



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 82196

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/506

A61K 31/519

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ВИКОРИСТАННЯ СПОЛУК 2,4-ПІРИМІДИНДІАМІНУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АБО ЗАПОБІГАННЯ АУТОІМУННИМ ХВОРОБАМ

1

2

(21) a200500801

(22) 29.07.2003

(24) 25.03.2008

(86) PCT/US2003/024087, 29.07.2003

(31) 10/631,029

(32) 29.07.2003

(33) US

(31) 60/399,673

(32) 29.07.2002

(33) US

(31) 60/443,949

(32) 31.01.2003

(33) US

(31) 60/452,339

(32) 06.03.2003

(33) US

(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік

(72) СІНГ РЕДЖІНДЕР, GB/US, АРГАДЕ АНКУШ,
IN/US, ПАЯН ДОНАЛЬД ДЖ., GB/US, КЛОУФ
ДЖЕФРІ, КЕЙМ ХОЛГЕР, DE/US, СІЛВЕЙН
КЕТРИН, FR/US, ЛІ ХУІ, CN/US, БАМІДІПАТІ
СОМАСЕКХАР, IN/US

(73) РІГЕЛЬ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ІНК.

(56) WO 01 60816 A 23.08.2001

WO 01 64656 A 07.09.2001

WO 00 39101 A 06.07.2000

US 5 958 935 A 28.09.1999

WO 01 47897 A 05.07.2001

WO 00 58305 A 05.10.2000

WO 03 063794 A 07.08.2003

WO 03 078404 A 25.09.2003

WO 03 076437 A 18.09.2003

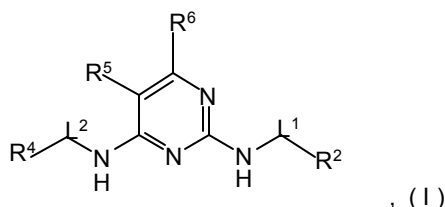
WO 03 002544 A 09.01.2003

WO 03 026664 A 03.04.2003

GB 2 373 186 A 18.09.2002

(57) 1. Використання сполуки 2,4-піримідиндіаміну, яка відповідає структурній формулі (I), для приготування лікарського засобу для лікування аутоімунного захворювання, іншого ніж виразковий коліт, запалення кишечника, та хвороба ідіопатичного запалення кишечника та хвороба Крона, де сполука 2,4-піримідиндіаміну являє собою:

сполуку структурної формули (I):

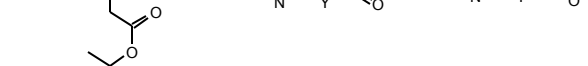
або її солі, гідрату, сольвату та/або N-оксиду, де:
L¹ та L² кожен - прямий зв'язок;R² вибирається з групи, що містить феніл монозаміщений в 3- або 5-позиції групою R⁸, феніл ди- або тризаміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, та 5-15-членний гетероарил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸;R⁴ вибирається з групи, що містить феніл, заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, та 5-15-членний гетероарил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸;R⁵ вибирається з групи, що містить -CN, -NC, -NO₂, фтор, (C1-C3) галоалкіл, (C1-C3) пергалоалкіл, галоалкокси, (C1-C3) пергалоалкокси, -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)CF₃ та -C(O)OCF₃;R⁶ являє собою водень;R⁸ вибирається з групи, що складається з R^c, R^b, R^e, заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b, -OR^a, заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_mR^b, -(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_mR^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_mCH[(CH₂)_mR^b]R^b, -S-(CHR^a)_mR^b, -C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_mC(O)NH-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_mC(O)NH-(CH₂)_mR^b, -O-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -S-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -NH-(CH₂)_mR^b, -NH-(CHR^a)_mR^b, -NH[(CH₂)_mR^b], -N[(CH₂)_mR^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_mR^b, -NH-C(O)-(CH₂)_mCHR^bR^b та -NH-(CH₂)_mC(O)-NH-(CH₂)_mR^b;кожен R^a незалежно вибирається з групи, що складається з водню, (C1-C6) алкілу, (C3-C8) циклоалкілу, (C4-C11) циклоалкілалкілу, (C5-C10) арилу, (C6-C16) арилалкілу, 2-6-членного гетероалкілу, 3-8-членного циклогетероалкілу, 4-

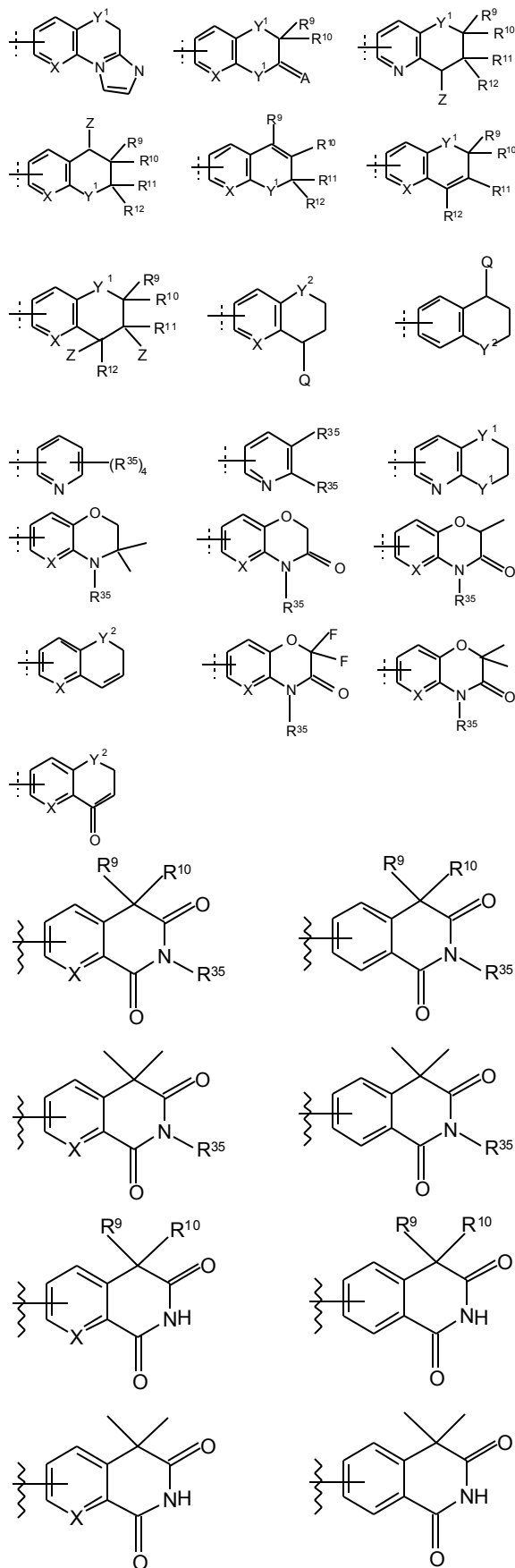
(13) C2

(11) 82196

(19) UA

3. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що в ньому один або обидва R^2 та R^4 , незалежно один від одного, являють собою вибірково заміщений гетероарил, вибраний з групи, що складається з:





де:

р є ціле число від одного до трьох;
кожне позначення \equiv незалежно представляє
одиначний або подвійний зв'язок;
 R^{35} означає водень або R^8 , де R^8 визначений за
п. 1;

X вибирається з групи, що складається з CH, N та
N-O;

кожен Y незалежно вибирається з групи, що
складається з O, S та NH;

кожен Y^1 незалежно вибирається з групи, що
складається із O, S, SO, SO_2 , $SONR^{36}$, NH і NR^{37} ;

кожен Y^2 незалежно вибирається з групи, що
складається з CH, CH_2 , O, S, N, NH і NR^{37} ;

R^{36} означає водень або алкіл;

R^{37} вибирається з групи, що складається з водню
та прогупи, переважно водню або прогупи,
вибраної з групи, що складається з арилу,
арилалкілу, гетероарилу, R^a , R^b - CR^aR^b -O-C(O) R^8 ,
- CR^aR^b -O-PO(OR^8) $_2$, - CH_2 -O-PO(OR^8) $_2$, - CH_2 -
PO(OR^8) $_2$, -C(O)- CR^aR^b -N(CH_3) $_2$, - CR^aR^b -O-C(O)-
 CR^aR^b -N(CH_3) $_2$, -C(O) R^8 , -C(O)CF $_3$ та -C(O)- NR^8 -
C(O) R^8 ;

R^{38} вибирається з групи, що складається з алкілу
та арилу;

A вибирається з групи, що складається з O, NH та
 NR^{38} ;

R^9 , R^{10} , R^{11} та R^{12} , кожен, незалежно один від
одного, вибирається з групи, що складається з
алкілу, алкокси, галогену, галогеналкокси,
аміноалкілу і гідроксгалкілу, або, в
альтернативному випадку, R^9 і R^{10} та/або R^{11} і R^{12} ,
узяті разом являють кеталь;

кожен Z вибирається з групи, що складається з
гідроксилу, алкокси, арилокси, складного ефіру та
карбамату;

Q вибирається з групи, що складається з -OH,
 OR^8 , - NR^cR^c , - NHR^{39} -C(O) R^8 , - NHR^{39} -C(O) OR^8 ,
- NR^{39} - CHR^{40} - R^b , - NR^{39} -(CH_2) m - R^b та - NR^{39} -C(O)-
 CHR^{40} - NR^cR^c ;

R^{39} та R^{40} , кожен та незалежно один від одного,
вибираються з групи, що складається з водню,
алкілу, арилу, алкіларилу; арилалкілу і NHR^8 ; і
 R^a , R^b і R^c визначаються за п. 1.

4. Використання за п. 3, яке **відрізняється** тим,
що R^2 та R^4 однакові.

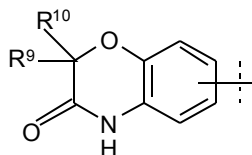
5. Використання за пп. 3 або 4, яке **відрізняється**
тим, що кожен R^{35} незалежно вибирається з групи,
що складається з водню, R^d , - NR^cR^c , -(CH_2) m -
 NR^cR^c , -C(O) NR^cR^c , -(CH_2) m -C(O) NR^cR^c , -C(O) OR^d , -
(CH_2) m -C(O) OR^d та -(CH_2) m - OR^d , де m, R^c і R^d
визначені за п. 1.

6. Використання за п. 5, яке **відрізняється** тим,
що кожне m дорівнює одиниці.

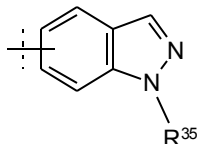
7. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим,
що R^2 означає довільно заміщений гетероарил,
зв'язаний з іншою частиною молекули за
допомогою атома кільця вуглецю.

8. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим,
що R^4 представляє довільно заміщений
гетероарил, зв'язаний з іншою частиною молекули
за допомогою атома кільця вуглецю.

9. Використання за п. 3, яке **відрізняється** тим,
що R^4 являє собою

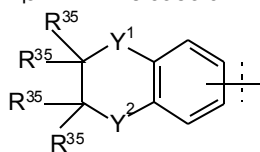


де R^9 та R^{10} визначаються за п. 3 і надалі включають, кожен незалежно, атом водню, та R^2 являє собою фенільну групу, заміщену як визначено в п. 1, або

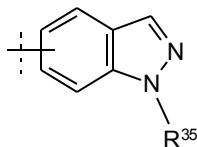


де R^{35} є таким, як визначено в п. 3.

10. Використання за п. 3, яке **відрізняється** тим, що R^4 являє собою



де Y^1 та Y^2 і кожен R^{35} визначені за п. 3 і R^2 являє собою

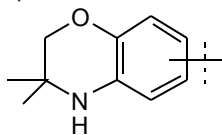


де R^{35} визначений за п. 3.

11. Використання за п. 10, яке **відрізняється** тим, що Y^1 є киснем, Y^2 є NH і один або декілька R^{35} частин є алкільною групою.

12. Використання за п. 11, яке **відрізняється** тим, що два R^{35} приєднані до одного і того ж атома вуглецю, кожен являє собою метил.

13. Використання за п. 12, яке **відрізняється** тим, що R^4 являє собою



14. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що R^5 вибраний з групи, що складається з фтору, (C1-C3) фторалкілу, (C1-C3) перфторалкілу, (C1-C3) фторалкосу та (C1-C3) перфторалкокиси.

15. Використання за п. 14, яке **відрізняється** тим, що R^5 вибраний з фтору, $-CF_3$ та $-OCF_3$.

16. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що один або обидва R^2 та R^4 є, незалежно один від одного, фенілом, заміщеним однією, двома або трьома R^8 групами, де R^8 визначений за п. 1.

17. Використання за п. 16, яке **відрізняється** тим, що R^2 та R^4 кожен однаково або по-різному заміщений фенілом.

18. Використання за п. 16 або 17, яке **відрізняється** тим, що заміщений феніл є монозаміщеним.

19. Використання за п. 18, яке **відрізняється** тим, що R^4 - феніл, заміщений у орто-, мета- або пара-позиції.

20. Використання за п. 18, яке **відрізняється** тим, що R^8 вибирається з групи, що складається з (C1-C10) алкілу, (C1-C10) розгалуженого алкілу, $-OR^d$, $-O-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-O-C(O)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, $-O-C(O)OR^a$, $-O-(CH_2)_mC(O)OR^a$, $-O-C(NH)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(NH)NR^cR^c$, $-NH-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-NH-C(O)NR^cR^c$ та $-NH-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, де m , R^a , R^c та R^d визначені за п. 1.

21. Використання за п. 16 або 17, яке **відрізняється** тим, що заміщений феніл є двозаміщеним.

22. Використання за п. 21, яке **відрізняється** тим, що замісники R^8 займають позиції 2,3-; 2,4-; 2,5-; 2,6-; 3,4- або 3,5-.

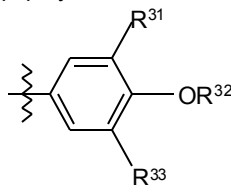
23. Використання за п. 21, яке **відрізняється** тим, що кожен R^8 незалежно вибирається з групи, що складається з (C1-C10) алкілу, (C1-C10) розгалуженого алкілу, $-OR^a$, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b групами, $-O-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-O-C(O)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, $-O-C(O)OR^a$, $-O-(CH_2)_mC(O)OR^a$, $-O-C(NH)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(NH)NR^cR^c$, $-NH-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-NH-C(O)NR^cR^c$ та $-NH-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, де m , R^a , R^b і R^c визначені за п. 1.

24. Використання за п. 16 або 17, яке **відрізняється** тим, що заміщений феніл є тризаміщеним.

25. Використання за п. 24, яке **відрізняється** тим, що замісники R^8 займають позиції 2,3,4; 2,3,5; 2,3,6; 2,4,5; 2,4,6; 2,5,6 або 3,4,5.

26. Використання за п. 25, яке **відрізняється** тим, що кожен R^8 незалежно вибирається з групи, що складається з (C1-C10) алкілу, (C1-C10) розгалуженого алкілу, $-OR^a$, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b групами, $-O-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-O-C(O)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, $-O-C(O)OR^a$, $-O-C(NH)NR^cR^c$, $-O-(CH_2)_mC(O)OR^a$, $-O-(CH_2)_mC(NH)NR^cR^c$, $-NH-(CH_2)_mNR^cR^c$, $-NH-C(O)NR^cR^c$ та $-NH-(CH_2)_mC(O)NR^cR^c$, де m , R^a , R^b та R^c визначені за п. 1.

27. Використання за п. 24, яке **відрізняється** тим, що тризаміщений феніл відповідає наступній формулі:

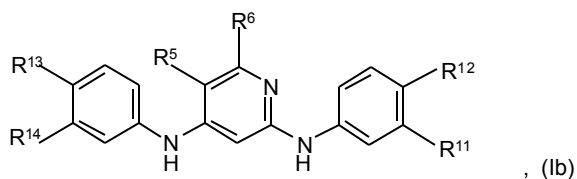


де:

R^{31} означає метил або (C1-C6) алкіл; R^{32} означає водень, метил або (C1-C6) алкіл; і R^{33} означає галогенгрупу.

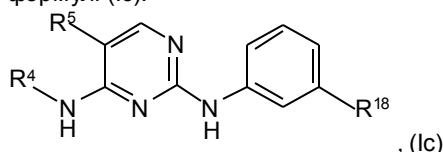
28. Використання за п. 17, яке **відрізняється** тим, що R^2 і R^4 однакові.

29. Використання за п. 1, де сполука 2,4-піримідиндіаміну відповідає наступній структурній формулі (Ib):



або її сіль, гідрат, сольват та/або N-окис, яке **відрізняється** тим, що R^{11} та R^{14} , кожен незалежно один від одного, вибираються з групи, що складається з гідрокси, (C1-C6) алкокси та -NR^cR^c; R^{12} та R^{13} кожен є гідрогеном; і R^5 та R^6 визначені за п. 1.

30. Використання за п. 1, у якому сполука 2,4-піримідиндіаміну відповідає наступній структурній формулі (Ic):



або її сіль, гідрат, сольват та/або N-окис, яке **відрізняється** тим, що R^4 представляє феніл, довільно заміщений від 1 до 3 однаковими або різними R^8 групами або 5-14-членним гетероариллом, довільно заміщеним від 1 до 4 однаковим або різними R^8 групами; R^5 та R^8 є такими, як визначені за п. 1; і R^{18} є -O(CH₂)_m-R^b, де m та R^b є такими, як визначені за п. 1.

31. Використання за п. 30, яке **відрізняється** тим, що R^4 являє собою довільно заміщений гетероарил.

32. Використання за п. 30, яке **відрізняється** тим, що R^{18} являє собою O-CH₂-C(O)-NHCH₃.

33. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що сполука 2,4-піримідиндіаміну вибирається з групи, що складається з наступних сполук:

N2,N4-біс(3-амінофеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R921302),
N4-(3-хлор-4-метоксифеніл)-5-фтор-N2-[3-[(N-метиламіно)карбонілметиленокси]феніл]-2,4-піримідиндіамін (R926891),
N4-[(2,2-диметил-4Н-бензо[1,4]оксазин-3-моно)-6-іл]-5-фтор-N2-[3-(метиламінокарбонілметиленокси)феніл]-2,4-піримідиндіамін (R940323),
N4-[(2,2-диметил-4Н-5-піридо[1,4]оксазин-3-моно)-6-іл]-5-фтор-N2-[3-(метиламінокарбонілметиленокси)феніл]-2,4-піримідиндіамін (R940347) та
N4-[(2,2-дифтор-4Н-бензо[1,4]оксазин-3-моно)-6-іл]-5-фтор-N2-[3-(метиламінокарбонілметиленокси)феніл]-2,4-піримідиндіамін (R921303).

34. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що сполука 2,4-піримідиндіаміну вибирається з групи, що складається зі сполук 7.4.30 до 7.4.090, 7.4.101 до 7.4.138, 7.4.147 до 7.4.150, 7.4.152 до 7.4.180, 7.4.183, 7.4.186, 7.4.187, 7.4.194 до 7.4.211, 7.4.213, 7.4.245, 7.4.247 до 7.4.249, 7.4.253 до 7.4.255, 7.4.259 до 7.4.261, 7.4.270, 7.4.271, 7.4.277, 7.4.281, 7.4.282, 7.4.290 до 7.4.295, 7.4.297, 7.4.303, 7.4.306, 7.4.307, 7.4.314, 7.4.316, 7.4.319 до 7.4.329, 7.4.342 до 7.4.362, 7.4.372 до 7.4.382 та 7.4.384 до 7.4.445.

35. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що сполука 2,4-піримідиндіаміну являє собою:

5(S)-5-фтор-N2-[3-(N-метиламіно)карбонілметиленоксифеніл]-N4-(2-метил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R909317);
(R)-5-фтор-N2-[3-(N-метиламіно)карбонілметиленоксифеніл]-N4-(2-метил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R909317);
N4-(2,2-дифтор-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-N2-(3,5-диметилоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R926970);
N2-(3-хлор-4-гідрокси-5-метилфеніл)-N4-(2,2-дифтор-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R926971);
N2-(3,5-дихлор-4-гідроксифеніл)-N4-(2,2-дифтор-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R927048);
N2-(3,5-дихлор-4-гідроксифеніл)-N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R927051);
N2-(3-хлор-4-гідрокси-5-метилфеніл)-N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R940358);
N2-(3-хлор-4-метокси-5-метилфеніл)-N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R940358);
N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(індазолін-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R940363);
N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(N4-метиліндазолін-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R940366);
N4-(2,2-дифтор-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(1-метиліндазолін-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R940368) або
N2-(3,5-диметоксифеніл)-5-фтор-N4-(2Н-3-оксо-4Н-5-пірид[1,4]оксазин-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R945401).

36. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що сполука 2,4-піримідиндіаміну являє собою:

N4-(3,3-диметил-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(N1-метиліндазол-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R908592);
N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-[1-(3-гідроксипропіл)індазолін-5-іл)-2,4-піримідиндіамін (R935432);
N4-(3-хлор-4-метоксифеніл)-5-фтор-N2-[1-(3-гідроксипропіл)індазолін-5-іл)-2,4-піримідиндіамін (R935461);
N4-(2,2-дифтор-3-оксо-4Н-бенз[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(індазолін-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R940364);
N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-5-пірид[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-N2-(індазолін-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R940380);
N2-(3-хлор-4-гідрокси-5-метилфеніл)-N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-5-пірид[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R940394);
N2-(3,5-диметил-4-метоксифеніл)-N4-(2,2-диметил-3-оксо-4Н-5-пірид[1,4]оксазин-6-іл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R940395) або
N4-(4-аміно-1-бензопіран-6-іл)-5-фтор-N2-(індазол-6-іл)-2,4-піримідиндіамін (R950423).

37. Використання за будь-яким з пп. 1-36, яке **відрізняється** тим, що лікарський засіб застосовують у формі фармацевтичної композиції, що включає сполуку і фармацевтично придатний носій, розчинник і ексципієнт.

38. Використання за будь-яким із пп. 1-36, яке **відрізняється** тим, що аутоімунна хвороба вибрана з групи, що складається з аутоімунних хвороб, що часто визначаються як аутоімунні розлади та аутоімунні захворювання одного органа або одного типу клітин, що часто визначаються як системний аутоімунний розлад, спричинений хворобою.

39. Використання за п. 38, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання вибирається з групи, що включає: аутоімунний тиреоїдит (хвороба Хасімото), аутоімунна гемолітична анемія, аутоімунний атрофічний гастрит перніціозної анемії, аутоімунний енцефаломієліт, аутоімунний орхіт, синдром Гудпасчура, аутоімунна тромбоцитопенія, симпатична офтальмія, міастенія gravis, базедова хвороба, первинний біліарний цироз, хронічний агресивний гепатит та мембранозна гломерулопатія.

40. Використання за п. 38, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання вибирається з групи, що складається з наступних: системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, синдром Рейтера, поліміозит, дерматоміозит, системний склероз, вузликовий поліартеріт, розсіяний склероз і бульозний пемфігоїд.

41. Використання за п. 40, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання являє собою системний червоний вовчак.

42. Використання за п. 40, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання являє собою ревматоїдний артрит.

43. Використання за п. 40, яке **відрізняється** тим, що аутоімунне захворювання являє собою розсіяний склероз.

44. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що сполука 2,4-піримідиндіаміну являє собою N4-[(2,2-дифтор-4Н-бензо[1,4]оксазин-3-дин)-6-іл]-5-фтор-N2-(3-(метиламінокарбонілметилеокси)феніл)-2,4-піримідиндіамін (R921303).

45. Використання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що аутоімунною хворобою є гломерулонефрит

Згідно з §119(e) частини 35 Зводу Законів США (United States Code -U.S.C.), дійсна заявка є переважальною стосовно нижчеперелічених заявок: реєстраційний номер 60/399,673, дата подання 29 липня 2002; реєстраційний номер 60/443,949, дата подання 31 січня 2003 та реєстраційний номер 60/452,339, дата подання 6 березня 2003.

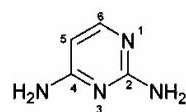
Даний винахід має відношення в основному до 2,4-піримідиндіамінових сполук, фармацевтичних композицій, що містять вказані сполуки, проміжних сполук, синтетичних методів виробництва цих сполук та методів використання цих сполук та композицій у різних сферах, наприклад при лікуванні або профілактиці аутоімунних захворювань та/або симптомів, що з ними пов'язані.

Перехресне зшивання Fc рецепторів, таких як рецептор високої спорідненості для IgE (FcεRI) та/або рецептор високої спорідненості для IgG (FcγRI), активізує сигнальний каскад у тучних клітинах, базофілах та інших імунних клітинах, який призводить до виділення хімічних посередників, відповідальних за багато несприятливих подій. Наприклад, таке зшивання призводить до виділення наперед-сформованих медіаторів анафілактичних реакцій гіперчутливості типу I (реакції гіперчутливості негайного типу), таких як гістамін, з місця зберігання у гранулах через дегрануляцію. Це також призводить до синтезу та виділення інших медіаторів, включаючи лейкотрієни, простагландини та фактори активації тромбоцитів (PAF), які грають важливу роль у перебігу реакцій запалення. Додаткові медіатори, що синтезуються та виділяються в результаті зшивання Fc-рецепторів, включають цитокіни та окис азоту.

Сигнальний каскад або каскади, активовані в результаті зшивання Fc-рецепторів, таких як FcεRI та/або FcγRI, містить набір клітчатих протеїнів. Найбільш важливими міжклітчати розмножувачами сигналу являються тирозинкінази. Важливою тирозинкіназою, що бере участь у шляхах переносу сигналу, пов'язаного із зшиванням FcεRI та/або FcγRI рецепторів, а також інших сигнальних трансдукційних каскадів, є Syk-кіназа [див. Valent et al., 2002, Intl. J. Hematol. 75 (4): 257-362].

Оскільки медіатори, виділені в результаті перехресного зшивання FcεRI та FcγRI рецепторів, являються відповідальними за, або грають важливу роль у маніфестації численних несприятливих подій, дуже бажано мати в наявності сполуки, здатні інгібувати сигнальний каскад (каскади), які ініціюють їхнє виділення. Більш того, завдяки критичній ролі, яку Syk-кінази грають у сигнальному каскаді цих та інших рецепторів, наявність сполук, здатних інгібувати Syk-кіназу, також була б бажаною.

Одним з аспектів даного винаходу є пропозиція нових сполук 2,4-піримідиндіаміну, які, як буде більш детально наведено нижче, проявляють біологічну активність у ряді напрямів. Взагалі, ці сполуки містять 2,4-піримідиндіаміновий "стрижень", що має таку структуру та систему нумерування:



Сполуки згідно з даним винаходом заміщаються у місті приєднання азоту (N2) до атому C2 з метою утворення вторинного аміну та

можуть за бажанням заміщатись додатково в одній або декількох позиціях: у місці приєднання азоту (N4) до атомів C4, C5 та/або C6. При заміщенні у позиції N4, замітник утворює вторинний амін. Замітник в вузлі N2, а також замітники в інших позиціях, можуть широко різнитися за своїми характеристиками та фізико-хімічними властивостями. Наприклад, замітник (и) можуть являти собою розгалужений, нерозгалужений або циклічний алкіл, розгалужений, нерозгалужений або циклічний гетероалкіл, моно- або поліциклічний арил, моно- або поліциклічний гетероаріл, або комбінації цих груп. Ці групи заміщення можуть далі заміщатись, як буде більш детально описано нижче.

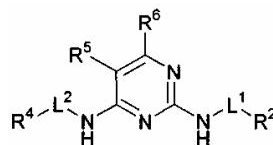
Замітники N2 та/або N4 можуть бути прикріплені безпосередньо до відповідних атомів азоту, або відділені від відповідних атомів азоту за допомогою лінкерів, що можуть бути однаковими або різними. Природа лінкерів може бути різноманітною та може включати практично будь-яку комбінацію атомів або груп, придатних для віддалення однієї частини молекули від іншої. Наприклад, лінкером може бути ациклічний вуглеводневий міст {наприклад, насичений або ненасичений алкілен-, такий як метан-, етан-, етен-, пропан-, проп[1]ен-, бутан-, бут[1]ен-, бут[2]ен-, бута[1,3]діен-, та подібні), моноциклічний або поліциклічний вуглеводневий міст {наприклад, [1,2] бензол-, [2,3] нафталін-, та подібні), простий звичайний ациклічний гетероатомний або гетероалкіділовий міст {наприклад, -O-, -S-, -S-O-, -NH-, -PH-, -C(O)-, -C(O)NH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NH-, -S(O)₂NH-, -O-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -O-CH=CH-CH₂-, та подібні), моноциклічний або поліциклічний гетероаріловий міст {наприклад, [3,4]фуран-, піридин-, тіофен-, піперидін-, піперазин-, піразидін-, піролідін-, та подібні) або комбінації таких мостів.

Замітники у позиціях N2, N4, C5 та/або C6, а також потенціальні лінкери, можуть далі замінятися однією або декількома однаковими або різними групами заміників. Природа цих груп заміщення може бути різноманітною. Необмежені приклади придатних груп заміників включають розгалужені, нерозгалужені або циклічні алкіли, моно- або поліциклічні аріли, розгалужені, нерозгалужені або циклічні гетероалкіли, моно- або поліциклічні гетероаріли, галоїдоуглеводні, розгалужені, нерозгалужені або циклічні галоїдоалкіли, гідроксиди, оксоети, тіоксоети, розгалужені, нерозгалужені або циклічні алкокси, розгалужені, нерозгалужені або циклічні галоїдоалкокси, трифторметоксили, моно- або поліциклічні арілоксили, моно- або поліциклічні гетероарілоксили, ефіри, спирти, сульфідиди, тіоефіри, сульфаніли (тіоли), іміни, азоди, азиди, аміни (первинний, вторинний та третинний), нітрили (будь-які ізомери), цианати (будь-які ізомери), тіоцианати (будь-які ізомери), нітрозогрупи, нітро-групи, діази, сульфоксиди, сульфоніли, сульфонові кислоти, сульфамідиди, сульфонамідиди, ефіри сульфамінових кислот, альдегіди, кетони, карбонові кислоти, складні ефіри, амідиди, амідіни, формадіни, амінокислоти, ацетилени, карбамати, лактони, лактами,

глюкозиди, глюконурідиди, сульфониди, кетали, ацетали, тіокетали, оксими, оксамінові кислоти, ефіри оксамінових кислот, тощо, та комбінації цих груп. Групи заміників, що мають функціональну здатність до реакції, можуть бути захищені або не захищені, як добре відомо у цій галузі науки.

З

У одному з ілюстративних прикладів, сполуки 2,4-піримідиндіамінів згідно з даним винаходом являють собою сполуки, що мають наступну структурну формулу (I):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-оксиди, де:

структурні ланки L¹ та L² кожна, незалежно одна від одної, вибираються з групи, що містить прямий зв'язок та лінкер;

R² вибирається з групи, що містить (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними R⁸ групами, (C3-C8) циклоалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, циклогексил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, 3-8-членний циклогетероалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C5-C15) арил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, феніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸ та 5-15-членний гетероаріл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸;

R⁴ вибирається з групи, що містить водень, (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C3-C8) циклоалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, циклогексил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, 3-8-членний циклогетероалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C5-C15) арил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, феніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸ та 5-15-членний гетероаріл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸;

R⁵ вибирається з групи, що містить R⁶, (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C1-C4) алканіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C2-C4) алкеніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸ та (C2-C4) алкініл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R⁸;

Кожний R⁶ незалежно вибирається з групи, що складається з водню, електронегативної групи, -

OR^d, -SR^d, (C1-C3) галоїдоалкілокси, (C1-C3) пергалоїдоалкілокси, -NR^cR^c, галоген, (C1-C3) галоїдоалкіл, (C1-C3) пергалоїдоалкіл, -CF₃, -CH₂CF₃, -CF₂CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)NR^cR^c, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -SC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -SC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -SC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -SC(NH)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c та -[NHC(NH)]_nNR^cR^c, (C5-C10) арілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, фенілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, (C6-C16) арілалкілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R⁸, 5-10-членного гетероарілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R та 6-16-членного гетероарілалкілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або відмінними групами R⁸;

R⁸ вибирається з групи, що складається з R^a, R^b, R^a, заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b, -OR^a, заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b, -B(OR^a)₂, -B(NR^cR^c)₂, -(CH₂)_mR^b, -(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_mR^b, -O-CHR^aR^b, -O-CR^a(R^b)₂, -O-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_m-CH[(CH₂)_mR^b]R^b, -S-(CHR^a)_mR^b, -C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -O-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -S-(CH₂)_m-C(O)NH-(CH₂)_mR^b, -O-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -S-(CHR^a)_m-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b, -NH-(CH₂)_mR^b, -NH-(CHR^a)_mR^b, -NH[(CH₂)_mR^b], -N[(CH₂)_mR^b]₂, -NH-C(O)-NH-(CH₂)_mR^b, -NH-C(O)-(CH₂)_m-CHR^bR^b та -NH-(CH₂)_m-C(O)-NH-(CH₂)_mR^b;

Кожний R^a незалежно вибирається з групи, що складається з водню, (C1-C6) алкілу, (C3-C8) циклоалкілу, циклогексилу, (C4-C11) циклоалкілалкілу, (C5-C10) арілу, фенілу, (C6-C16) арілалкілу, бензилу, 2-6-членного гетероалкілу, 3-8-членного циклогетероалкілу, морфоліну, піперазинілу, гомопіперазинілу, піперидинілу, 4-11-членного циклогетероалкілалкілу, 5-10-членного гетероарілу та 6-16-членного гетероарілалкілу;

Кожний R^b являє собою підходящу групу, незалежно вибрану з групи, що складається з =O, -OR^d, (C1-C3) галоїдоалкілокси, -OCF₃, =S, -SR^d, =NR^d, =NOR^d, -NR^cR^c, галоген, -CF₃, -CN, -NC, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R^d, -S(O)₂R^d, -S(O)₂OR^d, -S(O)NR^cR^c, -S(O)₂NR^cR^c, -OS(O)R^d, -OS(O)₂R^d, -OS(O)₂OR^d, -OS(O)₂NR^cR^c, -C(O)R^d, -C(O)OR^d, -C(O)NR^cR^c, -C(NH)NR^cR^c, -C(NR^a)NR^cR^c, -C(NOH)R^a, -C(NOH)NR^cR^c, -OC(O)R^d, -OC(O)OR^d, -OC(O)NR^cR^c, -OC(NH)NR^cR^c, -OC(NR^a)NR^cR^c, -[NHC(O)]_nR^d, -[NR^aC(O)]_nR^d, -[NHC(O)]_nOR^d, -[NR^aC(O)]_nOR^d, -[NHC(O)]_nNR^cR^c, -[NR^aC(O)]_nNR^cR^c, -[NHC(NH)]_nNR^cR^c та -[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c;

Кожний R^c незалежно являє собою захисну групу або R^a, або, альтернативно, кожний R^c береться сумісно з атомом азоту, з яким він зв'язан, з метою утворення 5-8 членного циклогетероалкілу або гетероарілу, які можуть включати один або декілька однакових або різних

додаткових гетероатомів та можуть заміщатися однією або декількома однаковими або різними R^a або підходящими групами R^b;

кожний R^d незалежно являє захисну групу або R^a;

кожне m являє самостійне ціле число від 1 до 3; та

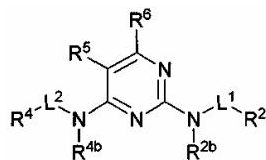
кожне n являє самостійне ціле число від 0 до 3.

У іншому аспекті, даний винахід пропонує проліки сполук 2,4-піримідиндіаміну. Такі проліки можуть бути активними у своїй пролікарській формі, або ж неактивними до тих пір, поки не перетворяться у активну лікарську форму за фізіологічних або інших умов застосування. У проліках згідно з даним винаходом, одна або декілька функціональних груп 2,4-піримідиндіамінових сполук включені в прокомпоненти (promoieties), що відділяються від молекули за умов застосування, типово шляхом гідролізу, ферментного розщеплення або деякого іншого механізму розщеплення з метою утворення функціональних груп. Наприклад, первинні або вторинні аміно групи можуть бути включені в амідний прокомпонент, який розщеплюється за умов застосування, утворюючи первинну або вторинну аміно групу. Таким чином, проліки згідно з даним винаходом включають спеціальні типи захисних груп, що звуться "прогрупи", та маскують одну або більше функціональних груп 2,4-піримідиндіамінових сполук, що розщеплюються за умов застосування з утворенням активних лікарських сполук 2,4-піримідиндіаміну. Функціональні групи, що входять до складу 2,4-піримідиндіамінових сполук, які можуть бути замасковані з допомогою прогруп з метою включення у прокомпонент, включають, але не обмежуються амінами (первинними та вторинними), гідроксилами, сульфанілами (тіоли), карбоксілами, карбонілами, фенолами, катехолами, діолами, алкінами, фосфатами, тощо. В даний час відомо багато прогруп, придатних для маскування вказаних функціональних груп з метою утворення прокомпонентів, здатних до розщеплення за умов застосування. Усі ці прогрупи, незалежно або у комбінаціях, можуть бути включені у проліки згідно з даним винаходом. Конкретні приклади прокомпонентів, що утворюють первинні або вторинні аміно групи, які можуть бути включені у проліки за даним винаходом включають, але не обмежуються амідами, карбаматами, імінами, сечовиною, фосфенілами, фосфорилами та сульфенілами. Конкретні приклади прокомпонентів, що утворюють сульфанілові групи, та що можуть бути включені у проліки згідно з даним винаходом, включають, але не обмежуються тіоефірами, наприклад S-метил-похідні (монотіо-, дітіо-, оксітіо-, амінотіо-асетали), силілові тіоефіри, складні тіоефіри, тіокарбонати, тіокарбомати, асиметричні дисульфіді, тощо. Конкретні приклади прокомпонентів, що розщеплюються з метою утворення гідроксильних груп, та які можуть бути включені у проліки згідно з даним винаходом включають, але не обмежуються, сульфонатами, складними ефірами та карбонатами. Конкретні

приклади прокомпонентів, що утворюють карбоксильні групи і можуть бути включені у проліки згідно з даним винаходом включають, але не обмежуються, складними ефірами (включаючи складні силілові ефіри, ефіри оксамінової кислоти та тіоефіри), амідів та гідразидів.

У одному з ілюстративних прикладів, проліки згідно з даним винаходом являють сполуки зі структурною формулою (I), у якій захисні групи R^c та R^d являють собою прогрупи.

Заміщення атомів водню, прикріплених до N2 та N4 у 2,4-піримідиндіамінів, які відповідають структурній формулі (I), заміниками, несприятливо впливає на активність сполук. Але, як буде оцінено фахівцями, ці атоми азоту можуть бути включені у прокомпоненти, що при умовах застосування розщеплюються і утворюють 2,4-піримідиндіаміни згідно з структурною формулою (I). Таким чином, у іншому ілюстративному прикладі, проліки згідно з даним винаходом являють сполуки з структурною формулою (II):



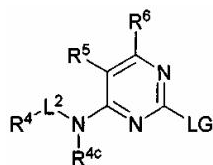
включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де:

R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 та L^2 - попередньо визначені для структурної формули (I); та

R^{2b} та R^{4b} , кожний, незалежно один від одного, являє прогрупу.

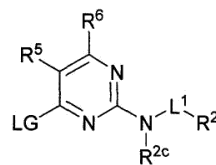
Інший аспект даного винаходу полягає у пропозиції композицій, які містять одну або декілька сполук та/або проліків згідно з цим винаходом, а також відповідний носій, наповнювач або розчинник. Точна природа носія, наповнювача або розчинника буде залежати від жаданого застосування такої композиції від засобів, придатних для застосування у ветеринарній практиці, до засобів, придатних для лікування людей.

Ще один аспект даного винаходу полягає у пропозиції проміжних сполук, корисних для синтезу 2,4-піримідиндіамінів та пролік згідно з даним винаходом. В одному з прикладів, проміжні сполуки представлені у формі 4-піримідинамінів зі структурною формулою (III):



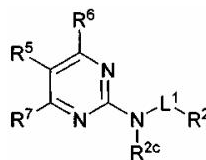
включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де R^4 , R^5 , R^6 та L^2 - являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I); LG являє групу заміщення, як наприклад, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ або галоїдну групу (наприклад, F, Cl, Br, I); та R^{4c} являє водень або прогрупу.

В іншому прикладі, проміжні сполуки являють 2-піримідинаміни, які відповідають структурній формулі (IV):



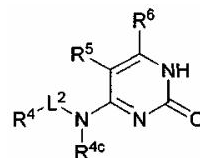
включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де R^2 , R^5 , R^6 та L^1 попередньо визначені для структурної формули (I); LG являє групу заміщення, як наприклад, $-S(O)_2Me$, $-SMe$ або галоїдну групу (наприклад, F, Cl, Br, I) та R^{2c} являє водень або прогрупу.

У ще одному прикладі, проміжні сполуки являють 4-аміно- або 4-гідрокси-2-піримідинаміни згідно зі структурною формулою (V):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де R^2 , R^5 , R^6 та L^1 попередньо визначені для структурної формули (I), R^7 являє амінову або гідроксильну групу, та R^{2c} являє водень або прогрупу.

У іншому прикладі, проміжні сполуки являють N4-заміщені цитозіни згідно зі структурною формулою (VI):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де R^4 , R^5 , R^6 та L^2 визначені раніше для структурної формули (I) та R^{4c} являє водень або прогрупу.

У ще одному аспекті, даний винахід пропонує методи синтезу 2,4-піримідиндіамінових сполук та проліків згідно з даним винаходом. У одному прикладі, вказаний метод передбачає проведення реакції 4-піримідинаміну зі структурною формулою (III) з аміном за формулою $HR^{2c}N-L^1-R^2$, де L^1 , R^2 та R^{2c} визначені вище для структурної формули (IV), з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну зі структурною формулою (I), або проліків зі структурною формулою (II).

У іншому прикладі, вказаний метод передбачає проведення реакції 2-піримідинаміну зі структурною формулою (IV) з аміном за формулою $R^4-L^2-NHR^{4c}$, де L^4 , R^4 та R^{4c} визначено вище для структурної формули (III), з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну зі структурною формулою (I), або проліків згідно зі структурною формулою (II).

У ще іншому прикладі, цей метод передбачає проведення реакції 4-аміно-2-піримідинаміну

згідно зі структурною формулою (V) (у якій R^7 є аміно групою) з аміном формули $R^4-L-NHR^{4c}$, де L , R^4 та R^{4c} визначені раніше для структурної формули (III), з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну згідно зі структурною формулою (I), або проліків згідно зі структурною формулою (II). В альтернативному випадку, 4-аміно-2-піримідинамін може реагувати з сполукою, що має формулу R^4-L^2-LG , де R^4 та L^2 визначені раніше для структурної формули (I), та LG являє групу заміщення.

У ще одному прикладі, цій метод передбачає проведення реакції галогенування 4-гідроксі-2-піримідинаміну згідно зі структурною формулою (V) (R^7 являє гідроксильну групу) з метою утворення 2-піримідинаміну згідно з структурною формулою (IV), з наступною реакцією цього піримідинаміну з відповідним аміном, як описано вище.

У ще одному прикладі, цей метод передбачає проведення реакції галогенування N4-заміщеного цитозину згідно зі структурною формулою (VI) з метою утворення 4-піримідинаміну згідно зі структурною формулою (III) та проведення реакції цього піримідинаміну з відповідним аміном, як описано вище.

Сполуки 2,4-піримідиндіаміну цього винаходу є сильними інгібіторами дегрануляції імунних клітин, таких як тучні клітини, базофіли, нейтрофіли та/або еозінофільні клітини. Таким чином, у ще одному аспекті даний винахід пропонує методи регуляції, та зокрема інгібування дегрануляції таких клітин. Запропонований метод взагалі включає приведення клітини, що дегранулює, у контакт з 2,4-піримідиндіаміною сполукою, або проліками згідно з даним винаходом, або з їх прийнятною сіллю, гідратом, сольватом, N-окисом та/або іншою композицією, у кількості, достатній для ефективного регулювання або інгібування дегрануляції клітини. Вказаний метод може застосовуватись *in vitro* або *in vivo* як терапевтичний підхід до лікування або профілактики захворювань, охарактеризованих, викликаних або пов'язаних з клітковою дегрануляцією.

Не маючи наміру бути зв'язаним будь-якою теорією функціонування, біохімічні дані підтверджують, що сполуки 2,4-піримідиндіаміну здійснюють інгібуючий ефект на дегрануляцію, принаймні частково завдяки блокуванню та інгібуванню сигнального трансдукційного каскаду(iv), ініційованого в результаті зшивання Fc-рецепторів високої спорідненості для IgE ("Fc ϵ RI") та /або IgG ("Fc γ RI"). Дійсно, сполуки 2,4-піримідиндіаміну є потужними інгібіторами дегрануляції, опосередкованої як Fc ϵ RI, так і Fc γ RI-рецепторами. Внаслідок цього, 2,4-піримідинові сполуки можна застосовувати для інгібування сигнальних каскадів вказаних Fc рецепторів у клітинах будь-якого типу, експресуючих такі Fc ϵ RI та/або Fc γ RI рецептори, включаючи але не обмежуючись макрофагами, мастоцитами, базофілами, нейтрофілами та/або еозінофільними клітинами.

Ці методи також дозволяють регулювати, та зокрема, інгібувати процеси, які протікають у

прямому напрямку та являються результатом активації таких сигнальних каскадів Fc-рецепторів. Такі процеси включають в себе, але не обмежуються наступними: Fc ϵ RI- та/або Fc γ RI-опосередкована дегрануляція, виробництво цитокіну та/або виробництво та/або виділення ліпідних посередників, таких як лейкотрієни та простагландини. Цей метод взагалі полягає у приведенні клітини з категорії вищенаведених, експресуючої Fc-рецептор, в контакт із 2,4-піримідиндіаміною сполукою або проліками згідно з даним винаходом, або з їх прийнятною сіллю, гідратом, сольватом, N-окисом та/або подібною композицією у кількості, достатній для ефективного регулювання або інгібування сигнального каскаду Fc-рецепторів, та/або прямого процесу, що залежить від активації цього сигнального каскаду. Цей метод може застосовуватись *in vitro* або *in vivo* як терапевтичний підхід до лікування або запобігання захворювань, охарактеризованих, викликаних або пов'язаних з сигнальним каскадом Fc-рецепторів, таких як захворювання, обумовлені виділенням специфічних хімічних медіаторів гранул в процесі дегрануляції, виділенням та/або синтезом цитокінів, та/або виділенням та/або синтезом ліпідних медіаторів, таких як лейкотрієни та простагландини.

У ще одному аспекті, даний винахід пропонує методи лікування та/або профілактики захворювань, охарактеризованих, викликаних або пов'язаних з виділенням хімічних медіаторів в результаті активації сигнальних каскадів Fc-рецепторів, таких як сигнальні каскади Fc ϵ RI та/або Fc γ RI-рецепторів. Ці методи можуть застосовуватись на тваринах у ветеринарних цілях або на людях. Вказані методи в цілому включають введення тваринам або людині деякої кількості 2,4-піримідиндіамінової сполуки або проліків згідно з даним винаходом, або її прийнятною солі, гідрату, сольвату, N-окису та/або подібною композиції, ефективною для лікування або запобігання захворювання. Як обговорювалось раніше, активація сигнального каскаду Fc ϵ RI або Fc γ RI рецепторів у певних імунних клітинах веде до виділення та/або синтезу різновидних хімічних речовин, які являються фармакологічними медіаторами широкого різновиду захворювань. Будь-яке з цих захворювань можна лікувати або запобігти за методами даного винаходу.

Наприклад, у тучних клітинах та базофілах, активація сигнальних каскадів Fc ϵ RI або Fc γ RI веде до негайного (від 1 до 3 хвилин з моменту активації рецептора) виділення наперед сформованих медіаторів atopічної реакції та/або реакції гіперчутливості I типу (наприклад, гістаміну, протеаз таких, як тріптаза, тощо) за допомогою процесів дегрануляції. Такі atopічні реакції або реакції гіперчутливості I типу, включають, але не обмежуються анафілактичними реакціями на середовище та інші алергени (наприклад, пилок, отрута комах та/або тварин, продукти харчування, ліки, контрастні фарби, тощо), анафілактоїдними реакціями, сінною лихоманкою, алергічним кон'юнктивітом, алергічним ринітом, алергічною астмою, atopічним дерматитом, екземою,

кропивницею, порушенням функцій слизистої оболонки, тканин та певними шлунково-кишковими порушеннями.

За негайним виділенням наперед сформованих посередників через дегрануляцію слідує виділення та/або синтез різновиду інших хімічних медіаторів, включаючи серед інших, фактор активації тромбоцитів (PAF), простагландіни та лейкотрієни (наприклад, LTC₄) та de novo синтез та виділення цитокінів, наприклад TNF α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, тощо. Перший з цих двох процесів трапляється приблизно через 3-30 хвилин після активації рецепторів; другий, через приблизно 30 хвилин-7 годин після активації рецепторів. Вважають, що ці медіатори "пізньої стадії" є частково відповідальними за хронічні симптоми вищенаведених atopічних реакцій та реакцій гіперчутливості Типу I, та до того ж являються хімічними медіаторами запалення та запальних захворювань (наприклад, остеоартриту, запального кишкового захворювання, виразкового коліту, хвороби Крона, ідіопатичних запальних кишкових захворювань, подразних кишкових синдромів, слизовий коліт, тощо), низького ступеню рубцювання (наприклад, склеродерма, збільшений фіброз, утворення келоїдів, післяопераційні шрами, легеневи фіброз, судинні спазми, мігрень, реперфузійне ураження, та пост інфаркт міокарда), та комплексу або синдрому сухості. Всі ці захворювання можна лікувати або запобігти за методами даного винаходу.

