

Даний винахід відноситься до використання деяких сполук у лікуванні і попередженні алергічних захворювань, наприклад, астми, алергічного риніту й atopічного дерматиту, і інших запальних захворювань, опосередкованих дією простагландину D₂ (PGD₂) у CRTH2-рецепторі на клітини, включаючи еозинофіли, базофіли і Th2-лімфоцити.

PGD₂ - це ейкозаноїд, клас хімічного медіатора, синтезованого клітинами у відповідь на місцеве ушкодження тканини, нормальні подразники або гормональні подразники або через провідні шляхи клітинної активації. Ейкозаноїди зв'язуються зі специфічними рецепторами поверхні клітин широкого ряду тканин по всьому тілі і служать посередником для виникнення різноманітних ефектів у цих тканинах. Відомо, що PGD₂ продукується мастоцитами, макрофагами і Th2-лімфоцитами і направляється у високих концентраціях у дихальні шляхи хворих астмою, кидаючи виклик антигеніві [Murray et al, (1986), N. Engl. J. Med. 315: 800-804]. Укорінення PGD₂ у дихальних шляхах може спровокувати багато ознак астматичної реакції, включаючи бронхостеноз [Hardy et al, (1984) N. Engl. J. Med. 311: 209-213; Sampson et al, (1997) Thorax 52: 513-518] і нагромадження еозинофілів [Emery et al, (1989) J. Appl. Physiol. 67: 959-962].

Потенціал екзогенно додаваного PGD₂ для індукції запальних реакцій підтверджений використанням трансгенних мишей, зверхекспресуючих PGD₂-CHNТазу людини, що прискорює еозинофільне запалення легень і продукування Тп2-цитокіну у відповідь на дію антигену [Fujitani et al, (2002) J. Immunol. 168: 443-449].

Першим специфічним до PGD₂-рецептором, що був відкритий, став DP-рецептор, який зв'язаний з підвищенням внутрішньоклітинних рівнів cAMP. Однак представляється, що велику частину своєї посередницької ролі в протизапальній активності PGD₂ грає через взаємодію з рецептором, зв'язаним з G-протеїном і іменований CRTH2 (гомологічна молекула хемотактичного рецептора, експресована на Тп2-клітинах), що експресується Th2-лімфоцитами, еозинофілами і базофілами [Hirai et al, (2001) J. Exp. Med. 193: 255-261 і EP0851030 і EP-A-1211513 і Bauer et al, EP-A-1170594]. Стає ясным, що вплив PGD₂ на активацію Тп2-лімфоцитів і еозинофілів опосередкований через CRTH2, оскільки селективні агоністи CRTH2 13,14 дигідро-15-кето-PCO₂ (DK-PGD₂) і 15R-метил-PCO₂ можуть виявити цю реакцію, а дія PGD₂ блокується антитілом проти CRTH2 [Hirai et al, 2001; Monneret et al, (2003) J. Pharmacol. Exp. Ther. 304: 349-355]. На противагу цьому, селективний DP-агоніст BW245C не стимулює міграцію Th2-лімфоцитів або еозинофілів [Hirai et al, 2001; Gervais et al, (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108: 982-988]. Ґрунтуючись на цих фактах, можна зробити висновок, що протидія PGD₂ у CRTH2-рецепторі є привабливим підходом для лікування запальної складової Th2-залежних алергічних захворювань, наприклад, астми, алергічного риніту й atopічного дерматиту.

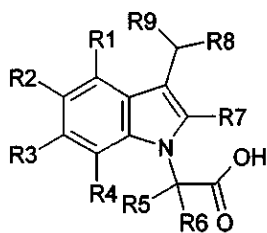
У EP-A-1170594 запропонований спосіб, який може бути використаний для ідентифікації сполук, корисних при лікуванні алергічної астми, atopічного дерматиту, алергічного риніту, аутоімунної хвороби, реперфузійної травми і ряду запальних станів, причому усі вони опосередковані дією PGD₂ у CRTH2-рецепторі.

