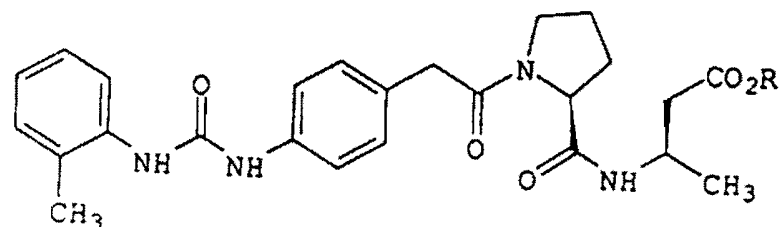
9. β -Alaninový derivát podle nároku 7, tvořený esterovým prekurzorem sloučeniny vzorce



připraveným reakcí sloučeniny uvedeného vzorce s alkoholem obsahujícím 1 až 4 uhlíkové atomy v přímém nebo rozvětveném řetězci.

10

10. β -Alaninový derivát podle nároku 7 tvořený esterovým prekurzorem obecného vzorce

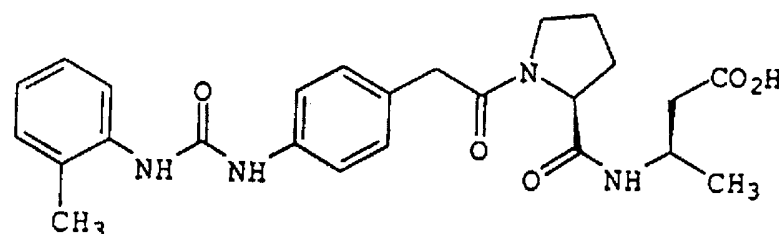


ve kterém R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 10 uhlíkových atomů.

15

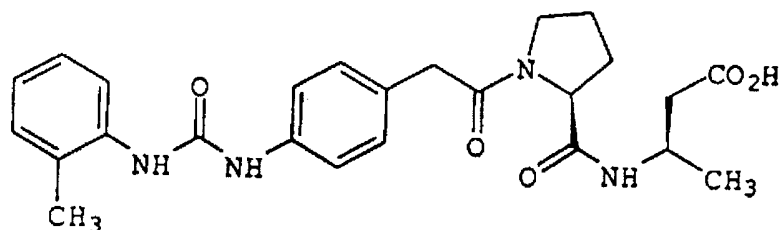
11. β -Alaninový derivát podle nároku 10, ve kterém R znamená přímou nebo rozvětvenou alkylovou skupinu obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy.

12. β -Alaninový derivát podle nároku 1, tvořený sloučeninou vzorce



20

13. Farmaceutická kompozice podle nároku 2, **v y z n a č e n á t í m**, že jako β -alaninový derivát obsahuje sloučeninu vzorce



nebo její sůl.

5 **14.** Použití β -alaninového derivátu podle některého z nároků 1 a 7 až 12 pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění souvisejícího s buněčnou adhezí.

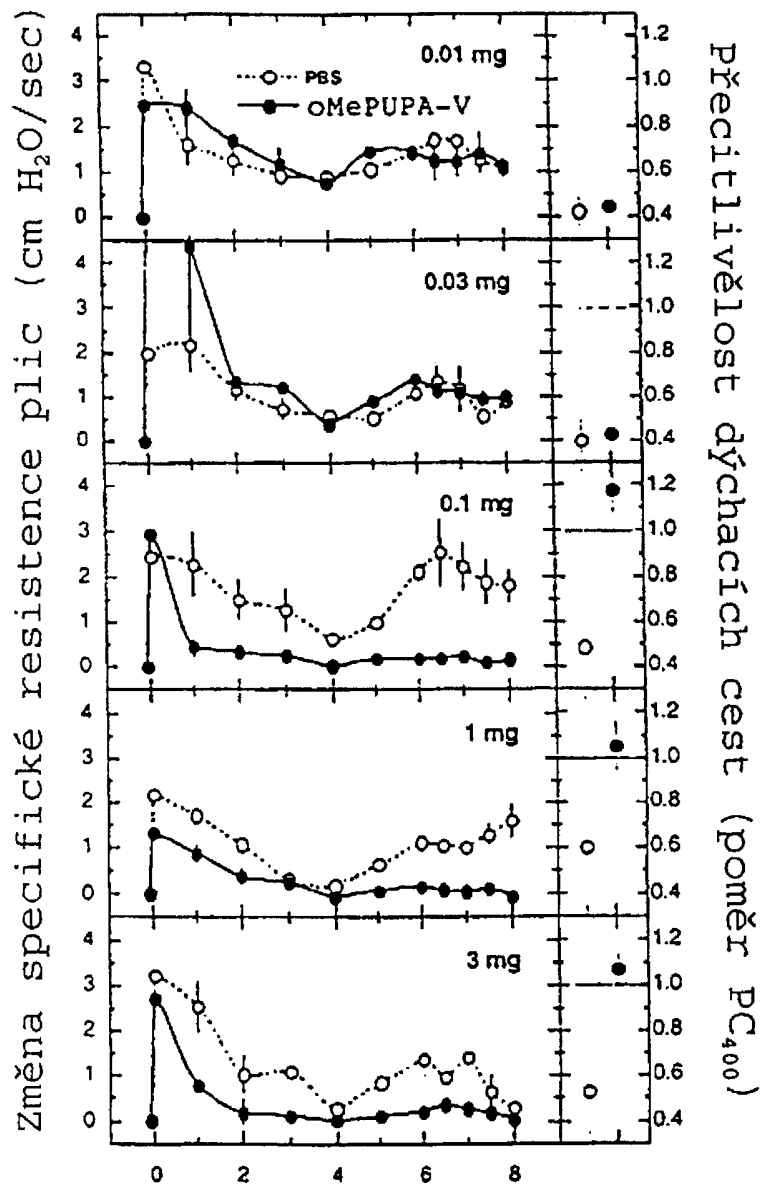
10 **15.** Použití podle nároku 14, v rámci kterého je β -alaninový derivát použit pro přípravu léčiva pro léčení onemocnění zvoleného z množiny zahrnující astma, mnohočetnou sklerózu, alergickou rhinitidu, alergickou konjunktivitidu, zánětlivé onemocnění plic, revmatoidní artritidu, mnohočetný myelom, septickou artritidu, diabetes typu I, odmítnutí transplantovaného orgánu a zánětlivé střevní onemocnění.