Додаткові захворювання, які можна лікувати або запобігти згідно з методами даного винаходу, включають захворювання, пов'язані з патологією базофілів та/або тучних клітин. Приклади таких захворювань включають, але не обмежуються, захворюваннями шкіри, як наприклад склеродерма, захворюваннями серця, як наприклад пост інфаркт міокарда, захворюваннями легень, як наприклад, зміни або перетворення м'язів легень або хронічне обструктивне захворювання легень (COPD) та кишкові захворювання, як наприклад, запальний кишковий синдром (слизовий коліт).

2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу є також потужними інгібіторами тирозінкінази, а саме Syk-кінази. Таким чином, у ще одному аспекті, даний винахід пропонує методи регулювання, та зокрема, інгібування діяльності Syk-кінази. Метод взагалі полягає у приведенні Syk-кінази, або клітини, що містить Syk-кіназу, у контакт з 2,4-піримідиндіаміновою сполукою або проліків даного винаходу, або їх прийнятною сіллю, гідратом, сольватом, N-окисом та/або подібною композицією у кількості, ефективній для регулювання або інгібування діяльності Syk-кінази. У одному з прикладів, Syk-кіназа являє ізольовану або рекомбіновану Syk-кіназу. У іншому прикладі, Syk-кіназа являє ендогенну або рекомбіновану Syk-кіназу, експресовану клітиною, наприклад тучною або базофілом. Цей метод можна застосовувати *in vitro* або *in vivo* як терапевтичний підхід до лікування або запобігання захворювань

охарактеризованих, викликаних або пов'язаних з активністю Syk-кінази.

Не маючи наміру бути зв'язаним ніякою певною теорією функціонування, вважають, що 2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу інгібують дегрануляцію клітин та/або виділення інших хімічних медіаторів переважно за рахунок інгібування Syk-кінази, яка активується через гомодімер гамма ланцюга Fc ϵ RI (див. Fig.2). Цей гомодімер гамма ланцюга частково вживається іншими Fc рецепторами, включаючи Fc γ RI, Fc γ RIII та Fc α RI. Для всіх цих рецепторів, процес внутріклітинного переносу сигналу опосередковується спільним гомодімером гамма ланцюга. Зв'язування та агрегація цих рецепторів призводить до підбору та активації тирозінкінази, як наприклад Syk-кінази. В результаті цієї спільної сигнальної діяльності, описані 2,4-піримідиндіамінові сполуки можуть використовуватись для регулювання, та, зокрема, інгібування, сигнальних каскадів Fc-рецепторів, маючих цей гомодімер гамма ланцюга, таких як Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RIII та Fc α RI, а також, відповідей клітин, отриманих через ці рецептори.

Відомо, що Syk-кіназа грає критичну роль у інших сигнальних каскадах. Наприклад, Syk-кіназа є ефектором сигналів рецепторів B-клітин (BCR) [Turner et al., 2000, Immunology Today 21: 148-154], а також є істотним компонентом сигнального шляху бета (1), бета (2) та бета (3) інтегрину у нейтрофілах [Mocsai et al., 2002, Immunity 16: 547-558]. Оскільки описані 2,4-піримідиндіамінові сполуки є потужними інгібіторами Syk-кінази, їх можна застосовувати для регулювання та, зокрема, інгібування будь-яких сигнальних каскадів, у яких Syk-кіназа грає роль, наприклад у сигнальних каскадах Fc-рецепторів, BCR та інтегрину, а також реакцій клітин, отриманих через ці сигнальні каскади. Регулювання або інгібування конкретної клітинної реакції частково залежить від специфічного типу клітини та сигнального каскаду рецепторів, як це добро відомо у галузі науки. Необмежуючі приклади клітинних відповідей, які можна регулювати або інгібувати сполуками 2,4-піримідиндіамінів, включають розрив в дихальних каналах, клітинну адгезію, клітинну дегрануляцію, розповсюдження клітин, міграцію клітин, фагоцитоз (наприклад, у макрофагів), потік іонів кальція (наприклад, у тучних клітинах, базофілах, нейтрофілах, еозинофілах та B-клітинах), агрегація тромбоцитів, та визрівання клітин (наприклад, у B-клітинах).

Таким чином, у іншому аспекті, даний винахід пропонує методи регулювання та, зокрема, інгібування сигнальних каскадів, у яких Syk-кіназа приймає участь. Взагалі, цей метод полягає у приведенні Syk-залежного рецептору або клітини, що експресує Syk-залежний рецептор, у контакт з 2,4-піримідиндіаміновою сполукою або проліків даного винаходу, або їх прийнятною сіллю, гідратом, сольватом, N-окисом та/або їх композиції у кількості, достатній для ефективного регулювання або інгібування сигнального каскаду. Ці методи можна також застосовувати для регулювання та, зокрема, інгібування прямих процесів або клітинних відповідей, отриманих в

результаті активації окремих Syk-залежних сигнальних каскадів. Ці методи можна застосовувати для регулювання будь-яких сигнальних каскадів, у яких роль Syk-кінази невідома, або ж встановлена пізніше. Ці методи також можна застосовувати *in vitro* або *in vivo* як терапевтичний підхід до лікування або запобігання захворювань, охарактеризованих, викликаних або пов'язаних з активацією Syk-залежного сигнального каскаду. Необмежені приклади таких захворювань включають захворювання, описані раніше.

Дані досліджень на клітинному рівні та дані досліджень на тваринах також свідчать про те, що 2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу можна застосовувати для лікування або профілактики аутоімунних захворювань та/або симптомів таких захворювань. Методи взагалі полягають у застосуванні особою, що страждає на аутоімунне захворювання або з підвищеним ризиком розвитку захворюванням, дози 2,4-піримідиндіамінового засобу або проліків даного винаходу, або їх прийнятної солі, N-оксиду, гідрату, сольвату або їх комбінації, у кількості достатній для ефективного лікування або профілактики аутоімунних захворювань та/або пов'язаних з ними симптомів. До аутоімунних хвороб, які можна лікувати або запобігти з допомогою 2,4-піримідиндіамінових сполук, відносять захворювання, що звичайно пов'язані з неанафілактичними реакціями гіперчутливості (реакції гіперчутливості типу II, типу III, та/або типу IV) та/або таких захворювань, які опосередковані, принаймні частково, активацією FcγR сигнального каскаду у моноцитах. Такі аутоімунні захворювання включають, але не обмежуються, аутоімунними захворюваннями, які часто відносять до аутоімунних порушень одного органу або одного типу клітин або тими, які часто відносять до системних аутоімунних порушень. Необмежуючі приклади захворювань, які часто відносять до аутоімунних порушень одного органу або одного типу клітин, включають аутоімунний тиреоїдит, аутоімунну гемолітичну анемію, аутоімунний атрофічний гастрит перніціозної анемії, аутоімунний енцефаломієліт, аутоімунний орхіт, синдром Гудпасчура, аутоімунну тромбоцитопенію, симпатичну офтальмію, міастенію gravis, базедову хворобу, первинний біліарний цироз, хронічний агресивний гепатит, виразковий коліт та мембранозну гломерулопатію. Необмежуючі приклади захворювань, які часто відносять до системних аутоімунних порушень, включають системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, синдром Рейтера, поліміозит-дерматоміозит, системний склероз, вузликовий періартеріїт, розсіяний склероз, бульозний пемфігоїд.

Фіг.1 ілюструє виробництво IgE, індуковане алергеном, та наступне виділення преформованих та інших хімічних медіаторів з мастоцитів;

Фіг.2 ілюструє сигнальний трансдукційний каскад FcεRI рецепторів, який призводить до дегрануляції тучних клітин та/або базофілів;

Фіг.3 ілюструє припустимі пункти діяльності сполук, що селективно інгібують дегрануляцію в

зворотному напрямку, опосередковану FcεRI-рецепторами, та сполук, які інгібують дегрануляцію, опосередковану FcεRI-рецепторами та спонуквану іоніцинами;

Фіг.4 наводить графічну ілюстрацію ефекту певних 2,4-піримідиндіамінових сполук, DMSO (контроль) та іоніцинів на потік Ca²⁺ у культивованих тучних клітинах людини (CHMC);

Фіг.5 наводить графічну ілюстрацію швидкості інгібуючої діяльності сполук R921218 та R926495;

Фіг.6 ілюструє ефект вимивання на інгібуючу діяльність сполук R921218 та R921302;

Фіг.7 наводить дані, що показують, як змінні концентрації сполук R921218 (A) та R921219 (B) інгібують фосфорилювання різноманітних протеїнів, що слідують за Syk-кіназою у сигнальному трансдукційному каскаді IgE-рецепторів в активованих кістково-мозкових тучних клітинах (BMMS);

Фіг.8 ілюструє дані, що показують інгібувannya фосфорилювання ендogenous субстрату (LAT) та пептидного субстрату в залежності від дози фосфорилювання Syk-кінази при збільшенні концентрації сполук R921218 (X), R921219 (Y) та R921304 (Z);

Фіг.9 ілюструє дані, які показують, що інгібувannya Syk-кінази сполукою R921219 має конкурентоспроможний характер відносно АТФ;

Фіг.10 ілюструє дані, які показують, що сполуки R921219 (A) та R218218 (B) з різною концентрацією інгібують фосфорилювання протеїнів, слідуючих за Syk-кіназою, але не LYN кіназою, у сигнальному трансдукційному каскаді FcεRI-рецепторів у активованих CHMC клітинах; також показано інгібувannya фосфорилювання протеїнів, слідуючих за LYN кіназою, але не Syk-кіназою, у присутності відомого інгібітору (PP2) LYN кінази;

Фіг.11A-11D наводять дані, які демонструють інгібувannya фосфорилювання протеїнів в прямому напрямку від Syk-кінази у сигнальному трансдукційному каскаді FcεRI-рецепторів у BMMS клітинах;

Фіг.12 наводить графічну ілюстрацію ефективності сполуки R921302 при модулюванні на мишах артриту, індукованого антитілами до колагену (CAIA);

Фіг.13 наводить графічну ілюстрацію ефективності сполуки R921302 щодо інгібувannya експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) у мишах, що являє собою клінічну модель розсіяного склерозу, та

Фіг.14 наводить графічну ілюстрацію ефективності сполуки R921302 при моделюванні на щурах артриту, індукованого колагеном (CIA);

Фіг.15 наводить графічну ілюстрацію ефективності сполуки R921302 щодо інгібувannya аутоімунного енцефаломієліту (EAE) у мишах, що являє собою клінічну модель розсіяного склерозу, та

Фіг.16 наводить графічну ілюстрацію ефективності сполуки R921302 при дослідженні на мишах SJL, яким у перший день імунізації ввели дозу 150мкг PLP 139-151/200мкг МТВ (CFA).

Визначення

Наступні терміни, які використовуються в даному тексті, мають наведені нижче значення:

"Алкіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до насиченого або ненасиченого моновалентного вуглеводневого радикалу з розгалуженою, нерозгалуженою або циклічною структурою, що має встановлене число атомів вуглецю (так, C1-C6 означає один до шести атомів вуглецю), і отримується усуненням одного атома водню з одного атому вуглецю вихідного алкану, алкену або алкіну. Типові групи алкілів включають, але не обмежуються наступними: метил; етили, такі як етаніл, етеніл, етиніл; пропіли, такі як пропан-1-іл, пропан-2-іл, циклопропан-1-іл, проп-1-ен-1-іл, проп-1-ен-2-іл, проп-2-ен-1-іл, циклопроп-1-ен-1-іл, циклопроп-2-ен-1-іл, проп-1-ін-1-іл, проп-2-ін-1-іл, тощо; бутіли, такі як бутан-1-іл, бутан-2-іл, 2-метил-пропан-1-іл, 2-метил-пропан-2-іл, циклобутан-1-іл, бут-1-ен-1-іл, бут-1-ен-2-іл, 2-метил-проп-1-ен-1-іл, бут-2-ен-1-іл, бут-2-ен-2-іл, бута-1,3-діен-1-іл, бута-1,3-діен-2-іл, циклобут-1-ен-1-іл, циклобут-1-ен-3-іл, циклобута-1,3-діен-1-іл, бут-1-ін-1-іл, бут-1-ін-3-іл, бут-3-ін-1-іл, тощо; та подібні. Там де маються на увазі певні рівні насичення, використовуються терміни "алканіл", "алкеніл" та/або "алкініл", як визначено нижче. У переважних варіантах здійснення винаходу, групи алкілів являють (C1-C6) алкіл.

"Алканіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до насиченого або ненасиченого алкілу з розгалуженою, нерозгалуженою або циклічною структурою, отриманого усуненням одного атома водню з одичного атому вуглецю вихідного алкану. Типові групи алканілів включають, але не обмежуються наступними: метаніл; етаніл; пропаніли, такі як: пропан-1-іл, пропан-2-іл (ізопропіл), циклопропан-1-іл, тощо; бутаніли, такими як: бутан-1-іл, бутан-2-іл (лес-бутил), 2-метил-пропан-1-іл (ізобутил), 2-метил-пропан-2-іл (t-бутил), циклобутан-1-іл, тощо; та подібні. У переважних варіантах здійснення винаходу, алканіл-групи являють (C1-C6) алканіл.

"Алкеніл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до насиченого або ненасиченого алкілу з розгалуженою, нерозгалуженою або циклічною структурою, що має принаймні один вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок та отримується усуненням одного атома водню з одного атому вуглецю початкового алкену. Ця група може мати цис-або транс-конфігурацію навколо подвійного зв'язку. Типові групи алкенілів включають, але не обмежуються наступними: етеніл; пропеніли, такі як: проп-1-ен-1-іл, проп-1-ен-2-іл, проп-2-ен-1-іл, проп-2-ен-2-іл, циклорпроп-1-ен-1-іл; циклопроп-2-ен-1-іл; бутеніли, такі як: бут-1-ен-1-іл, бут-1-ен-2-іл, 2-метил-проп-1-ен-1-іл, бут-2-ен-1-іл, бут-2-ен-2-іл, бута-1,3-діен-1-іл, бута-1,3-діен-2-іл, циклобут-1-ен-1-іл, циклобут-1-ен-3-іл, циклобута-1,3-діен-1-іл, тощо; та подібні. У переважних варіантах здійснення винаходу, алкеніл-група являє (C2-C6) алкеніл.

"Алкініл" самостійно, або як частина іншого замітника, відноситься до насиченого або ненасиченого алкілу з розгалуженою, нерозгалуженою або циклічною структурою, що має принаймні один вуглець-вуглецевий потрійний

зв'язок та отримується усуненням одного атома водню з одного атому вуглецю вихідного алкіну. Типові групи алкінілів включають, але не обмежуються наступними: етиніл; пропініли, такі, як проп-1-ін-1-іл, проп-2-ін-1-іл, тощо; бутініли, такі, як бут-1-ін-1-іл, бут-1-ін-3-іл, бут-3-ін-1-іл, тощо; та подібні. У переважних варіантах здійснення винаходу, алкініл-група являє (C2-C6) алкініл.

"Алкілдііл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до насиченої або ненасиченої двувалентної групи вуглеводнів з розгалуженою, нерозгалуженою або циклічною структурою, що має встановлене число атомів вуглецю (наприклад, C1-C6 означає від одного до шести атомів вуглецю), і отримується усуненням одного атома водню з кожного від двох різних атомів вуглецю вихідного алкану, алкену або алкіну, або усуненням двох атомів водню з одинарного атома вуглецю, вихідного алкану, алкену або алкіну. Два моновалентних радикальних центра або кожна валентність двувалентного радикального центру можуть утворювати зв'язок з тими же або різними атомами. Типові групи алкілдіїлів включають, але не обмежуються наступними: метандііл; етилдііли, такі як етан-1,1-дііл, етан-1,2-дііл, етен-1,1-дііл, етен-1,2-дііл; пропілдііли, такі як пропан-1,1-дііл, пропан-1,2-дііл, пропан-2,2-дііл, пропан-1,3-дііл, циклопропан-1,1-дііл, циклопропан-1,2-дііл, проп-1-ен-1,1-дііл, проп-1-ен-1,2-дііл, і проп-2-ен-1,2-дііл, проп-1-ен-1,3-дііл, циклопроп-1-ен-1,2-дііл, циклопроп-2-ен-1,2-дііл, циклопроп-2-ен-1,1-дііл, проп-1-ін-1,3-дііл, тощо; бутилдііли, такі як бутан-1,1-дііл, бутан-1,2-дііл, бутан-1,3-дііл, бутан-1,4-дііл, бутан-2,2-дііл, 2-метил-пропан-1,1-дііл, 2-метил-пропан-1,2-дііл, циклобутан-1,1-дііл; циклобутан-1,2-дііл, циклобутан-1,3-дііл, бут-1-ен-1,1-дііл, бут-1-ен-1,2-дііл, бут-1-ен-1,3-дііл, бут-1-ен-1,4-дііл, 2-метил-проп-1-ен-1,1-дііл, 2-метаніледин-пропан-1,1-дііл, бута-1,3-діен-1,1-дііл, бута-1,3-діен-1,2-дііл, бута-1,3-діен-1,3-дііл, бута-1,3-діен-1,4-дііл, циклобут-1-ен-1,2-дііл, циклобут-1-ен-1,3-дііл, циклобут-2-ен-1,2-дііл, циклобута-1,3-діен-1,2-дііл, циклобута-1,3-діен-1,3-дііл, бут-1-ін-1,3-дііл, бут-1-ін-1,4-дііл, бута-1,3-диін-1,4-дііл, тощо, та подібні. Якщо маються на увазі певні рівні насичення, використовуються терміни "алканілдііл", "алкенілдііл" та/або "алкінілдііл". Якщо передбачається, що задіяні дві валентності того ж самого атому вуглецю, використовується найменування "алкіліден". У переважних варіантах здійснення винаходу, алкілдііл-група являє (C1-C6) алкілдііл. Також перевага віддається насиченим нециклічним групам алканілдіїлів, у яких радикальні центри знаходяться біля кінцевих атомів вуглецю, наприклад, метандііл (метано); етан-1,2-дііл (етано); пропан-1,3-дііл (пропано); бутан-1,4-дііл (бутано); та подібні (також відомі як алкілени, які визначені нижче).

"Алкілен-" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до нерозгалуженої насиченої або ненасиченої групи алкілдіїлів, маючих два кінцевих моновалентних радикальних центри, отриманих усуненням одного атома водню

з кожного з двох кінцевих атомів вуглецю нерозгалуженого початкового алкану, алкену або алкіну. Позначення подвійного або потрійного зв'язку, якщо він існує, в певних алкілен-групах вказується у квадратних дужках. Типові алкілен-групи включають, але не обмежуються наступними: метан-, етилен-, такі як етан-, етен-, етін-, пропілен-, такі як пропан-, проп[1]ен-, проп[1,2]ієн-, проп[1]ін-, тощо; бутилен-, такі як бутан-, бут[1]ен-, бут[2]ен-, бута[1,3]дієн-, бут[1]ін-, бут[2]ін-, бута[1,3]діін-, тощо; та подібними. Якщо маються на увазі специфічні рівні насичення, то використовуються терміни "алкан-", "алкен-" та/або "алкін-". У переважних варіантах здійснення винаходу, алкілен-група являє (C1-C6) або (C1-C3) алкілен-. Перевага також віддається нерозгалуженим насиченим групам алкан-, наприклад, метан-, етан-, пропан-, бутан-, та подібним.

"Гетеро алкіл", "Гетероалканіл", "Гетероалкеніл", "Гетероалкініл", "Гетероалкілділ" та "Гетероалкілен" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до груп алкілів, алканілів, алкенілів, алкінілів, алкілділів та алкіленів, відповідно, у яких один або більше атомів вуглецю незалежно заміщені тими ж, або різними гетероатомами або гетероатомними групами. Типові гетероатоми та/або гетероатомні групи, які можуть заміщати атоми вуглецю, включають, але не обмежуються наступними: O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, та подібними, включаючи їх комбінації, де кожний R' незалежно є воднем або (C1-C6) алкілом.

"Циклоалкіл" та "Гетероциклоалкіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до циклічної версії груп "алкілів" та "гетероалкілів" відповідно. Для груп гетероалкілів, гетероатом може займати позицію, у якій він з'єднується з рештою молекули. Типові групи циклоалкілів включають, але не обмежуються наступними: циклопропіли; циклобутили, такі як циклобутаніл та циклобутеніл; циклопентіли, такі як циклопентаніл та циклопентеніл; циклогексіли, такі як циклогексаніл та циклогексеніл; та подібні. Типові групи гетероциклоалкілу включають, але не обмежуються наступними: тетрагідрофураніли (наприклад, тетрагідрофуран-2-іл, тетрагідрофуран-3-іл, тощо), піперидініли (наприклад, піперидін-1-іл, піперидін-2-іл, тощо), морфолініли (наприклад, морфолін-3-іл, морфолін-4-іл, тощо), піперазиніли (наприклад, піперазін-1-іл, піперазін-2-іл, тощо), та подібні.

"Нециклічний гетероатомний міст" відноситься до двувалентного мосту, початкові атоми якого являють виключно гетероатоми та/або гетероатомні групи. Типові нециклічні гетероатомні містки включають, але не обмежуються наступними: O-, -S-, -S-O-, -NR'-, -PH-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR'-, -S(O)₂NR'-, та подібні, включаючи їх комбінації, де кожний R' радикал самостійно являє атом водню або (C1-C6) алкіл-групу.

"Вихідна система ароматичних кілець" відноситься до ненасиченої циклічної або поліциклічної системи кілець, що має спряжену

систему π-електронів. До визначення "вихідної системи ароматичних кілець" конкретно відносяться спаяні системи кілець, що мають одне або декілька ароматичних кілець, та одне або декілька насичених або ненасичених кілець, такі як, наприклад, флуорен, індан, інден, фенален, тетрагідронафталін, тощо. Типові вихідні системи ароматичних кілець включають, але не обмежуються наступними: ацеантрилен, аценафтілен, ацефенантрілен, антрацен, азулен, бензол, крисен, коронен, флуорантен, флуорен, гексацен, гексафен, гексалин, індацен, s-індацен, індан, інден, нафталін, октацен, октафен, октален, овален, пента-2,4-дієн, пентацен, пентален, пентафен, перилен, фенален, фенантрен, піцен, плеіацен, пірен, пірантрен, рубіцен, тетрагідронафталін, трифенілен, тринафталін, та подібними, а також різноманітні гідроізмери вказаних сполук.

"Аріл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до моновалентної групи ароматичних вуглеводнів з встановленою кількістю атомів вуглецю (так, C5-C15 означає від 5 до 15 атомів вуглецю) і отриманих шляхом відділення одного атома водню з одиночного атому вуглецю вихідної системи ароматичних кілець. Типові групи арілів включають, але не обмежуються групами, одержаними з наступних: ацеантрилену, аценафтілену, ацефенантрілену, антрацену, азулену, бензолу, хрисену, коронену, флуорантену, флуорену, гексацену, гексафену, гексалину, as-індацену, s-індацену, індану, індену, нафталіну, октацену, октафену, окталену, овалену, пента-2,4-дієну, пентацену, пенталену, пентафену, перилену, феналену, фенантреноу, піцену, плеіацену, пірену, пірантреноу, рубіцену, трифенілену, тринафталіну, та подібними, а також різноманітними гідроізмерами вказаних сполук. У переважних варіантах здійснення винаходу група арілу являє (C5-C15) аріл, або переважно зі структурою (C5-C10). Найбільш переважними арілами є циклопентадієніл, феніл та нафтіл.

"Аріларіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до моновалентної групи вуглеводнів, отриманої шляхом відділення одного атома водню з окремого атому вуглецю кільцевої системи, у якій два або декілька ідентичних або неідентичних вихідних систем ароматичних кілець з'єднані безпосередньо одна з одною одинарним зв'язком, у якому кількість таких прямих кільцевих сполучень на один менше, ніж кількість задіяних вихідних систем ароматичних кілець. Типові групи аріларілів включають, але не обмежуються наступними: біфенілом, трифенілом, феніл-нафтілом, бінафтілом, біфеніл-нафтілом, та подібними. Якщо вказана кількість атомів вуглецю у аріларільній групі, то це число дорівнює числу атомів вуглецю, що містяться в кожному вихідному ароматичному кільці. Наприклад, (C5-C15) аріларіл являє аріларільну групу, у якій кожне ароматичне кільце містить від 5 до 15 атомів вуглецю, наприклад, біфеніл, трифеніл, бінафтіл, фенілнафтіл, тощо. Бажано, щоб кожна вихідна система ароматичних кілець аріларільної групи була незалежною ароматичною системою (C5-C15), а краще, системою (C5-C10). Також

бажаними являються аріларільні групи, що мають ідентичні вихідні системи ароматичних кілець, наприклад, біфеніл, трифеніл, бінафтіл, тринафтіл, тощо.

"Біаріл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до групи аріларілу, що має дві ідентичні вихідні ароматичні системи, безпосередньо з'єднані одинарним зв'язком. Типові групи біарілу включають, але не обмежуються наступними: біфеніл, бінафтіл, біантраціл, та подібні. Бажано, щоб системи ароматичних кілець являли ароматичні кільця (C5-C15), а краще (C5-C10) кільця. Особливо бажано, щоб біарильна група являла собою біфеніл.

"Арілалкіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до групи нециклічного алкілу, у якій один з атомів водню, зв'язаний з атомом вуглецю, типово, кінцевим або sp^3 -атомом вуглецю, заміщений арільною групою. Типові групи арілалкілів включають, але не обмежуються наступними: бензилом, 2-фенілетан-1-ілом, 2-фенілетен-1-ілом, нафтилметилом, 2-нафтилетан-1-ілом, 2-нафтилетен-1-ілом, нафтобензилом, 2-нафтофенілетан-1-ілом та подібними. У випадку певних алкільних сполук використовуються терміни "арілакканіл", "арілакеніл" та/або "арілалкініл". У переважних варіантах здійснення винаходу, групи арілалкілу являють (C6-C21) арілалкіл, наприклад, алканільний, алкенільний або алкінільний фрагмент арілалкільної групи має (C1-C6) структуру, а арільний фрагмент має (C5-C15) структуру. У переважних варіантах здійснення винаходу, перевага надається групі арілалкілу зі структурою (C6-C13), наприклад, алканільний, алкенільний або алкінільний фрагмент арілалкільної групи має структуру (C1-C3), а арільний фрагмент має структуру (C5-C10).

"Початкова система гетероароматичних кілець" відноситься до початкової системи ароматичних кілець, у якій один або декілька атомів вуглецю незалежно одні від одного заміщені однаковими або різними гетероатомами або гетероатомними групами. Ці типові гетероатоми або гетероатомні групи включають, але не обмежуються наступними: b-N, NH, P, O, S, S(O), S(O)₂, Si, тощо. До визначення "початкова система гетероароматичних кілець" конкретно відносяться системи спаяних кілець з одним або декількома ароматичними кільцями та одним або декількома насиченим або ненасиченим кільцем, як наприклад, бензодіоксан, бензофуран, хроман, хромін, індол, індолин, ксантін, тощо. До визначення "початкова система гетероароматичних кілець" також відносяться відомі кільця, що містять загальні групи заміщення, як наприклад, бензопірон та 1-метил-1,2,3,4-тетразол. До визначення "початкової системи гетероароматичних кілець" не відносяться кільця бензолу, спаяні з циклічними поліалкіленовими гликолями, такими як циклічні поліетиленові гликолі. Типова початкова система гетероароматичних кілець включає, але не обмежуються наступними: акрідин, бензімідазол, бензісоксазол, бензодіоксан, бензодіоксол, бензофуран, бензопірон, бензотіадіазол, бензотіазол, бензотриазол, бензоксаксин,

бензоксазол, бензоксазолін, карбазол, β-карболин, хроман, хромін, циннолин, фуран, імідазол, індазол, індол, індолін, індолізин, ізобензофуран, ізохромін, ізоіндол, ізоіндолин, ізохінолін, ізотіазол, ізоксазол, нафтирідин, оксадіазол, оксазол, перимідин, фенантридин, фенантролін, феназин, фталазин, птерідин, пурин, піран, піразин, піразол, пірадазин, пірідин, піримідин, пірол, піролізин, хіназолін, хінолін, хінолізин, хіноксалин, тетразол, тіадіазол, тіазол, тιοфен, триазол, ксантен, та подібні.

"Гетероаріл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до моновалентної гетероароматичної групи з встановленою кількістю атомів кільця (наприклад, "5-14-членний" означає кількість кільцевих атомів від 5 до 14), отриманої видаленням одного атома водню з визначеного атому початкової системи гетероароматичних кілець. Типові групи гетероарілу включають, але не обмежуються групами, одержаними з наступних: акрідину, бензімідазолу, бензісоксазолу, бензодіоксану, бензодіаксолу, бензофурану, бензопірону, бензотіадіазолу, бензотіазолу, бензотриазолу, бензоксазину, бензоксазолу, бензоксазоліну, карбазолу, β-карболіну, хроману, хромену, циноліну, фурану, імідазолу, індазолу, індолу, індоліну, індолізіну, ізобензофурану, ізохромену, ізоіндолу, ізоіндоліну, ізохіноліну, ізотіазолу, ізоксазолу, нафтирідину, оксадіазолу, оксазолу, перимідину, фенантридину, фенантроліну, феназину, фталазину, птерідину, пурину, пірану, піразину, піразолу, пірадазину, пірідину, піримідину, піролу, піролізіну, хіназоліну, хіноліну, хінолізіну, хіноксалину, тетразолу, тіадіазолу, тіазолу, тιοфену, триазолу, ксантіну, та подібних, а також різноманітних гідроізомерів вказаних сполук. У переважних варіантах здійснення винаходу, перевага надається групі 5-14-членного гетероарілу, а особливо, 5-10-членному гетероарілу.

"Гетероаріл-гетероаріл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до моновалентної гетероароматичної групи, одержаної відділенням одного атома водню від визначеного атому кільцевої системи, у якій дві або більше ідентичних або неідентичних початкових систем гетероароматичних кілець безпосередньо з'єднані одна з одною одинарним зв'язком, у якому кількість таких кільцевих сполучень на одну менше, ніж кількість задіяних початкових систем гетероароматичних кілець. Типові гетероаріл-гетероаріл групи включають, але не обмежуються біпіридиллом, трипіридиллом, піридилпуринілом, біпуринілом, тощо. При заданому числі атомів, ці числа відносяться до кількості атомів, що складають кожну з початкових систем гетероароматичних кілець. Наприклад, 5-15-членний гетероаріл-гетероаріл являє групу гетероаріл-гетероарілу, у якій кожна початкова система гетероароматичних кілець містить від 5 до 15 атомів, наприклад, біпіридил, трипіридил, тощо. Бажано, щоб кожна початкова система гетероароматичних кілець являла незалежно 5-15-членну гетероароматичну систему, а краще -5-10-членну гетероароматичну систему. Також перевага надається гетероаріл-гетероаріл групам,

у яких всі початкові системи гетероароматичних кілець ідентичні.

"Бігетероаріл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до гетероаріл-гетероаріл групи, що має дві ідентичні початкові системи гетероароматичних кілець, з'єднаних безпосередньо одна з одною одинарним зв'язком. Типові групи бігетероарілів включають, але не обмежуються біпіридіолом, біпіриніолом, біхінолініолом, та подібними. Перевага віддається системам з 5-15-членними гетероароматичними кільцями, а краще з 5-10-членними гетероароматичними кільцями.

"Гетероаріалалкіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до нециклічної групи алкілу, у якій один з атомів водню, зв'язаний з атомом вуглецю, типово, кінцевого або sp^3 -атому вуглецю, заміщається групою гетероарілу. У випадку конкретних алкільних сполук використовуються такі найменування як гетероаріалканіл, гетероарілакеніл та/або гетероаріалалканіл. У переважних варіантах здійснення винаходу, гетероаріалалкільна група являє собою 6-21-членний гетероаріалалкіл, наприклад, алканільний, алкенільний або алкінільний фрагмент гетероаріалалкілу являє алкіл зі структурою (C1-C6), а гетероарільний фрагмент являє 5-15-членний гетероаріл. Особиста перевага надається 6-13-членним гетероаріалалкілам, наприклад, алканільний, алкенільний або алкінільний фрагмент гетероаріалалкілу являє алкіл зі структурою (C1-C3), а гетероарільний фрагмент являє 5-10-членний гетероаріл.

"Галоген" або "Галоїдо" самостійно або як частина іншого замітника взагалі відноситься до фтор-, хлор-, бром-та іод-групам.

"Галоїдоалкіл" самостійно або як частина іншого замітника відноситься до групи алкілу, у якій один або більше атомів водню заміщається галогеном. Таким чином, термін "галоїдоалкіл" об'єднує моногалоїдоалкіли, дігалоїдоалкіли, тригалоїдоалкіли, тощо, включаючи пергалоїдоалкіли. Наприклад, вираз "(C1-C2) галоїдоалкіл" включає фторметил, дифторметил, трифторметил, 1-фторетил, 1,1-дифторетил, 1,2-дифторетил, 1,1,1-трифторетил, перфторетил, тощо.

Вищенаведені групи можуть включати префікси та/або суфікси, що загально використовуються з метою утворення додаткових, добре відомих груп заміщення. Наприклад, "алкілокс" або "алкокс" відноситься до групи формули -OR", "алкіламін" відноситься до групи формули -NHR" та "сіалкіламін" відноситься до групи формули -NR"R", де кожний R" незалежно являє алкіл. У іншому прикладі "галоїдоалкокс" або "галоїдоалкілокс" відноситься до групи формули -OR"" , де R"" являє собою галоїдоалкіл.

"Захисна група" відноситься до групи атомів, що маскують, зменшують або блокують реактивність функціональної групи, якщо вони приєднані до реактивної функціональної групи у молекулі. Типово, захисну групу можна селективно видалити в процесі синтезу. Приклади захисних груп можна знайти у [книзі Гріна та Ватса "Захисні

групи в органічній хімії", 3-е видання, 1999р., вид-во Дж. Уайлі енд Соне, Нью-Йорк (Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, 3rd Ed., 1999, John Wiley & Sons, NY), а також у книзі Харрісона та ін. короткий огляд методів синтетичної органіки", т.1-8, 1971-1996р., Джон Уайлі енд Соне, Нью-Йорк (Harrison et al, Compendium of Synthetic Organic Methods, Vols.1-8, 1971-1996, John Wiley & Sons, NY)]. Репрезентативні амінозахисні групи включають, але не обмежуються наступними: форміл, ацетил, трифторацетил, бензил, бензилоксикарбоніл ("CBZ"), трет-бутоксикарбоніл ("BOC"), триметилсиліл ("TMC"), 2-триметилсиліл-етанесульфоніл ("TEC"), тритіл та заміщені тритіл-групи, алілоксикарбоніл, 9-фторенілметилоксикарбоніл ("FMOC"), нітро-вератрилоксикарбоніл ("NVOC") та подібні. Представники гідроксильних захисних груп включають, але не обмежуються тими, де гідроксильна група є ацильована або алкілована, як наприклад, ефіри бензилу та тритілу, а також ефіри алкілу, ефіри тетрагідропіранілу, ефіри триалкілсилілу (наприклад, груп TMC або TIPPS) та ефіри алілу.

"Проліки" відноситься до похідної активної сполуки 2,4-піримідиндіаміну (ліків), яка потребує трансформації за умов застосування, наприклад всередині тіла, з метою виділення активного 2,4-піримідиндіаміну. Проліки часто, але не обов'язково, фармакологічно неактивні, доки їх не перетворять у активні ліки. Проліки типово отримують в результаті маскування функціональної групи, яка входить до складу ліків, що містять 2,4-піримідиндіамін, з метою активування прогрупи (визначеної нижче) для подальшого формування прокомпоненту, який потім зазнає трансформацію, як наприклад, розщеплення за конкретних умов застосування з метою виділення функціональної групи, а отже й ліків, що містять активну форму 2,4-піримідиндіаміну. Розщеплення прокомпонентів може відбуватись спонтанно, наприклад шляхом реакції гідролізу, або під впливом каталізатору чи іншого агенту, наприклад ферменту, світла, кислоти або луга, а також в результаті зміни або впливу будь-якого фізичного параметру або середовища, як наприклад, зміна температури. Агент може бути ендегенним (внутрішнім) з точки зору умов застосування, наприклад фермент, присутній у клітинах, для яких ці ліки призначені, або кислотні умови шлунку, або він може застосовуватись екзогенно.

Широкий різновид прогруп і прокомпонентів, придатних для маскування функціональних груп в активних 2,4-піримідиндіамінових сполуках з метою отримання проліків, добре відомий на практиці. Наприклад, гідроксильна функціональна група може бути замаскована як сульфат, ефір або як частка карбонату, який може бути гідролізований *in vivo* для утворення гідроксильної групи. Аміно-функціональна група може бути замаскована як амід, карбамат, імін, сечовина, фосфеніл, фосфоріл або прокомпонент сульфенілу, які можуть бути гідролізовані *in vivo* з метою отримання аміно групи. Карбоксильна група

може бути замаскована як складний ефір (включаючи силілові ефіри та тіоефіри), прокомпонент аміду або гідразиду, який може бути гідролізований *in vivo* з отриманням карбоксильної групи. Інші характерні приклади придатних прогруп та їхніх відповідних прокомпонентів будуть очевидними для фахівців у цій галузі.

"Прогрупа" відноситься до типу захисної групи, що при використанні з метою маскування функціональної групи в ліках, що містять активний 2,4-піримідиндіамін, для формування прокомпоненту, перетворює ліки в проліки. Прогрупи типово з'єднуються з функціональними групами ліків через зв'язки, які можуть розпадатися за зазначених умов застосування. Таким чином, прогрупа є тою часткою прокомпоненту, що розпадається для вивільнення функціональної групи при зазначених умовах застосування. Як конкретний приклад можна навести прокомпонент аміду, що має формулу NH-C(O)CH_3 і містить прогрупу -C(O)CH_3 .

"Fc-Рецептор" відноситься до члену родини молекул клітинної поверхні, що зв'язує Fc-частину імуноглобуліну (яка містить специфічну константну область). Кожний Fc-рецептор зв'язує імуноглобуліни певного типу. Наприклад, $\text{Fc}\alpha$ -рецептор (" $\text{Fc}\alpha\text{R}$ ") зв'язує IgA, $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ зв'язує IgE та $\text{Fc}\gamma\text{R}$ зв'язує IgG.

$\text{Fc}\alpha\text{R}$ -родина включає полімерний Ig-рецептор, задіяний в епітеліальному переносі IgA/IgM, мікродічний специфічний рецептор $\text{R}\alpha\text{RI}$ (який також називається CD89), $\text{Fc}\alpha/\mu\text{R}$, та принаймні два альтернативних IgA рецепторів [див. Monteiro & van de Winkel, 2003, Annu. Rev. Immunol., advanced e-publication]. $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ виражається на нейтрофілах, еозінофілах, моноцитах/макрофагах, дендритних клітинах та купфер-клітинах. $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ складається з одного альфа-ланцюга та FcR гамма гомодімеру, що несе мотив активації (ITAM) у цитоплазмичній області та фосфорилує Syk-кіназу.

Родина $\text{Fc}\epsilon\text{R}$ включає два типи рецепторів, що зветься $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ та $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ (також відомий як CD23). $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ являє собою рецептор з високою спорідненістю (зв'язує IgE зі спорідненістю близько 10^{10}M^{-1}), що знаходиться на тучних клітинах, базофілах та еозінофільних клітинах, які утримують мономерний IgE на поверхні клітини. $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ має один альфа-ланцюг, один бета-ланцюг та гомодімерний гамма-ланцюг, описаний вище. $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ являє рецептор з низькою спорідненістю, виражений на моноядрових фагоцитах, В-лімфоцитах, еозінофілах та тромбоцитах. $\text{Fc}\epsilon\text{RII}$ містить одинарний поліпептидний ланцюг, та не включає гомодімер гамма-ланцюга.

Родина $\text{Fc}\gamma\text{R}$ включає три типи, які називаються $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (також відомий як CD64), $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ (також відомий як CD32), та $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (також відомий як CD 16). $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ являє собою рецептор з високою спорідненістю (зв'язує IgG1 зі спорідненістю біля 10^8M^{-1}), який знаходиться на тучних клітинах, базофілах, мононуклеарних клітинах, нейтрофілах, еозінофільних, дендритових та фагоцитових клітинах, і утримує мономерний IgG на поверхні клітини. $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ включає один альфа-

ланцюг та димер гамма-ланцюга, який входить до $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ та до $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$.

$\text{Fc}\gamma\text{RII}$ являє рецептор з низькою спорідненістю, виражений на нейтрофілах, моноцитах, еозінофілах, тромбоцитах та В-лімфоцитах. $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ включає один альфа-ланцюг, та не включає гомодімер гамма-ланцюга, який описано вище.

$\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ являє рецептор з низькою спорідненістю (зв'язує IgG1 зі спорідненістю $5 \times 10^5\text{M}^{-1}$), виражений на NK, еозінофілах, макрофагах, нейтрофілах та тучних клітинах. Він містить один альфа ланцюг та гамма гомодімер, який входить до $\text{Fc}\alpha\text{RI}$, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ та $\text{Fc}\gamma\text{RI}$.

Фахівці у даній галузі погодяться, що запропонована структура субодиниць та зв'язуючих характеристик цих різноманітних Fc-рецепторів, а також типи клітин, що їх виражають, охарактеризовані не повністю. Наведена вище лише відображає загальну картину сучасного стану щодо цих рецепторів [див. наприклад, Immunobiology: The Immune System in Health & Disease, 5th Edition, Janeway et al., Eds, 2001, ISBN 0-8153-3642-x, Figure 9.30 at pp.371], та не спрямована на обмеження набору сигнальних каскадів рецепторів, які можна регулювати сполуками, описаними в даній заяві.

"Дегрануляція, опосередкована Fc-Рецептором" або "Дегрануляція, обумовлена Fc-Рецептором" відноситься до дегрануляції, яка відбувається за допомогою сигнального трансдукційного каскаду Fc-рецептору, ініційованого зшиванням Fc рецептора.

"Дегрануляція, обумовлена IgE" або "Дегрануляція, опосередкована $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ " відноситься до дегрануляції, яка відбувається за допомогою сигнального трансдукційного каскаду IgE-рецептору, ініційованого зшиванням IgE, зв'язаного за допомогою $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$. Пережресне зшивання може бути викликано алерген-специфічним IgE, або іншим багатовалентним зв'язуючим агентом, таким як анти-IgE антитіло. На Фіг. 2, у тучних та/або базофільних клітинах, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -сигнальний каскад, ведучий до дегрануляції, можна розбити на дві стадії: зворотню та пряму. Зворотна стадія включає всі процеси, які відбуваються перед мобілізацією іону кальція (ілюстрована як " Ca^{2+} " на Фіг.2; див. також Фіг.3). Пряма стадія включає мобілізацію іонів кальцію та всі її наступні прямі процеси. Сполуки, що інгібують $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -опосередковану дегрануляцію, можуть діяти на будь-якому етапі в напрямку $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -опосередкованого сигнального трансдукційного каскаду. Сполуки, які вибірково інгібують дегрануляцію, опосередковану $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, у зворотному напрямку, діють так з метою інгібування тієї частини сигнального каскаду $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ у зворотному напрямку від точки, у якій викликається мобілізація іонів кальцію. У клітинних аналізах спостерігається, що сполуки, які вибірково інгібують $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -опосередковану дегрануляцію в зворотному напрямку, також інгібують дегрануляцію таких клітин, як тучні або базофіли, які активуються або стимулюються алерген-специфічним IgE або зв'язуючим агентом

(таким як анти-IgE антитіло), але помітно не інгібують дегрануляцію клітин, які активуються або стимулюються агентами дегрануляції, що обходять Fc ϵ RI-сигнальний шлях, такими як наприклад іонофор кальцію-іономіцин та A23187.

"IgG-обумовлена Дегрануляція" або "Дегрануляція, опосередкована Fc γ RI" відноситься до дегрануляції, яка відбувається за допомогою сигнального трансдукційного каскаду Fc γ RI-рецепторів, ініційованого перехресним зшиванням IgG, зв'язаного за допомогою Fc γ RI. Перехресне зшивання може бути ініційоване алерген-специфічним IgE або іншим багатовалентним зв'язуючим агентом, наприклад анти-IgG або фрагментом антитіла. Також як і сигнальний каскад Fc ϵ RI-рецепторів, сигнальний каскад Fc γ RI-рецепторів у тучних та базофільних клітинах призводить до дегрануляції, яку можна розбити на ті ж дві стадії: зворотну та пряму. Подібно до Fc ϵ RI-опосередкованої дегрануляції, сполуки, що селективно інгібують дегрануляцію, опосередковану Fc γ RI у зворотному напрямку, діють в зворотному напрямку від точки, у якій спонукається мобілізація іонів кальцію. У клітинних дослідженнях спостерігається, що сполуки, які вибірково інгібують дегрануляцію, опосередковану Fc γ RI у зворотному напрямку, також інгібують дегрануляцію клітин, таких як мастоцити або базофіли, що активуються або стимулюються алерген-специфічним IgE або зв'язуючим агентом (таким як анти-IgG антитіло або його фрагментом), але помітно не інгібують дегрануляцію клітин, які активуються або стимулюються дегрануючими агентами, що обходять сигнальний шлях Fc γ RI, наприклад, іонофор кальцію-іономіцин та A23187.

"Дегрануляція, обумовлена Іонофором" або "Іонофор-опосередкована Дегрануляція" відноситься до дегрануляції клітини, такої як тучна або базофільна, що відбувається в результаті впливу іонофору кальцію, такого як, наприклад, іономіцин або A23187.

"Сук-кіназа" відноситься до добре відомої тирозинкінази протеїну селезінки не-рецептору 72kDa (цитоплазматичного), експресованій у В-клітинах та інших гематопоетичних клітинах. Сук-кіназа включає два послідовних консенсусних домени Src-гомології 2(SH2), які зв'язуються з фосфорильованими мотивами імунорецепторів, базованих на тирозині (МІБТ), лінкерні домени та каталітичні домени [для перегляду структури та функції Сук-кінази, див. Sada et al., 2001, J. Biochem. (Tokyo) 130:177-186 ; див. також Turner et al., 2000, Immunology Today 21:148 -154]. Сук-кіназа інтенсивно вивчалася як впливаючий фактор на сигнальний рецептор В-клітин (BCR) [Turner et al., 2000, supra]. Сук-кіназа є також критичним фактором для фосфорилування тирозину багатьох протеїнів, які регулюють важливий шлях, ведучий від імунорецепторів, таких як каскади мобілізації Ca²⁺ та мітоген-активовані каскади протеїнкінази (МАРК) (див. Фіг.2) та дегрануляції. Сук-кіназа також грає критичну роль у сигналюванні інтегрину у нейтрофілах [див., наприклад, Mocsai et al. 2002, Immunity 16:547 -558].

Як прийнято у даній заяві, Сук-кіназа включає кіназу будь-якого виду тварин, включаючи але не обмежуючись людиною, мавпами, худобою, свинями, гризунами, тощо, що належать до Сук родини. До цієї групи спеціально включені ізоформи, варіанти сплайсінгу, алельні різновиди, мутанти природного та штучного походження. Амінокислотні послідовності таких Сук-кіназ добре відомі та доступні через GENBANK (банк генетичного матеріалу). Специфічні приклади mRNAs-кодування різних ізоформ людської Сук-кінази можна знайти у GENBANK за наступними номерами: gi|21361552|reflNM_003177.2|, gi|496899|emb|Z29630.1|HSSYKPTK [496899] та gi|15030258|gb|BC011399.1|JBC011399 [15030258], які включені у цю заяву як посилання.

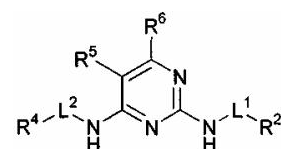
Досвідчені фахівці оціняють, що тирозинкінази, які належать до інших родин, можуть мати активні місця або зв'язуючі кишені з трьохмірною структурою, подібною до Сук-структури. В результаті цієї структурної подібності, вважається, що такі кінази, далі -"Сук імітатори", можуть служити каталізаторами фосфорилування субстратів, які фосфорилуються за допомогою Сук-кінази. Таким чином, стає зрозумілим, що такі Сук-імітатори, каскади трансдукції сигналів, у яких такі Сук імітатори грають роль, та біологічні реакції, що мають місце завдяки цим Сук-імітаторам та сигнальним каскадам, залежним від таких Сук-імітаторів, можна регулювати, та зокрема інгібувати за допомогою сполук 2,4-піримідиндіамінів, описаних у даній заяві.

"Сук-Залежний Сигнальний Каскад" відноситься до каскаду трансдукції сигналів, у якому грає роль Сук-кіназа. Необмежуючі приклади таких Сук-залежних сигнальних каскадів включають Fc ϵ RI, Fc ϵ RI I, Fc γ RI, Fc γ RIII, BCR та сигнальні каскади інтегрину.

До "Аутоімунних захворювань" відносять захворювання, що звичайно пов'язані з неанафілактичними реакціями гіперчутливості (реакції гіперчутливості типу II, типу III, та/ або типу IV), які обумовлені клітинно-опосередкованою та/або гуморальною імунною відповіддю організму на один або декілька імуногенних речовин ендogenous та/або екзогенного походження. Ці аутоімунні захворювання відрізняються від захворювань, пов'язаних з анафілактичними реакціями гіперчутливості (типу I або опосередкованими IgE).

Сполуки 2,4-піримідиндіамінів

Сполуки даного винаходу в основному являють собою 2,4-піримідиндіамінові сполуки зі структурною формулою (I):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де:

L¹ та L² кожний, незалежно один від одного, вибираються з групи, що містить прямий зв'язок та лінкер;

R^2 вибирається з групи, що містить (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними R^8 групами, (C3-C8) циклоалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , циклогексил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , 3-8-членний циклогетероалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , (C5-C15) арил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , феніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 та 5-15-членний гетероаріл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 ;

R^4 вибирається з групи, що містить водень, (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , (C3-C8) циклоалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , циклогексил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , 3-8-членний циклогетероалкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , аріл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , феніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 та 5-15-членний гетероаріл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 ;

R^5 вибирається з групи, що містить R^6 , (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R , (C1-C4) алканіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , (C2-C4) алкеніл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R та (C2-C4) алкініл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними групами R^8 ;

Кожний R^6 незалежно вибирається з групи, що складається з водню, електронегативної групи, $-OR^d$, $-SR^d$, (C1-C3) галоїдоалкілокси, (C1-C3) пергалоїдоалкілокси, $-NR^cR^c$, галоген, (C1-c3) галоїдоалкіл, (C1-c3) пергалоїдоалкіл, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CF_2CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)_2OR^d$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)_2NR^cR^c$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2OR^d$, $-OS(O)NR^cR^c$, $-OS(O)_2NR^cR^c$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-OC(O)R^d$, $-SC(O)R^d$, $-OC(O)OR^d$, $-SC(O)OR^d$, $-OC(O)NR^cR^c$, $-SC(O)NR^cR^c$, $-OC(NH)NR^cR^c$, $-SC(NH)NR^cR^c$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$ та $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$, (C5-C10) арілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , фенілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , (C6-C16) арілалкілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R^8 , 5-10-членного гетероарілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R^8 та 6-16-членного гетероарілалкілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними групами R^8 ;

R^8 вибирається з групи, що складається з R^a , R^b , R^a , заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b , $-OR^a$, заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a або R^b , $-B(OR^a)_2$, $-B(NR^cR^c)_2$, $-(CH_2)_mR^b$, $-(CHR^a)_mR^b$, $-O-(CH_2)_mR^b$, $-S-(CH_2)_mR^b$, $-O-CHR^aR^b$, $-O-CR^a(R^b)_2$, $-O-(CHR^a)_mR^b$, $-O-(CH_2)_mCH[(CH_2)_mR^b]R^b$, $-S-(CHR^a)_mR^b$, $-C(O)NH-(CH_2)_mR^b$, $-C(O)NH-(CHR^a)_mR^b$, $-O-(CH_2)_mC(O)NH-(CH_2)_mR^b$, $-S-(CH_2)_mC(O)NH-(CH_2)_mR^b$, $-O-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b$, $-S-(CHR^a)_mC(O)NH-(CHR^a)_mR^b$, $-NH-(CH_2)_mR^b$, $-NH-(CHR^a)_mR^b$, $-NH[(CH_2)_mR^b]$, $-N[(CH_2)_mR^b]_2$, $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_mR^b$, $-NH-C(O)-(CH_2)_m-CH_2R^bR^b$ та $-NH-(CH_2)_mC(O)-NH-(CH_2)_mR^b$;

Кожний R^a незалежно вибирається з групи, що складається з водню, (C1-C6) алкілу, (C3-C8) циклоалкілу, циклогексілу, (C4-C11) циклоалкілалкілу, (C5-C10) арілу, фенілу, (C6-C16) арілалкілу, бензилу, 2-6-членного гетероалкілу, 3-8-членного циклогетероалкілу, морфоліну, піперазинілу, гомопіперазинілу, піперидинілу, 4-11-членного циклогетероалкілалкілу, 5-10-членного гетероарілу та 6-16-членного гетероарілалкілу;

Кожний R^b являє собою піджоу групу, незалежно вибрану з групи, що складається з $=O$, $-OR^d$, (C1-C3) галоїдоалкілокси, $-OCF_3$, $=S$, $-SR^d$, $=NR^d$, $=NOR^d$, $-NR^cR^c$, галоген, $-CF_3$, $-CN$, $-NC$, $-OCN$, $-SCN$, $-NO$, $-NO_2$, $=N_2$, $-N_3$, $-S(O)R^d$, $-S(O)_2R^d$, $-S(O)_2OR^d$, $-S(O)NR^cR^c$, $-S(O)_2NR^cR^c$, $-OS(O)R^d$, $-OS(O)_2R^d$, $-OS(O)_2NR^cR^c$, $-C(O)R^d$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^cR^c$, $-C(NH)NR^cR^c$, $-C(NR^a)NR^cR^c$, $-C(NOH)R^a$, $-C(NOH)NR^cR^c$, $-OC(O)R^d$, $-OC(O)OR^d$, $-OC(O)NR^cR^c$, $-OC(NH)NR^cR^c$, $-OC(NR^a)NR^cR^c$, $-[NHC(O)]_nR^d$, $-[NR^aC(O)]_nR^d$, $-[NHC(O)]_nOR^d$, $-[NR^aC(O)]_nOR^d$, $-[NHC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NR^aC(O)]_nNR^cR^c$, $-[NHC(NH)]_nNR^cR^c$ та $-[NR^aC(NR^a)]_nNR^cR^c$;

Кожний R^c незалежно являє собою R^a , або, альтернативно, кожний R^c береться сумісно з атомом азоту, з яким він зв'язан, з метою утворення 5-8 членного циклогетероалкілу або гетероарілу, які можуть включати один або декілька однакових або різних додаткових гетероатомів та можуть заміщатися однією або декількома однаковими або різними R^a або піджоу групами R^b ;

кожний R^d незалежно являє R^a ;

кожне m являє самостійне ціле число від 1 до 3; та

кожне n являє самостійне ціле число від 0 до 3.

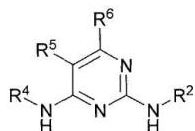
У сполук згідно зі структурною формулою (I), L^1 та L^2 незалежно одна від одної представляють прямий зв'язок або лінкер. Таким чином, як буде оцінено досвідченими фахівцями, замітники R^2 та/або R^4 можуть бути зв'язані як безпосередньо з відповідними атомами азоту, так і альтернативно бути віддаленими від відповідних атомів азоту за допомогою лінкеру. Природа лінкеру не є критичною і типові придатні лінкери включають, але не обмежуються (C1-C6) алкілділами, (C1-C6) алканами та (C1-C6) гетероалкілділами, кожний з яких може бути заміщений однією або декількома однаковими або різними R^8 групами, де R^8 було раніше визначено у структурній формулі (I). У конкретному прикладі здійснення винаходу,

кожний L^1 та L^2 незалежно один від одного, вибирається з групи, що складається з прямого зв'язку, (C1-C3) алкідіілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a , додатних R^b або R^9 груп та 1-3-членного гетероалкідіілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними R^a , підхожих R^b або R^9 груп, де R^9 вибирається з групи, що складається з (C1-C3) алкілу, $-OR^a$, $-C(O)OR^a$, (C5-C10) арілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або різними галогенами, фенілу, довільно заміщеного одним або декількома однаковими або різними галогенами, 5-10-членного гетероарілу, довільно заміщеного одним або декількома однаковими або відмінними галогенами, та 6-членного гетероарілу, довільно заміщеного одним або декількома однаковими або відмінними галогенами; та R^a та R^b , що були раніше визначені для структурної формули (I). Специфічні R^9 групи, що можуть заміщати L^1 та L^2 , включають $-OR^a$, $-C(O)OR^a$, феніл, галоїдофеніл та 4-галоїдофеніл, де R^a було раніше визначено для структурної формули (I).

У іншому конкретному варіанті здійснення винаходу, кожний L^1 та L^2 , незалежно один від одного, вибраний з групи, що складається з метан-, етан-та пропан-, кожний з яких може додатково бути однозаміщений групою R^9 , де R^9 відповідає вищевизначеному визначенню.

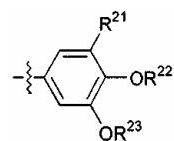
У всіх вищезгаданих варіантах здійснення винаходу конкретні R^a групи, що можуть бути включені до R^9 групи, вибираються з групи, що включає водень, (C1-C6) алкіл, феніл та бензил.

У ще одному конкретному варіанті здійснення винаходу, кожний L^1 та L^2 має прямий зв'язок такий, що 2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом являють сполуки згідно зі структурною формулою (Ia):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де R^2 , R^4 , R^5 та R^6 являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I). Додаткові конкретні приклади застосування 2,4-піримідиндіамінових сполук згідно з даним винаходом описуються нижче.

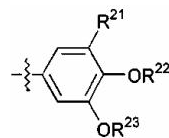
У першому прикладі реалізації сполук зі структурними формулами (I) та (Ia), R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 та L^2 являють групи, описані раніше при визначенні відповідних структурних формул (I) та (Ia) з застереженням, що R^2 не є 3,4,5-триметоксифеніл, 3,4,5-три(C1-C6)алкоксифеніл або



де, R^{21} , R^{22} та R^{23} відповідають визначенню для R^1 , R^2 та R^3 згідно з [патентом США №6235746], розкриття якого включається в даний документ на правах посилання. У конкретній реалізації першого варіанту здійснення винаходу, R^{21} являє водень, галоїдо-, нерозгалужений або розгалужений (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними R^{25} групами, гідроксил, (C1-C6) алкокс-, довільно заміщений однією або декількома однаковими або різними фенілами або R^{25} групами, тіол (-SH), (C1-C6) алкілтіо, довільно заміщений однією або декількома однаковими або відмінними фенілами або R^{25} групами, аміно (-NH₂), -NHR²⁶ або -NR²⁶R²⁶; R^{22} та R^{23} кожний незалежно один від одного являють нерозгалужений або розгалужений алкіл (C1-C6), довільно заміщений однією або декількома однаковими або відмінними R^{25} групами; R^{25} вибирається з групи, що складається з галоїдо-, гідроксил-, (C1-C6) алкокс-, тіол, (C1-C6) алкілтіо, (C1-C6) алкіламіно-та (C1-C6) діалкіламіно-; та кожний R^{26} незалежно являє (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або відмінними фенілами або R^{25} групами або -C(O)R²⁷, де R^{27} являє (C1-C6) алкіл, довільно заміщений однією або декількома однаковими або відмінними фенілами або R^{25} групами.

У іншому конкретному прикладі реалізації першого варіанту, R^{21} являє метокс-, довільно заміщену однією або декількома однаковими або відмінними галоїдо-групами та/або кожний R^{22} та R^{23} незалежно один від одного являють метил або етил, довільно заміщений однією або декількома однаковими або відмінними галоїдо-групами.

У другому варіанті здійснення винаходу сполук згідно зі структурною формулою (I) та (Ia) R^2 , R^4 , R^5 та L^2 являють групи, описані раніше при визначенні відповідних структур (I) та (Ia), L^1 являє прямий зв'язок, та R^6 є водень, при умові, що R^2 не є 3,4,5-триметоксифенілом, 3,4,5-три (C1-C6) алкоксифенілом або



де R^{21} , R^{22} та R^{23} визначені вище, у зв'язку з першим прикладом здійснення винаходу.

У третьому прикладі здійснення винаходу до 2,4-піримідиндіамінових сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включають одну або декілька наступних сполук:

N2,N4-біс(4-етоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R070790);

N2,N4-біс(2-метоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R081166);

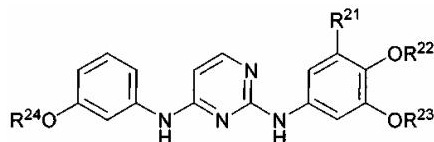
N2,N4-біс(4-метоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R088814);

N2,N4-біс(2-хлорофеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R088815);

N2,N4-бісфеніл-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R091880);

N2,N4-біс(3-метилфеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R092788);
 N2,N4-біс(3-хлорофеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R067962);
 N2,N4-біс(2,5-диметилфеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R067963);
 N2,N4-біс(3,4-диметилфеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R067964);
 N2,N4-біс(4-хлорофеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R0707153);
 N2,N4-біс(2,4-диметилфеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R070791);
 N2,N4-біс(3-бромфеніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін (R008958);
 N2,N4-біс(феніл)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін;
 N2,N4-біс(морфоліно)-5-фтор-2,4-піримідиндіамін; та
 N2,N4-біс[(3-хлоро-4-метоксифеніл)]-5-фтор-2,4-піримідиндіамін.

У четвертому прикладі здійснення винаходу до сполук, що мають структурну формулу (I) та (Ia), не включаються сполуки з наступною структурною формулою (Ib):



де R^{24} являє (C1-C6) алкіл; та R^{21} , R^{22} та R^{23} визначені вище у зв'язку з першим прикладом здійснення винаходу.

У п'ятому прикладі реалізації винаходу, до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включаються сполуки, описані у Прикладах 1-141, [Патенту США №6235746], розкриття якого включається в даний документ на правах посилання.

У шостому прикладі реалізації винаходу, до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включаються сполуки, визначені формулою (1) або формулою 1 (a) [Патенту США №6235746 (див., наприклад, опис від стовпця 1, лінії 48 до стовпця 7, лінії 49 та стовець 8, лінії 9-36, інформація про який включена на основі посилання)].

У сьомому прикладі здійснення винаходу, до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включаються сполуки, у яких R^5 є ціано- або -C(O)NHR, де R-водень або (C1-C6) алкіл, якщо R^2 заміщається фенілом; R^4 являє заміщений або незаміщений (C1-C6) алкіл, (C3-C8) циклоалкіл, 3-8-членний циклогетералкіл або 5-15-членний гетероаріл; та R^6 -водень.

У восьмому прикладі здійснення винаходу, до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включаються сполуки, визначені формулою (I) та (X) [WO 02/04429] або будь-які сполуки, розкриті у [WO 02/04429], розкриття яких включається в даний документ на основі посилання.

У дев'ятому прикладі реалізації сполук зі структурною формулою (I) та (Ia), коли R^5 є ціано- або -C(O)NHR, де R-водень або (C1-C6) алкіл; та R^6 -водень, то R^2 є відрізняється від заміщеної фенільної групи.

У десятому прикладі здійснення винаходу до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включаються сполуки, у яких кожний R^2 та R^4 незалежно є заміщене або незаміщене кільце піролу або індолу, яке з'єднується з рештою молекули за допомогою кільцевого атому азоту.

У одинадцятому прикладі здійснення винаходу, до сполук зі структурною формулою (I) та (Ia) не включають сполуки, визначені у формулах (I) та (IV) [Патенту США №4983608] або будь-яку сполуку, розкрити у [Патенті США №4983608], інформація про які включається в даний документ на основі посилання.

Фахівцям у даній галузі зрозуміло, що R^2 та R^4 , які входять до складу формул (I) та (Ia), можуть бути однаковими або різними, а також можуть широко мінятися. Якщо R^2 та/або R^4 являють додатково заміщені кільця, такі як додатково заміщені циклоалкіли, циклогетероалкіли, аріли та гетероаріли, то одне кільце може бути приєднане до решти молекули з допомогою будь-якого доступного вуглецю або гетероатому. Додаткові замітники можуть бути приєднані до будь-яких доступних атомів вуглецю та/або гетероатомів.

У дванадцятому прикладі реалізації сполук структурної формули (I) та (Ia) R^2 та/або R^4 являють додатково заміщений феніл або додатково заміщений (C5-C15) аріл, при умові, що:

(1) якщо R^6 - водень, R^2 не може бути 3,4,5-триметоксифенілом або 3,4,5-три (C1-C6) алкоксифенілом;

(2) якщо R^2 - 3,4,5-тризаміщений феніл, замітники у 3-й та 4-й позиціях не можуть бути одночасно метоксі- або (C1-C6) алкоксі-групами; або

(3) якщо R^6 - водень та R^4 -(C1-C6) алкіл, (C3-C8) циклоалкіл, 3-8-членний циклогетероалкіл або 5-15-членний гетероаріл, то R^5 не може бути ціано-групою. Альтернативно, R^2 підлягає умовам, описаним у зв'язку з першим або другим прикладами здійснення винаходу. Додатково заміщена група арілу або фенілу може бути приєднана до решти молекули через будь-який доступний атом вуглецю. Конкретні приклади додатково заміщених фенілів включають феніли, що являють додатково моно-, ді- або три-заміщені однакові або відмінні R^8 групи, де R^8 було визначено раніше при описі структурної формули (I) та підлягає вищезгаданим умовам. Якщо феніл є моно-заміщений, R^8 замітник може бути в орто-, мета-або пара-позиції. При знаходженні в орто-, мета-або пара-позиції R^8 переважно вибирається з групи, що складається з (C1-C10) алкілу, (C1-C10) розгалуженого алкілу, -OR^a додатково заміщеного однією або декількома однаковими або відмінними R^b групами, -O-C(O)OR^a, -O-(CH₂)_m-C(O)OR^a, -C(O)OR^a, -O-(CH₂)_m-NR^cR^c, -O-C(O)NR^cR^c, -O-(CH₂)_m-C(O)NR^cR^c, -O-C(NH)NR^cR^c, -O-(CH₂)_m-C(NH)NR^cR^c та -NH-(CH₂)_m-NR^cR^c, де m, R^a та R^c - визначені раніше у описі структурної формули (I). В одному прикладі реалізації цих сполук -NR^cR^c являє 5-6-членний гетероаріл, який довільно включає один або декілька однакових або відмінних додаткових гетероатомів. Конкретні приклади таких 5-6-членних гетероарілів включають, але не обмежуються наступними:

оксадіазолілом, триазолілом, тіазолілом, оксазолілом, тетразолілом та ізоксазолілом.

У іншому прикладі реалізації цих сполук - NRCRC являє 5-6-членне насичене циклогетероалкільне кільце, яке додатково включає один або декілька однакових або відмінних гетероатомів. Конкретні приклади таких циклогетероалкілів включають, але не обмежуються наступними: піролідиніл, піразолідиніл, імідазолідиніл, піперидиніл, піперазиніл та морфолініл.

У ще іншому прикладі реалізації цих сполук, кожний радикал R^a являє незалежно (C1-C6) алкіл та/або кожний $-NR^cR^c$ являє $-NHR^a$, де R^a є (C1-C6) алкілом. У одному конкретному прикладі, R^8 є $-O-CH_2-C(O)NHCH_3$. У іншому конкретному прикладі здійснення винаходу, R^8 є $-OH$.

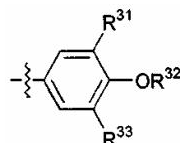
У випадку двозаміщеного або тризаміщеного фенілу R^8 замітники можуть знаходитися в будь-якій комбінації позицій. Наприклад, R замітники можуть знаходитися у 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-, 3,5-, 2,3,4-, 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,5-, 2,4,6-, 2,5,6- або 3,4,5-позиціях. У одному прикладі реалізації сполук, яке включає двозаміщений феніл, замітники знаходяться у будь-якій позиції, окрім 3,4-позиції. У іншому прикладі здійснення винаходу вони знаходяться у 3,4 позиції. У одному прикладі реалізації сполук, що включає тризаміщений феніл, замітники знаходяться у будь-якій позиції, окрім 3,4,5 або, альтернативно, жоден з двох заміників не знаходиться у 3,4 позиції. У іншому прикладі, замітники знаходяться у 3,4,5 позиції.

Конкретні приклади R^8 заміників у таких двох та три-заміщених фенілах включають різноманітні R^8 замітники, описані вище у зв'язку з орто-, мета- або пара-заміщеними фенілами.

У іншому конкретному прикладі R^8 замітники, придатні для заміщення таких дво- та тризаміщених фенілів, включають (C1-C6) алкіл, (C1-C6) алкоксі, метоксі, галоїдо, хлоро, (C1-C6) пергалоїдоалкіл, $-CF_3$, (C1-C6) пергалоїдоалкоксі та $-OCF_3$ групи. У переважних варіантах здійснення винаходу такі R^8 замітники знаходяться у 3,4- або 3,5-позиціях. Конкретні приклади переважних двозаміщених фенільних кілець включають 3-хлоро-4-метоксі-феніл, 3-метоксі-4-хлорфеніл, 3-хлоро-4-трифторметоксифеніл, 3-трифторметоксифеніл, 3,4-дихлорфеніл, 3,4-діметоксифеніл та 3,5-діметоксифеніл, з умовою що: (1) якщо R^4 є один з вищенаведених фенілів, та кожний з R^5 та R^6 є воднем, то R^2 не може бути 3,4,5-три(C1-C6) алкоксифенілом або 3,4,5-триметоксифенілом; (2) якщо R^2 є 3,4-діметоксифеніл та кожний з R^5 та R^6 є воднем, тоді R^4 не може бути 3-(C1-C6) алкоксифенілом, 3-метоксифенілом, 3,4-ді-(C1-C6) алкоксифенілом або 3,4-діметоксифенілом; (3) якщо R^4 являє 3-хлоро-4-метоксифеніл та R^5 являє галоїдо- або фтор, та вибірково R^6 є воднем, тоді R^2 не може бути 3-хлор-4-(C1-C6) алкоксифенілом або 3-хлоро-4-метоксифенілом; (4) якщо R^4 являє 3,4-дихлорфеніл і R^5 являє водень, (C1-C6) алкіл, метил, галоїдо- або хлор-групу, та вибірково R^6 є воднем, тоді R^2 не може бути монозаміщеним фенілом у пара-позиції з (C1-C6) алкоксі-групою, яка довільно замінюється однією або декількома

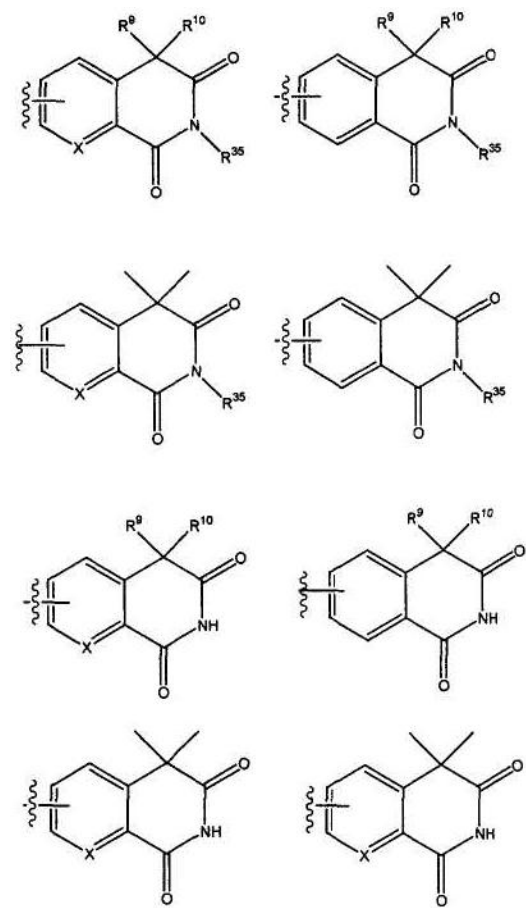
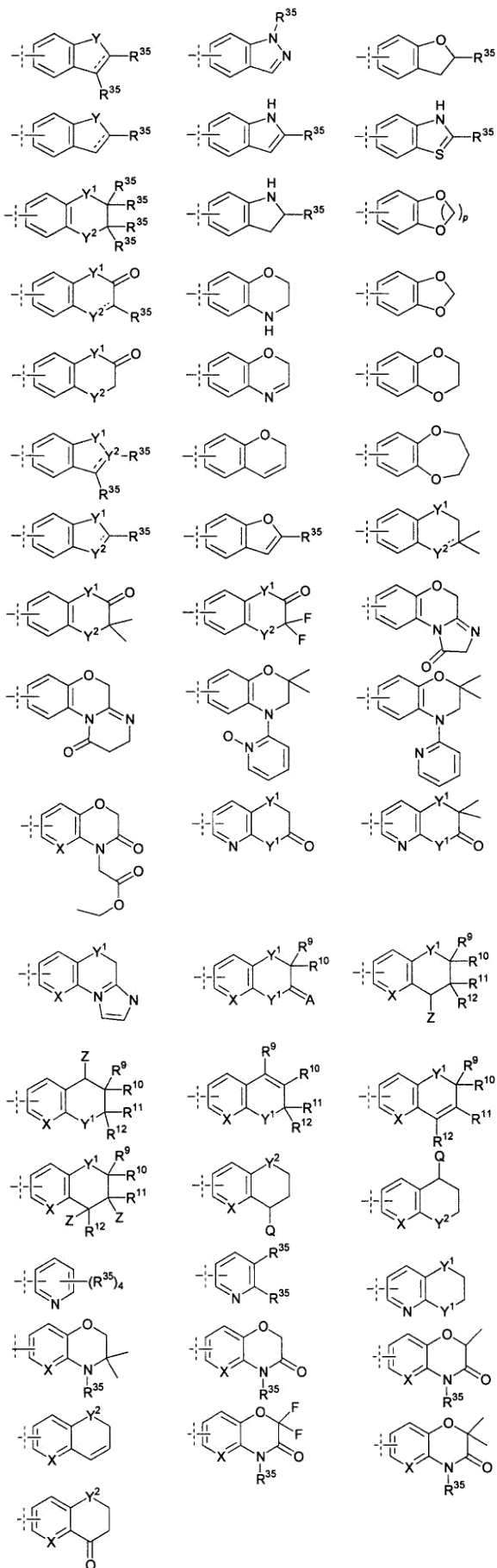
однаковими або відмінними R^b , $-OH$ або $-NR^cR^c$ групами, де R^b та R^c раніше описані у структурній формулі (I); та/або (5) R та/або R^4 не є 3,4,5-три (C1-C6) алкоксифеніл або 3,4,5-триметоксифеніл, особливо якщо R^5 та R^6 кожний є воднем.

У іншому прикладі реалізації сполук, які включають тризаміщений феніл, останній має формулу:



де R^{31} є метил або (C1-C6) алкіл; R^{32} водень, метил або (C1-C6) алкіл; та R^{33} є галоїдо-група.

У тринадцятому прикладі здійснення винаходу, у сполуках, що мають структурну формулу (I) та (Ia), R^2 та/або R^4 являє довільно заміщений гетероаріл. Типові групи гетероарілів, згідно з цим тринадцятим прикладом, містять від 5 до 15, а більш типово від 5 до 11 атомів кільця, та включають один, два, три або чотири однакових або відмінних гетероатомів або гетероатомних груп, вибраних з групи, що складається з N, NH, O, S, S(O) та S(O)₂. Довільно заміщений гетероаріл може бути приєднаний до відповідного C2 або C4 атому азота або лінкера L^1 або L^2 через будь-який доступний атом вуглецю або гетероатома, але типово приєднується через атом вуглецю. Додаткові замітники можуть бути однакові або відмінні, та бути приєднані до будь-якого доступного атому вуглеця або гетероатома. У одному прикладі здійснення винаходу, R^5 не є бромом, нітро, трифторметилом, циано або $-C(O)NHR$ групою, де R є воднем або (C1-C6) алкілом. У іншому прикладі здійснення винаходу, якщо кожний з R^2 та R^4 є заміщений або незаміщений пірол або індол, тоді кільце приєднується до решти молекули через кільце атома вуглецю. У ще іншому прикладі реалізації сполук даного винаходу, включаючи довільно заміщену групу гетероарілу, гетероаріл є незаміщений або заміщений з одного до чотирьох однакових або відмінних R^8 груп, де R^8 було визначено раніше у структурній формулі (I). Конкретні приклади таких довільно заміщених гетероарілів включають, але не обмежуються наступними групами гетероарілів:



де:

r є ціле число від одного до трьох;
кожний символ --- незалежно являє одинарний або подвійний зв'язок;

R^{35} є водень або R^8 , де R^8 визначено раніше для структурної формули (I);

X вибирається з групи, що складається з CH , N та $N-O$;

кожний Y незалежно вибирається з групи, що складається з O , S та NH ;

кожний Y^1 незалежно вибирається з групи, що складається з O , S , SO , SO_2 , $SONR^{36}$, NH та NR^{37} ;

кожний Y^2 незалежно вибирається з групи, що складається з CH , CH_2 , O , S , N , NH та NR^{37} ;

R^{36} водень або алкіл;

R^{37} вибирається з групи, що складається з водню та прогупи, бажано щоб водень або прогупа була вибрана з групи, що складається з арілу, арілалкілу, гетероарілу, R^a , $R^b-CR^aR^b-O-C(O)R^8$, $-CR^aR^b-O-PO(OR^8)_2$, $-CH_2-O-PO(OR^8)_2$, $-CH_2-PO(OR^8)_2$, $-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$, $-CR^aR^b-O-C(O)-CR^aR^b-N(CH_3)_2$, $-C(O)R^8$, $-C(O)CF_3$ та $-C(O)-NR^8-C(O)R^8$;

A вибирається з групи, що складається з O , NH та NR^{38} ;

R^{38} вибирається з групи, що складається з алкілу та арілу;

R^9 , R^{10} , R^{11} та R^{12} кожний, незалежно один від одного, вибираються з групи, що складається з алкілу, алкокси, галогену, галогідоалкокси, аміноалкілу та гідроксіалкілу, або, альтернативно,

R^9 and R^{10} та/або R^{11} та R^{12} беруться разом з кеталу;

кожний Z вибирається з групи, що складається з гідроксилу, алкокси, арилокси, складного ефіру, карбамату та сульфонілу;

Q вибирається з групи, що складається з $-\text{OH}$, OR^8 , $-\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{NHR}^{39}-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$, $-\text{NHR}^{39}-\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$, $-\text{NR}^{39}-\text{CHR}^{40}-\text{R}^b$, $-\text{NR}^{39}-(\text{CH}_2)_m-\text{R}^b$ та $-\text{NR}^{39}-\text{C}(\text{O})-\text{CHR}^{40}-\text{NR}^c\text{R}^c$.

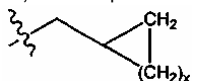
R^{39} та R^{40} кожний незалежно один від одного вибираються з групи, що складається з водню, алкілу, арилу, алкіларілу, арилалкілу та NHR^8 ; та

R^a , R^b та R^c визначені вище для структурної формули (I). Перевага віддається R^b замісникам для Q, які вибрані з $\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$, $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$, $-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ та $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ груп.

У одному із прикладів реалізації вищезгаданих гетероарилів, а також і інших 5-15-членних гетероарилів, згідно з даним винаходом, кожний R^8 незалежно вибирається з групи, що складається з R^d , $-\text{NR}^c\text{R}^c$, $-(\text{CH}_2)_m-\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NR}^c\text{R}^c$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$, $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{OR}^d$ та $-(\text{CH}_2)_m-\text{OR}^d$, де m, R^c та R^d визначені вище для структурної формули (I).

У конкретному прикладі R^d та/або R^c вибирається з групи, що складається з R^a та (C3-C8) циклоалкілу, довільно заміщеного однією або декількома однаковими або відмінними гідроксильними, аміновими або карбоксильними групами.

У іншому прикладі реалізації вищезгаданих гетероарилів кожний R^{35} являє собою атом водню, (C1-C6) вуглецевий ланцюг, включаючи метил, етил, ізопропіл, циклоалкільна група, включаючи циклопропіл, циклобутил, циклопентил,



циклогексил, циклооктил, CH_2CONHMe , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHMe}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHMe}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHMe}$ or $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$

В ще одному прикладі здійснення вищезгаданих гетероарилів зв'язність ароматичного кільця знаходиться у 5 або 6 позиції. Вважають, що будь-який з R^2 або R^4 може використовувати групи гетероарилів, описаних в даній заяві.

У чотирнадцятому прикладі реалізації сполук структурних формул (I) та (Ia), R^2 та R^4 кожний, незалежно один від одного, являє собою довільно заміщений феніл, арил або гетероарил, при умові, що:

(1) якщо L^1 являє прямий зв'язок та R^6 (та вибірково R^5) є воднем, то R^2 не може бути 3,4,5-триметоксифенілом або 3,4,5-три(C1-C6) алкоксифенілом;

(2) якщо кожний L^1 та L^2 являють прямий зв'язок, R^6 -водень та R^5 -галоїдо-група, то R^2 та R^4 не можуть бути одночасно 3,4,5-триметоксифенілом або 3,4,5-три (C1-C6) алкоксифенілом;

(3) якщо R^4 являє 3-метоксифеніл або 3-(C1-C6) алкоксифеніл та R^2 є 3,4,5-тризаміщений феніл, то замісники, що знаходяться у 3-й та 4-й позиціях не можуть бути одночасно метоксі або (C1-C6) алкокси групами;

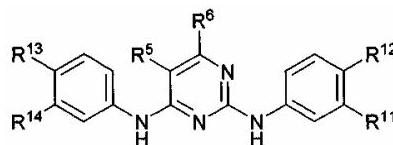
(4) якщо R^2 являє заміщений феніл та R^6 є водень, тоді R^5 не може бути ціано-або $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}$ групою, де R - водень або (C1-C6) алкіл; та/або

(5) якщо кожний R^2 та R^4 являють незалежно заміщені або незаміщені пірол або індол, тоді пірол або індол приєднується до решти молекули через кільце атома вуглеця. Альтернативно, R^2 підлягає умовам, описаним у зв'язку з першим або другим прикладами реалізації винаходу.

У цьому чотирнадцятому прикладі реалізації винаходу R^2 та R^4 замісники можуть бути однаковими або різними. Конкретний, довільно заміщений феніл, арил та/або гетероарил включають ті з них, які проілюстровані вище у дванадцятому та тринадцятому прикладах реалізації.

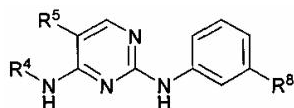
У п'ятнадцятому прикладі реалізації сполук зі структурними формулами (I) та (Ia), включаючи описані приклади реалізації з першого до чотирнадцятого, R^6 є водень та R^5 являє електронегативну групу. Як визнається досвідченими фахівцями, електронегативні групи становлять атоми або групи атомів, які мають відносно велику тенденцію притягати електрони до самих себе. Конкретні приклади електронегативних груп, згідно з чотирнадцятим прикладом реалізації, включають, але не обмежуються наступними: CN, -NC, $-\text{NO}_2$, галоїдо-, бромо, хлоро, фторо, (C1-C3) галоїдоалкіл, (C1-C3) пергалоїдоалкіл, (C1-C3) фторалкіл, (C1-C3) перфторалкіл, $-\text{CF}_3$, (C1-C3) галоїдоалкокси, (C1-C3) пергалоїдоалкокси, (C1-C3) фторалкокси, (C1-C3) перфторалкокси, $-\text{OCF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ та $-\text{C}(\text{O})\text{OCF}_3$. У конкретному прикладі електронегативна група є електронегативна група, що містить галоген, наприклад $-\text{OCF}_3$, $-\text{CF}_3$, бром, хлор або фтор група. У іншому конкретному прикладі R^5 є фтор, при умові, що ця сполука не може бути сполукою, описаною у третьому прикладі реалізації винаходу.

У шістнадцятому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурними формулами (I) та (Ia) відповідають сполукам, що мають структурну формулу (Ib):



а також їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де кожний R^{11} , R^{12} , R^1 та R^{14} незалежно один від одного вибирається з групи, що складається з водню, гідроксиду, (C1-C6) алкокси та $-\text{NR}^c\text{R}^c$; та R^5 , R^6 та R^c визначені раніше при опису структурної формули (I), при умові, що якщо кожний R^{13} , R^5 та R^6 є воднем, то R^{11} та R^{12} не можуть бути одночасно метоксі, (C1-C6) алкокси або (C1-C6) галоїдоалкокси групами.

У сімнадцятому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурними формулами (I) та (Ia) відповідають структурній формулі (Ic):



а також їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де

R^4 вибирається з групи, що складається з 5-10-членного гетероарилу та 3-гідроксифенілу;

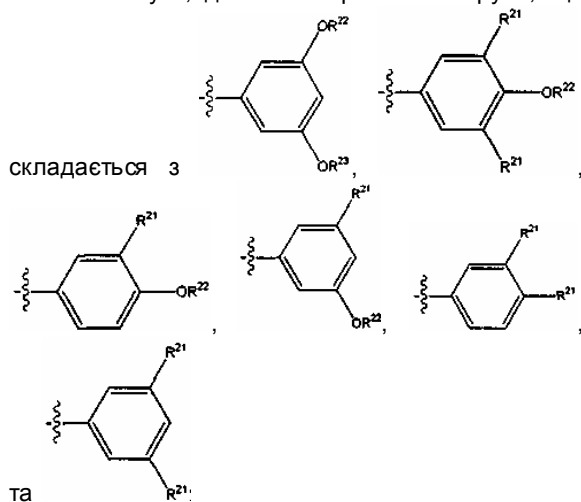
R^5 є F або $-\text{CF}_3$; та

R^8 є $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{R}^b$, де m та R^b визначені раніше для структурної формули (I). У конкретному прикладі реалізації, R^8 є $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_3$ та/або R^4 є гетероарилом, згідно з тринадцятим прикладом реалізації.

У вісімнадцьому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурними формулами (I) та (Ia) включають будь-яку сполуку, вибрану з Таблиці 1, що інгібує сигнальний трансдукційний каскад Fc-рецепторів, діяльність Syk-кінази, сигнальний каскад рецепторів залежних від Syk-кінази або дегрануляцію клітин, як встановлено *in vitro* дослідженнями, при умові, що дана сполука не є сполукою, яка виключається у вищеведеному третьому прикладі реалізації та/або інших прикладах. В одному конкретному прикладі такі сполуки мають IC_{50} приблизно 20 мкмоль або менше за результатами вимірювання дегрануляції клітин в процесі аналізу *in vitro*, як описано в розділі "Приклади".

У дев'ятнадцьому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурними формулами (I) та (Ia) включають будь-яку сполуку, вибрану з Таблиці 1, яка інгібує каскад рецепторів FcγR1 або FcεR1 з IC_{50} 20 мкмоль згідно з результатами вимірювання дегрануляції клітин *in vitro*, як описано в розділі "Приклади", при умові, що ця сполука не є сполукою, яка виключається у вищеведеному третьому прикладі реалізації винаходу та/або інших прикладах.

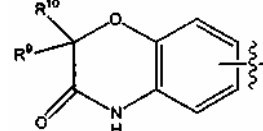
У двадцьому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, де R^2 вибирається з групи, що



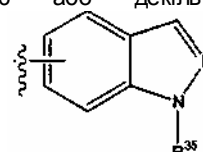
R^4 , R^8 , R^a , R^b , R^c , R^d - відповідають вказаним вище значенням; R^5 являє собою атом фтору; R^6 являє собою атом водню та кожний R^{21} незалежно являє собою атоми галогену або алкіл, вибірково заміщений однією або декількома однаковими або

різними гало-групами; R^{22} та R^{23} являють собою, кожний незалежно один від одного, атом водню, метил або етил, заміщені за вибором однією або декількома однаковими або різними гало-групами; кожне m незалежно являє собою ціле число від 1 до 3, та кожне n незалежно являє собою ціле число від 1 до 3.

У двадцять першому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, де R^4 являє собою

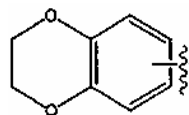


, де R^9 та R^{10} відповідають вказаним вище значенням та включають, кожний незалежно атом водню, а R^2 являє собою феніл-групу, заміщену однією або декількома



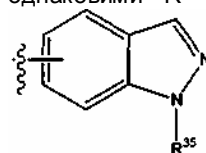
однаковими групами R^8 , або R^{35} має вказане вище значення. У одному конкретному випадку, якщо R^2 являє собою феніл-групу, то один або декілька R^8 вибираються з галоген або алкілокси груп. У іншому випадку, феніл-група є дво-або тризаміщена однією або декількома однаковими групами R^8 .

У двадцять другому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, де R^4 являє собою



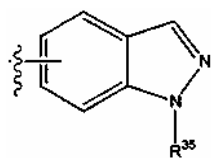
та R^2 являє собою феніл-групу, заміщену однією або декількома однаковими R^8 групами. У одному конкретному випадку, один або декілька R^8 вибирається з галоген або алкілокси групи. У іншому випадку, феніл-група є дво або тризаміщена однією або декількома однаковими R^8 групами.

У двадцять третьому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, де R^4 являє собою феніл-групу, заміщену однією або декількома однаковими R^8 групами, де R^2 являє собою



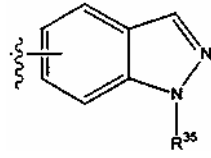
де R^{35} має вказане вище значення. В конкретній реалізації, феніл-група R^4 є дво або тризаміщена однаковими або різними атомами галогену. У іншій реалізації, R^4 являє собою феніл-групу, однозаміщену атомом галогену. В одному випадку, R^{35} являє собою гідроксильну-групу. У інших випадках, гідроксильна-група може перейти у ефір-групу, карбамат, тощо.

У двадцять четвертому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 являє собою

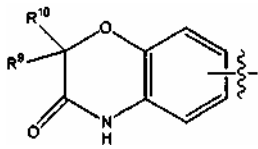


, де R^{35} має вказане вище значення, а R^2 являє собою феніл-групу, заміщену однією або декількома однаковими групами R^8 . В одному конкретному випадку, R^{35} являє собою атом водню або алкіл-групу. У іншому випадку, феніл-група R^2 є дво-або тризаміщена однаковими або різними групами R^8 , та зокрема атомами галогену.

У двадцять п'ятому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 являє собою

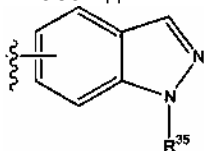


значення та, де R^{35} має вказане вище значення, а R^2 являє собою



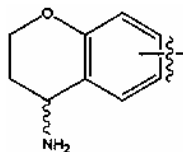
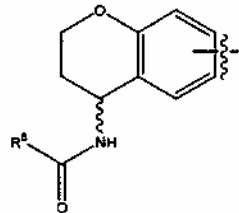
, де R^9 та R^{10} мають вказані вище значення та кожний незалежно включає атом водню. У одному випадку, R^{35} являє собою атом водню або алкіл-групу, наприклад метил, а R^9 та R^{10} являють собою алкіл-групи, наприклад метил-групи.

У двадцять шостому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 є двозаміщена феніл-група, заміщена однаковими або відмінними

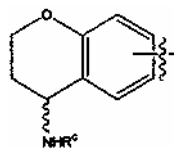


групами R^8 , а R^2 являє собою, де R^{35} має вказане вище значення. У деяких випадках, феніл-група заміщається атомом галогену та алкілоксид-групою, наприклад метоксид-групою. У конкретних прикладах реалізації винаходу, R^{35} являє собою атом водню, алкіл-групу, як наприклад, метил-групу, або гідроксильну-групу. У деяких випадках, гідроксильна-група може перейти у ефір-групу, карбамат, тощо.

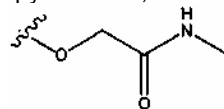
У двадцять сьомому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 є



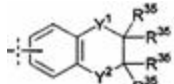
або



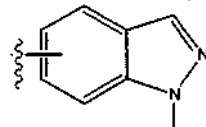
, де R^8 та R^c мають вказані вище значення, а R^2 являє собою феніл-групу, заміщену однією або декількома групами R^8 . В одному конкретному випадку, R^c являє собою атом водню або алкіл-групу. У іншому випадку, феніл-група R^2 є дво-або тризаміщена однаковими або різними групами R^8 , та зокрема атомами галогену або



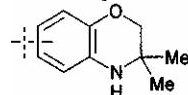
У двадцять восьмому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 є



, де Y^1 , Y^2 та кожний R^{35} незалежно мають вказані вище значення, а R^2

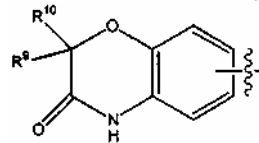


являє собою, де R^{35} має вказане вище значення. В одному випадку реалізації двадцять восьмого прикладу винаходу відносно R^4 , Y^1 являє собою кисень, Y^2 є NH, а один або декілька R^{35} або R^4 компоненти являють собою алкіл-групу, зокрема метил-групу. У деяких випадках двадцять восьмого прикладу реалізації винаходу, дві групи R^{35} , що входять до складу R^4 , утворюють гем-діалкіл компонент, зокрема гем-діметил компонент сумісний з NH групою, що

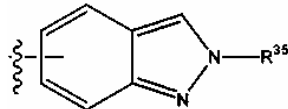


позначається. У інших випадках реалізації двадцять восьмого прикладу винаходу стосовно R^2 , R^{35} являє собою атом водню або алкіл-групу, зокрема метил-групу.

У двадцять дев'ятому прикладі реалізації винаходу, сполуки зі структурною формулою (Ia) являють собою сполуки, у яких R^4 являє собою

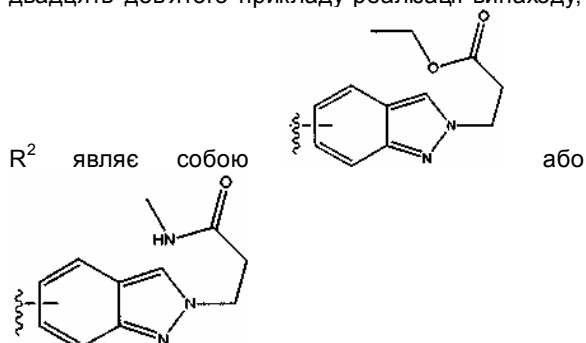


, де R^9 та R^{10} мають вказані вище значення або являють собою заміщену феніл-групу. В одному випадку, феніл-група є дво-або тризаміщена однією або декількома однаковими групами R^8 . Зокрема, феніл-група може бути дво-або тризаміщена одним або декількома атомами галогену, які можуть бути однаковими або різними. R^2 у двадцять дев'ятому прикладі реалізації винаходу являє собою



, де R^{35} має вказане вище значення. В одному випадку двадцять

дев'ятого прикладу реалізації винаходу, R^{35} з R^2 не являє собою метил-групу. У іншому випадку двадцять дев'ятого прикладу реалізації винаходу,



У тридцятому прикладі реалізації винаходу, застосовного до прикладів від першого до двадцять дев'ятого, R^5 являє собою атом галогену, такий як фтор, а R^6 являє собою атом водню.

Також конкретно описані комбінації вищенаведених прикладів реалізації даного винаходу від першого до тридцятого.

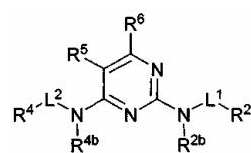
Фахівці у цій галузі оціняють, що описані в даній заяві сполуки 2,4-піримідиндіамінів можуть включати функціональні групи, які може бути замасковані прогрупами з метою утворення проліків. Такі проліки, звичайно, але не завжди, являються фармакологічно неактивними, доки не будуть перетворені в активну лікарську форму. Дійсно, багато активних 2,4-піримідиндіамінових сполук, нижченаведених у Таблиці 1, включають прокомпоненти, здатні до гідролізу або іншого способу розщеплення за умов застосування. Наприклад, групи складного ефіру звичайно зазнають кислотного-каталізованого гідролізу з метою утворення початкової карбонової кислоти, якщо вони знаходяться у кислотних умовах шлунку, або піддаються лужно-каталізованому гідролізу, якщо вони знаходяться в умовах основного середовища кишечника або крові. Таким чином, при призначенні для орального застосування, 2,4-піримідиндіаміни, які включають складні ефіри, можуть вважатися проліками відповідної карбонової кислоти незалежно від того, чи має складний ефір фармакологічно активну форму. Наведені у Таблиці 1 численні 2,4-піримідиндіаміни даного винаходу, що містять складний ефір, демонструють активність у формі складного ефіру- у формі проліків.

У запропонованих проліках даного винаходу будь-який наявний функціональний компонент може бути замаскований прогрупою з метою утворення проліків. Функціональні групи у 2,4-піримідиндіамінових сполуках, що можуть бути замасковані прогрупою для включення у прокомпонент, включають, але не обмежуються амінами (первинними та вторинними), гідроксилами, сульфанами (тіолами), карбоксілами, тощо. У практиці відома велика кількість прогруп, придатних для маскування таких функціональних груп з метою отримання прокомпонентів, які розщеплюються при бажаних умовах застосування. Всі ці прогрупи, окремо або

у комбінаціях, можуть бути включені у проліки даного винаходу.

В одному ілюстративному прикладі, проліки даного винаходу являють сполуки, які відповідають структурній формулі (I), у яких R^c та R^d можуть представляти прогрупу на додаток до раніше визначених альтернативних варіантів.