15 **16.** Použití podle nároku 15, v rámci kterého je β -alaninový derivát použit pro přípravu léčiva pro léčení mnohočetné sklerózy.

17. Použití podle nároku 15, v rámci kterého je β -alaninový derivát použit pro přípravu léčiva pro léčení zánětlivého střevního onemocnění.

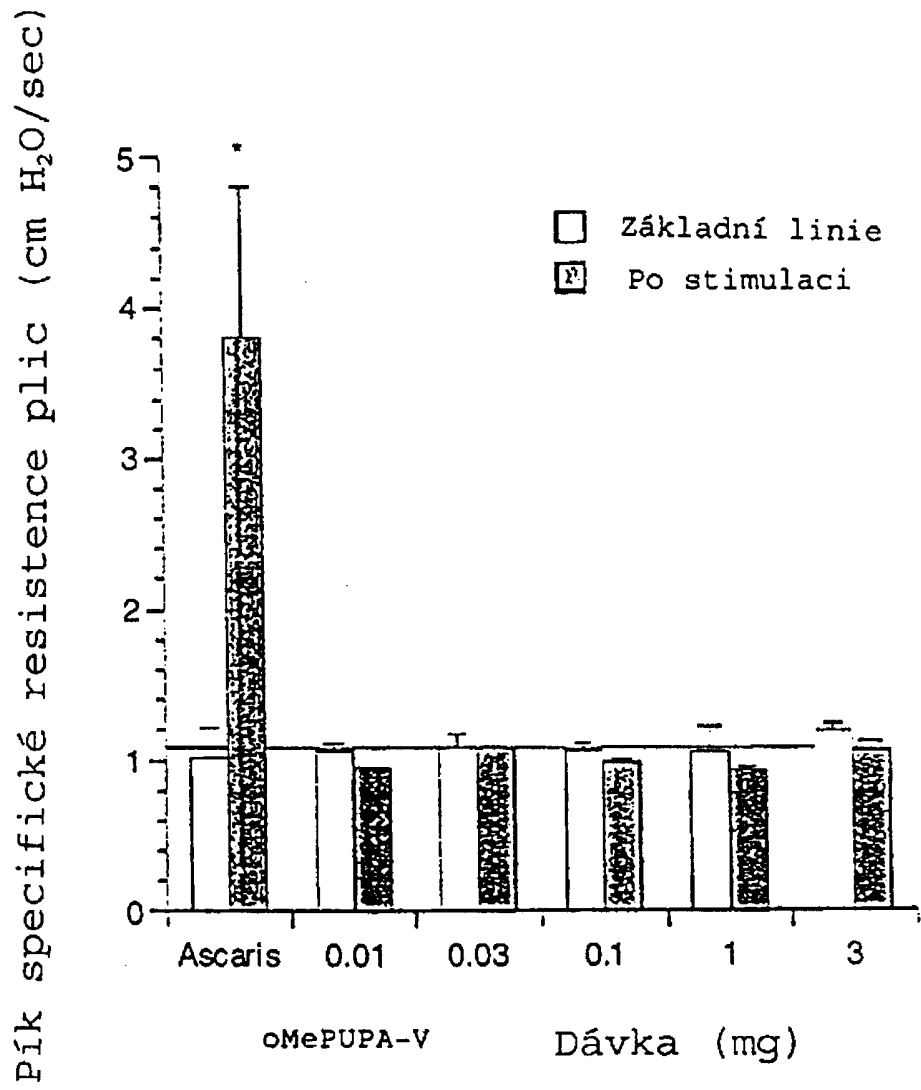
20

5 výkresů

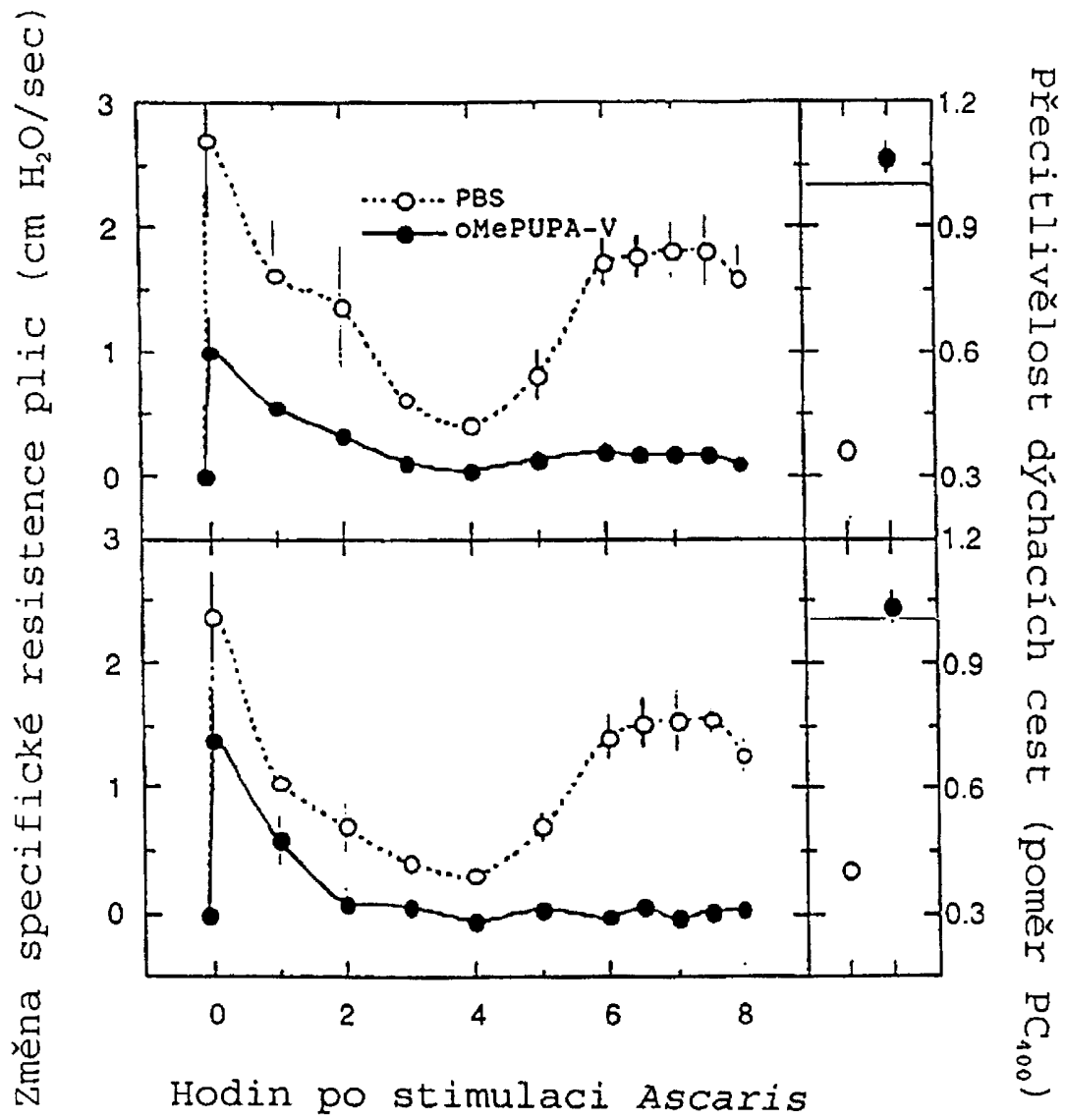


Hodin po stimulaci *Ascaris*

Obr. 1



Obr. 2

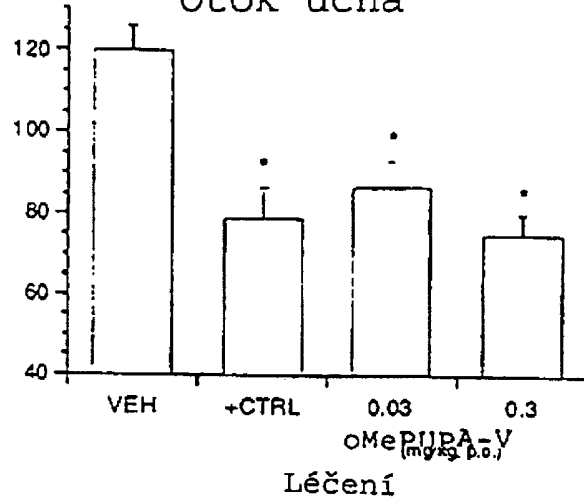


Obr. 3