Заміна атомів водню, прикріплених до N2 та N4 у 2,4-піримідиндіамінах структурної формули (I), замінниками несприятливо впливає на активність сполук. Але ж, як буде оцінено фахівцями, ці атоми азота можуть бути включені у прокомпоненти, які при умовах застосування розщеплюються з утворенням 2,4-піримідиндіамінів структурної формули (I). Таким чином, у іншому прикладі, проліки згідно з даним винаходом являють сполуки згідно з структурною формулою (II):



включаючи їх солі, гідрати, сольвати та N-окиси, де

R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 та L^2 визначені раніше для структурної формули (I); та

R^{2b} та R^{4b} кожний, незалежно один від одного, являється прогрупою. Конкретні приклади прогруп у цьому прикладі реалізації винаходу, включають, але не обмежуються (C1-C6) алкілом, $-C(O)CH_3$, $-C(O)NHR^{36}$ та $-S(O)_2R^{36}$, де R^{36} (C1-C6) є алкілом, (C5-C15) арілом та (C3-C8) циклоалкілом.

У проліках зі структурною формулою (II), замінники можуть вибиратися згідно з першого по двадцятій прикладами реалізації, вищенаведені для сполук структурної формули (I) та (Ia) або комбінацій таких прикладів.

Фахівці у цій галузі оціняють, що багато сполук та проліків згідно з даним винаходом, а також різноманітні зразки сполук, конкретно описані та/або ілюстровані у даній заяві, можуть демонструвати явища таутомерії, конформаційної ізомерії, геометричної ізомерії та/або оптичної ізомерії. Наприклад, сполуки та проліки згідно з даним винаходом можуть включати один або декілька хіральних центрів та/або подвійних зв'язків та, як наслідок, можуть існувати як стереоізомери, такі як ізомери подвійного зв'язку (наприклад, геометричні ізомери), інантимери та діастереомери та їх суміші, як наприклад, рацемічні суміші. Як інший приклад, сполуки та проліки згідно з даним винаходом можуть існувати у декількох таутомерічних формах, включаючи енольну форму, кегельну форму та їх суміш. Так як різноманітні назви, формули та структури сполук в межах специфікації та пунктів формули винаходу можуть представляти тільки одну з можливих таутомерічних форм, форм конформаційної ізомерії, оптичної ізомерії або геометричної ізомерії, то слід вважати, що цей винахід охоплює будь-які таутомерічні форми, форми конформаційної ізомерії, оптичної ізомерії та/або геометричної ізомерії сполук або проліків,

що мають одну або декілька переваг, описаних в даній заяві, а також і суміші цих різноманітних ізомерних форм. У випадках обмеженого обертання навколо структури стрижня 2,4-піримідиндіаміну, атропні ізомери є можливими та також конкретно включені у сполуки згідно з даним винаходом.

Більш того, досвідчені в даній галузі фахівці оціняють, що якщо до переліку альтернативних замінників входять члени, які по причині валентності або по іншим причинам не можуть бути використані для заміни конкретної групи, то належить використовувати тільки ті члени з переліку, які підходять для заміни конкретної групи. Наприклад, досвідчені фахівці оціняють, що в той час, як всі внесені до списку альтернативи для R^b можуть бути використані для заміни групи алкілу, певні альтернативи, такі як = O, не можуть бути використані для заміни групи фенілу. Варто мати на увазі, що можна використовувати тільки можливі комбінації груп-замінників.

Сполуки та/або проліки згідно з даним винаходом можуть бути ідентифіковані за їх хімічною структурою або їх хімічною назвою. Якщо хімічна структура та хімічна назва суперечать одна одній, то хімічна структура є визначальною для ідентифікації конкретної сполуки.

Залежно від природи різноманітних замінників, 2,4-піримідиндіамінові сполуки та проліки згідно з даним винаходом можуть мати форму солі. Такі солі включають солі, придатні для фармацевтичного застосування ("фармацевтично-придатні солі"), солі, придатні для ветеринарного застосування, тощо. Такі солі можуть бути одержані з кислот або лугів, як добре відомо у цій галузі.

У одному з прикладів реалізації сіль є фармацевтично-придатною сіллю. Звичайно, фармацевтично-придатні солі є солі, які в значній мірі зберігають одну або більше бажаних фармакологічних функцій початкової сполуки та які придатні до застосування людьми. Фармацевтично-придатні солі включають солі з кислотним додатком, утворені з неорганічними або органічними кислотами. Неорганічні кислоти придатні для утворення фармацевтично-придатних солей з кислотним додатком, включають, але не обмежуються наступними: гідрогалідні кислоти (наприклад, соляна, бромоводнева кислота, йодоводнева, тощо), сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, та подібні. Органічні кислоти, придатні для утворення фармацевтично-придатних солей з кислотним додатком, включають, але не обмежуються наступними: оцтова кислота, трифтороцтова кислота, пропіонова кислота, гексаноїдна кислота, циклопентанпропіонова кислота, гліколева кислота, щавелева кислота, пировиноградна кислота, молочна кислота, маленова кислота, янтарна кислота, яблучна кислота, малеїнова кислота, фумарова кислота, тартарна кислота, лимонна кислота, пальмітинова кислота, бензойна кислота, 3-(4-гідроксibenзоїл) бензойна кислота, корична кислота, міндальна кислота, алкілсульфонові кислоти (наприклад, метансульфонова кислота, етансульфонова

кислота, 1,2-етан-дисульфонова кислота, 2-гідроксietансульфонова кислота, тощо), арилсульфонові кислоти (наприклад, бензолсульфонова кислота, 4-хлорбензолсульфонова кислота, 2-нафталінсульфонова кислота, 4-толуенсульфонова кислота, циклоалкілсульфонові кислоти (наприклад, камфорсульфонова кислота), 4-метилбіцикло [2,2,2]-окт-2-ене-1-карбоксильна кислота, глюкогептонова кислота, 3-фенілпропіонова кислота, триметилоцтова кислота, трет-бутилоцтова кислота, лаурилсірчана кислота, глюконова кислота, глютамінова кислота, гідроксинафтоїна кислота, саліцилова кислота, стеаринова кислота, муконова кислота, та подібні.

Фармацевтично-придатні солі також включають солі, утворені при заміщенні кислотного протону, присутнього у початковій сполуці, іоном металу (наприклад, іоном лужних металів, іоном лужних земляних металів або іоном алюмінію), іоном амонію або в результаті коордінації з органічною базою (наприклад, етаноламін, діетаноламін, триетаноламін, N-метилглюкамін, морфолін, піперидін, діметиламін, діетиламін, тощо).

2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом, а також їх солі, можуть також мати форму гідратів, сольватів та N-оксидів, як добре відомо на практиці.

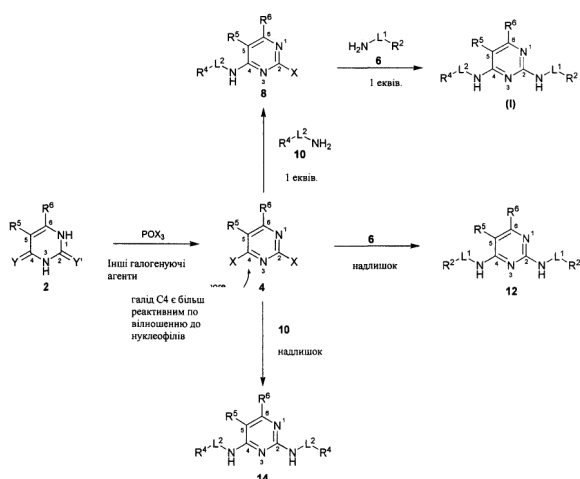
Методи синтезу

Сполуки та проліки даного винаходу можна синтезувати за допомогою різних способів, використовуючи комерційно доступні вихідні матеріали та/або вихідні матеріали, приготовлені звичайними синтетичними методами. Різні методи, які можна застосовувати для синтезу сполук 2,4-піримідиндіаміну та проліків даного винаходу, описані у [Патенті США №5958935], посилання на який наведене у даній заяві. Конкретні приклади, що описують синтез численних сполук та проліків згідно з даним винаходом, а також їх проміжних сполук, наведені у розділі "Приклади". Всі сполуки зі структурними формулами (I), (Ia) та (II) можуть бути приготовлені шляхом нескладної модифікації цих методів.

Різновид можливих методів синтезу, які можна використовувати для синтезу 2,4-піримідиндіамінових сполук згідно з даним винаходом, описані нижче у Схемах (I)-(XI). У Схемах (I)-(XI) сполуки з подібними номерами мають подібну структуру. Ці методи можна застосовувати з метою синтезу проліків, які відповідають структурній формулі (II).

У одному з прикладів реалізації сполуки можуть бути синтезовані з заміщених або незаміщених урацилів або тіоурацилів, як проілюстровано у Схемі (I) нижче:

Схема (I)



У Схемі (I) R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 та L^2 визначені раніше для структурної формули (I), X є галоген (наприклад, F, Cl, Br або I) та Y та Y' , кожний незалежно один від одного, вибираються з групи, що складається з O та S. За Схемою (I), урацил або тіоурацил 2 є дігалогенізований у 2-й та 4-й позиціях з допомогою стандартного галогенуючого агента POX_3 (або іншого стандартного галогенуючого агента) за стандартних умов для утворення 2,4-бісгалогідопіримідину 4. Залежно від замітника R^5 , у піримідині 4, галід у позиції C4 сильніше реагує з нуклеофілами, ніж галідом у позиції C2. Цю різницю у реактивності можна використовувати для синтезу 2,4-піримідиндіамінів структурної формули (I) шляхом проведення реакції між 2,4-бісгалогідопіримідином 4 з одним еквівалентом аміну 10 з утворенням 4Н-заміщеного-2-галогідо-4-піримідинаміну 8, за яким слідує амін 6 для утворення 2,4-піримідиндіаміну, який відповідає структурній формулі (I). 2N,4N-біс(заміщений)-2,4-піримідиндіаміни 12 та 14 можуть бути отримані в результаті реакції 2,4-бісгалогідопіримідину 4 з надлишком сполук 6 або 10 відповідно.

У більшості випадків, C4 галід є більш реактивним по відношенню до нуклеофілів, як показано на Схемі. Однак, як має бути визнано досвідченими фахівцями, природа замітника R^5 можуть змінити цю реактивність. Наприклад, якщо R^5 являє трифторметил, то отримують 50:50 суміш сполук 4Н-заміщеного-4-піримідинаміну 8 та відповідного 2N-заміщеного-2-піримідинаміну. Незалежно від природи замітника R^5 , регіоселективність реакції можна регулювати з допомогою підбору розчинника та інших умов синтезу (таких як температура), як добре відомо у цій галузі.

Реакції, зображені на Схемі (I), можуть відбуватися швидше при мікрохвильовому нагріванні реакційних сумішей. В такому випадку можна використовувати наступні умови: нагрів до 175°C у етанолі протягом 5-20хв у реакторі Сміту (виробництва фірми Personal Chemistry) у герметичній трубці (під тиском 20бар).

Початкові матеріали урацил або тіоурацил 2 можна придбати на комерційній основі або

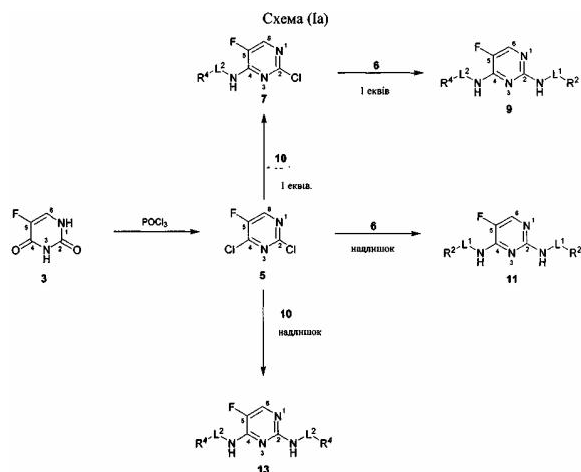
приготувати, використовуючи стандартні засоби органічної хімії. Комерційні урацили та тіоурацили, що можуть бути використані як початкові матеріали у Схемі (I), включають, але не обмежуються наступними: урацил (Aldrich №13,078-8; CAS Registry 66-22-8); 2-тіо-урацил (Aldrich №11,558-4; CAS Registry 141-90-2); 2,4-дитіоурацил (Aldrich № 15,846-1; CAS Registry 2001-93-6); 5-оцтоурацил (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 6214-65-9); 5-азідоурацил; 5-аміноурацил (Aldrich №85,528-6; CAS Registry 932-52-5); 5-бромуррацил (Aldrich №85,247-3; CAS Registry 51-20-7); 5-(транс-2-бромовініл)-урацил (Aldrich №45,744-2; CAS Registry 69304-49-0); 5-(транс-2-хлорвініл)-урацил (CAS Registry 81751-48-2); 5-(транс-2-карбоксівініл)-урацил; урацил-5-карбоксильна кислота (гідрат 2,4-дигідроксіпіримідин-5-карбонової кислоти; Aldrich №27, 770-3; CAS Registry 23945-44-0); 5-хлоруррацил (Aldrich № 22, 458-8; CAS Registry 1820-81-1); 5-ціаноурацил (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 4425-56-3); 5-етилурацил (Aldrich №23, 044-8; CAS Registry 4212-49-1); 5-етенілурацил (CAS Registry 37107-81-6); 5-фторурацил (Aldrich №85, 847-1; CAS Registry 51-21-8); 5-йодурацил (Aldrich №85, 785-8; CAS Registry 696-07-1); 5-метилурацил (тімін; Aldrich №13,199-7; CAS Registry 65-71-4); 5-нітроурацил (Aldrich №85, 276-7; CAS Registry 611-08-5); урацил-5-сульфамінова кислота (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 5435-16-5); 5-(трифторметил)-урацил (Aldrich №22, 327-1; CAS Registry 54-20-6); 5-(2,2,2-трифторетил)-урацил (CAS Registry 155143-31-6); 5-(пентафторетил)-урацил (CAS Registry 60007-38-3); 6-аміноурацил (Aldrich №a5060-6; CAS Registry 873-83-6) урацил-6-карбонова кислота (оротова кислота; Aldrich №0-840-2; CAS Registry 50887-69-9); 6-метилурацил (Aldrich № D11, 520-7; CAS Registry 626-48-2); урацил-5-аміно-6-карбонова кислота (5-амінооротова кислота; Aldrich №19, 121-3; CAS Registry №7164-43-4); 6-аміно-5-нітрозоурацил (6-аміно-2,4-дигідрокси-5-нітрозопіримідин; Aldrich №27, 689-8; CAS Registry 5442-24-0); урацил-5-фтор-6-карбоксильна кислота (5-фтороротова кислота; Aldrich №42, 513-3; CAS Registry 00000-00-0); та урацил-5-нітро-6-карбонова кислота (5-нітрооротова кислота; Aldrich №18, 528-0; CAS Registry 600779-49-9). Додаткові 5-, 6-та 5,6-заміщені урацили та/або тіоурацили можна придбати в компаніях General Intermediates of Canada, Inc., (Едмонтон, Альберта, Канада) (www.generalintermediates.com) та/або Interchim, Франція (www.interchim.com), або можна приготувати з допомогою стандартних методів. Нижче наведена велика кількість посилань на підручники, в яких викладені відповідні синтетичні методи.

Аміни 6 та 10 можна придбати з комерційних джерел або, альтернативно, можна синтезувати, використовуючи стандартні методи. Наприклад, відповідні аміни можуть бути синтезовані з нітро-прекурсорів, використовуючи стандартні хімічні методи. Конкретні приклади реакцій наведені у розділі "Приклади". Див. також: [Vogel, 1989,

Practical Organic Chemistry, Addison Wesley Longman, Ltd. and John Wiley & Sons, Inc.].

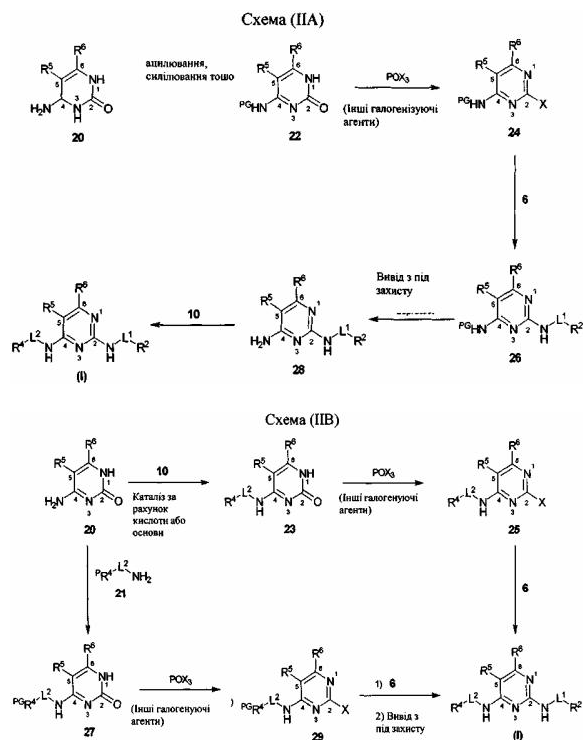
З практики відомо, що в деяких випадках аміни 6 та 10 та/або замісники R^5 та/або R^6 на урацилі або тіоурацилі 2 можуть включати функціональні групи, які потребують захист під час синтезу. Конкретний вигляд будь-якої з використовуваних захисних груп буде залежати від особливості функціональної групи, яка підлягає захисту, та буде яким для фахівців. Поради щодо вибору відповідних захисних груп, а також стратегій синтезу для їхнього приєднання та усунення, можна знайти, наприклад, в [роботі Гріна та Вутса, "Захисні Групи в Органічному Синтезі", 3-є видання, Джон Вайлі енд Сане, Нью-Йорк, 1999р. (Greene & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3d Видання, John Wiley & Sons, Inc., New York (1999) та у посиланнях, наведених у цьому виданні (далі "Greene & Wuts")].

Конкретний приклад реалізації Схеми (I), у якій в якості первинного матеріалу використовується 5-фторурацил (Aldrich №32, 937-1), наведений нижче у Схемі (Ia):



У Схемі (Ia) $-R^2$, R^4 , L^1 та L^2 відповідають значенням, визначеним раніше для Схеми (I). За Схемою (Ia), 5-фторурацил 3 галогенізують з допомогою $POCl_3$ з метою утворення 2,4-дихлор-5-фторпіримідину 5, який потім реагує з залишком аміну 6 або 10 з метою утворення N2,N4-біс-заміщений 5-фтор-2,4-піримідиндіамін 11 або 13 відповідно. Альтернативно, асиметричний 2N,4N-двозаміщений-5-фтор-2,4-піримідиндіамін 9 можна отримати в результаті реакції 2,4-дихлор-5-фторпіримідину 5 з одним еквівалентом аміну 10 (з метою утворення 2-хлор-N4-заміщеного-5-фтор-4-піримідинаміну 7), а потім з одним або більше еквівалентами аміну 6.

У іншому прикладі реалізації, 2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу можна синтезувати із заміщених або незаміщених цитозинів, як наведено у Схемах (IIA) та (IIB), нижче:



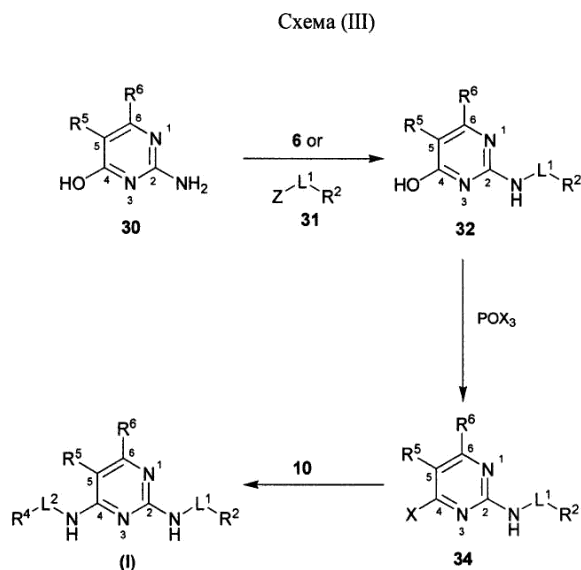
У Схемах (IIA) та (IIB) R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 та X відповідають їх попереднім значенням у Схемі (I), та PG являє захисну групу. Звертаючись до Схеми (IIA), C4 екзоциклічний амін цитозину 20 спочатку захищається відповідною захисною групою PG з метою утворення Ш-захисненого цитозину 22. Для конкретної поради щодо захисних груп, використаних у цьому контексті, [див. Vorbrüggen and Ruh -Pohlentz, 2001, Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, NY, pp.1-631]. Захищений цитозин 22 галогенізують у позиції C2, використовуючи стандартний реагент галогенізації у стандартних умовах з метою утворення 2-хлор-4N-захисненого-4-піримідинаміну 24. Реакція з аміном 6 та наступне зняття захисту з C4 екзоциклічного аміну і реакція з аміном 10 призводять до утворення 2,4-піримідиндіаміну, який відповідає структурній формулі (I).

Альтернативно, як показано на Схемі (IIB), цитозин 20 може вступати в реакцію з аміном 10 або захищеним аміном 21 з метою утворення Ш-заміщеного цитозину 23 або 27 відповідно. Ці заміщені цитозини можуть потім бути галогенізовані, як описано раніше, звільнені від захисту (у випадку N4-заміщеного цитозину 27) та вступати в реакцію з аміном 6 з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну, який відповідає структурній формулі (I).

Комерційно доступні цитозини, які можна використовувати в якості початкових матеріалів у Схемах (IIA) та (IIB), включають, але не обмежуються цитозином (Aldrich №14, 201-8; CAS Registry 71-30-7); N⁴-ацетилцитозином (Aldrich №37, 791-0; CAS Registry 14631-20-0); 5-фторцитозином (Aldrich №27, 159-4; CAS Registry 2022-85-7); та 5-(трифторметил)-цитозином. Інші цитозини, що можуть бути використані як початкові матеріали у Схемах (IIA), можна придбати на

фірмах General Intermediates of Canada, Inc., (Едмонтон, Альберта, Канада) (www.generalintermediates.com) та/або Interchim, Франція (www.interchim.com), або можуть бути приготовлені, використовуючи відомі стандартні засоби. Посилання на підручники, що містять відповідні синтетичні методи, наведено нижче.

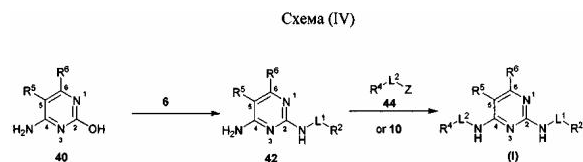
У ще іншому прикладі реалізації, 2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу можуть бути синтезовані із заміщених або незаміщених 2-аміно-4-піримідинолів, як проілюстровано у Схемі (III) нижче:



У Схемі (III) R², R⁴, R⁵, R⁶, L¹, L² та X відповідають значенням у Схемі (I), та Z являє групу заміщення, яка буде більш детально описана у Схемі IV нижче. За Схемою (III), 2-аміно-4-піримідинол 30 реагує з аміном 6 (або вибірково захищеним аміном 21) з метою отримання N2-заміщеного-4-піримідинолу 32, який потім піддається галогенізації, як описано вище, для отримання N2-заміщеного-4-галогідо-2-піримідинаміну 34. Додаткова втрата захисту (наприклад, при використанні захищеного аміну 21 у першому етапі) з наступною реакцією з аміном 10 призводить до утворення 2,4-піримідиндіаміну структурної формули (I). В альтернативному випадку, піримідинол 30 може вступити в реакцію з ацилюючим засобом 31.

Відповідні комерційно-доступні 2-аміно-4-піримідиноли 30, що можуть бути використані як початкові матеріали у Схемі (III), включають, але не обмежуються 2-аміно-6-хлоро-4-піримідинол гидратом (Aldrich №A4702-8; CAS Registry 00000-00-0) та 2-аміно-6-гідроксі-4-піримідинолом (Aldrich № A5040-1; CAS Registry 56-09-7). Інші 2-аміно-4-піримідиноли 30, що можуть бути використані як початкові матеріали у Схемі (III), можна придбати у компаніях General Intermediates of Canada, Inc., (Едмонтон, Альберта, Канада) (www.generalintermediates.com) та/або Interchim, Франція (www.interchim.com), або можна приготувати, використовуючи стандартні методи. Посилання на підручники, у яких викладені відповідні синтетичні методи, наведено нижче.

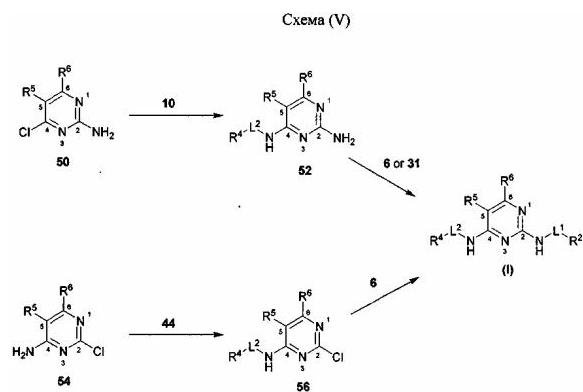
Альтернативно, 2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом можуть бути приготовлені з заміщених або незаміщених 4-аміно-2-піримідинолів, як проілюстровано у Схемі (IV), нижче:



У Схемі (IV) R², R⁴, R⁵, R⁶, L¹ та L² відповідають попереднім визначенням у Схемі (I), та Z являє заміщувану групу. У Схемі (IV) C2-гідроксил 4-аміно-2-піримідинолу 40 є більш реактивний по відношенню до нуклеofilів, ніж C4-аміно настільки, що реакція з аміном 6 призводить до утворення N2-заміщеного-2,4-піримідиндіаміну 42. Наступна реакція зі сполукою 44, яка включає добре заміщувану групу Z або амін 10, призводить до утворення 2,4-піримідиндіаміну, який відповідає структурній формулі (I). Сполука 44 може включати практично будь-яку заміщувану групу, яка може бути замінена C4-аміном N2-заміщеного-2,4-піримідиндіаміну 42. Відповідні заміщені групи Z включають, але не обмежуються галогенами, метан-сульфонілокси (мезилокси; "OMs"), трифторметансульфонілокси ("OTf") та п-толуолсульфонілокси (тосилокси; "OTs"), бензолсульфонілокси ("безілат") та метанітробензолсульфонілокси ("нозілат"). Інші відповідні заміщені групи будуть очевидні до фахівців у цій галузі.

Заміщений 4-аміно-2-піримідинол, який використовується в якості вихідного матеріалу, може бути отриманий на комерційній основі або синтезований з використанням стандартних засобів. Посилання на підручники, у яких викладені відповідні синтетичні методи, наведено нижче.

У ще одному прикладі реалізації, 2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом можна приготувати з 2-хлоро-4-амінопіримідинів або 2-аміно-4-хлоропіримідинів, як проілюстровано у Схемі (V) нижче:

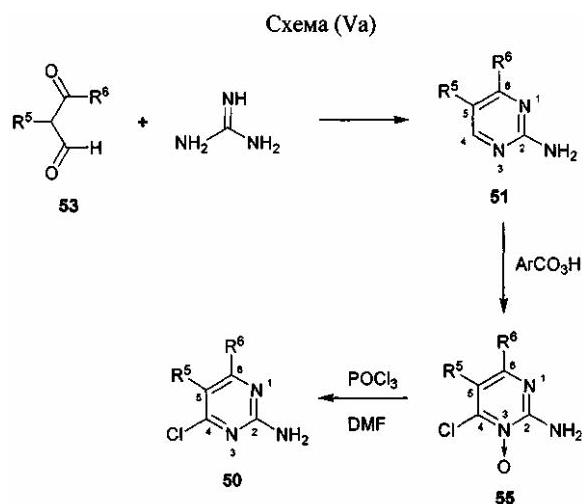


У Схемі (V) R², R⁴, R⁵, R⁶, L¹, L² та X відповідають попереднім визначенням у Схемі (I), та Z являє групу, визначену у Схемі (IV). У Схемі (V) 2-аміно-4-хлоропіримідин 50 реагує з аміном 10

з метою утворення 4N-заміщеного-2-піримідинаміну 52, який потім реагує з сполукою 31 або аміном 6 з утворенням 2,4-піримідиндіаміну структурної формули (I). Альтернативно, 2-хлоро-4-аміно-піримідин 54 може реагувати з сполукою 44 і аміном 6 з утворенням сполуки, яка відповідає структурній формулі (I).

Приклади комерційно доступних піримідинів 50 та 54, які можна використовувати в якості початкових матеріалів у Схемі (V), включають, але не обмежуються наступними: 2-аміно-4,6-дихлорпіримідин (Aldrich № A4860-1; CAS Registry 56-05-3); 2-аміно-4-хлор-6-метоксі-піримідин (Aldrich №51, 864-6; CAS Registry 5734-64-5); 2-аміно-4-хлор-6-метилпіримідин (Aldrich №12, 288-2; CAS Registry 5600-21-5); та 2-аміно-4-хлоро-6-метилтіопіримідин (Aldrich № A4600-5; CAS Registry 1005-38-5). Додаткові початкові матеріали на основі піримідину можна придбати у компаніях General Intermediates of Canada, Inc., (Едмонтон, Альберта, Канада) (www.generalintermediates.com) та/або Interchim, Франція (www.interchim.com), або можна приготувати, використовуючи стандартні засоби. Посилання на підручники, які наводять відповідні синтетичні методи, наведено нижче.

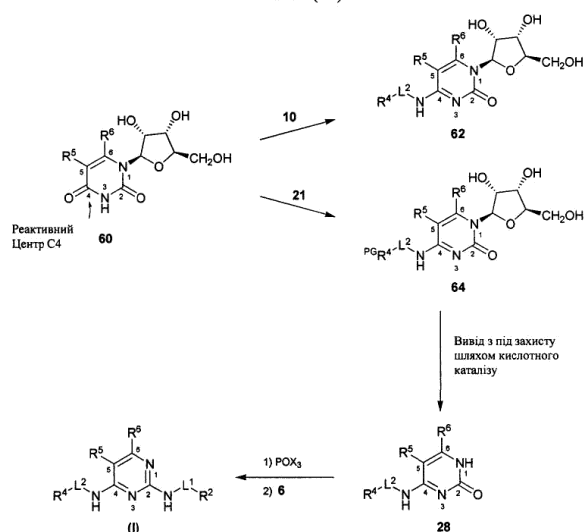
Альтернативно, 4-хлоро-2-піримідинаміни 50 можуть бути приготовлені так, як проілюстровано у Схемі (Va):



У цій Схемі (Va) R^5 та R^6 являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I). У Схемі (Va), дікарбоніл 53 реагує з гуанідом з метою утворення 2-піримідинаміну 51. Реакція з надкислотами типу м-хлоропербензойної кислоти, трифторпероцтової кислоти або комплексом пероксиду водню з сечовиною призводить до утворення N-оксиду 55, який потім галогенізують для утворення 4-хлор-2-піримідинаміну 50. Відповідні 4-галогідо-2-піримідинаміни можна отримати, використовуючи відповідні реагенти галогенування.

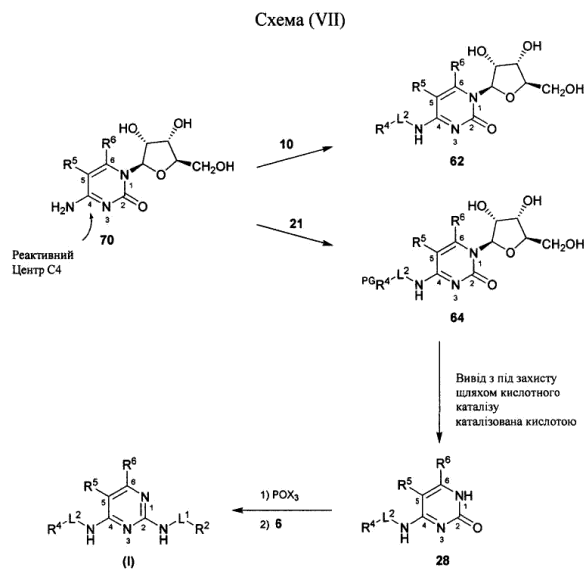
У ще одному прикладі реалізації, сполуки 2,4-піримідиндіаміну даного винаходу можна отримати з заміщених або незаміщених уридинів, як проілюстровано у Схемі (VI) нижче:

Схема (VI)



У Схемі (VI) R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 та X являють групи, описані раніше при визначенні Схеми (I), та показник ступеню PG являє захисну групу, описану у зв'язку зі Схемою (IIb). Відповідно до Схеми (VI), уридин 60 має реактивний центр C4 такий, що реакція з аміном 10 або захищеним аміном 21 призводить до утворення N4-заміщеного цитидину 62 або 64 відповідно. Каталізована кислотою реакція депротекції (вивід з під захисту) N4-заміщеного 62 або 64 (якщо PG являє кислотнестійку захисну групу) призводить до утворення N4-заміщеного цитозину 28, який згодом може бути галогенований у позиції C2 та може вступати в реакцію з аміном 6 з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну згідно з структурною формулою (I).

Аналогічним чином в якості початкових матеріалів також можна використовувати цитидини, як проілюстровано у Схемі (VII) нижче:



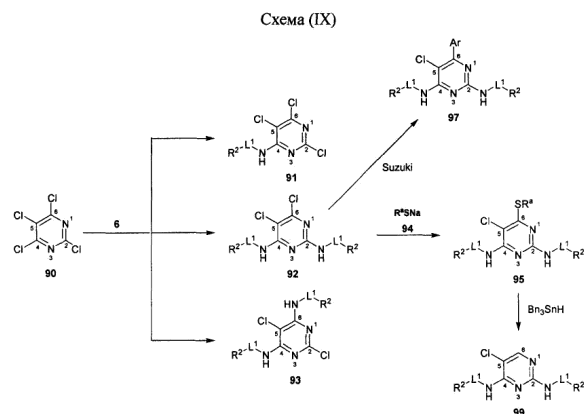
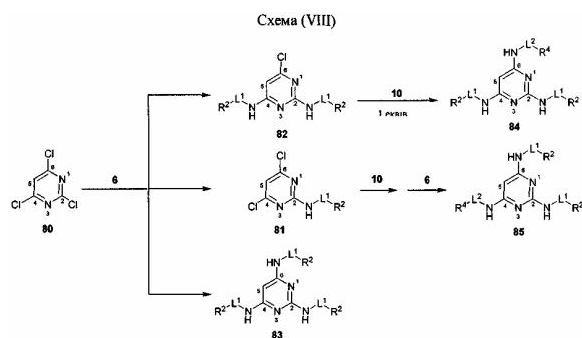
У Схемі (VII) R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 , L^2 та X являють групи, описані раніше при опису Схеми (I), та показник ступеню PG являє захисну групу, описану вище. У Схемі (VII), аналогічно уридину 60, цитидин

70 теж має реактивний центр C4; таким чином реакція з аміном 10 або захищеним аміном 21 призводить до утворення N4-заміщеного цитидину 62 або 64 відповідно. Потім ці цитидини 62 та 64 обробляються, як наведено вище для Схеми (VI), з метою утворення 2,4-піримідиндіаміну, який відповідає структурній формулі (I).

Незважаючи на те, що в Схемах (VI) та (VII) наведені приклади з рибозилнуклеозидами, досвідченому фахівцю ясно, що можна використовувати відповідні 2'-деоксириб та 2',3'-дідеоксирибонуклеозиди, а також нуклеозиди, що включають цукор або цукрові аналоги, за винятком рибозів.

Численні уридини та цитидини, які можна використовувати як початкові матеріали у Схемах (VI) та (VII), добре відомі фахівцям та включають, але не обмежуються наступними: 5-трифторметил-2'-деоксцитидин (Chem. Sources № ABCR F07669; CAS Registry 66,384-66-5); 5-бромуридин (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 957-75-5); 5-йодо-2'-деоксйуридин (Aldrich №1-775-6; CAS Registry 54-42-2); 5-фторуридин (Aldrich №32,937-1; CAS Registry 316-46-1); 5-йодоуридин (Aldrich №85,259-7; CAS Registry 1024-99-3); 5-(трифторметил) уридин (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 70-00-8); 5-трифторметил-2'-деоксйуридин (Chem. Sources Int'l 2000; CAS Registry 70-00-8). Додаткові уридини та цитидини, яка можна використовувати як початкові матеріали у Схемах (VI) та (VII), можна придбати у компаніях General Intermediates of Canada, Inc., (Едмонтон, Альберта, Канада) (www.generalintermediates.com) та/або Interchim, Франція (www.interchim.com). або можна приготувати, використовуючи стандартні засоби. Посилання на підручники, які наводять відповідні синтетичні методи, наведено нижче.

2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом можуть бути також синтезовані з заміщених піримідинів, таких як хлор-заміщені піримідини, як проілюстровано у Схемах (VIII) та (IX) нижче:

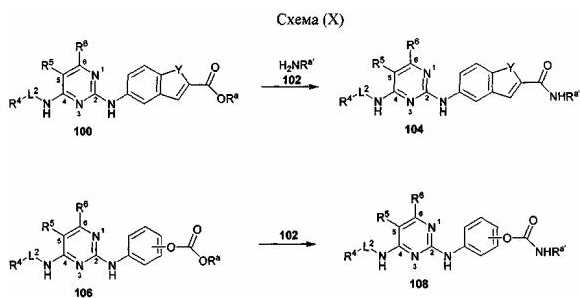


У Схемах (VIII) та (IX) R^2 , R^4 , L^1 , L^2 та R^a являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I), та "Ar" являє групу арилу. За Схемою (VIII) реакція 2,4,6-трихлорпіримідину 80 (Aldrich #T5,620-0; CAS#3764-01-0) з аміном 6 призводить до утворення суміші трьох сполук: заміщеного піримідин моно-, ді- та триамінів 81, 82 та 83, які можуть бути відокремлені та виділені за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) або інших звичайних засобів. Моно- та діаміни 81 та 82 можуть далі реагувати з амінами 6 та/або 10 з утворенням N2, N4, N6-тричізаміщених-2,4,6-піримідинтріамінів 84 та 85 відповідно.

N2,N4-біс-заміщені-2,4-піримідиндіаміни можна приготувати способом, аналогічним до наведеного на Схемі (VIII), використовуючи як початкові матеріали 2,4-дихлор-5-метилпіримідин або 2,4-дихлор-піримідин. У цьому випадку, моно-заміщений піримідинамін, який відповідає сполучі 81, не утворюється. Замість цього, реакція безпосередньо призводить до утворення N2,N4-біс-заміщеного-2,4-піримідиндіаміну.

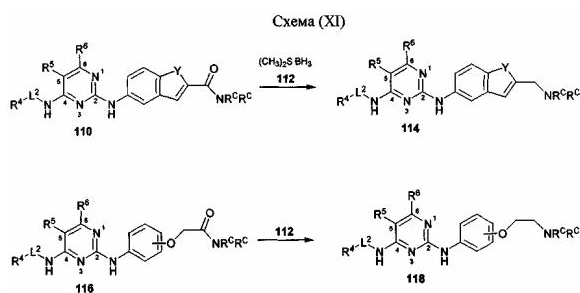
За Схемою (IX) 2,4, 5,6-тетрахлорпіримідин 90 (Aldrich №24,671-9; CAS № 1780-40-1) реагує з надлишковим аміном 6 з метою утворення суміші трьох сполук: 91, 92, та 93, які можуть бути відокремлені та виділені з допомогою ВЕРХ або інших звичайних засобів. Як проілюстровано вище, N2,N4-біс-заміщений-5,6-дихлор-2,4-піримідиндіамін 92 може далі реагувати у позиції C6 галід з, наприклад, нуклеофільним агентом 94 для утворення сполуки 95. Альтернативно, сполука 92 може бути перетворена у N2,N4-біс-заміщений-5-хлор-6-аріл-2,4-піримідиндіамін 97 за допомогою реакції Сузукі (Suzuki). 2,4-піримідиндіамін 95 може бути перетворений до 2,4-піримідиндіаміну 99 за допомогою реакції з Bn_3SnH .

Спеціалістам у даній галузі ясно, що 2,4-піримідиндіаміни даного винаходу, синтезовані за допомогою методів, наведених вище, або інших добре відомих способів, можна також використовувати як початкові матеріали та/або проміжні сполуки для синтезування додаткових 2,4-піримідиндіамінових сполук винаходу. Конкретний приклад наводиться у Схемі (X) нижче:



У Схемі (X) R^4 , R^5 , R^6 , L^2 та R^a являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I). Кожний R^a незалежно являє R^a , та може являти собою той же самий або відмінний від наведеного R^a . За Схемою (X) карбонова кислота або складний ефір 100 може бути перетворений у амід 104 за допомогою реакції з аміном 102. В аміні 102 група R^a може бути тією самою, або відмінною від R^a кислоти або складного ефіру 100. Аналогічно, ефір вуглекислої кислоти 106 може бути перетворений на карбамат 108.

Другий конкретний приклад ілюструється у Схемі (XI) нижче:



У Схемі (XI) R^4 , R^5 , R^6 , L^2 та R^c являють групи, описані раніше при визначенні структурної формули (I). За Схемою (XI), амід 110 або 116 може бути перетворений на амін 114 або 118 відповідно в результаті відновлення борану боранметилсульфідним комплексом 112. Інші відповідні реакції для синтезування 2,4-піримідиндіамінових сполук з 2,4-піримідиндіамінових початкових матеріалів є зрозумілими для фахівців у цій галузі.

Незважаючи на те, що багато з синтетичних схем, розглянутих вище, не відображають використання захисних груп, ясно, що у деяких випадках заміники R^2 , R^4 , R^5 , R^6 , L^1 та/або L^2 можуть включати функціональні групи, які потребують захисту. Точні властивості застосованої захисної групи будуть залежати, поміж усього іншого, від природи функціональної групи, яка знаходиться під захистом, та умов реакції у конкретній синтетичній схемі, що очевидно для фахівців у цій галузі. Пораду щодо вибору захисної групи та механізмів для приєднання та усунення, зручних для певного застосування, можна знайти, наприклад, у Greene & Wuts (див. вище).

Проліки, які відповідають структурній формулі (II), можна приготувати з допомогою звичайної модифікації вищенаведених методів.

Альтернативно, такі проліки можна отримати в результаті реакції певним чином захищеного 2,4-піримідиндіаміну зі структурною формулою (I) з придатною прогруппою. Умови для проведення таких реакцій та умови для зняття захисту з продукту реакції для утворення проліків, що відповідають формулі (II), є добре відомі.

В літературі відома велика кількість методів синтезу піримідинів, а також початкових матеріалів, описаних у Схемах (I)-(IX). За конкретними порадами читач може звернутися до наступних джерел: [Brown, D. J., "The Pyrimidines", in The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16 (Weissberger, A. Ed.), 1962, Interscience Publishers, (A Division of John Wiley & Sons), New York ("Brown I"); Brown, D. J., "The Pyrimidines", in The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16, Supplement I (Weissberger, A. and Taylor, E. C. Ed.), 1970, Wiley-Interscience, (A Division of John Wiley & Sons), New York (Brown II); Brown, D. J., "The Pyrimidines", in The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16, Supplement II (Weissberger, A. and Taylor, E. C. Ed.), 1985, An Interscience Publication (John Wiley & Sons), New York ("Brown III"); Brown, D. J., "The Pyrimidines" in The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 52 (Weissberger, A. and Taylor, E. C. Ed.), 1994, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.1-1509 (Brown IV); Kenner, G. W. and Todd, A., in Heterocyclic Compounds, Volume 6, (Elderfield, R. C. Ed.), 1957, John Wiley, New York, Chapter 7 ("Pyrimidines"); Paquette, L. A., Principles of Modern Heterocyclic Chemistry, 1968, W. A. Benjamin, Inc., New York, pp.1-401 ("Uridyl synthesis" pp. 313, 315; "Pyrimidine synthesis" pp.313-316; "Amino pyrimidine synthesis" pp.315); Joule, J. A., Mills, K. and Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 3rd Edition, 1995, Chapman and Hall, London, UK, pp.1-516; Vorbriiggen, H. and Ruh-Pohlenz, C., Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2001, pp.1-631 ("Protection of pyrimidines by acylation" pp. 90-91; "Silylation of pyrimidines" pp.91-93); Joule, J. A., Mills, K. and Smith, G. F., Heterocyclic Chemistry, 4th Edition, 2000, Blackwell Science, Ltd, Oxford, UK, pp.1-589; and Comprehensive Organic Synthesis, Volumes 1-9 (Trost, B. M. and Fleming, I., Ed.), 1991, Pergamon Press, Oxford, UK].

Інгібування сигнальних каскадів Fc Рецепторів
Активні сполуки 2,4-піримідиндіамінів даного винаходу інгібують сигнальні каскади Fc рецепторів, які ведуть, поміж всього іншого, до дегрануляції клітин. Наприклад, ці сполуки інгібують сигнальні каскади FcεRI та/або FcγRI рецепторів, що ведуть до дегрануляції імунних клітин, таких як нейтрофільні, еозінофільні, тучні та/або базофільні клітини. Тучні та базофільні клітини грають центральну роль у порушеннях, викликаних алергенами, включаючи, наприклад, алергічні риніти та астму. Як показано на Fig.1, під впливом алергенів, якими можуть бути, поміж іншого, пилко або паразити, В-клітини, активовані IL-4 (або IL-13) та іншими посередниками, синтезують алерген-специфічні IgE антитіла з метою переходу до синтезу конкретного антитіла класу IgE. Ці алерген-специфічні IgE зв'язуються з FcεRI з високою спорідненістю. Після зв'язування

антигену, зв'язані з Fc α R1 IgE перехресно зшиваються, та активується шлях трансдукції сигналу рецептора IgE, який призводить до дегрануляції клітин та наступного виділення та/або синтезу набору хімічних посередників (медіаторів), включаючи гістамін, протеази (такі, як триптази та хімази), ліпідні посередники, такі як лейкотрієни (наприклад, LTC₄), фактор активації тромбоцитів (PAF), простагландіни (наприклад, PGD₂) та серію цитокінів, включаючи TNF- α , IL-4, IL-13, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, VEGF та TGF- β . Виділення та/або синтез цих медіаторів з тучних та/або базофільних клітин є причиною ранніх та пізніх відповідей, викликаних алергенами, та безпосередньо пов'язано з процесами, що відбуваються в прямому напрямі, які ведуть до тривалого запального стану.

Молекулярні процеси на шляху трансдукції сигналу Fc ϵ R1-рецепторами, які ведуть до виділення преформованих медіаторів через дегрануляцію та виділення та/або синтез інших хімічних медіаторів, добре відомі та зображені на Фіг.2. Як показано на Фіг.2, Fc ϵ R1 являє гетеротетраметричний рецептор, що складається з IgE-зв'язуючого альфа субодиниць, бета-субодиниць, та двох гамма-субодиниць (гамма-гомодімер). Перехресне зшивання Fc ϵ R1-зв'язаного IgE з допомогою багатовалентних зв'язуючих агентів (включаючи, наприклад IgE-специфічні алергени, або анти-IgE антитіла, або фрагменти) викликає швидку асоціацію та активацію Src-залежної Lyn-кінази. Lyn фосфорилує мотив активації імунорецептору, базований на тирозині (MAIT), на внутріклітинних бета-та гамма-субодиницях, який призводить до рекрутингу додаткової Lyn до бета-субодиниць та Syk-кінази до гамма-гомодімеру. Ці пов'язані з рецепторами кінази, що активуються завдяки внутрі- та між-молекулярному фосфорилуванню, фосфорилують інші компоненти шляху, наприклад Btk-кінази, LAT, та фосфоліпазу C-гамма PLC-гамма). Активована PLC-гамма ініціює шляхи, що ведуть до активації протеїн кінази C та мобілізації іонів Ca²⁺, обидва з яких необхідні для дегрануляції. Перехресне зшивання Fc α R1 також активує три головні класи протеїн кіназ, що активуються мітогеном (MAP), тобто ERK1/2, JNK1/2, та p38. Активація цих шляхів важлива при транскрипційному регулюванні прозапальних медіаторів, таких як TNF- α та IL-6, а також ліпідних медіаторів лейкотрієну CA (LTC₄).

Хоч і не зображено на кресленні, вважається, що сигнальний каскад Fc γ R1 рецепторів має деякі спільні елементи з сигнальним каскадом Fc ϵ R1 рецепторів. Важливо те, що аналогічно Fc ϵ R1, Fc γ R1 включає гамма гомодімер, який фосфорильований та рекрутує Syk, та як і у випадку Fc ϵ R1, активація сигнального каскаду Fc γ R1 веде, поміж іншого, до дегрануляції. Інші Fc рецептори, що мають гамма гомодімер та можуть регулюватися активними 2,4-піримідиндіаміновими сполуками, включають, але не обмежуються Fc α R1 та Fc γ R1II.

Здатність 2,4-піримідиндіамінових сполук даного винаду інгібувати сигнальні каскади Fc

рецепторів можна просто визначити або підтвердити в результаті *in vitro* аналізів. Аналізи, що підтверджують інгібування Fc ϵ R1-опосередкованої дегрануляції, наведені у розділі "Приклади". У одному типовому аналізі, клітини, що зазнають Fc ϵ R1-опосередковану дегрануляцію, як наприклад тучні або базофільні клітини, спочатку вирощуються у присутності IL-4, фактору стовбурних клітин (SCF), IL-6 та IgE для збільшення експресії Fc ϵ R1, підданого впливу досліджуваної сполуки 2,4-піримідиндіаміну даного винаходу та стимулюються анти-IgE антитілами (або, альтернативно, IgE-специфічним алергеном). Після інкубації, кількість хімічного медіатора або іншого хімічного агента, вивільненого та/або синтезованого внаслідок активації сигнального каскаду Fc ϵ R1, можна визначити, використовуючи стандартні засоби, та порівняти з кількістю медіатора або агента, вивільненого з контрольних клітин (таких, як клітини, що стимулюються, але не зазнають впливу досліджуваних сполук). Концентрація досліджуваної сполуки, що призводить до 50% зменшення виміряної кількості медіатора або агента у порівнянні з контрольними клітинами, дорівнює IC₅₀ досліджуваної сполуки. Походження тучних або базофільних клітин, використаних у кількісному аналізі, буде залежати, частково, від бажаного застосування сполук, що очевидно для фахівців у цій галузі. Наприклад, якщо сполуки будуть використовуватись для лікування або профілактики деякого захворювання у людини, то зручним джерелом тучних або базофільних клітин є людина або інша тварина, яку прийнято вважати за придатну або відому клінічну модель такого захворювання. Таким чином, в залежності від конкретного застосування, тучні або базофільні клітини можна одержати з різних тваринних джерел, починаючи від нижчих ссавців, таких як миші та щури, до собак, овець та інших ссавців, які загально використовуються у клінічних досліджах, до вищих ссавців, таких як мавпи, шимпанзе та людиноподібні мавпи, та людини. Конкретні приклади клітин, що підходять для виконання *in vitro* аналізу, включають, але не обмежуються клітинами гризунів або базофілами людини, лініями базофільних клітин лейкоїї щурів, первинними тучними клітинами мишей (такими як тучні клітини, одержані з кісткового мозку миші "BMMC") та первинними тучними клітинами людини, виділеними з пуповини крові ("CHMC") або інших тканин, наприклад тканин легень. Методи виділення та культивування цих типів клітин добре відомі або наведені у розділі "Приклади" [див, наприклад, Demo et al., 1999, Cytometry 36 (4): 340-348 та заявку на патент №10/053,355, дата подачі-8-е листопада 2001 року, розкриття якого включається у даний документ на основі посилання]. Звичайно, інші типи імунних клітин, що дегранулюють після активації сигнальних каскадів Fc ϵ R1, можуть також бути використані, включаючи, наприклад, еозінофіли.

Фахівці в даній галузі погодяться, що кількісне визначення медіатора або агента не є обов'язковим. Єдина вимога полягає в тому, щоб саме посередник або агент був вивільнений та/або

синтезований внаслідок ініціації або активації сигнального каскаду FcεR1 рецептора. Наприклад, як показано на Фіг.1, активація сигнального каскаду FcεR1 у тучних та/або базофільних клітинах веде до численних подій, які відбуваються у прямому напрямі. Наприклад, активація сигнального каскаду FcεR1 веде до негайного виділення за допомогою дегрануляції (від 1 до 3 хвилин після активації рецептора) різновиду преформованих хімічних медіаторів посередників та агентів. Таким чином, в одному прикладі реалізації, визначені медіатори або агенти можуть бути характерними для гранул (тобто, бути присутніми у гранулах, а не у цитоплазмі клітини). Приклади грануло-специфічних медіаторів або агентів, які можна кількісно визначити з метою визначення та/або підтвердження активності 2,4-піримідиндіамінової сполуки даного винаходу, включають, але не обмежуються наступними: грануло-специфічні ферменти, такі як гексозамінідаза, триптаза, та грануло-специфічні компоненти, наприклад гістамін та серотонін. Аналізи для кількісного визначення таких факторів є добре відомими та, у багатьох випадках, комерційно доступними. Наприклад, виділення триптази та/або гексозамінідази можна кількісно визначити шляхом інкубації клітин з розщеплюваними субстратами, які флуоресціюють після розщеплення, та визначають кількість утвореної флуоресценції загальноприйнятими методами. Такі спроможні до розщеплення флуорогенні субстрати є комерційно доступними. Наприклад, флуорогенні субстрати Z-Gly-Pro-Arg-AMC (де Z=бензилоккарбонил та AMC=7-аміно-4-метилкумарин; BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA 19462, Catalog No. P-142) та Z-Ala-Lys -Arg-AMC (Enzyme Systems Products, a division of ICN Biomedicals, Inc., Livermore, CA 94550, Catalog No. AMC-246)) можна застосовувати для визначення кількості вивільненої триптази. Флуорогенний субстрат 4-метилумбелліферил-N-ацетил-β-D-глюкозамінід (Sigma, St. Louis, MO, Catalog #69585) можна застосовувати для підрахунку кількості вивільненої гексозамінідази. Виділення гістаміну можна кількісно визначити, використовуючи комерційно доступний твердофазний імуоферментний аналіз (ELISA), такий як ELISA аналіз гістаміну "Immunotech" № IM2015 (Beckman-Coulter, Inc.). Конкретні методи кількісного визначення виділення триптази, гексозамінідази та гістаміну наведені у розділі "Приклади". Будь-який з цих кількісних аналізів можна використовувати для визначення або підтвердження активності 2,4-піримідиндіамінових сполук даного винаходу.

Звертаючись знову до Фіг.1, дегрануляція є тільки однією з декількох відповідей, ініційованих сигнальним каскадом FcεR1. До того ж, активація цього сигнального шляху веде до *de novo* синтезу та виділення цитокінів та хемокинів, таких як IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IL-13 та MIP1-α, та виділення ліпідних медіаторів таких, як лейкотрієни (LTC4), факторів активації тромбоцитів (PAF) та простагландинів. Відповідно, активність сполук 2,4-піримідиндіамінів даного винаходу можна оцінити шляхом визначення кількості одного або декількох

медіаторів, виділених та/або синтезованих активованими клітинами.

На відміну від грануло-специфічних компонентів, описаних вище, ці медіатори "пізньої стадії" не виділяються негайно ж після активації сигнального каскаду FcεR1. Тому, при проведенні кількісного визначення цих медіаторів пізньої стадії, необхідно врахувати, щоб активована культура клітини вирощувалась протягом часу, достатнього для здійснення синтезу (при необхідності) та виділення медіаторів, які підлягають кількісному визначенню. В загальному випадку, PAF та ліпідні медіатори, такі як лейкотрієн C4, виділяються через 3-30 хвилин після активації FcεR1. Цитокіни та інші медіатори пізньої стадії виділяються приблизно через 4-8 годин після активації FcεR1. Тривалість часу, яка відповідає конкретним медіаторам, відома фахівцям у цієї галузі. Конкретні поради та кількісні аналізи наведені в розділі "Приклади".

Кількість конкретного виділеного медіатора пізньої стадії можна визначити за допомогою будь-якого стандартного методу. У одному прикладі реалізації, кількість можна визначити, використовуючи аналіз ELISA. Комплекти проб ELISA, які підходять для визначення кількості TNFα, IL-4, IL-5, IL-6 та/або вивільненого IL-13, можна придбати в компанії Biosource International, Inc., Camarillo, CA 93012 (див, наприклад, каталоговий номер KHC3011, KHC0042, KHC0052, KHC0061 та KHC0132). Комплекти ELISA, що підходять для визначення кількості вивільненого з клітин лейкотрієна C4 (LTC4), можна придбати в компанії Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI 48108 (див, наприклад, каталоговий номер No. 520211).

Як правило, активні 2,4-піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом будуть мати концентрацію IC₅₀ по відношенню до FcεR1-опосередкованої дегрануляції та/або рівень виділення або синтезу медіаторів порядку 20мкмоль або менше згідно з результатами вимірювання *in vitro*, як описано вище або у розділі "Приклади". Звичайно, досвідченим фахівцям відомо, що сполуки які проявляють низькі величини IC₅₀, наприклад 10мкмоль, 1мкмоль, 100нмоль, 10нмоль, 1нмоль, або навіть нижче, являються особливо корисними.

Спеціалісти в даній галузі також погодяться, що різноманітні медіатори, описані вище, можуть викликати різні несприятливі ефекти або можуть проявляти різні рівні до одного і того ж несприятливого ефекту. Наприклад, ліпідний медіатор LTC4 являє міцний засіб звуження судин, який приблизно у 1000 разів більше здатний викликати звуження судин, ніж гістамін. У іншому прикладі, окрім опосередкування atopічних реакцій або реакцій гіперчутливості Типу I, цитокін може також викликати трансформацію тканин та проліферацію клітин. Таким чином, незважаючи на можливість застосування сполук, що інгібують виділення та/або синтез одного з раніше описаних хімічних медіаторів, фахівці в даній галузі погодяться, що сполуки, які інгібують виділення та/або синтезу більшості, або навіть всіх раніше описаних медіаторів, безсумнівно знайдуть окреме застосування з огляду на їх здатність поліпшувати

або повністю подавляти більшість, або навіть всі несприятливі ефекти, викликані окремими медіаторами. Наприклад, сполуки які інгібують виділення всіх трьох типів медіаторів, грануло-специфічних, ліпідних та цитокінних, є корисними для лікування або запобігання негайної реакції гіперчутливості Типу I, а також їх супроводжуючих хронічних симптомів.

Сполуки згідно з даним винаходом, які здатні інгібувати виділення більш ніж одного типу медіатора (наприклад, грануло-специфічного або медіатора пізньої стадії), можна ідентифікувати шляхом визначення IC_{50} по відношенню до представника медіатора кожного класу, використовуючи різноманітні аналізи *in vitro*, які описано вище (або інші еквівалентні аналізи *in vitro*). Для сполук, запропонованих у даному винаході, які здатні інгібувати виділення більш ніж одного типу медіатора, типово характерні значення IC_{50} менше ніж 20 мкмоль для кожного типу досліджуваного медіатора. Наприклад, сполука, для якої значення IC_{50} становить 1 мкмоль щодо виділення гістаміну ($IC_{50}^{\text{гістамін}}$) та 1 нмоль щодо синтезу та/або виділення LTC₄-лейкотрієну ($IC_{50}^{\text{LTC}_4}$), інгібуює виділення як негайного (грануло-специфічного) медіатора, так і медіатора пізньої стадії. В іншому конкретному прикладі, сполука, для якої $IC_{50}^{\text{триптаза}}$ дорівнює 10 мкмоль, $IC_{50}^{\text{LTC}_4}$ дорівнює 1 мкмоль та $IC_{50}^{\text{IL-4}}$ дорівнює 1 мкмоль, інгібуює виділення негайного (грануло-специфічного), ліпідного та цитокінного медіаторів. Незважаючи на те, що у вищенаведених конкретних прикладах використовуються IC_{50} одного медіатору-представника кожного класу, фахівці в даній галузі погодяться, що значення IC_{50} більшості, або навіть усіх медіаторів, які складають один або більше класів, можуть також бути отримані. Для фахівців в даній галузі буде очевидним кількість та ідентичність медіаторів, для яких повинні бути встановлені значення IC_{50} для певної сполуки та її застосування.

Подібні кількісні аналізи можна застосовувати для підтвердження інгибування сигнальних каскадів, ініційованих іншими Fc рецепторами, такими, як Fc α RI, Fc γ RI та/або Fc γ RIII, з звичайною модифікацією. Наприклад, здатність сполук інгібувати трансдукцію сигналу Fc γ RI-рецепторами можна підтвердити з допомогою аналізів, подібних до вищенаведених, за виключенням того, що сигнальний каскад Fc γ RI активується, наприклад, в результаті інкубації клітин IgG та алерген-специфічним IgG, або антитілом замість IgE та алерген-специфічного IgE або антитіла. Фахівцям в цій галузі відомі придатні типи клітин, активуючих агентів та агентів, потрібних для кількісного визначення з метою підтвердження інгибування інших Fc рецепторів, наприклад Fc рецепторів, що входять до складу гамма гомодімеру.

Особливо корисний клас сполук включає 2,4-піримідиндіамінові сполуки, які інгібують виділення негайних грануло-специфічних медіаторів та медіаторів пізньої стадії з приблизним еквівалентними значеннями IC_{50} . Під приблизним еквівалентними мається на увазі, що IC_{50} для кожного типу медіатора відрізняються один від одного не більше, ніж у 10 раз. Інший особливо

корисний клас сполук включає 2,4-піримідиндіамінові сполуки, які інгібують виділення негайних грануло-специфічних медіаторів, ліпідних медіаторів та цитокінних медіаторів з приблизно еквівалентними IC_{50} . У конкретному прикладі, ці сполуки інгібують виділення наступних медіаторів з приблизно еквівалентними значеннями IC_{50} : гістаміну, триптази, гексозамінідази, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF α та LTC₄. Такі сполуки є особливо корисними, поміж іншого, для поліпшування або повного пригнічення відповідей як на ранніх, так і на пізніх стадіях, пов'язаних з atopічними реакціями або негайними реакціями гіперчутливості Типу I.

В ідеальному випадку бажано, щоб здатність інгібувати виділення всіх бажаних типів медіаторів була присуща одній сполуці. Однак, можна назвати суміші сполук, які забезпечують такий же результат. Наприклад, першу сполуку, яка інгібуює виділення грануло-специфічних медіаторів, можна використати у комбінації з другою сполукою, що інгібуює виділення та/або синтез медіаторів цитокіну.

Крім Fc α RI або Fc γ RI шляхів дегрануляції, описаних вище, дегрануляція тучних та/або базофільних клітин може бути викликана іншими агентами. Наприклад, іономіцин, що являє іонофор кальцію, який обходить ранній механізм переносу сигналу Fc α RI або Fc γ RI клітини, безпосередньо викликає потік кальцію, який ініціює дегрануляцію. Як показано на Фіг.2, активований PLC γ ініціює шляхи, що ведуть, поміж іншого, до мобілізації іонів кальцію та наступної дегрануляції. Згідно з ілюстрацією, ця Ca²⁺ мобілізація викликана на пізнішій стадії шляху сигнального переносу Fc α RI. Як було згадано вище та показано на Фіг.3, іономіцин безпосередньо викликає мобілізацію Ca²⁺ та потік Ca²⁺, який призводить до дегрануляції. Інші іонофори, що викликають дегрануляцію цим способом, включають A23187. Здатність іонофорів, таких як іономіцин, обходити ранні стадії сигнальних каскадів Fc α RI та/або Fc γ RI, можна використати як екран підрахунку для вияву активних сполук даного винаху, які особливо проявляють свою активність інгібувати дегрануляцію шляхом блокування або інгибування ранніх сигнальних каскадів Fc α RI або Fc γ RI, як було розглянуто вище. Сполуки, які особливо інгібують такі ранні Fc α RI або Fc γ RI-опосередковані дегрануляції, інгібують не тільки дегрануляцію та наступне швидке виділення гістаміну, триптази та змісту інших гранул, а також і шляхи активації прозапалення, які викликають виділення TNF α , IL-4, IL-13 та ліпідних медіаторів, таких як LTC₄. Таким чином, сполуки, які конкретно інгібують таку ранню Fc α RI та/або Fc γ RI-опосередковану дегрануляцію, також блокують або інгібують гострі atopічні реакції або реакції гіперчутливості Типу I та й пізню відповідь, у якій задіяно багато медіаторів запалення.

Сполуки згідно з даним винаходом, які особливо інгібують ранню Fc α RI та/або Fc γ RI-опосередковану дегрануляцію, являють ті сполуки, що інгібують Fc α RI та/або Fc γ RI-опосередковану дегрануляцію (наприклад зі значенням IC_{50} менше

ніж 20мкмоль по відношенню до виділення грануло-специфічного медіатора або компоненту згідно з результатами вимірювання у *in vitro* кількістному аналізі за участю клітин, стимульованих IgE або IgG-зв'язковим агентом), але незначним чином інгібують викликану іонофором дегрануляцію. У одному з прикладів реалізації, сполуки вважаються такими, що у незначній мірі інгібують викликану іонофором дегрануляцію, якщо їх IC_{50} значення викликаної іонофором дегрануляції становить більше ніж 20мкмоль згідно з результатами вимірювання *in vitro* аналізі. Зрозуміло, що активні сполуки для яких характерне вище значення IC_{50} викликаної іонофором дегрануляції, або ті, що зовсім не інгібують викликану іонофором дегрануляцію, є особливо ефективними. У іншому прикладі реалізації, сполуки вважаються такими, що не значним чином інгібують дегрануляцію, викликану іонофором, якщо вони демонструють більш ніж 10-кратну відмінність величини значень IC_{50} для Fc ϵ RI та/або Fc γ RI-опосередкованої дегрануляції та викликаної іонофором дегрануляції згідно з результатами *in vitro* аналізу. Аналізи, які можна використовувати для визначення величин IC_{50} обумовленої іонофором дегрануляції, включають будь-який з раніше описаних аналізів дегрануляції за умови, що клітини стимулюються або активуються обумовлюючим дегрануляцію іонофором кальцію, таким як іономіцин або A23187 (A.G. Scientific, San Diego, CA), замість анти-IgE антитіл або IgE-специфічного алергену. Специфічні аналізи для оцінки здатності певної 2,4-піримідиндіамінової сполуки даного винаходу інгібувати дегрануляцію, обумовлену іонофором, наводяться у розділі "Приклади".

Спеціалісти в даній галузі погодяться, що сполуки, які проявляють високий ступінь вибіркової до Fc ϵ RI-опосередкованої дегрануляції, знаходять певне застосування, оскільки такі сполуки селективно діють на Fc ϵ RI каскад та не чинять впливу на інші механізми дегрануляції. Аналогічно, сполуки, які проявляють високий ступінь вибору по відношенню до Fc γ RI-опосередкованої дегрануляції, знаходять певне застосування, оскільки такі сполуки селективно діють на Fc γ RI каскад та не чинять впливу на інші механізми дегрануляції. Сполуки, які проявляють високий ступінь вибіркової, в цілому в 10 або більше разів селективні по відношенню до Fc ϵ RI-або Fc γ RI-опосередкованої дегрануляції у порівнянні до обумовленої іонофором дегрануляції, такої як дегрануляції, обумовленої іономіцином.

Біохімічні та інші дані підтверджують, що 2,4-піримідиндіамінові сполуки, наведені у даній роботі, є сильними інгібіторами діяльності Сук-кінази. Наприклад, в експериментах з ізольованою Сук-кіназою, всі з двадцяти чотирьох випробованих 2,4-піримідиндіамінових сполук, за винятком двох, інгібували каталізоване Сук-кіназою фосфорилування пептидного субстрату з значеннями IC_{50} у субмікромолярному діапазоні. Сполуки, що залишилися, інгібували фосфорилування у мікромолярному діапазоні.

Крім того, всі шістнадцять сполук, випробованих у *in vitro* аналізі з тучними клітинами, інгібували фосфорилування субстратів Сук-кінази (наприклад, PLC- γ , LAT) та протеїнів, слідуючих в прямому напрямку за Сук-кіназою (наприклад, JNK, p38, Erk1/2 та PKB, при випробуванні), але не інгібували протеїни в зворотному напрямі від Сук-кінази у каскаді (наприклад, Lyn). Випробовані 2,4-піримідиндіамінові сполуки не інгібували фосфорилування Lyn-субстратів. Більш того, для наступних сполук спостерігалось висока кореляція між їх здатністю до інгібування діяльності Сук-кінази у біохімічних аналізах (IC_{50} у діапазоні від 3 до 1850нмоль) та інгібування Fc ϵ RI-опосередкованої дегрануляції у тучних клітинах (IC_{50} у діапазоні від 30 до 1650нмоль): R950373, R950368, R921302, R921302, R945371, R945370, R945369, R945365, R921304, R921304, R945144, R945140, R945071, R940358, R940353, R940352, R940351, R940350, R940347, R921303, R921303, R940338, R940323, R940290, R940277, R940276, R940275, R940269, R940255, R935393, R935372, R935366, R935310, R935309, R935307, R935304, R935302, R935293, R935237, R935198, R935196, R935194, R935193, R935191, R935190, R935138, R927050, R926968, R926956, R926931, R926891, R926839, R926834, R926816, R926813, R926791, R926782, R926780, R926757, R926753, R926745, R926715, R926508, R926505, R926502, R926501, R926500, R921218, R921147, R920410, R909268, R921219, R908712, R908702.

Активність 2,4-піримідиндіамінових сполук, запропонованих у даному винаході також можна підтвердити з допомогою біохімічних або клітинних аналізів активності Сук-кінази. Як показано на Фіг. 2, у Fc ϵ RI сигнальному каскаді у тучних та/або базофільних клітинах, Сук-кіназа фосфорилує LAT та PLC- γ , що призводить, поміж іншого, до дегрануляції. Будь-яку з цих дій можна використати для підтвердження активності 2,4-піримідиндіамінових сполук даного винаходу. У одному прикладі реалізації даного винаходу, активність підтверджується шляхом контакту ізольованої Сук-кінази або її активного фрагменту з 2,4-піримідиндіаміновою сполукою в присутності субстрату Сук-кінази (наприклад, синтетичного пептиду або протеїну який, якщо відомо, що він має бути фосфорильован з допомогою Сук у сигнальному каскаді) та оцінки факту фосфорилування субстрату Сук-кіназою. Альтернативно, аналіз можна провести з клітинами, які експресують Сук-кіназу. Клітини можуть виражати Сук-кіназу ендогенно, або вони можуть бути побудовані так, щоб виражати рекомбінантну Сук-кіназу. Клітини також можуть додатково виражати субстрат Сук-кінази. Клітини, придатні для застосування у таких підтверджуючих аналізах, а також відповідні методи створення таких клітин, є очевидними до фахівців у цій галузі. Конкретні приклади біохімічних та клітинних аналізів, придатних для підтвердження активності 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведені у розділі "Приклади".

Взагалі, для сполук, які інгібують Сук-кіназу, значення IC_{50} по відношенню до діяльності Сук-

кінази, як наприклад, здатності Syk-кінази фосфорилувати синтетичний або ендogenous субстрат, буде характерним у діапазоні приблизно 20мкмоль або менше у *in vitro* або клітинному аналізі. Фахівці в даній галузі погодяться, що сполуки, для яких характерні низькі значення IC₅₀, наприклад у діапазоні 10мкмоль, 1мкмоль, 100нмоль, 10нмоль, 1нмоль, або ще нижчі, є особливо корисними.

Застосування та Композиції

Як було описано раніше, активні сполуки даного винаходу інгібують сигнальні каскади Fc рецепторів, особливо тих Fc рецепторів, які містять гамма гомодімер, наприклад сигнальні каскади Fc α RI та/або Fc γ RI, що призводять, поміж іншого, до виділення та/або синтезу хімічних медіаторів з клітин через дегрануляцію чи інші процеси. Також, як було описано раніше, активні сполуки є ефективними інгібіторами Syk-кінази. Тому, активні сполуки даного винаходу можна використовувати у різноманітних *in vitro*, *in vivo* та *ex vivo* контекстах для регулювання або інгібування Syk-кінази, сигнальних каскадів, у яких Syk-кіназа грає роль, сигнальних каскадів Fc рецепторів, та біологічних реакцій, викликаних такими сигнальними каскадами. Наприклад, в одному з прикладів реалізації даного винаходу, сполуки можна використати для інгібування Syk-кінази, *in vitro* або *in vivo*, фактично у клітині будь-якого типу, що виражає Syk-кіназу. Вони також можуть бути використані для регулювання каскадів трансдукції (переносу) сигналу, у яких Syk-кіназа грає роль. Такі Syk-залежні каскади трансдукції сигналу включають, але не обмежуються Fc α RI, Fc γ RI, Fc γ RIII, BCR та сигнальними трансдукційними каскадами інтегрину. Ці сполуки можуть також бути використані *in vitro* або *in vivo* для регулювання, та зокрема інгібування клітинних або біологічних відповідей, обумовлених такими Syk-залежними сигнальними трансдукційними каскадами. Такі клітинні або біологічні відповіді включають, але не обмежуються респіраторними розривами, клітинною адгезією, клітинною дегрануляцією, розпластанням клітин, міграцією клітин, агрегацією клітин, фагоцитозом, синтезом та виділенням цитокіну, визріванням клітин та потоком Ca²⁺. Важливим є те, що ці сполуки можна застосовувати для інгібування Syk-кінази *in vivo* як терапевтичний підхід до лікування або профілактики захворювань, цілком або частково опосередкованих діяльністю Syk-кінази. Необмежуючі приклади захворювань, опосередкованих Syk-кіназою, які можна лікувати або запобігти з допомогою таких сполук, більш детально наведені нижче.

У іншому прикладі реалізації винаходу, активні сполуки можна використати для регулювання або інгібування сигнальних каскадів Fc рецепторів та/або Fc α RI- та/або Fc γ RI-опосередкованої дегрануляції як терапевтичний підхід до лікування або профілактики захворювань, характеризованих, викликаних та/або пов'язаних з виділенням або синтезом хімічних медіаторів, таких як сигнальні каскади Fc рецепторів, або дегрануляцією. Таке лікування може бути призначене тваринам у

ветеринарних цілях або людині. Захворювання, які характеризуються, спричиняються або пов'язані з таким виділенням медіатора, синтезом або дегрануляцією, та тому піддаються лікуванню або профілактиці з допомогою активних сполук, включають, але не обмежуються наступними: атопія, атопічні або анафілактичні реакції гіперчутливості або алергічні реакції, алергії (наприклад, алергічний кон'юнктивіт, алергічний риніт, атопічна астма, атопічний дерматит та алергія на продукти харчування), низький рівень рубцювання {наприклад, склеродерма, збільшений фіброз, утворення келоїдів, післяопераційні рубці, фіброз легень, спазм судин, мігрень, реперфузійна травма та після інфаркту міокарда), захворювання, пов'язані з руйнуванням тканин {наприклад, хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ), кардіобронхит та після інфаркту міокарда), захворювання, пов'язані з запаленням тканин (наприклад, синдром подразненої кишки, спастична товста кишка та запальне кишкове захворювання), запалення та рубцювання.

Додатково до низки захворювань, які наведено вище, дані досліджень на клітинному рівні та дані досліджень на тваринах свідчать про те, що 2,4 піримідиндіамінові сполуки згідно з даним винаходом можуть використовуватись для лікування або профілактики аутоімунних захворювань та/або різних симптомів, пов'язаних з такими захворюваннями. До аутоімунних захворювань, які можна лікувати або запобігти з допомогою 2,4-піримідиндіамінових сполук, взагалі відносять порушення, пов'язані з ураженням тканини, що обумовлені гуморальною та/або клітинно-опосередкованою відповіддю на імуногени або антигени ендogenous та/або екзogenous походження. Такі захворювання часто називають захворюваннями, пов'язаними з неанафілактичними реакціями гіперчутливості (реакції гіперчутливості типу II, типу III, та/або типу IV).

Як обговорювалось раніше, реакції гіперчутливості типу I, як правило, обумовлені вивільненням фармакологічно активних речовин, таких як гістамін, з тучних та/або базофільних клітин внаслідок контакту з специфічним екзogenous антигеном. Як зазначалось раніше, реакції типу I грають роль у багатьох захворюваннях, включаючи алергічну астму, алергічний риніт, тощо.

Реакції гіперчутливості типу II (які також мають назву цитотоксичних реакцій, реакцій комплемент-залежного цитолізу або клітинно-стимулюючих реакцій гіперчутливості) обумовлені реакцією імуноглобулінів з антигенними компонентами клітини або тканини, або з антигеном чи гаптенем, прикріпленим до клітини або тканини. Захворювання, які пов'язані з реакціями гіперчутливості типу II включають, але не обмежуються, аутоімунною гемолітичною анемією, гемолітичною хворобою новонароджених та синдромом Гудпасчура.

Реакції гіперчутливості типу III (які також мають назву реакцій гіперчутливості, обумовлені токсичними, розчинними, або імунними комплексами) обумовлені відкладенням розчинних

циркулюючих комплексів антиген-імуноглобуліну у судинах або у тканинах та супроводжуються гострими запальними реакціями у місці відкладення імунного комплексу. Необмежуючі приклади захворювань, що розвиваються за реакціями III типу, включають феномен Артюса, ревматоїдний артрит, сировоткову хворобу, системний червоний вовчак, деякі типи гломерулонефриту, розсіяний склероз та бульозний пемфігоїд.

Реакції гіперчутливості IV типу (які часто мають назву реакції гіперчутливості клітинного, клітинно-опосередкованого, затриманого, або туберкулінового типу) обумовлені синтезованими Т-лімфоцитами внаслідок контакту з певним антигеном. Необмежуючі приклади захворювань, що розвиваються за реакціями IV типу, включають контактний дерматит та відторгнення аллотранспланта.

Аутоімунні захворювання, пов'язані з будь-якими з наведених вище неанафілактичними реакціями гіперчутливості, можна лікувати або запобігти з допомогою 2,4-піримідиндіамінових сполук цього винаходу. Зокрема, ці засоби можна застосовувати для лікування або профілактики аутоімунних захворювань, які часто відносять до аутоімунних порушень одного органу або одного типу клітин та які включають, але не обмежуються, аутоімунним тиреоїдитом, аутоімунною гемолітичною анемією, аутоімунним атрофічним гастритом перніціозної анемії, аутоімунним енцефаломієлітом, аутоімунним орхітом, синдромом Гудпасчура, аутоімунною тромбоцитопенією, симпатичною офтальмією, міастенією *gravis*, базедову хворобу, первинним біліарним цирозом, хронічним агресивним гепатитом, виразковим колітом та мембранозною гломерулопатією, а також аутоімунні захворювання, які часто відносять до системних аутоімунних порушень та які включають, але не обмежуються наступними: системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, синдром Рейтера, поліміозит-дерматоміозит, системний склероз, вузликовий періартеріїт, розсіяний склероз, бульозний пемфігоїд.

Фахівці в даній галузі погодяться, що зменшення гострих симптомів, притаманних більшості з вищенаведених аутоімунних захворювань, забезпечує значний терапевтичний результат навіть в разі, коли основне захворювання не піддається поліпшенню. Багато таких симптомів, а також стадії основних захворювань, обумовлені активацією Fc γ R сигнального каскаду у моноцитних клітинах. Так як 2,4-піримідиндіамінові сполуки даного винаходу є сильними інгібіторами таких Fc γ R сигналів у моноцитних та інших клітинах, то ці засоби знаходять застосування у лікуванні та/або профілактиці низки гострих симптомів, які супроводжують вищенаведені аутоімунні захворювання.

Наприклад, ревматоїдний артрит (RA) обумовлює набряк, біль, втрату рухливості та чутливість уражених суглобів всього тіла. RA характеризується хронічним запаленням синовіальної оболонки, яка щільно заповнена

лімфоцитами. Синовіальна оболонка, яка типово являє собою одноклітинний шар, стає щільно заповненою клітинами та набуває форму, подібну до лімфоїдної тканини, включаючи дендритні клітини, Т-, В-та NK клітини, макрофаги та кластери плазматичів. Цей процес, а також надмірна кількість імунопатологічних механізмів, включаючи формування комплексів антиген-імуноглобуліну, призводить до деструкції цілостності суглобу, що веде до деформації, безповоротної втрати функціонування та/або у ерозію кістки суглобу або біля суглобу. Методи даного винаходу можна застосовувати для лікування та зменшення одного, декількох або усіх симптомів RA. Тому, у контексті RA, ці методи вважаються такими, що забезпечують терапевтичний результат (більш загально описано нижче), коли досягається зменшення або поліпшення симптомів притаманних RA, незалежно від результату супровідного лікування основного захворювання (RA) та/або зменшення кількості циркулюючого ревматоїдного фактору (РФ).

У іншому конкретному прикладі, системний червоний вовчак (SLE) типово характеризується жаром, ураженням суглобів(артралгією), артритом та серозитом (плевритом або перикардитом). У контексті SLE, методи даного винаходу вважаються такими, що забезпечують терапевтичний результат, коли досягається зменшення або поліпшення симптомів, притаманних SLE, незалежно від результату супровідного лікування основного захворювання.

Як ще один конкретний приклад, розсіяний склероз (MS) обумовлює у хворих розлад зору; розвиток подвійного зору; порушення моторних функцій, які впливають на здатність ходити та застосовувати руки; спричинює недержання сечі та калу; спастичність; та обмежену чутливість (на дотик, біль, чутливість до температури). У контексті MS, методи даного винаходу вважаються такими, що забезпечують терапевтичний результат, коли досягається зменшення або поліпшення одного або декількох симптомів притаманних MS, незалежно від результату супровідного лікування основного захворювання.

При застосуванні для лікування або профілактики таких захворювань, активні сполуки можуть застосовуватись окремо, у вигляді суміші однієї або декількох активних сполук або у розчині або у комбінації з іншими речовинами, які використовують для лікування таких захворювань та/або симптомів, пов'язаних з такими захворюваннями. Ці активні сполуки також застосовують у розчині або у комбінації з речовинами, які застосовують для лікування інших порушень або розладів, такими як стероїди, мембранні стабілізатори, 5LO-інгібітори, інгібітори синтезу та рецептору лейкотрієна, інгібітори переходу ізо типу IgE або синтезу IgE, перехід ізо типу IgG або синтезу IgG, β -агоністи, інгібітори триптази, аспірин, інгібітори COX, метотрексат, анти-TNF ліки, ретуксин, інгібітори PD4, інгібітори p38, інгібітори PDE4, та антигістаміни, та ін. Активні сполуки можна застосовувати *per se* (самостійно) у вигляді проліків або лікарських

препаратів фармацевтичних композицій, які містять активну сполуку або проліки.

Фармацевтичні композиції, що містять активні сполуки згідно з даним винаходом (або їх проліки), можна приготувати за допомогою звичайних процесів перемішування, розчинення, гранулювання, драже-утворюючого відмюлювання, емульгування, інкапсуляції, процесів захвату або леофілізації. Ці композиції можуть бути приготовлені звичайним способом, використовуючи один або декілька фізіологічно прийнятних носіїв, розчинників, наповнювачей або додаткових речовин, які полегшують переробку активних сполук у препарати для застосування у фармацевтичних цілях.

Активну сполуку або проліки можна приготувати у вигляді фармацевтичних композицій *per se*, або у вигляді гидрату, сольвату, N -окису або фармацевтично-прийнятної солі, як описано вище. Типово, такі солі є більш розчинними у водних розчинах, ніж відповідні вільні кислоти та основи, але можна сформувати солі, менш розчинні, ніж відповідні вільні кислоти та луги.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть приймати форму, що підходить для фактично будь-якого способу застосування, включаючи, наприклад, локальний, глазний, внутрішній, трансбукальний, системний, назальний, ін'єкційний, трансдермальний, прямокишечний, піхвовий, тощо, або форму, зручну для застосування шляхом інгаляції або вдихання.

Для локального застосування, активна сполука (сполуки) або проліки можуть бути виготовлені у вигляді розчинів, гелей, мазів, кремів, суспензій, тощо, як добре відомо у цій галузі.

Системний спосіб включає застосування сполук, які призначені для застосування у вигляді ін'єкцій, наприклад, підшкірних, внутрішньовенних, внутрішньовушних, інтратекальних або внутрішньочеревинних ін'єкцій, а також тих, які призначені для трансдермального, через слизову оболонку, перорального або легеневого застосування.

Лікарські засоби для ін'єкційного введення включають стерильні суспенсії, розчини або емульсії активної сполуки (сполук) у водних або масляних носіях. Композиції можуть також містити формуючі речовини, наприклад суспензуючі, стабілізуючі та/або диспергуючі. Ін'єкції можна приготувати у формі окремих доз, наприклад, у ампулах, або контейнерах з мультидозами, та можуть містити додані консерванти.

Альтернативно, ін'єкційний лікарський засіб можна приготувати у формі порошка, у який для відновлення перед застосуванням додається придатний наповнювач (розчинник), включаючи але не обмежуючись стерильною, вільною від пирогену водою, буфером, розчином глюкози, тощо. Для цього, активну(і) сполуку(и) можна висушити з допомогою будь-якого відомого засобу, такого як ліофілізація, та перед застосуванням відновити до попередньої форми.

Для застосування через слизову оболонку, у лікарських засобах використовуються змочуючі

реагенти, які відповідають існуючому бар'єру. Такі речовини відомі у цій галузі.

Для перорального застосування, фармацевтичні композиції можуть приймати форму, наприклад, пастилок, таблеток або капсул, приготовлених звичайними способами з використанням фармацевтично прийнятних носіїв, таких як зв'язуючих речовин (наприклад, попередньо желатинизований кукурудзяний крохмаль, полівінілпіролідон або гідроксіпропілметилцеллюлоза); наповнювачі (наприклад, лактоза, мікрокристалічна целюлоза або гідрофосфат кальція); змащуючі речовини (наприклад, стеарат магнію, тальк або кварц); дезинтегруючі речовини (наприклад, картопляний крохмаль або гліколят крохмалю натрію); або зволожуючі речовини (наприклад, лаурилсульфат натрію). Таблетки можуть бути покриті з допомогою добре відомих методів такими речовинами, як наприклад цукром, плівками або ентросолубільним покриттям. Сполуки, які особливо зручні для перорального застосування, включають сполуки R940350, R935372, R935193, R927050 та R935391.

Рідинні ліки для перорального застосування можуть мати форму, наприклад, еликсирів, розчинів, сиропів або суспензій, або можуть бути у формі сухого продукту, який перед застосуванням розчиняють у воді або іншому придатному наповнювачі. Такі рідинні ліки можна приготувати з допомогою звичайних засобів з використанням фармацевтично прийнятних добавок, таких як суспендуючі агенти (наприклад, сироп сорбітолу, похідні целюлози або гідрогенізовані харчові жири); емульгуючі агенти (наприклад, лецитин або акація); безводні наповнювачі (наприклад, мигдальні масла, масляні складні ефіри, етиловий спирт, кремофор™ або фракціоновані рослинні масла); та консерванти (наприклад, метил або пропіл-р-гідроксibenзоати або сорбінова кислота). При необхідності препарати також можуть містити буферну сіль, консерванти, ароматизатори, барвники та підсоложуючі речовини.

Як добре відомо, ліки для перорального застосування можуть бути приготовлені належним чином, щоб забезпечити контрольоване виділення активної сполуки або проліків.

Для трансбукального застосування, композиції можуть мати форму таблеток або пастилок, та приготовлені традиційним способом.

Для ректального та піхвового застосування, активна сполука (и) може бути приготовлена у вигляді розчинів (для утримуючих клізм), супозиторіїв або мазі, що містить традиційну супозиторну основу таку, як масло какао або інші гліцериди.

Для назального застосування або застосування з допомогою інгаляції або вдихання, активна сполука(и) або проліки можуть зручно поставлятися у вигляді аерозолей для розпилювання з балонів під тиском або розпилювача з використанням відповідної речовини, наприклад, дихлородифторметана, трихлорфторметана, дихлоротетрафторетану, фторвуглеця, двоокису вуглецю або іншого придатного газу. У випадку застосування

аерозолі під тиском, дозування можна визначати з допомогою клапану для постачання відміреної кількості. Капсули та балончики, які застосовуються у інгаляторі або апараті для вдихання (наприклад, капсули та балончики, що складаються з желатину) можуть бути приготовлені так, щоб містити порошкову суміш сполуки та відповідну порошкову базу, наприклад лактозу або крохмаль.

Конкретний приклад рецепту водної суспензії, яка підходить для назального застосування, використовуючи комерційно доступні інтраназальні аерозольні пристрої, включає наступні інгредієнти: активна сполука або проліки (0,5-20 мг/мл); хлорид бензалконію (0,1-0,2 мг/мл); полісорбат 80 (TWEEN® 80; 0,5-5 мг/мл); карбоксиметилцеллюлоза натрію або мікрокристалічна целюлоза (1-15 мг/мл); фенілетанол (1-4 мг/мл); та декстроза (20-50 мг/мл). рН кінцевої суспензії можна відрегулювати в діапазоні від приблизно рН 5 до рН 7 при типовому рН 5,5.

У іншому конкретному прикладі, водна суспензія, що підходить для застосування сполуки у формі інгаляції, а зокрема для застосування сполуки R921218, містить 1-20 мг/мл сполуки або проліків, 0,1-1% (за об'ємом) полісорбату 80 (TWEEN® 80), 50 мМ цитрату та/або 0,9% хлориду натрію.

Для очного застосування, активна сполука(и) або проліки може бути приготовлена у формі розчину, емульсії, суспензії, тощо, придатних для очного застосування. В літературі добре відомі різні наповнювачі, зручні для застосування з сполуками, які використовуються для очного застосування. Деякі конкретні приклади описані у [патентах США №6261547; №6197934; №6056950; №5800807; №5776445; №5698219; №5521222; №5403841; №5077033; №4882150; та №4738851].

Для довготривалої дії, активну сполуку(и) або проліки можна приготувати у вигляді препарату повільного всмоктування, який застосовують шляхом імплантаційної або внутрішньозовнішньої ін'єкції. Активний інгредієнт може бути приготований з використанням відповідних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, емульсія у відповідних маслах) або іонообмінних смол, або у формі похідних зі слабкою розчинністю, наприклад, сіль, що слабо розчиняється. Альтернативно, можна використовувати трансдермальні системи доставки, зроблені у вигляді адгезивного диску або лати, які повільно виділяють активну сполуку або сполуки з метою підшкірної абсорбції. Для цього можуть використовуватись речовини, що сприяють проникненню активної(их) сполуки(к) при підшкірному застосуванні. Приклади відповідних латок для трансдермального застосування описуються у [патентах США №5407713; №5352456; №5332213; №5336168; №5290561; №5254346; №5164189; №5163899; №5088977; №5087240; №5008110; та №4921475].

Альтернативно, можуть бути задіяні інші системи постачання лікарських засобів. Ліпосоми та емульсії є добре відомими прикладами носіїв, що можуть бути використані для доставки

активної(их) сполуки(к) або проліків. Певні органічні розчинники, такі як диметилсульфооксид (DMSO) можуть також бути задіяні, але звичайно це призводить до більшої токсичності.

Фармацевтичні композиції можна, за необхідності, представити у вигляді упаковки або пристрою для роздачі, який може містити одну або декілька доз з активною(ми) сполукою(ми). У цій упаковці може бути, наприклад, металічна або пластикова фольга, як блістерна упаковка. Упаковка або пристрій для роздачі може містити інструкцію для застосування.

Ефективні дози

Активна(і) сполука(и) або проліки згідно з даним винаходом, або їх композиції, в основному будуть використовуватись у кількості, ефективній для досягнення бажаного результату, наприклад у кількості, ефективній для лікування або профілактики конкретного захворювання. Сполуку(и) можна застосовувати терапевтично для досягнення терапевтичного результату або профілактично для досягнення профілактичного результату. Під терапевтичним результатом мається на увазі викорінення або зменшення основного розладу, яке є об'єктом лікування, та/або викорінення або поліпшення одного або декількох симптомів, пов'язаних з основним порушенням у такій мірі, що пацієнт відчуває поліпшення самопочуття або стану здоров'я, навіть якщо він продовжує страждати від основного розладу. Наприклад, застосування сполуки пацієнтом, хворим на алергію, забезпечує терапевтичний результат не тільки тоді, коли основна алергічна реакція викорінена або ослаблена, а й якщо пацієнт відчуває зменшення тяжкості або тривалості симптомів, пов'язаних з алергією в результаті впливу алергену. У іншому прикладі, терапевтичний результат у випадку астми включає поліпшення дихання після астматичного приступу або зменшення частоти або тяжкості астматичних епізодів. Терапевтичний результат також включає зупинення або уповільнення прогресу захворювання, незалежно від наявності поліпшення.

Для профілактичного застосування сполука може бути застосована пацієнтом з ризиком розвитку одного з раніше описаних захворювань. Наприклад, якщо невідомо чи у пацієнта є алергія до певних ліків, сполука можна застосовувати перед вживанням ліків з метою уникнення або зменшення алергічної реакції до цих ліків. Альтернативно, профілактичне застосування можна здійснювати з метою уникнення прояву у пацієнта симптомів, пов'язаних з основним розладом. Наприклад, сполука може бути застосована пацієнтом, що страждає на алергію, перед очікуваним впливом алергену. Сполуки можуть також бути профілактично застосовані здоровими особами, що неодноразово попадають під вплив агентів, пов'язаних з вищезгаданими захворюваннями, щоб запобігти появі розладів. Наприклад, сполука може бути застосована здоровою особою, яка неодноразово попадає під вплив алергену, відомого своєю здатністю викликати алергію, наприклад латексу, з метою запобігти розвитку алергії. Альтернативно, сполука

може бути застосована особою, яка страждає на астму, перед участю у діяльності, що викликає атаки астми, щоб зменшити тяжкість або цілком уникнути проявів астматичних епізодів.

Кількість застосованої сполуки буде залежати від різновиду факторів, включаючи, наприклад, конкретні показники захворювання, спосіб застосування, чи є лікування профілактичним або терапевтичним, гостроту протікання захворювання, вік та вагу хворого, біодоступність певної активної сполуки, тощо. Ефективна доза легко визначається фахівцями.

Ефективні дози напочатку можна визначати за допомогою результатів аналізу *in vitro*. Наприклад, первинна доза для тварин може бути сформульована таким чином, щоб концентрація циркулюючої у крові або сироватці активної сполуки дорівнювала або перевищувала величину IC_{50} для певної сполуки у відповідності з результатами *in vitro* аналізу, наприклад *in vitro* CHMC або BMMC, та інших *in vitro* аналізів, описаних у розділі "Приклади". Точна доза, яка потребується для досягнення такої концентрації в циркулюючій крові або сироватці з урахуванням біодоступності конкретної сполуки легко визначається фахівцем. Для подальшої поради, читач може звернутися до [Fingl & Woodbury, "General Principles," In: Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, Chapter 1, pp.1-46, latest edition, Pagamonon Press, та посилань, наведених у цій книзі].

Первинні дози можна також розрахувати на основі даних *in vivo*, наприклад на основі експериментальних моделей на тваринах. Експериментальні моделі на тваринах, які застосовуються для випробування ефективності сполук для лікування або профілактики різноманітних захворювань, описаних вище, є добре відомими в літературі. Відповідні експериментальні тваринні моделі для дослідження реакцій гіперчутливості або алергічних реакцій описані у наступних джерелах: [Foster, 1995, Allergy 50 (21Suppl): 6-9, discussion 34-38 та Tumas et al., 2001, J. Allergy Clin. Immunol. 107 (6): 1025-1033]. Відповідні тваринні моделі для дослідження алергічних ринітів описані у [Szelenyi et al., 2000, Arzneimittelforschung 50(11): 1037-42; Kawaguchi et al., 1994, Clin. Exp. Allergy 24 (3): 238-244 and Sugimoto et al., 2000, Immunopharmacology 48(1): 1-7]. Відповідні тваринні моделі алергічного кон'юнктивіту описані у [Carreras et al., 1993, Br. J. Ophthalmol. 77(8): 509-514; Saiga et al., 1992, Ophthalmic Res. 24(1): 45-50; та Kunert et al., 2001, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42(11): 2483-2489]. Відповідні тваринні моделі для дослідження системного мастоцитозу описуються [O'Keefe et al., 1987, J. Vet. Intern. Med. 1 (2): 75-80 та Bean-Knudsen et al., 1989, Vet. Pathol. 26 (1): 90-92]. Відповідні тваринні моделі гипер IgE синдрому описані у [Claman et al., 1990, Clin Immunol. Immunopathol. 56(1): 46-53]. Відповідні тваринні моделі лімфоми В-клітин описані у [Hough et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13853-13858 та Hakim et al., 1996, J. Immunol. 157(12): 5503-5511]. Відповідні тваринні моделі atopічних порушень, наприклад atopічного дерматиту, atopічної екземи

та atopічної астми, описані у [Chan et al., 2001, J. Invest. Dermatol. 117 (4): 977-983 та Suto et al., 1999, Int. Arch. Allergy Immunol. 120 (Suppl 1): 70-75]. Взагалі, фахівці можуть легко застосувати цю інформацію для визначення дози, яка підходить для застосування людиною. Додаткові відповідні тваринні моделі описуються у розділі "Приклади".

Розміри доз звичайно знаходяться у діапазоні від приблизно 0,0001 або 0,001 або 0,01мг/кг/день до приблизно 100мг/кг/день, але можуть бути вище або нижче залежно від, серед інших факторів, активності сполуки, її біодоступності, способу застосування та різноманітних факторів, описаних вище. Розмір дози та інтервал може бути відрегульовані особисто, щоб забезпечити достатній рівень сполуки у плазмі для підтримання терапевтичного або профілактичного ефекту. Наприклад, сполуки можуть бути застосовані один раз на тиждень, декілька разів на тиждень (наприклад, через день), один раз на день або багато разів на день, залежно від, поміж іншого, способу застосування, симптомів захворювання, та рішень лікаря, що прописує ліки. У випадках локального застосування або селективного прийняття, як наприклад зовнішнє застосування, ефективна локальна концентрація активної(х) сполуки(к) може не бути пов'язаною з концентрацією плазми. Спеціалісти зможуть оптимізувати ефективні локальні дози з допомогою необхідних експериментів.

Завжди бажано, щоб сполука (сполуки) забезпечували терапевтичний або профілактичний ефект, не викликаючи істотної токсичності. Токсичність сполуки можна визначити, використовуючи стандартні фармацевтичні процедури. Співвідношення між токсичним та терапевтичним (або профілактичним) ефектом дози представляє терапевтичний індекс. Перевагу віддають сполукам з високими терапевтичними індексами.

На додаток до опису винаходу, нижче наводяться наступні приклади, що ілюструють його дію, але не обмежують його застосування.