Čistý otok ucha vyvolaný DNFB ($\times 10^{-4}$ in.)

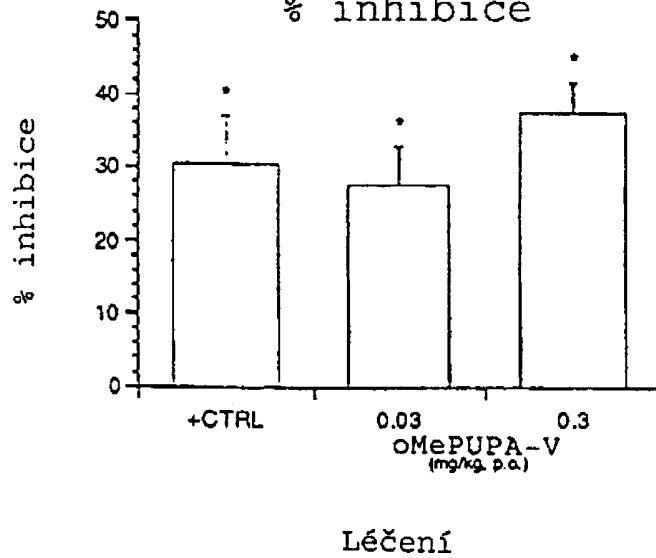
Obr. 4A

Otok ucha



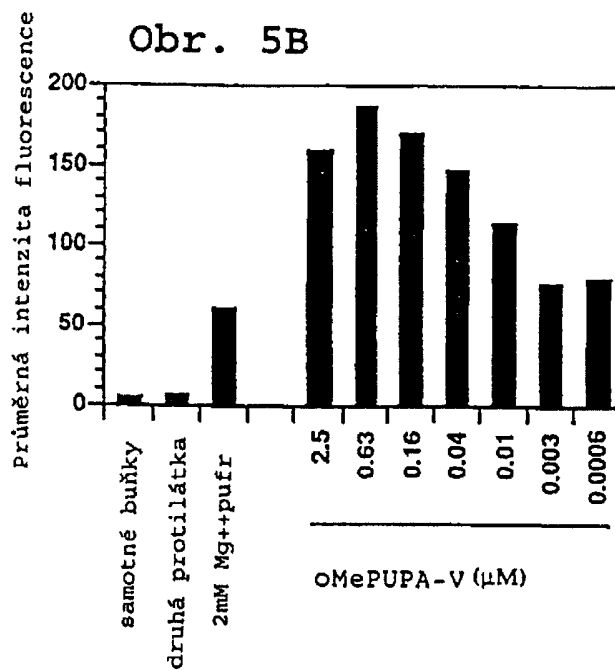
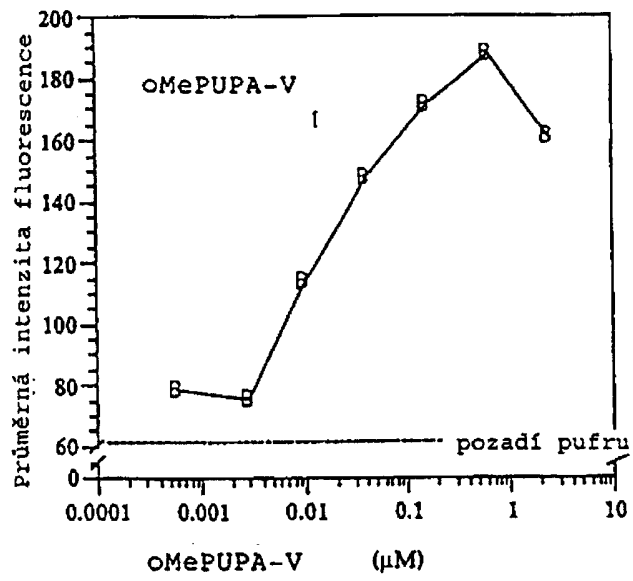
Obr. 4B

% inhibice



Obr. 4

Obr. 5A



Obr. 5

Konec dokumentu