7. Приклади

7.1. Синтез початкових матеріалів та проміжних сполук, корисних для синтезування сполук 2,4-піримідиндіаміну згідно із схемами (I)-(V)

Значна кількість початкових матеріалів та N4-однозаміщених-2-піримідиндіамінів, а також N2-однозаміщених-4-піримідиндіамінів [продукти реакції ароматичного нуклеофільного заміщення (SNAR)], які можуть використовуватись для синтезу сполук 2,4-піримідиндіаміну даного винаходу, була синтезована згідно із схемами (I)-(V) як описано нижче. Умови, що підходять для синтезу продуктів того-SNAR, демонструються на прикладі 2-хлор-N4-(3,4-етилендіоксифеніл)-5-фтор-4-піримідиндіаміну (R926087).

[illegible][illegible]

		бензолсміш. НН ДМСО 8,2 (д, 11),8,8 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,05 (м, 2H), 3,2 (м, 2H) частота 95 % МС (мас/мас): 281 (МН);
7.1.118	N4-(1,4-бензоксали-7-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N4-(1,4-бензоксали-7-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 7-аміно-1,4-бензоксали. НН ДМСО 8,2 (д, 11),8,8 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,05 (м, 2H), 3,2 (м, 2H) частота 94 % МС (мас/мас): 281 (МН);
7.1.119	N4-(1,4-бензоксали-3-он-6-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N4-(1,4-бензоксали-3-он-6-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 3-аміно-1,4-бензоксали-3-он. НН ДМСО 8,2 (д, 11), 6,6 (м, 11), 6,75 (м, 11), 4,73 (м, 2H) частота 96 % МС (мас/мас): 295 (МН);
7.1.120	N4-(1,4-бензоксали-3-он-7-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N4-(1,4-бензоксали-3-он-7-ил)-N2-хлор-5-фторіридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 3-аміно-1,4-бензоксали-3-он. НН ДМСО 8,2 (д, 11),8,8 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,68 (м, 2H) частота 93 % МС (мас/мас): 295 (МН);
7.1.121	N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-6-іл)-іридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-6-іл)-іридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 6-аміно-4-метил-1,4-бензоксали. НН ДМСО 8,2 (д, 11),8,8 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,05 (м, 2H), 3,2 (м, 2H), 2,8 (м, 3H) частота 95 % МС (мас/мас): 295 (МН);
7.1.122	N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-7-ил)-іридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-7-ил)-іридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 7-аміно-4-метил-1,4-бензоксали. НН ДМСО 8,2 (д, 11),8,8 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,05 (м, 2H), 3,2 (м, 2H), 2,8 (м, 3H) частота 94 % МС (мас/мас): 295 (МН);
7.1.123	N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-3-он-6-іл)-іридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-3-он-6-іл)-іридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 6-аміно-3-аміно-1,4-бензоксали-3-он. НН ДМСО 8,2 (д, 11), 6,6 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,73 (м, 2H), 2,8 (м, 3H) частота 96 % МС (мас/мас): 309 (МН);
7.1.124	N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-3-он-7-іл)-іридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-5-фтор-N4-(N-метил-1,4-бензоксали-3-он-7-іл)-іридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 7-аміно-3-аміно-1,4-бензоксали-3-он. НН ДМСО 8,2 (д, 11), 6,6 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,68 (м, 2H), 2,8 (м, 3H) частота 93 % МС (мас/мас): 309 (МН);
7.1.125	N2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл-4H-імідазол-5-іл)-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фторіридинамін (R950748)	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл-4H-імідазол-5-іл)-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фторіридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 5-аміно-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фторіридинаміну. НН ДМСО 8,2 (д, 11), 6,6 (м, 11), 6,75 (м, 11), 6,60 (м, 11), 4,73 (м, 2H), 2,8 (м, 3H) частота 96 % МС (мас/мас): 390 (МН);
7.1.126	N2-хлор-N4-(3-аміно)-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фтор-іридинамін	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, N2-хлор-5-фтор-N4-(3-аміно)-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фторіридинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 6-аміно-3-аміно-1,4-бензоксали-6-іл)-5-фторіридинаміну. НН ДМСО 8,18 (д, 11), 6,6 (м, 11), 6,67 (м, 11), 3,76 (м, 2H), 1,85 (м, 4H) частота 99 % МС (мас/мас): 309 (МН);
7.1.127	2-хлор-5-фтор-N4-(1-мететоксифеноксибензоїл-назол-5-іл)-4-пиримідинамін (R953241)	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, 2-хлор-5-фтор-N4-(1-мететоксифеноксибензоїл-назол-5-іл)-4-пиримідинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 5-аміно-1-мететоксифеноксибензоїл-назолу. НН РМР (ДМСО-d6): δ 10,08 (с, 1H), 8,28 (д, 1H, J = 3,5 Гц), 8,12 (с, 1H), 8,00 (дд, 1H, J = 12,4 + 4,1 Гц), 7,64 (д, 1H, J = 8,8 Гц), 7,38-7,54 (м, 1H), 5,39 (с, 2H), 3,66 (с, 3H).
7.1.128	2-хлор-5-фтор-N4[4H-імідазол-2-іл]-N1[4H-бензоксали-8-іл)-4-пиримідинамін (R953257)	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, 2-хлор-5-фтор-N4[4H-імідазол-2-іл]-N1[4H-бензоксали-8-іл)-4-пиримідинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 8-аміно-4H-імідазол-2-іл]-4-пиримідинаміну. НН РМР (ДМСO-d6): НН РМР (ДМСO-d6): δ 10,08 (с, 1H), 8,31 (с, 1H), 7,91 (д, 1H, J = 2,3 Гц), 7,94 (д, 1H, J = 1,2 Гц), 7,37 (дд, 1H, J = 2,3 + 8,8 Гц), 7,16 (д, 1H, J = 8,8 Гц), 7,14 (д, 1H, J = 1,2 Гц), 5,29 (с, 2H), 3,76 (с, 3H). РХМС: тривалість утримання: 18,74 хвилин; частота: 99% МС (мас/мас): 318 (МН);
7.1.129	2-хлор-5-фтор-N4-(N-ізазол-5-іл)-4-пиримідинамін (R953260)	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, 2-хлор-5-фтор-N4-(N-ізазол-5-іл)-4-пиримідинамін отримано у результаті реакції 2,4-хлор-5-фторіридинаміну та 6-аміноізазолу. НН РМР (CDCl ₃): δ 13,03 (с, 1H), 10,07 (с, 1H), 8,73 (д, 1H, J = 3,5 Гц), 8,07 (с, 1H), 7,99 (с, 1H), 7,71 (с, 1H, J = 8,8 Гц), 7,34 (дд, 1H, J = 1,7 + 8,8 Гц). РХМС: тривалість утримання: 18,52 хвилин; частота: 99% МС (мас/мас): 263 (МН);
7.1.130	2-хлор-5-фтор-N4-(N-ізазол-5-іл)-4-пиримідинамін (R953263)	Аналітичне приготування 2-хлор-N4-(3-етеноксибензоїл)-5-фтор-4-пиримідинамін, 2-хлор-5-

7.1.141	(R505384)	утворений осад фільтрату з метою отримання 2-хлор-N(4-(3-гідроксипентил-4-метоксифеніл)-5-фтор-4-амінофеніл)-4-фтор тетрафтор фторид, що має салікаторний характер. РХМС: чистота: 91,8%, МС (скалярна): 266,03 (m/z).
	2-хлор-N(4-(3-аміно-4-етоксифеніл)-5-фтор-4-амінофеніл) (R505387)	Розчин 3-аміно-4-етоксифеніліт та 2,4-дихлор-5-фтор-примішує у MeOH (температура кипіння 100 °C) протягом 1 години розчинює, додає 7 мл метанол, осад фільтрату з метою отримання 2-хлор-N(4-(3-аміно-4-етоксифеніл)-5-фтор-4-амінофеніл) з метою тетрафтор фторид, що має салікаторний характер. РХМС: чистота: 92,3%, МС (скалярна): 222,06 (m/z).
7.2	Синтез амальгами та попередня аналіз	
7.2.1	5-аміно-2-(2-гідроксипентил)амінін	Метаноловий розчин (50 мл) 5-(2-(2-гідроксипентил)-2-гідропентил) (0,5 г) гідролізують протягом 2 годин в присутності Pd/C (10%; 0,05 г), вакуумірують залишкову рідину. Після фільтрації розчин проливають з етанолу і промивають метанолом. Розчин концентрують з метою отримання 5-аміно-2-(2-гідроксипентил)амініну. ІН ЯМР (CDCl ₃): δ 7,58 (d, 1H, J = 5,0 Hz), 7,05 (dd, 1H, J = 2,7 та 8,1 Hz), 6,64 (d, 1H, J = 8,7 та 8,1 Hz), 3,49 (m, 2H).
7.2.2	4-хлор-3-метоксифеніл	Аналітично приготувано 5-аміно-2-(2-гідроксипентил)амінін, який отримують гідролізуючи 4-хлор-3-метоксифенілоксиформат отримують 4-хлор-3-метоксифеніл. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): чистота: 98%, MS (скалярна): 199 (+M ⁺ мономер).
7.2.3	2-(1-аміно-2-оксо-1,3-бензоксано-3(2H)-імідазидин)	Аналітично приготувано 5-аміно-2-(2-гідроксипентил)амінін, в результаті гідролізу 2-(1-бензоксано-3(2H)-імідазидин) (100 мг) отримують 2-(1-аміно-2-оксо-1,3-бензоксано-3(2H)-імідазидин). РХМС: чистота: 96%, MS: 208 (M ⁺).
7.2.4	7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін	7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін отримують за допомогою нитрування 1,2,3,4-тетрагідроксін згідно з наступною методикою: Gonsky, David, G. Dabakur, Vilas H., Caldwell, Timothy M., Criticos, Kevin R.; Journal of Medicinal Chemistry (1997), 40(25), 3997-4005.
7.2.5	2-(6-фтороксифеніл)-7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін	Суміш 7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін (0,55 г, 3,1 ммоль), d-6-бензоксифеніл (0,70 г, 2,2 ммоль) та триетиламіну (1,0 г, 6,2 ммоль) дисперсують в (8-м) перфторують при кімнатній температурі протягом 8 годин. Реакційну суміш розчинюють метанол (50 мл) та перемішують протягом 1 години. Додають фазу вакуумують і промивають розсолу. Після концентрування фазу мають субстанцію 2-(6-фтороксифеніл)-7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін. ІН ЯМР (CDCl ₃): δ 8,03-7,9 (m, 2H), 7,24 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 4,46 (t, 2H), 3,68 (t, 2H), J = 6,0 Hz), 2,95 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 1,49 (s, 9H).
7.2.6	2,3-дігідро-6-гідро-4-бензоксипан	3-гідропентил-2-гідропентил-2-гідропентил розчинюють з метою отримання гідролізу квалити та обробляють за допомогою P2O5. Суміш перемішують протягом 1 години при кімнатній температурі та висмолюють на вогонь. В результаті фільтрат отримують 2,3-дігідро-6-гідро-4-бензоксипан з метою тетрафтор фторид, що має салікаторний характер. РХМС: чистота: 91,8%, МС (скалярна): 266,03 (m/z).
7.2.7	3-дігідро-4-гідро-6-аміно-2H-1-бензоксипан	Суміш 2,3-дігідро-6-гідро-4-бензоксипан та Pd/C (10%) в MeOH гідролізують протягом 24 годин при кімнатній температурі та висмолюють на вогонь. В результаті фільтрат отримують 3-дігідро-4-гідро-6-аміно-2H-1-бензоксипан у формі маси кристалічного осадку. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): δ 8,47 (d, J = 3,0 Hz), 8,35 (dd, J = 3,0, 9,0 Hz), 7,29 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 4,70 (t, J = 7,2 Hz), 4,10, 2,90 (t, J = 7,2 Hz), 1H).
7.2.8	N(4-(3-етилпентил)феніл)-5-етоксифеніл-2,4-піридиндіамін (R505287)	Розчин 2-хлор-5-етоксифенілу-N(4-(3-етилпентил)феніл)-2,4-піридиндіамін у EtOH обробляють за допомогою 25%-ного розчину NaOH. Суміш перемішують протягом 30 хвилин при 100°C та висмолюють за допомогою фільтрат отримують на суцільній масі субстанції 2-хлор-5-етоксифенілу-N(4-(3-етилпентил)феніл)-2,4-піридиндіамін у формі тетрафтор фторид, що має салікаторний характер. РХМС: чистота: 92,3%, МС (скалярна): 317,28 (M ⁺).
7.2.9	3-N-морфолінокарбоніламінін	У розчин 3-гідроксипентилу (0,50 г, 2,7 ммоль) та пентанол (0,27 мл, 3,2 ммоль) бешумово розчинюють дисперсують (1-с) при 60 °C. Додають морфолін (0,28 мл, 3,2 ммоль). Реакційну суміш нагрівають до кімнатної температури та перемішують протягом 2 годин. Після висмолювання розчин концентрують у вакуумі, залишок сушать у етанолі та промивають розсолу. Після концентрування фазу мають субстанцію 3-N-морфолінокарбоніламінін. ІН ЯМР (CDCl ₃): δ 7,19-7,14 (m, 1H), 6,75-6,69 (m, 3H), 3,58-3,71 (m, 10H).
7.2.10	3-N-морфолінокарбоніламінін	Аналітично приготувано 3-N-морфолінокарбоніламінін, 3-N-морфолінокарбоніламінін отримують в результаті гідролізу 3-гідроксипентилу-3-гідропентилу, який отримують в результаті реакції 3-гідроксипентилу з метанолом. ІН ЯМР (CDCl ₃): δ 7,18 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,13 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 7,05-7,0 (m, 1H), 6,78 (dd, 1H, J = 7,5 та 7,5 Hz), 6,10 (bs, 1H), 5,58-5,35 (bs, 2H), 3,43-3,34 (2H), 1,68-1,57 (2H), 0,97 (t, 3H, J = 7,5 Hz).
7.2.11	3-(4-етоксипентил)піридиндіамін	Аналітично приготувано 3-(4-етоксипентил)піридиндіамін, 3-(4-етоксипентил)піридиндіамін отримують в результаті гідролізу 1-(4-етоксипентил)піридиндіамін-3-гідропентилу, який отримують в результаті реакції 3-гідропентилу та етанолу.
7.2.12	3-N-метилкарбоніламінін	Аналітично приготувано 3-N-морфолінокарбоніламінін, 3-N-метилкарбоніламінін отримують в результаті гідролізу 3-гідроксипентилу-3-гідропентилу, який отримують в результаті реакції 3-гідроксипентилу з метанолом. ІН ЯМР (CDCl ₃): δ 7,18 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 7,13 (t, 1H, J = 1,8 Hz), 7,04-6,99 (m, 1H), 6,8 (dd, 1H, J = 7,5 та 7,5 Hz), 6,10 (bs, 1H), 5,58-5,35 (bs, 2H), 3,43-3,34 (2H), 1,68-1,57 (2H), 0,97 (t, 3H, J = 7,5 Hz).
7.2.13	7-аміно-тетрапін	Аналітично приготувано 7-аміно-4-метоксифеніліт, 7-аміно-2,3,4-тетрагідроксін отримують в результаті гідролізу 7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): чистота: 98%, MS (скалярна): 199 (+M ⁺ мономер).
7.2.14	7-аміно-2-(6-фтороксифеніл)-1,2,3,4-тетрагідроксін	Аналітично приготувано 7-аміно-4-метоксифеніліт, 7-аміно-2,3,4-тетрагідроксін отримують в результаті гідролізу 7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): чистота: 98%, MS (скалярна): 199 (+M ⁺ мономер).
7.2.15	7-аміно-1,2,3,4-тетрагідроксін	Аналітично приготувано 7-аміно-4-метоксифеніліт, 7-аміно-2,3,4-тетрагідроксін отримують в результаті гідролізу 7-гідро-1,2,3,4-тетрагідроксін. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): чистота: 98%, MS (скалярна): 199 (+M ⁺ мономер).
7.2.16	2-(3-амінофеніл)-N(2-діметилпропаніл)амінін	Аналітично приготувано 2-(3-ам

[illegible]

7.3.10.01	N2,N4-dif(4-фенилфеніл)-5-фтор-2,4-піримідині (R925803)	Аналітичне приготування N2,N4-dif(4-фенілфеніл)-5-фтор-2,4-піримідині, N2,N4-dif(4-фенілфеніл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 4-ацетилфенілу. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 8,86 (d, 1H), 9,20 (t, 1H), 8,3 (t, 1H), 8,79 (m, 3H), 7,18 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,56-7,51 (m, 2H), 7,48-7,23 (m, 1H), 7,17-7,04 (m, 2H); ^1H RMP: тривалість утворення: 19,52 хвилини, чистота: 80 %; MS (мас/заряд): 494 (MH ⁺).
7.3.10.01	N2,N4-dif(4-4-метоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині (R925773)	Аналітичне приготування N2,N4-dif(4-4-метоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині, N2,N4-dif(4-4-метоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 4-метоксифенілу. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 9,69 (s, 1H), 9,28 (t, 1H), 8,40 (s, 1H), 7,66-6,89 (m, 4d), 6,79 (t, 1H), 5,7 (t, 2H), 6,65 (t, 1H), 4,22 (d, 4H), 4,16 (s, 4d); ^1H RMP: тривалість утворення: 24,42 хвилини, чистота: 92 %; MS (мас/заряд): 404 (MH ⁺).
7.3.10.02	N2,N4-dif(3-гідроксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині (R925774)	Аналітичне приготування N2,N4-dif(3-гідроксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині, N2,N4-dif(3-гідроксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 3-гідроксифенілу. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 9,73 (t, 1H), 9,40 (d, 1H), 9,33 (t, 1H), 9,24 (t, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,3 (t, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,09-7,02 (m, 2H), 6,99-6,87 (m, 3H), 6,54 (d, 1H), 7,2 (t, 1H), 6,37 (d, 1H), 4,79 (s, 2H); ^1H RMP: тривалість утворення: 19,71 хвилини, чистота: 97%; MS (мас/заряд): 320 (MH ⁺).
7.3.10.03	N2,N4-dif(4-4-етоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині (R925775)	Аналітичне приготування N2,N4-dif(4-4-етоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині, N2,N4-dif(4-4-етоксифеніл)-5-ціано-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 4-етоксифенілу. ІІІ RMP (CDCl3): δ 7,10 (d, 1H), 7,40 (d, 4H), 8,7 (d, 1H), 9,0 (4H), δ 9,0 (4H), δ 7,1 (t), 6,82-6,75 (m, 2H), 4,80 (t, 4H), 4,29-4,25 (d, 4H), 1,32-1,26 (m, 3H); ^1H RMP: тривалість утворення: 28,60 хвилини, чистота: 100 %; MS (мас/заряд): 493 (MH ⁺).
7.3.10.04	R935192: N2, N4-di(1-метил-ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині	Аналітичне приготування N2, N4-di(1-метил-ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині, N2, N4-di(1-метил-ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2-ацетил-5-фторпіримідину та 1-метил-ізохіноліну. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 10,65 (s, 1H), 10,4 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 5,3 (t, 1H), 7,98 (t, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,4 (t), 7,09-7,34 (m), 4 (H), 7,3 (d, 1H), 1,7 (t, 1H), 9,4 (t), 4,53 (s, 3H), 4,01 (s, 3H); ^1H RMP: тривалість утворення: 18,86 хвилини, чистота: 99%; MS (мас/заряд): 389 (MH ⁺).
7.3.10.05	R935205: N2,N4-di(1-метоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідині	Аналітичне приготування 5-фтор-N2,N4-di(1-гідроксифеніл)-2,4-піримідині, N2,N4-di(1-гідроксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 1-метоксифенілу. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 9,59 (t, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,18 (d, 1H), δ 7,1 (s), 3,53 (t, 1H), 8,81 (d, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,69 (t, 1H), 7,84 (t), 7,58 (d, 1H), 7,8 (t), 7,48 (d, 1H), 1,7 (s, 8,81 t); ^1H RMP: тривалість утворення: 17,80 хвилини, чистота: 99%; MS (мас/заряд): 305 (MH ⁺).
7.3.10.06	R935211: N2,N4-di(1-ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині	Аналітичне приготування N4-(3,4-4-етоксифеніл)-5-фтор-N2-(3-гідроксифеніл)-2,4-піримідині, N2,N4-di(1-ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 1-ізохіноліну. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 9,57 (t, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,18 (d, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,69 (t, 1H), 7,84 (t), 7,58 (d, 1H), 7,8 (t), 7,48 (d, 1H), 1,7 (s, 8,81 t); ^1H RMP: тривалість утворення: 17,80 хвилини, чистота: 99%; MS (мас/заряд): 305 (MH ⁺).
7.3.10.07	R935188: N2,N4-di(ізохінолін-4-іл)-5-фтор-2,4-піримідині	Аналітичне приготування 5-фтор-N2,N4-di(1-гідроксифеніл)-2,4-піримідині, N2,N4-di(ізохінолін-4-іл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2-ацетил-5-фторпіримідину та 4-ізохіноліну. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 9,80 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 4,1 (t), 8,01 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,69 (d, 1H), 7,57 (d, 1H), 8,3 (t), 7,54 (d, 1H), 1,7 (t, 1H), 8,8 (t), 7,29 (d, 1H), 1,7 (t, 8,8 (t); ^1H RMP: тривалість утворення: 15,17 хвилини, чистота: 94 %; MS (мас/заряд): 301 (MH ⁺).
7.3.10.08	R935189: N2,N4-di(ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині	Аналітичне приготування N2,N4-di(ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині, N2,N4-di(ізохінолін-5-іл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2-ацетил-5-фторпіримідину та 5-ізохіноліну. ІІІ RMP (DMSO-d6): δ 10,05 (s, 1H), 9,76 (s, 1H), 8,16 (d, 1H), 8,17 (t), 8,05 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,52-7,52 (d, 2H), 7,48 (d, 1H), 7,34 (d, 1H), 1,7 (t, 8,8 (t); ^1H RMP: тривалість утворення: 14,33 хвилини, чистота: 100%; MS (мас/заряд): 361 (MH ⁺).
7.3.10.09	N2,N4-dif(4-етоксифеніл)-2,4-піримідині (R925814)	Аналітичне приготування N2,N4-dif(4-етоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідині, N2,N4-dif(4-етоксифеніл)-5-фтор-2,4-піримідині отримувє в результаті реакції 2,4-ацетил-5-фторпіримідину та 4-етоксифенілу. ІІІ RMP (CDCl3): δ 8,15 (t, 1H), 6,10 (d, 1H), 8,4 (t), 5,67 (d, 1H), 1H, 8,1 (t), 4,66-4,62 (m, 1H), 4,50-4,46 (m, 1H), 4,23-4,13 (m, 1H), 2,27-2,14 (m, 2H), 1,31-1,24 (m, 6H), 1,00-0,94 (m, 6H); ^1H RMP: тривалість утворення: 30,61 хвилини, чистота: 98 %; MS (мас/заряд): 392 (MH ⁺).

[illegible][illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

		етоскарбоніфені)-N4-(3-етоксикарбоніфені)-6-етоскарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-аретиніаційні) (R26566). ІН ЯМР (CDCl ₃): 10.32 (d, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.40 (d, 2H), 7.31 (d, 2H), 7.32 (d, 2H), 7.37 (d, 6H), 6.91 (d, 2H), 6.71 (d, 6H), 6.82 (d, 2H), 6.71 (d, 6H), 6.25 (d, 2H), 4.77 (d, 2H), 1.71 (t, 3H), 4.30 (m, 4H), 1.47 (d, 2H), 1.31 (m, 6H); РХМС: тривалість утримання: 32.10 хв, чистота: 100%; МС (w): 584 (М+).
7.3.721	N2,N4-біс(4-мететині)-1,3-бензотіа-6-і-5-фтор-2-піримідині (R59502)	Аналізовано приготувано N2,N4-біс(4-мететині)-5-фтор-2-піримідині, N2,N4-біс(4-мететині)-1,3-бензотіа-6-і-5-фтор-2-піримідині отримують в результаті реакції N2,4-дихлор-5-фтор піримідину та 2-мететині)-1,3-бензотіа-6-аміну. РХМС: тривалість утримання: 24.98 хв, чистота: 84.6%; МС (w): 486.80 (М+).
7.3.722	N4-(3-і-аретиніаційні)феніл)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині (R59504)	Аналізовано приготувано N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині, N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції N2-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині та 2-і-аретиніаційні)феніл)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині. РХМС: тривалість утримання: 13.36 хв, чистота: 97.6%; МС (w): 495.42 (М+).
7.3.723	N4-(3-і-аретиніаційні)феніл)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині (R59504)	Аналізовано приготувано N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині, N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції N2-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині та 2-і-аретиніаційні)феніл)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та піридину. РХМС: тривалість утримання: 13.21 хв, чистота: 100%; МС (w): 481.40 (М+).
7.3.724	(+)-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R59501)	Аналізовано приготувано (+)-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та піридину. РХМС: тривалість утримання: 19.41 хв, чистота: 95.7%; МС (w): 569.98 (М+).
7.3.725	(+)-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R59505)	N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції (+)-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та піридину. РХМС: тривалість утримання: 11.98 хв, чистота: 90.1%; МС (w): 440.3 (М+).
7.3.726	5-мететинікарбоні-N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R26559)	Аналізовано приготувано N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині, 5-мететинікарбоні-N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції 5-етоксикарбоні-N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та піридину. Складний етоскарбоніфені у 3-етині замість складного мететині ефіром у мететині розчинуючи. МС (w): 575 (М+).
7.3.727	N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині (R26556)	Аналізовано приготувано N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-5-фтор-2,4-піримідині, N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2,4-піримідині отримують в результаті реакції N2,4-дихлор-5-фторпіримідину з 4-і-аретиніаційні). РХМС: тривалість утримання: 18.85 (М+).
7.3.728	N2-(3-і-аретиніаційні)метіакоксифені)-5-етоскарбоні-N4-(3-і-4-тетрафторкарбоніфені)-2,4-піримідині (R36799)	Аналізовано приготувано N2-(3-і-аретиніаційні)-N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-2,4-піримідині, N2-(3-і-аретиніаційні)-5-етоскарбоні-N4-(3-і-4-тетрафторкарбоніфені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції еті-3-аміноетіакоксифені та 2-хлор-5-етоскарбоні-N4-(3-і-4-тетрафторкарбоніфені)-4-піримідині. МС (w): 567 (М+).
7.3.729	N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R58811)	До розчину N4-(3-і-мететині)-N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині у ДМФ при температурі +20 °С додають алікватинти, та суміш отримують після 10 хвилин. До цієї суміші додають 10 мл 10% розчину N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та фосфонітрил трифторид (BOP), після чого суміш отримують при кімнатній температурі протягом 24 годин. Рішимо покласти водну та органічну фази. Органічну фази екстрактувати три рази. Після екстракції додати NaClO ₄ в загальному об'ємі. Осад, отриманий після утворення розчину, осадити препаратом TLX, отриманий N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині. РХМС: тривалість утримання: 19.29 хв, чистота: 99%; МС (w): 682 (М+).
7.3.730	5-фтор-N4-(3-і-аретиніаційні)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R26675)	Аналізовано приготувано N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині, 5-фтор-N4-(3-і-аретиніаційні)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції 5-фтор-N4-(3-і-аретиніаційні)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині та піридину. РХМС: тривалість утримання: 14.87 хв, чистота: 98%; МС (w): 438 (М+).
7.3.731	N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-5-фтор-2-піримідині (R26528)	Аналізовано приготувано N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-5-фтор-2,4-піримідині, N2,N4-біс(4-і-аретиніаційні)-5-фтор-2,4-піримідині отримують в результаті реакції 2,4-дихлор-5-фторпіримідину та етоскарбоніфені. РХМС: тривалість утримання: 26.55 хв, чистота: 100%; МС (w): 425 (М+).
7.3.732	N2-(3-і-аретиніаційні)-N4-(3-і-4-етоксикарбоніфені)-5-фтор-2-піримідині (R59806)	Аналізовано приготувано N2-(3-і-аретиніаційні)-N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-2-піримідині, N2-(3-і-аретиніаційні)-N4-(3-і-4-етоксикарбоніфені)-5-фтор-2-піримідині отримують в результаті реакції 2-хлор-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-2-піримідині та 3-і-аретиніаційні). РХМС: тривалість утримання: 25.38 хв, чистота: 99%; МС (w): 401 (М+).
7.3.733	(+)-N4-(3-і-аретиніаційні)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-	
7.3.734	N2-(3-і-аретиніаційні)феніл)-N4-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині (R27345)	Аналізовано приготувано N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині, N4-(3-і-етоксикарбоніфені)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині отримують в результаті реакції N2-карбонілетіакоксифені)-5-фтор-2-піримідині та 2-і-аретиніаційні)феніл)-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): 8.04 (m, 1H), 7.90 (m, 1H), 7.80 (m, 1H), 7.68 (dd, 1H, J = 7.7 Hz), 7.35 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.28 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.07 (t, 1H, J = 6.8 Hz), 6.81 (d, 1H, J = 7.7 Hz), 6.83 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.78 (d, 1H, J = 6.4 Hz), 6.36 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 4.26 (m, 4H), 1.35 (t, 3H), 1.71 (t, 3H), 1.97 (d, 1H, J = 6.6 Hz), 1.66 (d, 1H, J = 6.6 Hz), 1.47 (d, 2H), 1.31 (m, 6H); РХМС: тривалість утримання: 15.88 хв, чистота: 100%; МС (w): 411 (М+).
7.3.735	N4-(3-і-аірофеніл)-5-фтор-N2-(3-і-4-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині (R20394)	Розчин N-метил-3-аміноетіакоксифені (у еквіваленті) та 2-хлор-N4-(4-діфторфені)-5-фтор-2-піримідині (2 еквіваленти) у MeOH отримують у стехіометричній кількості реакції при температурі 100 °С протягом 24 годин. Після осадження до кімнатної температури, суміш розчиняють етилатом. Отриману суміш розчиняють в аірофенілі та промивають сумішшю оксидатури в оксиданті (1 : 1, в об'єм, отримують N4-(3-і-аірофеніл)-5-фтор-N2-(3-і-мететині)-карбонілетіакоксифені)-2,4-піримідині. ІН ЯМР (DMSO-d ₆): 1.05 (s, 1H), 9.83 (t, 1H), 8.24 (d, 1H, J = 2.7 Hz), 7.98 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.29 (m, 1H), 6.60 (m, 1H), 4.37 (t, 2H), 4.26 (t, 2H), 3.13 (J = 3.3 Hz), J = 3.3 Hz, J =

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

Chemical", каталоговий №520211). Протоколи проведення різних аналізів наводяться нижче.

7.5.1. Культивування тучних клітин та базофілів людини

Тучні клітини і базофіли людини культивували з CD34-негативних клітин-попередників згідно з наведеним нижче описом [див. також методи, викладені в одночасно поданій заявці на патент США №10/053355, дата подання 8 листопада 2001р., який включений в даний документ на основі посилання].

7.5.1.1. Підготовка повного живильного середовища STEMPRO-34

Для підготовки повного живильного середовища STEMPRO-34 (CM), в колбу для фільтрування помістили 250мл STEMPRO-34™ безсироваткового середовища (SFM, постачальник "GibcoBRL", каталоговий №10640). У цю колбу додали 13мл живильної добавки "STEMPRO-34 Nutrient Supplement" (NS, постачальник "GibcoBRL", каталоговий №10641) (процес приготування більш детально наведений нижче). Посудину з-під живильної добавки промили приблизно 10мл безсироватковим середовищем та додали цю рідину в колбу для фільтрування. Після додавання 5мл L-глутаміну (200ммоль; постачальник "Melfiatech", каталоговий № MT 25-005-CI) і 5мл 100X пеніциліну/стрептоміцину ("пен-стреп"; постачальник "HyCione", каталоговий № SV30010), об'єм довели до 500мл додаванням безсироваткового середовища, а потім розчин фільтрували.

Найбільш варіабельним елементом приготування повного живильного середовища є метод, за допомогою якого розморожують і змішують живильну добавку перед її вливанням у безсироваткове середовище. Розморожування живильної добавки необхідно здійснювати у водяній бані при температурі 37°C з круговим перемішуванням, без завихрення і струшення, до повного розчинення. Під час перемішування необхідно стежити, чи не лишилося нерозчинених ліпідів. Якщо вони присутні, і розчин не є однорідним, необхідно знову помістити добавку у водяну баню і продовжувати процес перемішування до одержання однорідного розчину. Іноді цей компонент розчиняється негайно, іноді - після одного-двох циклів перемішування, а іноді взагалі не розчиняється. Якщо через одну-дві години живильна добавка не переходить у форму однорідного розчину, її слід забракувати і розморозити нову. Не слід використовувати живильну добавку, яка має неоднорідний вигляд після розморожування.

7.5.1.2. Збільшення популяції CD34+ клітин

Початкову популяцію CD34-позитивних (CD34+) клітин, досить нечисленну ($1-5 \times 10^6$ клітин), збільшили до відносно високої численності CD34-негативних клітин-попередників (близько $2-4 \times 10^9$ клітин) із застосуванням описаної нижче методології і живильного середовища. CD34+ клітини (від одного донора) одержали від компанії "Allcells" (Берклі, шт. Каліфорнія). Оскільки, як правило, існує певна варіабельність за якістю і кількістю клітин, що постачаються цією компанією,

отримані клітинні культури перед використанням поміщали в конічну пробірку ємністю 15мл і доводили до об'єму 10мл в повному живильному середовищі.

У день 0 провели підрахунок життєздатних (рефрактильних) клітин, та потім клітини центрифугували при 1200об/хв. Клітини повторно суспендували до щільності 27500клітин/мл в повному живильному середовищі, що містить 200нг/мл рекомбінантного фактору стовбурних клітин людини (SCF, постачальник "Peprotech", каталоговий №300-07) і 20нг/мл людського flt-3 ліганда (постачальник "Peprotech", каталоговий №300-19) (далі - середовище CM/SCF/flt-3). Приблизно на четвертий або п'ятий день щільність культури перевірили проведенням підрахунку клітин, і розбавили культуру до щільності 27500клітин/мл свіжим живильним середовищем "CM/SCF/flt-3". Приблизно на сьомий день культуру перенесли в стерильну трубку і провели підрахунок клітин. Клітини центрифугували при 1200об/хв. і повторно суспендували до щільності 27500клітин/мл у свіжому середовищі "CM/SCF/flt-3".

Цей цикл повторили, починаючи з дня № 0, загалом від 3 до 5 разів протягом періоду збільшення чисельності популяції.

В разі потреби повторного суспендування великої кількості культур, що містяться в декількох колбах, вміст усіх колб об'єднують в одній посудині перед проведенням підрахунку клітин. Таким чином забезпечується точність підрахунку клітин, а також єдиний підхід до всієї популяції. Перед об'єднанням вмісту, колбу перевіряють під мікроскопом на наявність забруднень з метою попередження можливого забруднення всієї популяції.

Між 17 і 24 днями можливе погіршення стану культури (тобто гине від 5 до 10% від загальної кількості клітин), і зростання популяції сповільнюється. У цей період спостереження за клітинами ведеться щоденно, оскільки лише за добу культура може повністю загинути. Після початку погіршення її стану, клітини підраховують, центрифугують при 850об/хв. протягом 15хв. і повторно суспендують зі щільністю 35000клітин/мл у повному живильному середовищі CM/SCF/flt-3 з тим, щоб одержати ще одне чи два ділення культури. За клітинами ведуть щоденне спостереження, щоб не допустити загибелі культури.

При наявності загибелі більше 15% клітин культури клітин-попередників і наявності в культурі певної кількості продуктів розкладання, CD34-негативні клітини-попередники готові до диференціації.

7.5.1.3 Диференціація CD34-негативних клітин-попередників у тучні клітини слизових

Друга фаза виконується для перетворення вирощених CD34-негативних клітин-попередників в диференційовані тучні клітини слизових. Ці слизові культивовані тучні клітини людини (CHMC) одержують з CD34+ клітин, вилучених з пуповинної крові і оброблених для одержання численної популяції CD34-негативних клітин-попередників, як описано вище. Для одержання

CD43-негативних клітин-попередників цикл повторного суспендування культури був ідентичним до вищенаведеного, за тим винятком, що культуру висівали зі щільністю 42500клітин/мл і на четвертий або п'ятий день додавали близько 15% додаткового живильного середовища без підрахунку клітин. Крім того, цитокінний склад середовища змінили таким чином, що воно містило фактор стовбурних клітин (200нг/мл) і людський рекомбінант IL-6 (200нг/мл; постачальник "Peprotech", каталоговий №200-06, відновлений до 100мкм/мл у стерильній оцтовій кислоті, 10ммоль) (надалі-середовище CM/SCF/IL-6).

I і II фази займають близько 5 тижнів. Загибель клітин і наявність продуктів розкладу в культурі спостерігаються протягом з першого по третій тиждень; крім того, з другого по п'ятий тиждень існує період, протягом якого деяка частина культури перебуває не в суспензії, а прикріплюється до поверхні посудини, в якій вирощується культура.

Як і під час I фази, при необхідності повторного суспендування культури на сьомий день кожного циклу, вміст усіх колб об'єднували в одній посудині перед підрахунком клітин для забезпечення однаковості всієї популяції. Кожну колбу попередньо перевіряли під мікроскопом з метою виявлення забруднень і недопущення забруднення всієї популяції.

При об'єднанні вмісту колб, приблизно 75% від об'єму колби переливали в спільну посудину, при цьому в колбі залишалося близько 10мл. По колбі з рідиною, що лишилася, різко латерально стукали, щоб вивільнити клітини, які прикріпилися до поверхні. Повторне постукування здійснювали під прямим кутом до першого, щоб остаточно зсунути клітини з місця.

Перед переливанням рідини, що лишилася, в посудину для підрахунку, колбу нахилили під кутом 45 градусів на кілька хвилин. Перед висіванням в об'ємі 35-50мл на колбу (при щільності 42500клітин/мл), клітини центрифугували при 950об/хв протягом 15 хвилин.

7.5.1.4 Диференціація CD34-негативних клітин-попередників в тучні клітини сполучної тканини

Проліферативну популяцію CD34-негативних клітин-попередників готували за описаною вище методикою і обробляли для формування триптазо/хімазо-позитивного фенотипу (сполучної тканини). При цьому користувались методами, аналогічними описаним вище для тучних клітин слизових оболонок, за винятком додавання IL-4 замість IL-6 у живильне середовище культури. Одержані клітини - типові для мастоцитів сполучної тканини.

7.5.1.5 Диференціація CD34-негативних клітин-попередників у базофіли

Проліферативну популяцію CD34-негативних клітин-попередників готували за методикою, описаною вище в розділі 7.5.1.3, і користувались нею для формування збільшеної популяції базофілів. CD34-негативні клітини обробляли за методом, аналогічним викладеному вище для мастоцитів слизових оболонок, за винятком

додавання IL-3 (20-50нг/мл) замість IL-6 в живильне середовище культури.

7.5.2 IgE активація CHMC з низькою щільністю: аналіз триптази і LTC4

У два 96-лункових планшети з круглодонними лунками (модель Costar 3799) додають 65мкл розчинів приготовлених сполук або контрольних проб, приготовлених в МТ [137ммоль NaCl, 2,7ммоль KCl, 1,8ммоль CaCl₂, 1,0ммоль MgCl₂, 5,6ммоль глюкози, 20ммоль N-2-гідроксидетилпіперазин-N-2-етансульфонової кислоти (pH 7,4), 0,1% альбуміну бичачої сироватки, (Sigma A4503)] з вмістом 2% MeOH і 1% DMSO. Потім CHMC розділяють на центрифугу (980об/хв, 10хв) і повторно суспендують в заздалегідь підігрітому середовищі МТ. Далі, 65мкл клітин вливають в кожний 96-лунковий планшет. Залежно від активності дегрануляції кожного з індивідуальних донорів CHMC, від 1000 до 1500 клітин поміщають у кожен лунку. Потім перемішують чотири рази з наступною інкубацією протягом 1 години при температурі 37°C. Під час інкубації готують розчин 6X анти-IgE [анти-людський імуноглобулін кроля IgE] (1мг/мл, постачальник "Bethyl Laboratories", каталоговий № A80-109A), розбавлений 1:167 в буферному розчині МТ]. Клітини стимулюють додаванням 25мкл розчину 6X анти-IgE до відповідних планшетів. До контрольних пробірок, що не підлягають стимуляції, додають 25мкл МТ. Після додавання анти-імуноглобуліну Е суміш перемішують двічі та інкубують при 37°C протягом 30хв. Під час 30-хвилинної інкубації готують розчин 20ммоль бульйону з субстратом триптази [(Z-Ala-Lys-Arg-AMC-2TFA; Enzyme Systems Products, #AMC-246)] 1:2000 в буферному розчині для кількісного аналізу триптази [0,1M N-2-гідроксидетилпіперазин-N-2-етансульфонової кислоти (pH 7,5), 10%м/об гліцеролу, 10мкмоль гепарину (Sigma H-4898) 0,01% NaNs]. Планшети центрифугують при 1000об/хв протягом 10хв для сепарації клітин. Потім переносять 25мкл супернатанту в 96-лунковий чорно донний планшет і додають 100мкл свіжорозведеного розчину субстрату триптази в кожен лунку. Інкують 30хв при кімнатній температурі. За допомогою спектрофотометра для прочитання планшетів визначають оптичну щільність планшетів при 355nm/460nm.

Кількісний аналіз лейкотрієну C4 (LTC4) також проводиться за допомогою комплектів ELISA на належним чином розведених зразках супернатанту (визначається емпіричним шляхом для популяції клітин кожного з донорів з тим, щоб виміри проб знаходилися в межах стандартної кривої) відповідно до інструкцій виробника.

7.5.3 Активація CHMC з допомогою IgE за високої щільності клітин: аналізи на дегрануляцію (триптаза, гістамін), лейкотрієн (LTC4) і цитокін (TNFalpha, IL-13)

Культивовані тучні клітини людини (CHMC) сенсibilізують протягом 5 днів за допомогою IL-4 (20нг/мл), фактору стовбурних клітин (200нг/мл), IL-6 (200нг/мл), і IgE людини (CP 1035K, постачальник "Cortx Biochem", 100-500нг/мл залежно від покоління) в повному живильному

середовищі. Після сенсibiliзації клітини підраховують, центрифугують (1000об/хв, від 5 до 10хв) і повторно суспендують зі щільністю $1-2 \times 10^6$ клітин/мл в буферному розчині МТ. Додають 100мкл суспензії клітин в кожну лунку і 100мкл розчинів приготовлених сполук. Остаточна концентрація середовища - 0,5%DMSO. Інкують при 37°C (5% CO₂) протягом 1 години. Після години обробки реагентами стимулюють клітини 6X анти-IgE. Перемішують лунки з клітинами і залишають планшети для інкубації при 37°C (5% CO₂) на одну годину. Після інкубації протягом години, центрифугують клітини (10хв, 1000об/хв) і відбирають 200мкл супернатанту з кожної лунки, при цьому діють обережно, щоб не зачепити осад. Планшет з супернатантом поміщають на лід. При виконанні операції, що потребує 7 годин (див. нижче), визначають активність триптази супернатанту, розведеного в пропорції 1:500. Повторно суспендують клітини в 240мкл повного живильного середовища, що містить 0,5% DMSO і відповідну концентрацію сполуки. Клітини CHMC інкують протягом 7 годин при 37°C (5% CO₂). Після інкубації центрифугують клітини (1000об/хв., 10хв.), відбирають 225мкл із кожної лунки і зберігають при температурі -80°C до готовності до проведення аналізів ELISA. Аналіз ELISA проводиться на належним чином розведених пробах (визначається емпіричним шляхом для популяції клітин кожного з донорів, щоб виміри проб виявлялися в межах стандартної кривої) відповідно до інструкцій виробника.

7.5.4 Активация ВММС з допомогою IgE при високій щільності клітин: аналізи на деградуляцію (гексосимідаза, гістамін), лейкотрієн (LTC₄) і цитокін (TNFalpha, IL-6)

7.5.4.1 Приготування кондиціонованого середовища WEHI

Кондиціоноване середовище WEHI одержували шляхом вирощування мишачих мієломоноцитарних клітин WEHI-3B (Колекція американських типових культур, м. Роквілл, шт. Меріленд) в середовищі Ігла (Eagles), модифікованому за способом Іскова, (постачальник "Mediatech", м. Гернандон, шт. Вірджінія) з додаванням 10% телячої ембріональної сироватки, інактивованої тепловою обробкою (постачальник "JRH Biosciences", м. Канзас-сіті, шт. Міссурі), 50мкмоль 2-меркаптоетанола (постачальник "Sigma", м. Сент-Луїс, шт. Міссурі) і 100IU/мл пеніцилін-стрептоміцину (постачальник "Mefiatech") в інкубаторі при 37°C у зволоженому середовищі 5% CO₂/95% повітря. Початкову суспензію клітин висівали приблизно зі щільністю 200000клітин/мл, а потім ділили у відношенні 1:4 кожні 3-4 дні протягом двох тижнів. Безклітинні супернатанти збирали, аліквотували і зберігали при температурі -80°C до виникнення в них потреби.

7.5.4.2 Приготування середовища ВММС

Середовище ВММС складається з 20% кондиціонованого середовища WEHI, 10% телячої ембріональної сироватки, інактивованої тепловою обробкою (постачальник "JRH Biosciences"), 25ммоль N-2-гідроксietилпіперазин-N-2-етансульфонової кислоти, рН7,4 (постачальник

"Sigma"), 2ммоль L-глутаміну (постачальник "Mediatech"), 0,1ммоль заміних амінокислот (постачальник "Mediatech"), 1ммоль пірувату натрію (постачальник "Mediatech"), 50мкмоль 2-меркаптоетанола (постачальник "Sigma") і 100IU/мл пеніцилін-стрептоміцину (постачальник "Mediatech") в середовищі RPMI1640 (постачальник "Mediatech"). Для приготування середовища ВММС всі компоненти об'єднують в стерильній посудині для фільтрації IL і пропускають через фільтр 0,2мкм перед використанням.

7.5.4.3 Протокол

Тучні клітини кісткового мозку (ВММС) сенсibiliзують протягом ночі мишачим фактором стовбурних клітин (20нг/мл) і моноклональним анти-ДНК (10нг/мл, Clone SPE-7, постачальник "Sigma", каталоговий № D-8406) у середовищі ВММС при щільності клітин 666×10^3 клітин/мл. Після сенсibiliзації клітини підраховують, центрифугують (1000об/хв, 5-10хв.) і повторно суспендують зі щільністю $1-3 \times 10^6$ клітин/мл в буферному розчині МТ-буферу. Додають 100мкл суспензії клітин до кожної лунки і 100мкл розчинів сполуки. Остаточна концентрація наповнювача - 0,5% DMSO. Інкують при 37°C (5% CO₂) протягом 1 години. Після 1 години обробки сполукою стимулюють клітини стимулом 6X (60нг/мл ДНК-білковий комплекс-альбумін бичачої сироватки). Перемішують лунки з клітинами і інкують планшети при температурі 37°C (5% CO₂) протягом однієї години. Після однієї години інкубації, центрифугують клітини (10хв., 1000об/хв.), відбирають 200мкл супернатанту з кожної лунки; при цьому діють обережно, щоб не зачепити осад, і переміщують в чисту пробірку або 96-лунковий планшет. Розташовують планшет із супернатантом на лід. Під час операції, що потребує від 4 до 5 годин (див. нижче), проводять аналізи гексосимідази. Повторно суспендують клітини в 240мкл живильного середовища WEI, що містить 0,5% DMSO і відповідну концентрацію сполуки. Інкують клітини ВММС протягом 4-5 годин при температурі 37°C (5% CO₂). Після інкубації центрифугують клітини (1000об/хв., 10хв.), відбирають 225мкл з кожної пробірки і поміщають на зберігання при температурі -80°C до проведення ELISA. ELISA проводиться на належним чином розведених пробах (визначається емпіричним шляхом для популяції клітин кожного з донорів з тим, щоб зміни проб були в межах стандартної кривої) згідно з інструкціями виробника.

Аналіз гексосамідази: 50мкл субстрату гексосамідази (4-метилумбелліферил-N-ацетил-β-D-глюкозамінід; 2ммоль) вливають в кожну лунку чорного 96-лункового планшета для аналізу. Додають 50мкл супернатанту клітин ВММС (див. вище) до субстрату гексосамідази, витримують при 37°C протягом 30хв і аналізують планшет через 5, 10, 15 і 30хв на спектрофотометрі.

7.5.5. Активация базофілів з допомогою IgE або алергену хатнього кліща: аналіз виділення гістаміну

Аналіз активації базофілів проводили з використанням цільної периферичної крові

[illegible]

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R908580					
R908586		9999			
R908587		9999			
R908591	0,075				
R908592	0,05				
R908946	0,51	9999			
R908947	0,496	9999			
R908950	0,074	47,5			
R908951	0,085	5,48			
R908952	0,08	6,07			
R908953	0,084				
R908954	0,084	9999			
R908955	0,293				
R908956	0,34				
R909310	0,207	9999			
R909312	1,759	9999			
R909313	0,663	9999			
R909314	0,293	9999			
R909316	0,2	9999			
R909317	0,0287	9999	0,002	0,007	0,006
R909318	1,02	9999			
R909319	0,225	9999			
R909320	0,29	9999			
R909321	0,163	30			
R909322	0,225	9999	0,24	0,14	0,1
R909323	9999	9999			
R926957	1,519	9999			
R926958	0,353	9999			
R926959	0,3	9999			
R926960	0,399	9999			

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R926961	1,2	9999			
R926962	0,205	9999			
R926963	0,155	9999			
R926964	0,368	9999			
R926965	9999	9999	9999		
R926966	0,539	9999			
R926967	0,259	9999			
R926968	0,249				
R926969	0,359	9999			
R926970	0,06	9999			
R926971	0,034	9999			
R926972	5,29	9999			
R926973	0,284				
R926974	0,293				
R926975	0,421	30,2			
R926976	0,305	8,3	0,59	0,11	0,25
R926977	0,0359	9999			
R926978	0,995	18			
R926979	0,109	23,5			
R926980	0,68	5,49			
R926981	0,137	9999			
R926982	0,12	9999			
R926983	0,195	9999			
R926984	0,167	9999			
R926985	0,14	4,13			
R926986	0,345				
R926987	10				
R926989	0,199				
R926990	11,3				
R926991	0,436				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R926992	8888				
R926993	0,689				
R926994	0,061				
R926995	9,565	9999			
R927004	0,413				
R927005	1,158				
R927006	2,142				
R927007	5,739				
R927008	1,123				
R927009	4,933				
R927010	5,006				
R927011	0,464				
R927012	3,658				
R927013	5,171				
R927014	0,655				
R927015	9999	9999			
R927043	0,45	9999			
R927044		9999	4,28		
R927045	0,535	9999			
R927046		9999	2,4		
R927047	0,168	9999			
R927048	0,05	9999			
R927049	0,11	9999			
R927050	0,073	3,29	0,103	0,019	0,011
R927051	0,024	12,6			
R927052	0,678				
R927053	0,671				
R927054	9999				
R927055	9999				
R927056	0,144	1,58			

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R927057	0,37				
R927058	12,2				
R927059	0,291				
R927060	0,222	5,17			
R927061	0,126	4,72			
R927062	15,4	9999			
R927063	0,849	9999			
R927064	0,212	7,24	0,005	1,92	0,819
R927065	0,235	9999			
R927066	0,283	15,3			
R927067	0,625	22,5			
R927068	0,89				
R927069	0,076	13	1,35	0,93	1,09
R927070	0,054	5,24			
R927071	0,067				
R927072	0,064				
R927073	0,0668				
R927074	0,072	1,38			
R927075	0,057	15,2			
R927076	0,071				
R927077	0,284	8,8			
R927078	0,245				
R927079	0,599				
R927080	0,204				
R927081	2,27	9999			
R927082	0,256	9999			
R927083	0,316	19			
R927084	0,466	9999			
R927085	7,43	9999			
R927086	0,286	9999			

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R927087	0,436	9999			
R927088	0,117	9999			
R927089	0,144	9999			
R927090	0,102	9999			
R927091	0,27	9999			
R927092	0,377	9999			
R927093	0,303	9999			
R927094	9999	9999			
R927096	0,402	9999			
R927097	0,163	0,847			
R927098	1,53	9999			
R927099	9999	9999			
R927100	6,199	9999			
R927117	0,614	9999			
R927118	0,065	3,49			
R927119	1,162				
R927120	1,018				
R927121	0,389				
R927122	0,328				
R927123	0,087				
R927124	0,415				
R927125	0,255				
R927126	5,167				
R927127	9999				
R927128	1,893				
R927129	1,219				
R927130	1,586				
R927131	1,473				
R927132	2,756				
R927133	0,536				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R927134	1,286				
R927135	0,568				
R927136	0,945				
R927137	9999,000				
R927138	0,463				
R927139	9999,000				
R927140	4,823				
R927141	9999				
R927142	5,000				
R927143	3,998				
R927144	2,273				
R927145	5,022				
R927146	1,309				
R927147	5,088				
R927148	0,097				
R927149	0,355				
R927150	0,708				
R927151	0,408				
R927152	4,864				
R927153	9999,000				
R927154	4,978				
R927155	8888,000				
R927156	2,779				
R927157	0,072				
R927158	2,284				
R927159	4,830				
R927160	8888,000				
R927162	5,646				
R927163	1,827				
R931930	0,361				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R931931	1,817				
R931932	0,511				
R931933	0,580				
R931934	9999,000				
R931935	4,706				
R931936	0,957				
R931936		9999			
R931937	9999,000				
R931938	0,542				
R931939	0,415				
R931940	1,069				
R931941	0,494				
R931942	5,665				
R931943	9999,000				
R931944	0,285				
R931945	9999,000				
R931946	5,594	9999			
R931947	2,700	9999			
R931948	0,197				
R931949	0,033				
R931950	1,243				
R931951	0,017				
R931952	0,166				
R935381		9999	7,74		
R935382		9999	0,2		
R935383	0,146	9999			
R935384		9999	9999		
R935385		9999	0,217		
R935386	0,291				
R935389	0,877				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R935390	0,544				
R935391	0,212	9999	0,25	0,19	0,55
R935392	0,204	9999			
R935393	8888	9999	2,44	1,47	0,52
R935394	9999				
R935395	0,276				
R935396	2,58				
R935398	8888				
R935399	0,909				
R935400	0,502				
R935401	0,51				
R935402	0,216				
R935403	0,821				
R935404	0,581				
R935405	0,389				
R935406	1,17				
R935407	0,393				
R935408	0,137	9,94			
R935409	1,17				
R935410	0,417				
R935411	9999				
R935413	0,085	9999			
R935412	0,696				
R935414	0,204				
R935415	0,237				
R935416	0,166				
R935417	0,417				
R935418	0,228	9999			
R935419	0,23				
R935420	0,561				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R935421	2,89				
R935422	0,326				
R935423	0,167				
R935424	0,628				
R935425	8888				
R935426	9999				
R935427	8888				
R935428	1,272				
R935429	0,036	9999			
R935430	0,028	9,3			
R935431	0,124				
R935432	0,036	8,5			
R935433	0,106	16,2			
R935434	0,308				
R935435	0,337				
R935436	0,058				
R935437	0,082				
R935438	0,414	23			
R935439					
R935440	0,176	88			
R935441	0,586				
R935442	0,701				
R935443	8888				
R935444	0,429	9999			
R935445	0,184	11			
R935446	0,395	9999			
R935447	0,511	4,7			
R935448	0,111	4,3			
R935449	0,372	7,8			
R935450	0,494	9999			

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R935451	9999	9999			
R935452	0,213	9999			
R935453	0,15	9999			
R935458	8888	9999			
R935459	0,343	4,7			
R935460	0,748	15,6			
R935461	0,134	5,03			
R935462	0,364	9999			
R935463	0,176	9999			
R935464	22,4	9999			
R935465	0,019	4,22			
R935466	0,284				
R935467	0,352				
R935468	0,705	5,37			
R935469	0,039	3,79			
R935469	0,056				
R935470	0,804	4,90			
R935471	0,481				
R935472	1,056				
R935473	0,057				
R935474	0,474				
R935475	0,516				
R935476	0,639				
R935477	0,097				
R935478	1,700				
R935479	1,355				
R935480	4,576				
R935481	0,114				
R935482	0,743				
R935483	0,601				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R935484	1,252				
R935485	0,231				
R935486	1,845				
R935487	3,224				
R935488	4,443				
R935489	0,185				
R935490	1,474				
R935491	6,873				
R935492	26,130				
R935493	0,385				
R935494	3,063				
R935495	1,112				
R935496	1,952				
R935497	0,097				
R935498	1,016				
R935499	1,207				
R935500	1,588				
R935501	0,305				
R935502	1,466				
R935503	0,400				
R935504	2,777				
R935505	0,038				
R935506	0,375				
R935507	0,473				
R935508	0,967				
R935509	0,086				
R935510	0,897				
R935511	1,165				
R935512	2,098				
R935513	0,106				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R935514	1,662				
R935515	2,661				
R935516	2,800				
R935517	0,548				
R935518	2,963				
R935519	0,074				
R935520	0,001				
R935521	0,186				
R935522	1,236				
R935523	0,001				
R935524	0,249				
R935525	1,564				
R935526	9,126				
R935527	0,557				
R935528	3,332				
R935529	0,245				
R935529		9999			
R935531		9999			
R935531	0,871				
R935532		9999			
R935532	0,110				
R935533		9999			
R935533	0,219				
R935534	0,398	5,218			
R940355	99	9999			
R940356	7,21	9999			
R940358	0,03	4,3			
R940361	0,047	2,2	0,06	0,07	0,1
R940363	0,048	9999			
R940364	0,046	9999			

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R940365	8888	9999			
R940366	0,037	40	0,03	0,005	0,01
R940367	0,117	14,1			
R940368	0,025	1,58			
R940369	0,023	9999			
R940370 S	0,059	-			
R940371	0,316				
R940372	0,094				
R940373	8888				
R940380	0,042				
R940381	8888				
R940382	0,104				
R940383	0,064				
R940384	1,32				
R940385	0,033				
R940386	3,42				
R940387	1,19				
R940388	0,049				
R940389	0,06				
R940390	9999	9999			
R940391	0,261				
R940392	0,145				
R940393	5,26				
R940394	16,5353				
R940395	9999				
R940396	22,7164				
R940397	3,7				
R940399	0,051				
R940400	0,103				
R940401	0,125				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R940402	8888				
R945356	1,17	9999			
R945357	9999	9999			
R945358	9999	9999			
R945360	1,37	9999			
R945361	2,36	9999			
R945362	1,57	9999			
R945363	0,687	9999			
R945364	1,002	9999			
R945365	0,257	9999			
R945366	0,112	9999			
R945367		9999	1,29		
R945368		9999	1,71		
R945369		9999	1,27		
R945370	0,522	9999			
R945371	0,713	9999			
R945372		9999	0,923		
R945373	9999				
R945374	9999				
R945375	9999				
R945376	9999				
R945377	1,12				
R945378	0,754				
R945379	9999				
R945380	9999				
R945381	9999				
R945382	9999				
R945383	0,985				
R945384	0,913				
R945385	1,1				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R945386	1,39				
R945387	1,12				
R945389	0,0748	9999			
R945390	0,118	9999			
R945391	0,094	9999			
R945392	0,085	9999			
R945393	1,34	21,7			
R945394	1,24	5,61			
R945395	1,14	9999			
R945396	2,24				
R945397	0,928				
R945398	7				
R945399	0,163	9999			
R945400	9999				
R945401	8888	9999			
R945402	0,112				
R945403	1,7				
R945404	0,103				
R945405	0,131				
R945406	8888				
R945407	8888				
R945408	9999				
R945409	9999				
R945410	9999				
R945411	2,86				
R945412	0,095				
R945413	1,698				
R945414	0,038				
R945415	0,046				
R945416	0,053				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R945417	2,52082	9999			
R945418	8888	9999			
R945419	0,125				
R945420	0,436				
R945421	0,371				
R945422	0,092				
R945423	0,145				
R945424	0,188				
R945426	0,256				
R945427	0,279				
R945432	0,049				
R945433	0,276				
R945434	8888				
R945439	8888				
R945440	8888				
R945443	0,081	9999			
R945444	0,043	9999			
R945454	20,6	9999			
R945455	8888	9999			
R945456	8888				
R945457	0,188				
R945458	8888				
R945459	0,038				
R945460	1,184				
R945461	0,803				
R945462	1,722				
R945463	0,722				
R945464	0,943				
R945465	1,960				
R945466	1,885				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R945467	1,169				
R945470	0,862				
R945471	0,035				
R945472	0,094				
R945473	0,104				
R945474	0,104				
R945475	0,046				
R945476	0,293				
R945477	0,363				
R945478	0,153				
R945479	0,272				
R945480	0,199				
R945485	0,850				
R945486	0,588				
R945491	0,465				
R945492	0,079				
R945493	0,069				
R945498	0,001	9999			
R950405	1,36	9999			
R950406		9999	9999		
R950407		9999	9999		
R950408		9999	4,82		
R950409		9999	3,24		
R950410		9999	9999		
R950411		9999	4		
R950412	0,301				
R950413	9999	9999			
R950414	9999	9999			
R950415	5,19	16,3			
R950416	2,27				

Таблиця 1В					
Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R950417	2,16	9999			
R950418	1,67	9,09			
R950419	3,26	9999			
R950420	0,114	9999			
R950421	0,157	9999			
R950422	0,475	6,53			
R950423	0,05	9999			
R950424	0,236	4,28			
R950425	1,15				
R950426	0,142	30			
R950427	1,9				
R950428	0,123	21			
R950429	3,969				
R950430	0,239				
R950432	2,42				
R950433	9999				
R950434	1,16				
R950436	5,53				
R950437	0,811				
R950438	0,888				
R950439	9999				
R950440	10,47				
R950441	9999				
R950442	9999	9999			
R950443	9999	9999			
R950444	1,73				
R950445	0,379				
R950446	0,148				
R950447	1,41999	9999			
R950448	1,08228	36			

Сполука	СНМС анти-IgE Триптаза	СНМС Іонміцин Триптаза	ВММС анти-IgE Гексоз	ВММС анти-IgE TNF-альфа	ВММС анти-IgE IL-6
R950502	2,496				
R950503	2,085				
R950504	1,275				
R950505	9999,000				
R950506	9999,000				
R950507	0,106				
R950508	44,555	9999			
R950509	0,112				
R950510	0,093				
R950511	9999,000				
R950512	6,611				
R950513	7,049				
R950514	0,244				
R950515	0,031				
R950516	0,025				
R950518	1,405				
R950519	6,488				
R950520	0,397	4,513			
R950521	0,145	5,814			
R950522	0,123	9999			
R950523	0,084	7,728			
R950524	0,224	5,963			
R950525	0,292	14,819			

[illegible]

	Biomass indicators						Transpiration Ratio	Transpiration Ratio	Transpiration Ratio	Transpiration Ratio
	CHM ₁ mean indicator parameter	CHM ₂ mean indicator parameter	CHM ₃ mean indicator parameter	CHM ₄ mean indicator parameter	CHM ₅ mean indicator parameter	CHM ₆ mean indicator parameter				
R500313	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500312	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500311	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500310	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500309	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500308	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500307	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500306	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500305	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500304	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500303	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500302	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500301	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500300	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500299	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500298	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500297	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500296	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500295	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500294	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500293	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500292	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500291	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500290	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500289	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500288	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500287	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500286	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500285	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500284	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500283	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500282	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500281	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500280	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500279	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500278	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500277	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500276	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500275	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500274	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500273	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R500272	0.13	0.08	0.08	0.08	0.08	0.13	0.13			
R										

7.7 Сполуки 2,4-піримідиндіаміну, представлені у винаході, вибірково інгібують зворотний каскад реакцій за участю IgE-рецепторів

Для підтвердження того, що ряд сполук 2,4-піримідиндіаміну, представлених у винаході, проявляють свою інгібуючу здатність за рахунок блокування або інгібуння каскаду переносу початкових сигналів IgE-рецепторів, провели дослідження деяких сполук за допомогою клітинного аналізу на дегрануляцію, індуковану іономіцином, як описано нижче.

7.7.1 Активація CHMC низької щільності іономіцином: аналіз триптази

Аналіз дегрануляції тучних клітин, індукованої іономіцином, проводили аналогічно аналізу IgE активації CHMC низької щільності (Розділ 7.5.2, див. вище), за виключенням того, що під час інкубації протягом 1 години, готували розчин 6X іономіцину [5ммоль іономіцину (Sigma I-0634) у MeOH (базовий) розбавляють у відношенні 1:416,7 у MT-буфері (остаточна концентрація 2ммоль)] і стимулювали клітини шляхом додавання 25мкл розчину 6X іономіцину до відповідних планшетів.

7.7.2 Активація базофілів іономіцином: аналіз виділення гістаміну

Аналізи на викликану іономіцином дегрануляцію базофілів провели аналогічно методу, описаному для аналізу активації базофілів імуноглобуліном IgE або алергеном хатнього кліщу (Розділ 7.5.5, див. вище), за виключенням того, що після інкубації зі сполукою, клітини було стимульовано за допомогою 20мкл розчину іономіцину з концентрацією 2ммоль.

7.7.3 Результати

Результати аналізів на дегрануляцію, індуковану іономіцином, наведені у вигляді показників IC₅₀ (у ммоль) у Таблиці 1, вище. Переважна більшість проаналізованих активних сполук (тобто таких, що інгібують дегрануляцію, індуковану імуноглобуліном E), не інгібують дегрануляцію, індуковану іономіцином, що підтверджує вибіркоче інгібуння цими активними сполуками каскаду передачі початкових (або зворотних) сигналів IgE-рецепторів.

Ці результати було підтверджено для деяких сполук шляхом виміру потоків іонів кальцію у CHMC, викликаних анти-імуноглобуліном E та іономіцином. Тестування потоків Ca²⁺ виявило, що сполуки R921218 (10ммоль) та R902420 (10ммоль) інгібують потік Ca²⁺, викликаний анти-імуноглобуліном E, але не мають ніякого впливу на потік Ca²⁺, індукований іономіцином (див. Фіг.4).

7.8 Інгібуючий ефект сполук 2,4-піримідиндіаміну, наведених у даному винаході, проявляється негайно

Для перевірки негайної інгібуючої дії, деякі 2,4-піримідиндіаміни даного винаходу додавали одночасно з активатором анти-IgE антитіл при проведенні вищенаведених аналізів активності клітин. Усі проаналізовані сполуки блокували індуковану IgE дегрануляцію CHMC у тій же мірі, яка спостерігалась під час попередньої інкубації сполук з CHMC протягом 10 або 30 хвилин до перехресного зшивання рецепторів.

7.9 Кінетика фармакологічної активності in vitro

Сполуки R921218, R921302, R921219, R926240, R940277, R926742, R926495, R909243 та R926782 було проаналізовано в експериментах з вимиванням. Під час експериментів, клітини CHMC негайно активували антитілом до анти-IgE у присутності 1,25ммоль сполуки (нульовий момент часу), або вимивали сполуку з наступною активацією антитілом до анти-IgE через 30, 60 чи 120 хвилин. Інгібуюча активність цих сполук різко падала через 30 хвилин після їх вилучення, що вказує на необхідність постійного впливу цих сполук на тучні клітини з метою максимального інгібуння дегрануляції. Аналогічні результати було отримано під час іспиту інших сполук.

7.10 Токсичність: Т- та В-клітини

Здатність сполук, наведених у цьому винаході, проявляти інгібуючу активність при відсутності токсичності по відношенню до клітин імунної системи продемонстровано в процесі клітинного аналізу в присутності В- та Т-клітин. Протоколи проведення аналізів наведено нижче.

7.10.1 Токсичність по відношенню до клітин "Jurkat" (Т-клітин)

Клітини Jurkat розбавляли до концентрації 2x10⁵клітин/мл у повному середовищі RPMI (10% сироватки ембріонів телят, інактивованої термічною обробкою) та інкубували при 37°C в присутності 5% CO₂ протягом 18 годин. Після цього 65мкл клітин зі щільністю 7,7x10⁵клітин/мл додавали до 96-лункового планшета з глибокодними лунками (оброблений ТС (тканевую культуру), постачальник "Costar"), що містив 65мкл 2X сполуки (остаточна концентрація наповнювача: 0,5% DMSO, 1,5% MeOH), перемішували та інкубували протягом 18-24 годин при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Токсичність оцінювали за допомогою проточного цитометричного аналізу розсіювання світла клітинами.

7.10.2 Токсичність по відношенню до клітин "BJAB" (В-клітин)

Лінію В-клітин "BJAB" культивували у лог-фазі у середовищі RPMI1640+10% ембріональної телячої сироватки, інактивованої термічною обробкою, їх L-глутаміну, їх пеніциліну, їх стрептавідіну та їх бета-меркаптоетанолу при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Спочатку клітини BJAB збирали, відділяли на центрифугі та повторно суспендували у живильному середовищі з концентрацією 7,7x10⁵клітин/мл. Далі, приготували дві проби шляхом перемішування 65мкл клітин з 65мкл сполуки у присутності 0,1% розчину DMSO у 96-лунковому планшеті з глибокодними лунками. Клітини інкубували зі сполукою при різних концентраціях сполуки при температурі 37°C в атмосфері 5% CO₂. Токсичність оцінювали за допомогою проточного цитометричного аналізу розсіювання світла клітинами.

7.10.3 Токсичність: аналіз титру клітини Glo

50мкл клітин (1x10⁶/мл) додавали у кожну лунку, що містить 50мкл сполуки. Остаточна концентрація наповнювача 0,5% DMSO, 1,5% MeOH. Планшети струшували протягом 1 хвилини з метою перемішування клітин та сполуки. Потім планшети інкубували при 37°C (5% CO₂) протягом 18 годин. Наступного дня відбирали 50мкл клітин з

кожної лунки та вливали у 50мкл реагенту титру клітини Glo (постачальник "Invitrogen"). Планшети струшували протягом однієї хвилини та зчитували показники за допомогою люмінометру.

7.10.4 Результати

Результати аналізів на токсичність по відношенню до Т- та В-клітин, представлені у вигляді показників IC_{50} (у мкмоль), наведено у Таблиці 2, див. вище. За деякими виключеннями (див. Таблицю 1), усі проаналізовані сполуки не проявили токсичність по відношенню до Т- та В-клітин при ефективній для інгібування концентрації. Аналізи, проведені на ембріональних В-клітинах, дали аналогічні результати.

7.11 Переносимість сполук 2,4-піримідину тваринами

Здатність сполук, наведених у цьому винаході, проявляти інгібуючу активність у дозах нижче токсичних для тварин, показано на прикладі сполук R921218, R921219 та R921302.

7.11.1 Сполука R921218

Сполуку R921218 досліджували у рамках широкомасштабної програми неклінічних досліджень по безпеці, які показали, що ця сполука добре переноситься гризунами, а також іншими тваринами. В результаті токсикологічних/неклінічних досліджень по безпеці сполуки R921218 було встановлено, що ця речовина не викликає такої токсичної реакції, що потребує обмеження дози, ні при інтраназальному застосуванні на тваринах, що не є гризунами (кроликах та приматах), ні при пероральному застосуванні на гризунах (мишах та щурах) протягом 14-денного токсикологічного експерименту з багаторазовим введенням доз, які в декілька разів перевищували передбачувані ефективні дози, достатні для людини. Негативного впливу на основні показники функцій серцево-судинної, респіраторної і (або) центральної нервової системи, досліджуваних з метою визначення фармакологічної безпеки, не виявлено. При генетичних токсикологічних аналізах не знайдено ознак ні мутагенного, ні кластогенного потенціалу; не виявлено і несприятливих наслідків після впливу на очі і шкіру. Далі наводиться короткий опис основних токсикологічних досліджень.

14-денне токсикологічне дослідження з багаторазовим інтраназальним введенням доз проводилося на мавпах *cynomolgus* з дозуваннями 2,1, 4,5 або 6,3мг/кг/день. Параметри дослідження включали: клінічні спостереження, масу тіла, споживану їжу, офтальмологічні показники, кров'яний тиск, електрокардіографію, гематологічні показники, клінічні біохімічні показники, аналіз сечі, імуно-токсикологічну оцінку, загальну аутопсію, масу органів, токсикокінетичну оцінку і гістопатологію (у т.ч. носової порожнини). По жодному з параметрів дослідження не виявлено негативних ефектів, пов'язаних із застосуванням R921218, і доза, при якій не спостерігаються негативні прояви, була встановлена на рівні 6,3мг/кг/день.

14-денне токсикологічне дослідження з багаторазовим інтраназальним введенням доз проводилося на кроликах породи "Біла

Новозеландська" з дозуваннями 1,7, 3,4 або 5,0мг/кг/день. Параметри дослідження включали: клінічні спостереження, масу тіла, споживану їжу, офтальмологічні показники, гематологічні показники, клінічні біохімічні показники, загальну аутопсію, масу органів, токсикокінетичні оцінки і гістопатологію (у т.ч. носової порожнини). По жодному з параметрів дослідження не було виявлено негативних ефектів, пов'язаних із застосуванням R921218 і дозу, при якій не спостерігаються негативні прояви, було встановлено на рівні 5,0мг/кг/день.

7.11.2 Сполука R921219

В експериментальних дослідженнях з визначення дозування, однократна пероральна доза 600мг/кг була встановлена як доза, при якій не спостерігаються негативні прояви, тоді як багаторазові (протягом 7 днів) дози в розмірі 200мг/кг/день і вище не переносились.

Аналіз *in vitro* *Salmonella-Escherichia coli*/зворотної мутації мікросом ссавців (тест Еймса) показав позитивний результат сполуки R921219 у лінії-аналізаторі TA1537, як з метаболічною активацією, так і без неї, що підтверджує результати проведеного раніше дослідження. Негативного впливу сполуки R921219 на жодну з інших чотирьох ліній-аналізаторів не виявлено. Встановлено, що в R921219 відсутній кластогенний потенціал при дослідженні *in vitro* аналізом хромосомної аберації.

7.11.3 Сполука R921302

Було проведено декілька експериментальних неаробованих лабораторним методом токсикологічних досліджень на гризунах. Виявлена толерантність мишей до пероральної дози 1000мг/кг протягом до 7 днів. Проведено 14-денне токсикологічне дослідження на мишах із застосуванням пероральних доз 100, 300 і 1000мг/кг. Доза 1000мг/кг не витримувалась, а доза 300мг/кг призвела до появи гістопатологічних змін вульви. Дозу, при якій не спостерігаються негативні прояви у дослідженні, було встановлено на рівні 100мг/кг. Проведено 28-денне токсикологічне дослідження на мишах із застосуванням пероральних доз 100мг/кг раз у день, 100мг/кг два рази в день, 300мг/кг раз у день і 300мг/кг два рази в день. Нестерпність до сполуки R921302 з'явилася при дозуваннях 300мг/кг раз у день і два рази в день. Нижчі дози (100мг/кг раз у день, або два рази в день) переносилися добре (результати клінічних і гістопатологічних аналізів ще не відомі). Дослідження на щурах із застосуванням пероральних доз 50, 150 і 300мг/кг протягом 32 днів показало гарну переносимість (результати клінічних і гістопатологічних аналізів ще не відомі).

Аналіз *in vitro* *Salmonella-Escherichia coli*/зворотної мутації мікросом ссавців (тест Еймса) показав позитивний результат R921302 у лінії-аналізаторі TA98 з S9 і TA1537, як з метаболічною активацією, так і без неї. Негативного впливу сполуки R921302 на жодну з інших трьох ліній-аналізаторів не виявлено. При дослідженні *in vitro* за допомогою аналізу

хромосомної аберації було встановлено, що в сполуці R921302 відсутній кластогенний потенціал.

7.12 Біодоступність сполук 2,4-піримідиндіаміну при пероральному застосуванні

Більш 50 сполук 2,4-піримідиндіаміну, наведених у цьому винаході, було проаналізовано на предмет пероральної біодоступності. У ході дослідження сполуки розчиняли в різних наповнювачах (наприклад, розчин ПЕГ 400 і суспензія карбоксиметилцелюлози) для внутрішньовенного і перорального введення щурам. Після введення препарату, відбирали і досліджували зразки плазми. Концентрацію сполук у плазмі визначали методами високоефективної рідинної хроматографії/тандемної мас-спектрометрії (PX/MC/MC). Фармако-кінетичні аналізи проводили на основі даних про концентрації в плазмі. Фармакокінетичні параметри, що представляють інтерес, включали: кліренс (CL), обсяг розподілу при гомеостазі (Vss), термінальний період напіввиведення ($t_{1/2}$), і пероральну біодоступність (%F).

Фармакокінетичні дослідження вказують на те, що багато сполук 2,4-піримідиндіаміну є перорально доступними, при цьому %F досягає приблизно 50% (у діапазоні від 0 до 50%). Період напіввиведення змінювався від 30 хвилин до 3 годин. Зокрема, сполуки R940350, R935372, R935193, R927050 та R935391 дали позитивні результати щодо пероральної біодоступності та періоду напіввиведення при дослідженнях на щурах. Таким чином, дослідження підтверджують що ці сполуки 2,4-піримідиндіаміну являються придатними для перорального застосування.

7.13 Ефективність сполук при лікуванні алергії

Ефективність сполук R926109, R921218, R921219, R921302, R926495, R926508, R926742, R926745 та R945150 in vivo при лікуванні алергії оцінювали за допомогою моделі пасивної шкірної анафілаксії (ПША) на мишах. Ця модель дозволяє безпосередньо виміряти дегрануляцію тучних клітин тканин, викликану IgE. У цій моделі тварини, сенсibilізовані до IgE, піддаються дії алергену, і зміна проникності шкірної судинної мережі в результаті виділення гістаміну тучними клітинами вимірюється по зміні кількості проникнення барвника в оточуючі тканини. Інгібування вивільнення медіатора сполуками, що модулюють дегрануляцію тучних клітин, легко вимірюється вилученням барвника з тканини

7.13.1 Протокол та результати дослідження

При аналізі пасивної шкірної анафілаксії, мишей пасивно сенсibilізували внутрішкірною ін'єкцією IgE-антитілу анти-дінітрофенолу (DNP) (день мінус 1). У заздалегідь визначений момент часу тварини одержали досліджуваний препарат (день 0). Модулююча дія препарату на дегрануляцію шкірних тучних клітин вимірювалась після внутрішньовенного введення DNP, спряженого з людським сироватковим альбуміном (HSA-DNP), разом із синім барвником Еванса. Виникаюче в результаті перехресне зв'язування рецептора IgE і наступне підвищення судинної проникності, викликане дегрануляцією тучних клітин, визначалось виміром обсягу трансудації барвника в прилеглі тканини. Барвник вилучали із

тканини формамидом і зчитували коефіцієнт поглинання екстракту при 620нм. Інгібуючий ефект лікування препаратом виражали як процент інгібування в порівнянні з ефектом лікування наповнювачем, тобто як процент зниження A_{620} .

В якості позитивних контрольних було застосовано дві сполуки: антагоніст гістаміну - діфенгідрамін і антагоніст серотоніну - ципрогептадін. Обидва медіатори (гістамін і серотонін) вивільняються з тучних клітин миші після IgE-опосередкованої дегрануляції. Обидва контрольні препарати інгібують реакцію пасивної шкірної анафілаксії; тому у наступних експериментах звичайно використовували ципрогептадін. Ципрогептадін інгібує реакцію пасивної шкірної анафілаксії із збіжними результатами на 61% \pm 4% (8мг/кг внутрічеревино, час премедикації - 30 хвилин, число експериментів n=23).

7.13.1.1 Результати

Інгібування Fc ϵ R-опосередкованої судинної проникності в залежності від дози спостерігалось при збільшенні дози сполук R921218, R926109, R921219 і RR921302. Ці сполуки застосовували або у вигляді розчину (67% PEG/33% цитратного буферу), або як водну суспензію (1,5% Avicel). Результати показують виражену залежність між рівнем вмісту препарату в плазмі, ефективністю in vivo, і активністю in vitro. Найбільш сильнодіюча сполука, R921219, проявляла активність при рівні впливу на кровоносну систему близько 10мг/мл (68% інгібування при застосуванні дози 100мг/кг) у порівнянні з R921302, відносно менш активної молекули, що знижує трансудацію плазми на 42% при застосуванні дози в 100мг/кг. Більш того, тривалість впливу сполуки позначилась на тривалості інгібуючої активності. Так, сполука R921302, що має найбільшу метаболічну стабільність згідно з результатами фармакокінетичних досліджень, інгібує судинну проникність протягом 1-2 годин перед виникненням сигналів рецептора, викликаних антигеном, після чого її ефективність почала зменшуватись. Усі ці дані приведені в Таблицях 3 і 4.

ТАБЛИЦЯ 3 Ефективність R921218, R926109, R921219 і R921302 в аналізі пасивної шкірної анафілаксії					
Препарат	Спосіб введення	Наповнювач	Час премедикації (хв)	Доза (мг/кг)	Вміст у плазмі (мкг/мл)
R921218	Перор.	67%ПЕГ/33% цитратний буфер	10	50	7
				100	11
				200	50
R926109	Перор.	67%ПЕГ/33% цитратний буфер	15	50	22
				100	32
				200	48
R921219	Перор.	1,5% Авісел/вода	15	30	25
				100	68
				300	92
R921302	Перор.	1,5% Авісел/вода	60	50	35
				100	42
				150	56
				200	93

ТАБЛИЦЯ 4 Тривалість дії R921219 та R921302 в аналізі пасивної шкірної анафілаксії					
Сполука	Спосіб введення	Наповнювач	Доза (мг/кг)	Час премедикації (хв)	Вміст у плазмі (мкг/мл)
RR921302	Перор.	1,5% Авісел/вода	200	30	89
				60	83
				120	82
				240	37

Схожа активність in vivo спостерігалась у препаратів R926495, R926508, R926742, R926745 і R926150, які мали здатність інгібувати реакцію

пасивної шкірної анафілаксії при пероральному застосуванні у формулі на основі PEG (дані не приводяться).

7.14 Ефективність сполук при лікуванні астми

Ефективність сполук R921218, R921302, R926495, R926508, R926742 та R921219 при лікуванні астми було продемонстровано за допомогою моделі алергічної астми овець. Протягом декілька хвилин після впливу вдихуваного антигену (*Ascaris suum*), в овець розвивається бронхостеноз, при цьому максимальна обструкція дихальних шляхів спостерігається під час початкової алергічної реакції (EAR). Швидше за все, цю початкову фазу обструкції дихальних шляхів викликає вивільнення преформованих медіаторів тучних клітин. Крім початкової алергічної реакції (EAR), модель овець дозволила оцінити ефект від впливу вказаних сполук на пізню астматичну реакцію (LAR) і неспецифічну гіперчутливість дихальних шляхів (AHR), що розвивається в результаті локального або місцевого впливу алергену на дихальні шляхи. В овець неспецифічна гіперчутливість дихальних шляхів (AHR) розвивається протягом декількох часів після впливу антигену, і може тривати до двох тижнів. Викладені нижче результати демонструють потенціал проаналізованих сполук щодо інгібування каскаду подій, які можуть розвиватися в результаті звільнення цитокінів з тучних клітин.

7.14.1 Протокол дослідження

У моделі алергічної астми овець, тварин піддають впливу випробовуваної сполуки в аерозольній формі через ендотрахеальну трубку з наступним впливом аерозольного антигену, отриманого з круглого хробака, *Ascaris suum*, на який вівці мають природну алергію. Стимуляція алергеном приводить до прямого бронхостенозу (як початкової алергічної реакції (EAR), так і пізньої астматичної реакції (LAR)) і стійкої неспецифічної гіперчутливості дихальних шляхів. Ці три характеристики схожі із симптомами, що виявляються в людей, які страждають алергічною астмою. Активність випробовуваної сполуки визначають по зміні опору легені (R_L), який розраховують по вимірюваному черезлегеневому тиску, потоку повітря і дихальному об'єму. Контрольні дані за попередні періоди, отримані від тих же овець після лікування фізіологічним розчином у порівнянні з впливом алергену, показують різке підвищення R_L під час початкової алергічної реакції, що триває близько 2-3 годин після дії алергеном. Пізня астматична реакція дає менш виражене підвищення R_L , яке виникає через приблизно 5-6 годин після впливу алергену і зникає протягом 8 годин після впливу. Двадцять чотири години після впливу вимірюють реакцію на дозу карбахола для визначення неспецифічної гіперчутливості дихальних шляхів, яку виражають як дозу карбахола, необхідну для підвищення R_L на 400% у порівнянні з базовою величиною. (Цей вимір називають провокаційною концентрацією карбахола, необхідною для підвищення R_L на 400% у порівнянні з базовою величиною (PC400). Дані порівнюють з контрольними даними за попередні періоди стосовно того ж випробовуваного

при введенні контрольного аерозоля і впливу *Ascaris suum*.

7.14.2 Результати

Усі проаналізовані сполуки показали ефект інгібування пізньої астматичної реакції (LAR) і стійкої неспецифічної гіперчутливості (AHR), а деякі з цих сполук інгібували і початкову алергічну реакцію (EAR). Оптимальні результати по кожній з сполук, отримані в результаті ряду досліджень для оцінки активності у випадку різної тривалості премедикації і різних складів розчинів і суспензій, приведені в Таблиці 5. Ефективність впливу R921218 на початкову алергічну реакцію залежить від складу сполуки, при цьому найбільший ефект спостерігали при дозуванні 30мг/вівцю, вводючи 10%-ний розчин в етанолі методом аерозоля. Сполуки R926495, R926742, R926508 і R921219, які застосовували на чотирьох різних вівцях з дозуванням 45мг/вівцю у водній суспензії за 60 хвилин до впливу алергену, показали блокування пізньої астматичної реакції і неспецифічної гіперчутливості дихальних шляхів. На додаток до цих пізніх проявів, початкова алергічна реакція теж була значно знижена лікуванням сполуками R921219, R926508 або R926495. Ефективність сполуки RR921302 досліджували з застосуванням наповнювача 45% PEG 400/55% цитратного буферу. За таких умов, сполука R921302, введена у дозі 30 мг/вівцю за 60 хвилин до впливу, блокувала астматичну реакцію і неспецифічну гіперчутливість дихальних шляхів, але початкова алергічна реакція залишалась без змін. Отримані дані чітко продемонстрували, що згадані сполуки мають здатність блокувати астматичну реакцію в овець, що мають алергію. Спостерігалось значне інгібування всіма сполуками неспецифічної гіперчутливості дихальних шляхів і пізньої астматичної реакції в порівнянні з контрольними даними за попередні періоди. Початкову алергічну реакцію значною мірою інгібували R921219, R926508 і R926495 (54%, 21% і 33% відповідно). На відміну від них, R921218, R921302 і R926742 не інгібували початкову алергічну реакцію при використанні сполук у вигляді водної суспензії.

ТАБЛИЦЯ 5
Ефективність типових сполук у моделі алергічної астми овець

Препарат	Доза (мг/вівцю)	Час премедикації (хв)	Наповнювач	EAR (% інгібування) (0% етанол)	LAR (% інгібування)	AHR (% інгібування)
R921218	30	15		66	78	101
R926742	45	60		-19	87	94
R926495	45	60		33	85	41
R926508	45	60	Водна суспензія	21	96	88
R921219	45	60		56	75	90
RR921302	30	60	45%PEG400/55% цитратний буфер	-28	86	82

7.15 Ефективність сполук при лікуванні астми

Ефективність препаратів R921304 і R921219 при лікуванні астми було продемонстровано також на моделі алергічної астми мишей.

7.15.1 Протокол дослідження

Мишей сенсibilізують до овальбуміну (курячого білка) у присутності ад'юванта (квасців) внутрічеревним способом у день 0 і день 7. Через тиждень мишам інтраназально вводять овальбумін - у дні 14, 15 і 16 (модель з більшою точністю) або в день 14 (модель з меншою точністю). Така сенсibilізація і режим впливу приводять до гіперчутливості дихальних шляхів і запального процесу в легенях, що представляють дві домінуючі характеристики алергічної астми у

людини. У мишачій моделі реакцію дихальних шляхів *in vivo* вимірюють загальним плетизмографом, який визначає PENH (enhanced Pause, Buxco Electronics). PENH являє безрозмірний показник, що складається з максимальної швидкості вдиху, максимальної швидкості видиху, тривалості вдиху, тривалості видиху, тривалості релаксації, і вважається підтвердженим параметром чутливості дихальних шляхів. Реакцію на вплив алергену (OVA) порівнюють із тваринами, на яких впливали лише фізіологічним розчином. Через двадцять чотири години після впливу, мишам вводять підвищені дози метахоліну (агоніст мускаринових рецепторів), що викликає скорочення гладкої м'язової тканини. У мишей, підданих впливові овальбуміна, спостерігається значна гіперчутливість дихальних шляхів до метахоліну в порівнянні з мишами, що одержували фізіологічний розчин. Крім того, у дихальних шляхах мишей, підданих впливові овальбуміна, було виявлено клітинний інфільтрат на відміну від мишей, яким вводили фізіологічний розчин. Інфільтрат складається в основному з еозинофілів та незначної кількості нейтрофілів і мононуклеарних клітин.

Використання цієї моделі для оцінки дрібних молекулярних інгібіторів дегрануляції тучних клітин було обґрунтовано декількома способами. По-перше, на мишах з дефіцитом тучних клітин (W/W^v) було показано, що викликані овальбуміном реакції залежать від присутності тучних клітин. У мишей з дефіцитом тучних клітин сенсibiliзація і вплив овальбуміном не призвели до гіперчутливості дихальних шляхів і виділенню еозинофілів. По-друге, було виявлено, що стабілізатор тучних клітин, кромолін, може блокувати викликані овальбуміном гіперчутливість і запалення дихальних шляхів (дані не приводяться). Застосування цієї моделі для оцінки сполук для лікування астматичних реакцій, які можуть бути опосередковані іншими механізмами окрім стабілізації тучних клітин, обґрунтовується також інгібуючим ефектом застосування стероїдів дексаметазона і будесоніду при бронхостенозі, викликаному метахоліном.

7.15.2 Результати

Ефективність сполуки R921304 оцінювали при інтраназальному застосуванні протягом 10 днів підряд, з 7 по 16 день, при дозуванні 20мг/кг; при цьому останні три дози вводилися за 30 хвилин перед введенням фізрозчину, або овальбуміну. R921304 успішно інгібував викликану овальбуміном гіперчутливість дихальних шляхів до метахоліну у порівнянні з мишами, що одержували тільки наповнювач.

У рамках протоколу з меншою точністю, при якому овальбумін вводили мишам однократно, у день 14, було продемонстровано, що введення сполуки R921219 підшкірно в дозуванні 70мг/кг у суміші 67%PEG400/33% цитратного буферу за 30 хвилин до введення овальбуміну або фізрозчину цілком блокує гіперчутливість дихальних шляхів і клітинну інфільтрацію, викликані овальбуміном.

Ці результати чітко демонструють ефективність сполук R921219 і R921304 при інгібуванні реакції

дихальних шляхів у мишачій моделі алергійної астми.

7.16 Сполуки 2,4-піримідиндіаміна інгібують фосфорилування білків у прямому напрямку від Сук-кінази в активованих тучних клітинах

Інгібуючий вплив сполук 2,4-піримідиндіаміну на фосфорилування білків у прямому напрямку від Сук-кінази досліджували за допомогою сполук R921218, R218219 і R921304 у ВММС, активованих Ig-рецепторами.

Для проведення аналізу клітини ВММС інкубували в присутності різних концентрацій досліджуваного препарату (0,08мкмоль, 0,4мкмоль, 2мкмоль і 10мкмоль) протягом 1 години при температурі 37°C. Потім клітини стимулювали анти-IgE антитілом за допомогою викладеного вище методу. Через 10 хвилин клітини лизували і відокремлювали клітинні білки за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS PAGE). Після електрофорезу, фосфорилування білків визначали імуноблотом як показано на Фіг. 7, 10 та 11A-D. Постачальником антитіл була компанія "Cell Signaling Technology", місто Беверлі, шт. Масачусетс.

Як показано на Фіг. 7, 10 і 11A-D, досліджувані сполуки інгібували фосфорилування білків у прямому, але не в зворотному напрямку від Сук-кінази, у сигнальному каскаді IgE-рецепторів, що підтверджує здатність сполук інгібувати зворотну дегрануляцію, викликану IgE, так і прояв їх інгібуючої активності шляхом інгібування Сук-кінази.

7.17 Біохімічні аналізи показують, що сполуки 2,4-піримідиндіаміну інгібують Сук-кіназу

Декілька сполук 2,4-піримідиндіаміну було проаналізовано для виявлення їхньої здатності інгібувати фосфорилування субстрату пептиду, що каталізується Сук-кіназою, методом біохімічного аналізу флюоресцентної поляризації з ізолюваною Сук-кіназою. У даному експерименті, сполуку розбавляли до 1% DMSO в буфері кінази (20ммоль N-2-гідроксietилпіперазин-N-2-етансульфонової кислоти, pH 7,4, 5ммоль MgCl₂, 2ммоль MnCl₂, 1ммоль дітіотреїтолу, 0,1мг/мл ацетильованого бичачого гамма-глобуліну). Сполуку перемішували у 1% DMSO (0,2% DMSO-кінцевий) з аденозінтрифосфат/субстратним розчином при кімнатній температурі. Сук-кіназу (Upstate, Lake Placid NY) додавали до остаточного обсягу реакції, 20мкл, та інкубували реакцію протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Остаточні умови ферментної реакції: 20ммоль N-2-гідроксietилпіперазин-N-2-етансульфонової кислоти, pH 7,4, 5ммоль MgCl₂, 2ммоль MnCl₂, 1ммоль дітіотреїтолу, 0,1мг/мл ацетильованого бичачого гамма-глобуліну, 0,125нг Сук-кінази, 4мкмоль аденозінтрифосфату, 2,5мкмоль пептидного субстрату (біотин-EQEDEPEGDYEEVLE-CONH₂, SynPer Corporation). Етилендіамінтетраоцтову кислоту (10ммоль-остаточний)/анти-фосфотирозин антитіло (1X-кінцевий)/флюоресцентну мітку фосфопептиду (0,5X-кінцевий) додали до буферного розчину фосфопептиду для припинення реакції та одержання загального об'єму 40мкл

відповідно до інструкції виробника (PanVera Corporation). Планшет інкубували протягом 30 хвилин у темряві при кімнатній температурі. Планшети зчитували на апараті флуоресцентної поляризації для планшетів "Поляріон" (виробництва фірми Тесла). Дані перерахували у кількість наявного фосфопептиду по каліброваній кривій, отриманій в результаті порівняння з конкурентом фосфопептиду, наданим у комплекті для аналізу тирозин-кінази (Tyrosine Kinase Assay Kit, Green) (постачальник "PanVera Corporation").

Результати аналізу наведені нижче в Таблиці 6:

Таблиця 6					
Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)
R908701	0,022	R927060	0,62	R940376	0,067
R908702	0,038	R927061	0,158	R940380	0,029
R908712	0,024	R927064	0,466	R940381	4999,846
R908952	0,041	R927069	0,111	R940382	0,144
R908953	0,017	R927077	0,602	R940384	9999
R908956	1,178	R927078	0,222	R940386	19,49
R909236	2,071	R927080	0,254	R940387	9999
R921219	0,041	R927082	0,312	R940388	0,268
R909268	0,125	R927083	0,449	R940389	0,053
R909309	0,09	R935138	0,229	R940390	9999
R909317	0,008	R935189	0,354	R945071	0,43
R909321	0,104	R935190	0,047	R945140	0,611
R909322	0,141	R935191	0,045	R945142	2,007
R920410	0,187	R935193	0,11	R945144	0,612
R921218	0,254	R935194	0,169	R945157	1,762
R926242	1,81	R935196	0,266	R921304	0,017
R926252	9999	R935198	0,2	R945299	0,022
R926321	5049	R935202	0,035	R945365	0,465
R926500	0,929	R935237	0,046	R945366	0,059
R926501	0,193	R935293	0,047	R945369	1,85
R926502	0,217	R935302	0,027	R945370	1,05
R926505	0,07	R935304	0,042	R945371	1,3
R926508	0,097	R935307	0,057	R945385	2,12

Таблиця 6					
Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)
R926562	9999	R935309	0,098	R945389	0,035
R926594	0,771	R935310	0,206	R945390	0,009
R926715	0,534	R935366	0,38	R945391	0,01
R926742	0,076	R935372	0,205	R945392	0,014
R926745	0,093	R935375	2,8	R945398	0,182
R926753	0,108	R935391	0,223	R945399	0,166
R926757	0,51	R935393	0,45	R945400	17,925
R926763	0,024	R935413	0,195	R945401	0,007
R926780	0,107	R935414	0,152	R945402	0,418
R926782	0,117	R935416	0,196	R945402	0,418
R926791	0,207	R935418	0,558	R945404	9999
R926797	9999	R935431	0,132	R945405	0,168
R926798	9999	R935432	0,05	R945407	9999
R926813	0,405	R935433	0,07	R945412	0,308
R926816	0,062	R935436	0,064	R945413	9999
R926834	0,292	R935437	0,127	R945416	0,515
R926839	0,055	R940233	0,151	R945417	9999
R926891	0,116	R940255	0,771	R945418	9999
R926931	0,255	R940256	3,211	R945419	0,127
R926946	10,218	R940269	0,685	R945422	0,087
R926949	0,076	R940275	0,734	R945423	0,273
R926953	3,05	R940276	0,127	R945424	0,665
R926956	0,38	R940277	0,214	R945426	0,301
R926968	0,235	R940290	0,187	R945427	0,479
R926970	0,057	R940323	0,05	R945432	4444,247
R926971	0,008	R940338	0,028	R945433	0,431
R926975	0,767	R921303	0,003	R945434	9999
R926976	0,421	R940346	0,11	R921302	0,268
R926977	0,007	R940347	0,038	R950349	0,033
R926979	0,013	R940350	0,121	R950367	0,341
R926981	0,01	R940351	0,25	R950368	0,011

Таблиця 6					
Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)	Препарат	SYK Кіназа IC ₅₀ (у мкмоль)
R926982	0,028	R940352	0,13	R950373	0,067
R926983	0,012	R940353	0,325	R950428	0,127
R926984	0,459	R940358	0,023	R950430	0,15
R926985	0,203	R940361	0,069	R950431	9999
R926989	0,228	R940363	0,006	R950440	9999
R927016	0,954	R940364	0,001	R950466	1,81
R927017	2,351	R940366	0,003	R950467	9999
R927020	9999	R940367	0,013	R950468	9999
R927042	0,051	R940368	0,001	R950473	19,49
R927048	0,002	R940369	0,043	R950474	9999
R927049	0,004	R940370	0,069	R950475	9999
R927050	0,114	R940371	3,643	R950476	9999
R927051	0,01	R940372	0,253	R940376	0,067
R927056	0,473	R940373	9999	R940380	0,029

Ці дані показують, що всі досліджені сполуки, за винятком R945142 і R909236, інгібують фосфорилування Syk-кінази з параметрами IC₅₀ у субмікромолярному діапазоні. Усі досліджені сполуки інгібують фосфорилування Syk-кінази з параметрами IC₅₀ у мікромолярному діапазоні.

7.18. Ефективність сполук при лікуванні аутоімунітету

Ефективність *in vivo* певних 2,4-піримідиндіамінових сполук по відношенню до аутоімунних захворювань оцінювали на прикладі зворотної пасивної реакції Артюса, яка являє собою модель ушкодження тканини, опосередкованого комплексом антиген-антитіло, та у декількох інших моделях аутоімунних захворювань та запалень. Ці моделі схожі між собою тим, що антитіло до специфічного антигену опосередковує запальне захворювання, викликане імунним комплексом (IC), та наступне руйнування

тканини. Відкладення імунних комплексів у певних анатомічних місцях (центральної нервової системи (ЦНС) у випадку експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) та синовіальної оболонці у випадку артриту, індукованого колагеном (CIA) призводить до активації клітин з фіксованими на поверхні Fc γ R та Fc α R, особливо тучних клітин, макрофагів, та нейтрофілів, що викликає вивільнення цитокіну та хемотаксис нейтрофілів. Активізація запальної реакції ініціює ефекторні відповіді у прямому напрямку, включаючи набряк, крововилив, інфільтрацію нейтрофілів та виділення прозапальних медіаторів. У випадку аутоімунних порушень, наслідки таких подій, викликаних імунними комплексами, важко виявити; однак багато досліджень продемонстрували, що інгібування сигнального шляху Fc γ R у цих тваринних моделях призвело до значного зменшення захворюваності та тяжкості перебігу захворювання.

7.18.1 Ефективність сполук при реакції Артюса у мишах

In vivo ефективність сполук R921302, R926891, R940323, R940347 та R921303 щодо інгібування запальних каскадів, викликаних імунними комплексами, було продемонстровано шляхом моделювання на мишах зворотної пасивної реакції Артюса (реакція RPA).

7.18.1.1 Модель

Опосередковане імунним комплексом гостре запальне ураження тканини супроводжує низку аутоімунних захворювань людини, включаючи синдром васкуліту, сироваткову хворобу, системний червоний вовчак (SLE), ревматоїдний артрит, синдром Гудпасчура, та гломерулонефрит. Класичною експериментальною моделлю ураження тканини, опосередкованого імунними комплексами, є зворотна пасивна реакція за типом Артюса. Модель RPA являє собою зручний in vivo метод для дослідження локальних запалень, індукованих імунними комплексами, за відсутності системних ефектів. Внутрішкірна ін'єкція антитіл (Abs), специфічних до альбуміну курячого яйця (анти-OVA IgG кроля), з наступною внутрішньовенною (IV) ін'єкцією антигенів (Ags), особливо альбуміну курячого яйця (овальбумін, OVA), спричинює периваскулярне відкладення IC та негайну запальну реакцію, яка характеризується набряком, інфільтрацією нейтрофілів та крововиливом у місці ін'єкції. Деякі аспекти мишачої моделі RPA відображають запальну реакцію, що спостерігається у хворих на ревматоїдний артрит, SLE та гломерулонефрит.

7.18.1.2 Протокол дослідження

У цій моделі, досліджувані сполуки застосовують у певні моменти часу перед застосуванням антитіл та антигенів. Розчин кролячого анти-OVA IgG (50мкг на 25мл/мишу) вводять внутрішкірно, та одразу ж після цього вводять внутрішньовенно ін'єкцію альбуміну курячого яйця (20мг/кг маси тіла) у розчині, що містить 1% синього барвника Еванс. Ступінь набряку та крововиливу вимірюється у дорсальній шкірі миші C57BL/6, використовуючи синій барвник Еванс як показник локального ураження тканини.

Для контролю застосовується поліклональний IgG кроля.

Проміжок часу між застосуванням досліджуваних сполук та антитіл/антигенів (час премедикації) залежить від фармакокінетичних властивостей (PK) кожної окремої сполуки. Через 4 години після індукції реакції Артюса, мишей усипляють та збирають пробу тканин для оцінки набряку. Ця модель дозволяє проводити швидку перевірку in vivo активності багатьох інгібіторів.

7.18.1.3 Результати

Всі досліджувані сполуки були введені пероральним способом.

Препарат R921302 при застосуванні у дозах 50мг/кг, 100мг/кг та 200мг/кг за 60 хвилин до введення комплексу антитіл/антигенів мишам C57B16 продемонстрував залежність інгібування утворення набряку від введеної дози (49,9%, 93,2%, та 99,1% відповідно). Більш того, препарат R921302 продемонстрував не тільки профілактичне інгібування набряку, а також й терапевтичну ефективність, про що свідчить інгібування набряку на 77,5% при введенні препарату у дозі 100мг/кг через 30 хвилин після введення комплексу антитіл/антигенів.

Було продемонстровано ефективність препаратів R940323 та R926891 щодо інгібування набряку на 32,4% та 54,9% відповідно при застосуванні у дозі 200мг/кг за 60 хвилин до введення антитіл/антигенів. Ці сполуки є набагато менше біодоступними при пероральному введенні, та рівні системного впливу становили приблизно у 50 разів менше рівнів, характерних для R921302 (дані не наводяться). Препарат R940347 забезпечував інгібування набряків на 89% при застосуванні у дозі 100мг/кг за 2 години до введення антитіл/антигенів.

Препарат R921303 продемонстрував ефективність інгібувати набряк на 100%, 100%, та 93,6%, при застосуванні у дозі 200мг/кг та введенні за 30, 60 та 120 хвилин. Було також продемонстровано дозозалежне інгібування на 65,4%, 81,2% та 100% при введенні цього препарату у дозах 50мг/кг, 100мг/кг та 200мг/кг відповідно. Результати проведених досліджень наведені у Таблиці 7.

Таблиця 7				
Препарат	Доза (мг/кг)	Час премедикації (год)	% Інгібування контрольного наповнювача Розмір набряку ± стандартна похибка	Концентрація плазми ± SEM (нг/мл) Вплив = час премедикації + 4 години
R921302	100	0,5	89,44 ± 4,8	25200 ± 3910
	100	1	82,1 ± 10,9	н/з
	50	1	50,0 ± 6,4	1149 ± 172
	100	1	92,3 ± 4,2	2072 ± 447
	200	1	99,1 ± 0,9	4789 ± 1182
R940323	200	0,5	5,5 ± 9,3	2333 ± 618
		1	32,4 ± 13,0	878 ± 235
		2	26,9 ± 11,2	892 ± 434
R926891	200	0,5	44,8 ± 3,0	163 ± 70
		1	46,2 ± 4,1	37,2 ± 8
		1,5	28,1 ± 10,6	58,6 ± 19
R921303	200	0,5	100 ± 0	3703 ± 785
		1	100 ± 0	2653 ± 833
		2	93,3 ± 4,4	2678 ± 496
	50	1	64,1 ± 13,3	430 ± 115
	100	1	80,5 ± 9,8	983 ± 180
R935372	100	0,5	-0,6 ± 6,2	0,6 ± 1
		1	23,5 ± 7,4	4,2 ± 4
		2	-4,4 ± 17,7	52,65 ± 39
R920410	100	1	42,6 ± 15,1	1216 ± 239
R927050	100	0,5	-0,3 ± 6,6	619 ± 130
		1	14,9 ± 20,5	837 ± 104
		2	64,0 ± 8,9	557 ± 78
R940350	100	0,5	-15,6 ± 27,2	176 ± 58
		1	53,2 ± 15,1	129 ± 55
		2	38,9 ± 24,3	96 ± 28
R940347	100	0,5	36,7 ± 22,4	1596 ± 485

Таблиця 7				
			% Інгібування контрольного наповнювача	Концентрація плазми ± SEM (нг/мл)
Препарат	Доза (мг/кг)	Час премедикації (год)	Розмір набряку ± стандартна похибка	Вплив = час премедикації + 4 години
R940363	100	1	48,2 ± 5,7	3014 ± 590
		2	88,9 ± 9,1	1992 ± 247
		0,5	-16,4 ± 10,9	32 ± 10
		1	67,6 ± 12,1	42 ± 5
R927050	100	2	52,3 ± 22,7	37 ± 18
		1	7 ± 19	1018 ± 189
		50	56 ± 15	1755 ± 310
		100	61 ± 14	2851 ± 712
R940363	100	1	61 ± 8	625 ±60
R935429	100	1	85 ± 5	401 ± 96
R927070	50	1,5	31,1 ±17,29	1077 ± 296
	100	1,5	55,5 ± 7,7	4095 ± 1187
R935429	50	1,5	-5,1 ± 14,9	164 ± 89
	100	1,5	67,1 ± 13,8	206 ± 115
R935429	100	0	-2,8 ± 14,8	н/з
	100	1	34,08 ± 7,9	н/з
	100	2	55,5 ± 7,9	н/з
	100	4	35,0 ± 11,4	н/з
R927087	50	1,5	-10,4 ± 14,4	26,9 ± 8,0
	100	1,5	28,7 ± 16,6	28,7 ± 10,8
R935451	50	1,5	74,9 ± 7,5	385,0 ± 149,4
	100	1,5	77,1 ± 8,0	1459,0 ± 444,4
R935451	10	1,5	-14,4 ± 13,3	14,4 ± 1,8
	30	1,5	-30,6 ± 15,4	78,0 ± 32,0
R940388	100	1,5	75,0 ± 6,2	44,2 ± 8,9
R921302	50	1	49,9	1,1
	100	1	93,2	2,1
	200	1	99,1	4,8

Таблиця 7				
Препарат	Доза (мг/кг)	Час премедикації (год)	% Інгібування контрольного наповнювача Розмір набряку ± стандартна похибка	Концентрація плазми ± SEM (нг/мл) Вплив = час премедикації + 4 години
R940323	200	1	32,4	0,9
R926891	200	1	54,9	0,04
R940347	100	1	48	Нв*
		2	89	Нв
R921303	50	1	65,4	0,4
		1	81,2	0,98
		1	100	2,4

Примітка:

*нв=не визначено

**SEM=стандартна похибка середньої величини

7.18.2 Ефективність сполук при моделюванні на мишах артриту, індукованого антитілами до колагену

In vivo ефективність препарату R921302 по відношенню до аутоімунних захворювань було продемонстровано на прикладі мишиної моделі артриту, індукованого антитілом до колагену (CAIA).

7.18.2.1 Модель

Артрит, індукований колагеном (CIA), часто застосовують як експериментальну модель IC опосередкованого ушкодження тканини. Застосування колагену типу II на мишах чи щурах призводить до імунної реакції, яка як правило супроводжується запальною деструкцією хрящів та кісток дистальних суглобів та опухлістю оточуючих тканин. CIA часто застосовують для оцінки сполук, які можуть бути потенціальними засобами для лікування ревматоїдного артриту та інших хронічних запальних захворювань.

Нещодавно виникла нова технологія моделювання CIA, у відповідності з якою для індукції CIA, опосередкованого антитілами, застосовуються антитіла до анти-II типу колагену. Переваги цього методу полягають у наступному: малий період часу для індукції захворювання (розвиток відбувається протягом 24-48 годин після внутрішньовенної (IV) ін'єкції антитіл); артрит може бути індукований як у сприйнятливому до CIA так і стійкому до CIA штаммі мишей; процедура є ідеальною для швидкого дослідження протизапальних терапевтичних препаратів.

Суміш моноклональних антитіл Arthrogen-CIA®, що індукує артрит (постачальник Chemicon International Inc.) вводять внутрішньовенно мишам лінії Balb/c (2мг/мишу) у день 0. Через 48 годин вводять внутрішньовенну ін'єкцію 100мкл LPS (25мкг). На четвертий день може спостерігатись опухлість пазурів. На п'ятий день одна чи дві лапки (зокрема, задні кінцівки) починають червоніти та набрякати. У шостий день та протягом наступних 1-2 тижнів продовжують спостерігати почервоніння та набряклість лапок. В ході дослідження ведуть облік клінічних ознак запалення для оцінки величини набряку лапок. Ступінь тяжкості артриту визначають як суму індексів, що характеризують стан обох задніх лапок кожної тварини (максимальне значення індексу становить 8). Ступінь запалення у зазначених лапках визначають шляхом вимірювання діаметру лапок. Також ведуть спостереження за зміною маси тіла.

Тваринам вводять лікувальний препарат з моменту індукції артриту, тобто починаючи з дня 0. Досліджувані сполуки та контрольні сполуки застосовують перорально (PO) один раз або двічі на день, в залежності від попередньо встановлених фармакокінетичних властивостей кожної сполуки.

По завершенню дослідження (через 1-2 тижні після індукції артриту), мишей усипляють, роблять поперечний розріз лапок у місці дистальної великогомілкової кістки, використовуючи гільотинні ножиці, та зважують. Середню величину ± стандартну похибку (SEM) визначають для кожної групи кожний день за даними клінічних індексів кожної окремої тварини, а також по завершенню дослідження обчислюють та записують масу задніх лапок для кожної

експериментальної групи. Також отримують гістопатологічну оцінку лапок.

7.18.2.2 Результати

Застосування R921302 в значній мірі сприяло гальмуванню розвитку артриту та зменшенню тяжкості цього захворювання ($p < 0,005$), про що свідчать зміни середніх величин денних клінічних індексів артриту (Фіг.12). Величини щоденних клінічних індексів артриту з 4 по 14 день у групі, у якій застосовували лікувальний препарат, були нижчі на 71-92% в порівнянні з контрольною групою (у якій застосовували тільки контрольний наповнювач). Ступінь запалення лапок, визначений шляхом вимірювання маси лапок, виявився меншим у тварин, до яких застосовували препарат R921302 в порівнянні з тваринами контрольної групи (Фіг.13). По завершенню дослідження, ступінь опухлості визначили шляхом вимірювання маси лапок, та встановили зменшення на 99,9% у групі тварин, яким вводили препарат R921302 у порівнянні з середньою масою лапок мишей контрольної групи ($p < 0,002$).

Гістопатологічна оцінка видалених лапок показала наявність вираженого синовіту, характерного для CIA. В той час як у тварин, яким вводили фізіологічний розчин або наповнювач, була помічена наявність виражених уражень, в групі тварин, яким вводили препарат R921302, ступінь тяжкості уражень був меншим. Спостерігався набряк суглобів з вираженою проліферацією синовіту. Також спостерігалось зростання фібробластів з щільною інфільтрацією нейтрофілів, лімфоцитів, тучних клітин, макрофагів та клітин плазми. Спостерігалась судинна проліферація, яка супроводжувалась гіперемією, крововиливом та набряком. Спостерігалась наявність утворень паннуса у суглобовій щілині та деструкція хрящів. У групі тварин, де проводилось лікування, стан суглобів майже відповідав нормі або з незначним запаленням, яке не розповсюдилось на хрящі.

Таблиця 8. Середній груповий гістопатологічний індекс (0-15)

Лікувальний засіб	Середній сукупний індекс ± середнє квадратичне відхилення
Фізіологічний розчин	9,8 ± 2,1
Наповнювач	9,3 ± 4,5
R921302 (100 мг/кг), двічі на день	5,1 ± 1,9
* lipopolysaccharide – ліпополісахарид (прим. перекл.)	
Жодний	632 0, ± 0,0

Спостерігалось зменшення в середньому на 20% клінічних індексів артриту та набряку лапок у тваринах, яким вводили R050 двічі на день у дозі 100мг/кг, у порівнянні з тваринами контрольної групи, які не отримували лікування (застосовувався наповнювач, $p = 0,1$). Спостерігалось інгібування набряку лапок приблизно на 26% у порівнянні з тваринами контрольної групи (де застосовували наповнювач), як було встановлено в результаті вимірювання товщини задніх кінцівок ($p = 0,1$). R050 у дозі 30мг/кг не здійснював впливу на артрит.

Препарат R070, що є сіллю R050, при застосуванні у дозах 50 та 100мг/кг двічі на день,

інгібував клінічне захворювання у середньому на 39,75% ($p < 0,0002$) або 35,28% ($p < 0,0004$) відповідно у порівнянні з контрольним засобом (наповнювачем). Спостерігалось зменшення товщини лапок приблизно на 50%.

Препарат R429, що є сіллю R363, при застосуванні двічі на день у дозах 50 або 100мг/кг продемонстрував інгібування клінічних індексів артриту в середньому на 23,81% ($p < 0,05$) або 20,82% ($p = 0,05$) відповідно у порівнянні з контрольним засобом (наповнювачем). Також було виявлено зменшення товщини лапок.

При застосуванні R347 двічі на день у випробуваних дозах 30мг/кг та 100мг/кг не спостерігалось впливу на індекси артриту.

7.18.3. Ефективність сполук при моделюванні на щурах артриту, індукованого колагеном

In vivo ефективність препарату R921302 по відношенню до аутоімунних захворювань було продемонстровано на щуриній моделі артриту, індукованого колагеном (CIA).

7.18.3.1 Опис моделі

Ревматоїдний артрит (RA) характеризується хронічним запаленням суглобів, що призводить до необоротної деструкції хрящів. Синовіальні тканини хворих на RA рясно вкриті імунними комплексами, що містять IgG. Роль таких імунних комплексів в етіології та патології цього захворювання залишається неясною, але встановлено, що IC взаємодіють з кровотворними клітинами через Fc γ R.

CIA широко застосовується в якості тваринної моделі RA, який обумовлює хронічне запалення синовіту, що характеризується утвореннями паннуса та деградацією суглобів. У цій моделі, внутрішкірна ін'єкція колагену природного типу II, емульгованого з неповним ад'ювантом Фрейнда, спричинює запальний поліартрит впродовж 10 або 11 днів та наступну деструкцію суглобів через 3-4 тижні.

7.18.3.2 Протокол дослідження

У день 0 сингенним щурам лінії LOU вводили колаген природного типу II, та проводили оцінку ефективності препарату R921302 за схемою профілактики та схемою лікування. Згідно з протоколом дослідження профілактичної ефективності сполуки, наповнювач або різні дози R921302 застосовували перорально, починаючи з дня імунізації (день 0). Згідно з протоколом дослідження лікувальної ефективності препарату, після розвитку клінічних ознак артриту на десятій день починали лікування з пероральним застосуванням R921302 у дозі 300мг/кг щоденно до завершення дослідження (день 28), коли тварин уципляли. Згідно з обома протоколами велась щоденна реєстрація клінічних індексів, та проводилось вимірювання маса тіла двічі на тиждень. У день 28, отримували рентгенологічні дані та вимірювали рівень антитіл до колагену II у сироватці з допомогою аналізу ELISA* (* Enzyme Linked Immunosorbent Assay - твердофазний імуноферментний аналіз (прим, перекл.))

7.18.3.3 Результати

На десятій день після початку імунізації, у щурів розвинувся клінічний CIA, як свідчить зростання індексів перебігу артриту (Фіг.14). У

випадку щурів, яким вводили лише наповнювач, середня величина індексу перебігу артриту поступово зростала після десятого дня, та досягла $6,75 \pm 0,57$ на день 28. У випадку тварин, яким вводили високу дозу препарату R921302 (300мг/кг/день) з дня імунізації (день 0), середній клінічний індекс був значно меншим ($p < 0,01$) з 10 по 28 день в порівнянні з індексом контрольної групи (яким вводили наповнювач). У щурах, яким вводили дозу R921302 у 300мг/кг на початку захворювання, спостерігався значно нижчий індекс перебігу артриту, починаючи з 16 дня і тривав до завершення дослідження у день 28. Показники рентгенографічного аналізу (по шкалі 0-6), отримані у 28 день, становили $4,8 \pm 0,056$ для групи, до якої застосовували наповнювач, в порівнянні з $2,5 \pm 0,016$, $2,4 \pm 0,006$, and $0,13 \pm 0,000001$ для тварин, до яких застосовували препарат один раз на день у дозі 75, 150, та 300мг/кг/день відповідно за схемою профілактики, та $0,45 \pm 0,031$ для тварин, до яких щоденно застосовували однократну дозу препарату у 300мг/кг/день з початку захворювання. Лікування препаратом R921302 у дозі 300мг/кг/день в профілактичних цілях (при імунізації) або після початку захворювання сприяло запобіганню розвитку ерозій та зменшенню опухлості м'якої тканини. Аналогічно, лікування препаратом R921302 сприяло вираженому зменшенню сироваткових антитіл до анти-колагену II (дані не наводяться).

7.18.4 Ефективність сполук при лікуванні експериментального аутоімунного енцефаломієліту у мишей

In vivo ефективність препарату R921302 по відношенню до аутоімунних захворювань було продемонстровано на мишачій моделі експериментального аутоімунного енцефаломієліту (надалі-EAE).

7.18.4.1 Опис моделі

EAE є корисною моделлю розсіяного склерозу (MS)- аутоімунного захворювання центральної нервової системи, обумовленого імунноклітинною інфільтрацією білої речовини ЦНС. Запалення та наступна деструкція мієліну призводить до прогресивного паралічу. Як і при захворюванні людини, EAE супроводжується активацією на периферії Т-клітин, аутореактивних до білків мієліну, таких як основні білки мієліну (MBP), протеоліпідні білки (PLP), або протеїн мієліну олігодендроцитів (MOG). Активовані Т-клітини, специфічні до нейроантігенів, проникають крізь гематоенцефалічний бар'єр, обумовлюючи інфільтрацію фокальних мононуклеарних клітин та демієлінізацію. EAE можна індукувати у сприйнятливої лінії мишей шляхом імунізації специфічними до мієліну протеїнами у комбінації з ад'ювантом. У миш лінії SJL, які використовують у нашому дослідженні, параліч задніх лапок та хвоста спостерігається на 10 день після імунізації. Пік тяжкості захворювання спостерігається між 10 днем та 14 днем, а цикл часткової спонтанної ремісії з наступним рецидивом можна спостерігати аж до 35 дня. Наведені нижче результати демонструють потенціал досліджуваного препарату (R921302) пригнічувати тяжкість

захворювання та запобігати рецидиву симптомів захворювання, які можуть бути обумовлені FcγR-опосередкованим виділенням цитокінів з імунних клітин.

7.18.4.2 Протокол дослідження

Згідно з моделлю ЕАЕ з використанням мишей лінії SJL, кожну мишу сенсibilізували препаратом PLP/CFA (для індукції ЕАЕ у чотирьох місцях задньої частини миші сумарно застосовували 0,02мл емульсії, що містить 150мкг PLP139-151 з 200мкг CFA у 0,05мл гемогенату). За протоколом дослідження супресуючих властивостей препарату, наповнювач або різні дози R921302 застосовували перорально, починаючи з дня імунізації (день 0). За протоколом лікування, на початку захворювання тварин розділили на групи з подібними середніми клінічними індексами та перорально вводили наповнювач або різні дози досліджуваних препаратів з різною частотою. В обох протоколах вели щоденне спостереження за клінічними індексами, та вимірювали масу тіла двічі на тиждень.

7.18.4.3 Результати

На 10 день після імунізації PLP, у миш лінії SJL розвинувся клінічний ЕАЕ, про що свідчить зростання їх середніх клінічних показників (Фіг.15). Показник паралічу поступово зростає у тварин, яким вводили тільки наповнювач з дня початку імунізації (0 дня), та на 14 день досяг найвищого значення 5,1±0,3. У пік захворювання (14 день), середній клінічний показник у тварин, яким вводили щоденно 100мг/кг раз або двічі на день, був значно нижче ($p < 0,05$, 4,3±1,3 та 4,3±1,4, відповідно). На 16 день у всіх тварин спостерігалась ремісія симптомів середнього ступінютяжкості, що є характерно для моделі ЕАЕ з використанням мишей SJL. Значно нижчі клінічні показники у тварин, яким щоденно двократно вводили 100 мг/кг препарату R921302 не змінювались ($p < 0,05$) протягом всього експерименту до дня завершення дослідження у 30 день, коли тварин забивали. Ці нижчі показники впродовж всього експерименту відображаються у значно нижчому сукупному показнику захворювання (CDI) та збільшенню сукупного вагового показника (CWI), як наведено у Таблиці 9. У групі тварин, яким вводили лише наповнювач, спостерігався рецидив у 2/5 мишей. У групі тварин, яким застосовували дозу препарату 100мг/кг/день, спостерігався рецидив у 3/8 мишей. У жодної з мишей, яким вводили двічі на день 100 мг/кг, не спостерігався рецидив.

Таблиця 9

Самки SJL, яким вводили препарат Rigel R921302, починаючи з дня імунізації у дозі 150 мкг PLP 139-151/200 мкг MTB (CFA)						
	Захворюваність	Початок захворювання	Пік захворювання	Рівень летальності	CDI	CWI
Контроль	10/10	11,8 ± 0,5	5,1 ± 0,3	1/10 ^a	53,2 ± 7,1	118,1 ± 6,4
Placebo	10/10	12,3 ± 0,7	4,3 ± 1,3	0/10	44,1 ± 14,5	124,4 ± 6,0
100 мг/кг раз на день	10/10	13,0 ± 1,2 ^b	4,3 ± 1,4	3/10 ^a	33,7 ± 11,4 ^b	133,5 ± 6,8 ^b

Примітка:

CDI = Сукупний Показник Захворювання до дня +26

CWI = Сукупний Ваговий Показник до дня +23

^a = Летальність, не пов'язана з ЕАЕ, в результаті ушкодження при кормленні або умиртвіння гіпоцефалічних тварин.

^b = Значна відмінність між контрольною та експериментальною групами ($p < 0,05$), визначена за критерієм Ст'юдента (оцінка існування різниці між двома групами, але не напрямку різниці).

Для мишей SJL, яким вводили препарат R921302 на початку захворювання (11 день) у дозі 200мг/кг двічі на день, було продемонстровано значне зменшення ($p = 0,003$) рівню показника CDI (53,5±16,9, в порівнянні з 72,9±8,9 у тварин, яким вводили лише наповнювач). Більш того, спостерігалось значне зменшення кількості випадків рецидиву у тварин, яким вводили R921302 (2/12) в порівнянні з кількістю випадків рецидиву у тварин, яким вводили лише наповнювач (7/11). Результати підсумовані у Таблиці 10 та Фіг.16.

Таблиця 10

Самки SJL, яким вводили препарат Rigel R921302 з початку захворювання						
	Захворюваність	Середній індекс при застосуванні препарату	Пік захворювання	Летальність	Рецидив	CDI
Контроль	11/11	3,9 ± 1,6	5,0 ± 0,4	0/11	7/11	72,9 ± 8,9
200 мг/кг двічі на день	12/12	3,4 ± 1,6	4,3 ± 0,7	1/12	2/12	53,5 ± 16,9
P	1,00	0,48	0,02	0,97	0,055	0,003

Примітка:

CDI = Сукупний Показник Захворювання до дня +27

7.18.5 Сполуки 2,4-піримідиндіаміну, наведені у цьому винаході, інгібують активацію Т-клітин

7.18.5.1 Опис

Здатність 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, інгібувати активацію Т-клітин, було продемонстровано з допомогою різних аналізів з використанням Т-клітин лінії Jurkat та первинних культур Т-клітин. Інгібуння активації Т-клітин Jurkat у відповідь на стимуляцію рецептору Т-клітини (TCR) вимірювали шляхом кількісного визначення зростаючої регуляції клітинно-поверхневого маркера CD69. Інгібуння активації первинних Т-клітин вимірювали шляхом кількісного визначення виділення цитокінів, включаючи фактор некрозу пухлин альфа (TNF), інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 4 (IL-4), інтерферон гамма (IFNγ) та гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор(GM-CSF), у відповідь на кистимуляцію TCR/CD28.

7.18.5.2 Дослідження інгібуння активації Т-клітин лінії Jurkat

Т-клітини лінії Jurkat людини (клон N) рутинно культивували у середовищі RPMI 1640 (постачальник Mediatech), до якого додатково додали 10% ембріональної телячої сироватки (FBS, постачальник Hyclone), пеніциліну та стрептаміцину. Процес дослідження проходив протягом трьох днів.

У перший день дослідження, культивовані клітини центрифугували (1000об/хв, 5 хвилин) та повторно суспендували з щільністю $3,0 \times 10^5$ клітин/мл у RPMI+5% FBS. На другий день дослідження, клітини центрифугували при 1000об/хв протягом 5 хвилин та повторно суспендували у RPMI+5% FBS при $1,3 \times 10^5$ клітин/мл. 85мкл цієї клітинної суспензії внесли у лунки 96-лункового планшету з глибокодними лунками (постачальник Corning). 85мкл сполуки або розчин RPMI+5% FBS (для контролю) додали до кожної лунки планшету та інкубували при 37°C протягом 1 години. Потім клітини стимулювали анти-TCR (C305) у 500нг/мл

шляхом додавання 8X розчину у 25мкл у клітини планшета. Потім клітини інкубували при 37°C протягом 20 годин.

На третій день дослідження, планшети центрифугували при 2500 об/хв протягом 1 хвилини на центрифугі Beckman GS-6R, та видалили середовище. 50мкл фарбуючого розчину (1:100 розчин анти-CD69-APC антитіло (постачальник Becton Dickenson) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині+2% FBS) додали до кожної лунки, потім провели інкубацію планшетів при температурі 4°C протягом 20 хвилин у темряві. Додали до кожної лунки 150мкл буферу (забуферений фосфатом фізіологічний розчин+2% FBS, та центрифугували планшети при 3000об/хв протягом 1 хвилини. Супернатант знов видалили, а осад повторно суспендували при обережному помішуванні. Потім додали 75мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину+2% FBS+Цитофікс (розведення в пропорції 1:4), планшети обережно струшують та обертають алюмінієвою фольгою. Клітини на планшетах проаналізували з допомогою проточного цитометру, підключеного до автоматизованої системи подачі рідини.

Різні концентрації дослідних сполук порівнювали з розчинником для визначення показника інгібування активації Т-клітин IC_{50} для кожної сполуки. Репрезентативні значення IC_{50} для 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, представлені у Таблиці 11.

7.18.5.3 Виділення первинних Т-клітин

2E8-4E8 PBMC або проліферуючі Т-клітини, вирощені у rIL-2 із здорових людських донорів, суспендували у забуференому фосфатом фізіологічного розчину, центрифугували при 1500об/хв протягом 8-10 хвилин та повторно суспендували у 100мл повного середовища RPMI (1% Pen-Strep, 1% L-Глютамін, 10ммоль HEPES). Клітини внесли у пробірки T175 (37°C, 5% CO₂), та моноцити залишили зв'язуватись протягом 2-3 годин. Після зв'язування моноцитів, незв'язані клітини збирали, підраховували гемоцитометром, промивали декілька разів забуференим фосфатом фізіологічним розчином, та повторно суспендували у повному середовищі Yssel (середовище Іскова в модифікації Дульбеко з 1% сироватки АВ людини, 1% Pen-Strep, 1% L-Глютамін, 10ммоль HEPES) з концентрацією 1,5 4E6 клітин/мл. Потім додали 90мкл розведених клітин до сполук, розведених до 2X у середовищі Yssel та інкубували протягом 30 хвилин при 37°C (5% CO₂). Після цієї процедури, суміш сполук/клітин перенесли до стимуляційних планшетів, як наведено нижче.

7.18.5.4 Дослідження інгібування продукції цитокінів у стимульованих первинних Т-клітинах

Стимуляційні планшети готували шляхом нанесення на 96-лункові планшети 5мкг/мл α CD3 (постачальник BD PharMingen, каталоговий номер 555336)+10мкг/мл α CD28 (постачальник Beckman Coulter, каталоговий номер IM1376) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (у відсутності Ca²⁺/Mg²⁺) при 37°C (5% CO₂) протягом 3-5 годин. Після інкубації в присутності стимулюючих антитіл суміш видалили, планшети

тричі промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином перед додаванням суміші первинних Т-клітин/сполуки.

Суміш первинних Т-клітин з препаратом внесли до стимуляційних планшетів та інкубували протягом 18 годин при 37°C (5% CO₂). Після стимуляції клітин, приблизно 150мкл супернатанту з кожної лунки внесли у 96-лункові фільтраційні планшети (фільтраційні планшети Corning PVDF), центрифугували при 2000об/хв протягом 2-3 хвилин та негайно ж використовували для ELISA або аналізу LUMINEX чи заморожували при -80°C для подальшого використання.

Аналізи ELISA для IL-2 були проведені з допомогою набору Quantikine Human IL-2 ELISA (постачальник R&D Systems, каталоговий номер D2050) відповідно з інструкцією виробника, та абсорбцію вимірювали з допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 450нм. Після віднімання шумових значень поглинання перевели у пг/мл з допомогою калібровочної кривої.

Мультиплексування імуноаналізу Lumindex для TNF, IL-2, GMSCF, IL-4 та IFN γ здійснювали у відповідності з інструкцією виробника (Upstate Biotechnology). 50мкл проби розвели у 50мкл дослідному розчиннику та 50мкл інкубаційному буфері, потім інкубували в присутності 100мкл розведеного розчину діагностичних антитіл протягом 1 години при кімнатній температурі у темряві. Фільтраційний планшет двічі промивали буфером для промивання, потім інкубували в присутності 100мкл розведеного вторинного реагенту (SAV-RPE* (* Streptavidin R-Phycoerythrin - Стрептавідин R фікоеритрин (прим, перекл.))) протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у темряві. Нарешті, планшети промивали тричі та проводили вимірювання мічених мікросфер та флуоресцюючого RPE з допомогою приладу компанії Lumindex.

Провели порівняння різних концентрацій сполук з розчинником та встановили значення IC_{50} , які характеризують інгібування активації Т-клітин кожної досліджуваної сполуки. Репрезентативні показники IC_{50} для 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, представлені у Таблиці 11.

7.18.6 2,4-піримідиндіамінові сполуки, наведені у цьому винаході, інгібують активацію В-клітин

7.18.6.1 Опис

Здатність 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, інгібувати активацію В-клітин, було продемонстровано з допомогою первинних В-клітин при аналізі маркерів клітинної поверхні, використовуючи сортер клітин по флуоресцентним міткам (FACS). Інгібування активації первинних В-клітин у відповідь на стимуляцію рецепторів В-клітин (BCR) вимірювали шляхом кількісного аналізу маркера клітинної поверхні CD69.

7.18.6.2 Видалення первинних В-клітин

Первинні В-клітини людини виділили з лейкоцитарної плівки, що являє собою шар лейкоцитів, який утворюється між еритроцитами та тромбоцитами при центрифугуванні незгортаючої крові; або з свіжої крові з використанням мікросфер CD19-Dynal® та сортеру FACS.

Лейкоцитарну плівку отримали з Банку Крові Медичного Центру Стенфордського Університету, яка була виготовлена у той же день, зберігалась та транспортувалась в охолодженому стані (зі льодом). Лейкоцитарну плівку (приблизно 35мл) помістили у конічний стерильний центрифужний планшет ємністю 500мл та охолоджували на льоді, потім розвели холодним забуференим фосфатом фізіологічним розчином, що містив 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (постачальник Sigma, каталоговий № A7638) та цитрат натрію (0,1%, постачальник Sigma, каталоговий № S-5570) (P-B-C) до загального об'єму 200мл та обережно перемішували. Свіжу кров отримували від донорів у вакуумних пробірках ємністю 10мл з вмістом гепарину (1 вакуумна пробірка вміщує приблизно 8,5мл крові). Кров охолоджували на льоду, переносили у пробірки ємністю 50мл (20мл/пробірку) чи у конічний стерильний центрифужний планшет ємністю 500мл, та розвели рівним об'ємом P-B-C.

25мл розведеної крові чи лейкоцитарної плівки нашаровували на 15мл холодного фіколу та поміщали знов на лід. Кров, нашаровану на фіколі, центрифугували (модель Beckman GS-6R) протягом 45 хвилин при 2000об/хв при 4°C для відокремлення мононуклеарів периферійної крові (PBMC) від еритроцитів (червоних кров'яних клітин-RBC) та гранулоцитів. Верхній водний шар відсмоктували за допомогою аспілятора до рівня 1 дюйму (25,4мм) над шаром PBMC. Після цього клітини PBMC переносили з кожних 2 пробірок з фіколом у чисту пробірку Falcon ємністю 50мл (приблизно 10мл/пробірку). Перенесені PBMC розводили у 5-ти кратній пропорції льодовим льодом забуференим фосфатом фізіологічним розчином з 0,2% бичачого сироваткового альбуміну (P-B) та центрифугували протягом 20 хвилин при 1400об/хв при 4°C. Потім супернатант (може мати непрозорий вигляд) відсмоктували за допомогою аспілятора та клітини PBMC повторно суспендували у 25мл P-B, та підраховували клітини (шляхом розведення у відношенні 1:5) та зберігали на льоду.

Потім здійснили позитивне виділення клітин з використанням магнітних мікросфер, вкритих антитілами до анти-CD 19 (Dyna®) згідно з інструкцією виробника. Підраховували приблизну необхідну кількість мікросфер CD19-Dyna® (мікросфер M-450 (pabB) вкритих CD 19, постачальник Dyna®), припускаючи, що кількість В-клітин становить 5% від підрахованих PBMC та додаючи приблизно 10 мікросфер на кожну клітину з контейнеру з мікросферами, що містить 4×10^8 мікросфер/мл. Мікро сфери CD19-Dyna® двічі промивали розчином P-B у пробірці ємністю 5мл з використанням магніту Dyna®, потім додавали до суспензії клітин PBMC. Потім суміш пропустили крізь магніт Dyna® та промили декілька раз для виділення клітин, зв'язаних з мікросферами.

7.18.6.3 Дослідження сполук на здатність інгібувати активацію В-клітин

Після виділення клітин, мікросфери та антитіла вилучали з допомогою системи Dyna®

CD19-DETACHaBEAD® протягом 45 хвилин при 30°C. В результаті отримували приблизно 2×10^7 В-клітин на лейкоцитарну плівку. В-клітини промивали та повторно суспендували у концентрації 1×10^6 клітин/мл у середовищі RPMI1640 з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, пеніцилін/стрептавіну, та 1нг/мл IFN α 8. Клітини залишили на ніч при 37°C та 5% CO₂.

Наступного дня клітини промили та повторно суспендували у середовищі RPMI з додаванням 2,5% ембріональної телячої сироватки до концентрації 1×10^6 клітин/мл. Потім клітини внесли у глибокодонний 96-лунковий планшет (постачальник Corning), розподіляючи по 65мл клітин у кожну лунку. З допомогою автоматичного пристрою, 65мкл 2х сполуки додавали до клітин до остаточної концентрації DMSO у 0,2%, та інкубували протягом однієї години при 37°C. Потім клітини стимулювали 20мкл 7,5х α -IgM імуноглобуліну фірми Jackson laboratories (остаточна концентрація 5мкг/мл) протягом 24 годин. На третій день клітини центрифугували, фарбували для CD69, та аналізували з допомогою FACS шляхом стробування на живих клітинах (світлорозсіюванням).

Провели порівняння різних концентрацій досліджуваних сполук з розчинником та встановили значення IC₅₀, яке характеризує здатність кожної сполуки інгібувати активацію В-клітин Репрезентативні показники IC₅₀ для 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, представлені у Таблиці 11.

7.18.7 2,4-піримідиндіамінові сполуки, наведені у цьому винаході, інгібують активацію макрофагів

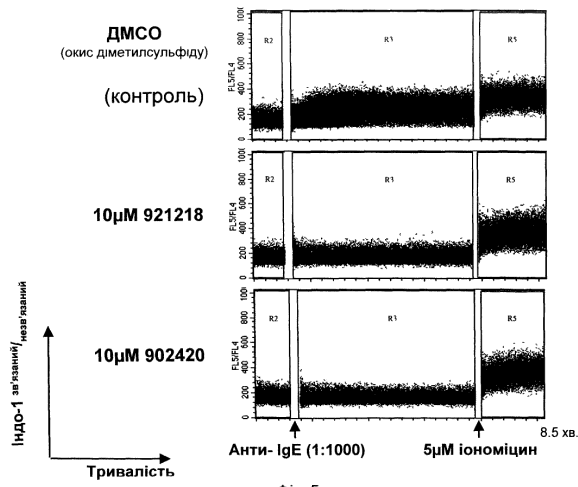
7.18.7.1 Опис

Здатність 2,4-піримідиндіамінових сполук, наведених у цьому винаході, інгібувати активацію диференційованих макрофагів, було продемонстровано шляхом вимірювання виділення цитокінів стимульованими макрофагами. Кількісно визначали виділення фактору некрозу пухлин альфа (TNF) та інтерлейкіну 6 (IL-6) у відповідь на стимуляцію IgG або LPS.

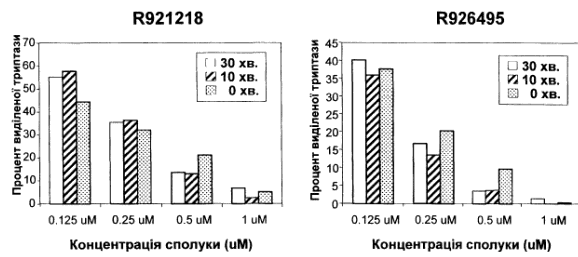
7.18.7.2 Очищення та культура макрофагів людини

CD14+моноцити очищали з PBMC (постачальник Alcells, каталоговий № PB002) з допомогою набору для видалення моноцитів (постачальник Miltenyi biotec, каталоговий №130-045-501) у відповідності до інструкції виробника. Ступінь чистоти оцінювали вимірюванням концентрації CD14+клітин з допомогою проточної цитометрії. Як правило, ступінь чистоти складав більше 90%. Очищені CD14+клітини внесли у планшети (6х10⁶ клітин на Чашу Петрі діаметром 150см у 15мл середовища) у макрофагальному безсироватковому середовищі (постачальник Gibco, каталоговий №12065-074) з 100нг/мл макрофагального колонієстимулюючого фактору (постачальник Perigo Tech, каталоговий №300-25) та залишили диференціюватись впродовж п'яти днів. По завершенню цього періоду, морфологія клітин та маркери поверхні клітин (CD14, HLA-DR,

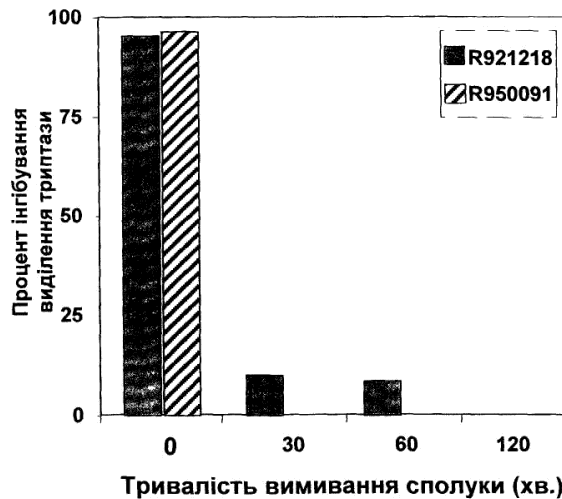
Фіг. 4



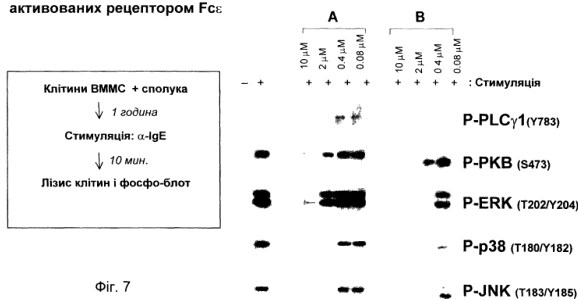
Фіг. 5



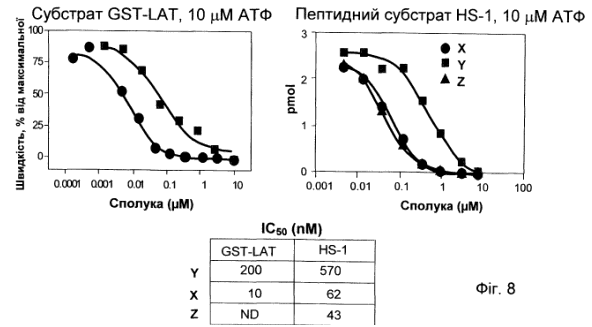
Фіг. 6



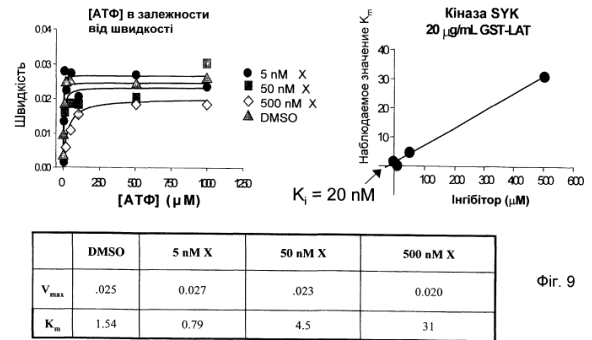
Інгібування фосфорилування протеїнів у прямому напрямку від Syk-кінази в клітинах кістково-мозкових мастоцитів (BMSC), активованих рецептором Fcε:



Фіг. 7

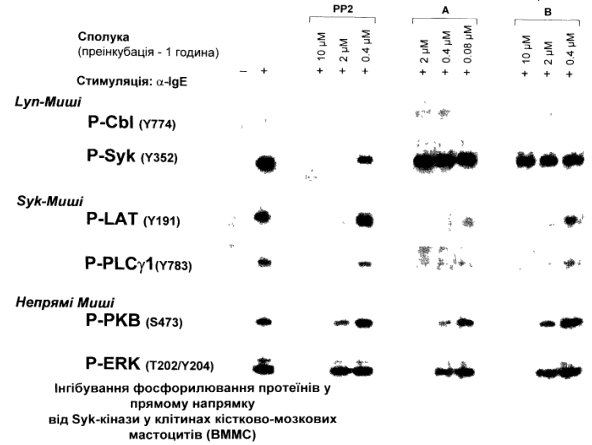
Аналіз Syk-кінази людини методом флуоресцентної поляризації *in vitro*

Фіг. 8

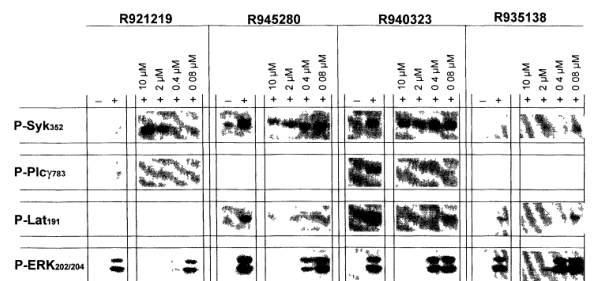


Фіг. 9

CHMC: Культивовані клітини мезангію людини

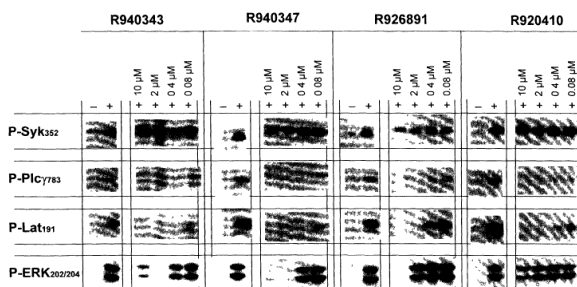


Фіг. 10



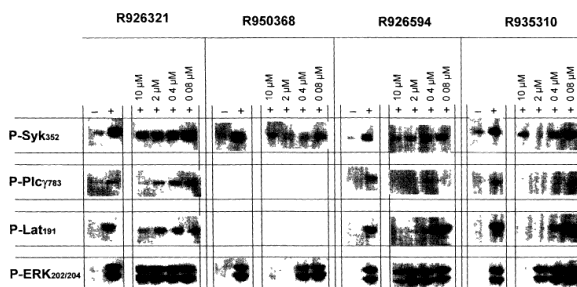
Фіг. 11A

Інгібування фосфорилування протеїнів у прямому напрямку
від Syk-кінази у клітинах кістково-мозкових мастоцитів (BMSC)



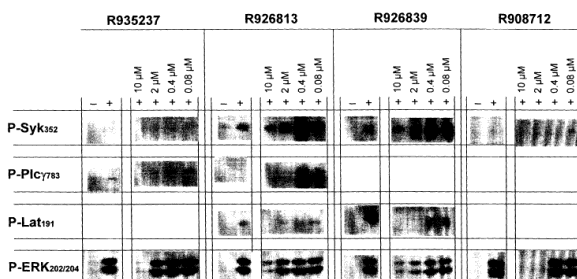
Фіг. 11B

Інгібування фосфорилування протеїнів у прямому напрямку
від Syk-кінази у клітинах кістково-мозкових мастоцитів (BMSC)



Фіг. 11C

Інгібування фосфорилування протеїнів у прямому напрямку
від Syk-кінази у клітинах кістково-мозкових мастоцитів (BMSC)



Фіг. 11D