Сполуки, що зв'язуються з CRTH2, розкриті в WO-A-03066046 і WO-A-03066047. Ці сполуки не є новими, але були розкриті вперше поряд з аналогічними сполуками в GB 1356834, GB 1407658 і GB 1460348, де вони були заявлені як такі, що мають протизапальну, болезаспокійливу і жарознижуючу дію. У WO-A-03066046 і WO-A-03066047 розкриті сполуки, які є модуляторами активності CRTH2-рецептора і, таким чином, корисні при лікуванні або попередженні обструктивних захворювань дихальних шляхів, наприклад, астми, хронічного обструктивного захворювання легень (COPD) і ряду інших хвороб, що включають різні стани кісток і суглобів, шкіри й очей, шлунково-кишкового тракту, центральної і периферичної нервової системи й інших тканин, а також відторгнення алотрансплантату.

PL 65781 і JP 43-24418 також відносяться до похідних індолу, що по своїй структурі аналогічні індометацину і, подібно індометацину, заявлені як такі, що мають протизапальну і жарознижуючу дію. Таким чином, хоча це і не могло бути оцінене на момент опублікування цих документів, описані сполуки являють собою інгібітори COX, тобто активності, яка цілком відрізняється від активності сполук, запропонованих відповідно до даного винаходу. Дійсно, інгібітори COX протипоказані при лікуванні багатьох хвороб і станів, наприклад, астми і запальних захворювань кишечника, для яких сполуки відповідно до даного винаходу є корисними, хоча вони і можуть іноді використовуватися для лікування артрогенних станів.

Нами було відкрито, що деякі похідні індолу, у яких азот індолу заміщується карбоною кислотною складовою, є антагоністами PGD₂ у CRTH2-рецепторі і корисні при здійсненні способу лікування захворювань і станів, опосередкованих PGD₂ у CRTH2-рецепторі, причому спосіб включає введення пацієнтові, що потребує такого лікування, підходящої кількості однієї з таких сполук.

Таким чином, відповідно до першого аспекту даного винаходу запропонована сполука загальної формули (I):



I

де
R¹, R², R³ і R⁴ - незалежно водень, галоген, алкіл C₁-C₆, -O(алкіл C₁-C₆), -CON(R¹¹)₂, -SOR¹¹, -SO₂R¹¹, -SO₂N(R¹¹)₂, -N(R¹¹)₂, -NR¹¹COR¹¹, -CO₂R¹¹, -COR¹¹, -SR¹¹, -OH, -NO₂ або -CN;
кожна R¹¹ - незалежно водень або алкіл C₁-C₆;

R^5 і R^6 - кожна незалежно водень або алкіл C_1-C_6 або разом з атомом вуглецю, до якого вони прикріплені, утворюють циклоалکیلну групу C_3-C_7 ;

R^7 - водень або алкіл C_1-C_6 ;

R^8 - складова ароматичного ряду, необов'язково заміщена одним або більше замісниками, вибраними з галогену, алкілу C_1-C_6 , алкілу $-O(C_1-C_6)$, $-\text{CON}(R^{11})_2$, $-\text{SOR}^{11}$, $-\text{SO}_2R^{11}$, $-\text{SO}_2N(R^{11})_2$, $-N(R^{11})_2$, $-\text{NR}^{11}\text{COR}^{11}$, $-\text{CO}_2R^{11}$, $-\text{COR}^{11}$, $-\text{SR}^{11}$, $-\text{OH}$, $-\text{NO}_2$ або $-\text{CN}$;

де R^{11} - як це визначено вище;

R^9 - водень або алкіл C_1-C_6 ;

за умови, що:

R^8 не є фенілом, заміщеним $-\text{COOH}$;

коли будь-які дві з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 - водень, жодна з інших пар з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 не є алкілом C_3-C_6 ;

або її фармацевтично прийнятна сіль, гідрат, сольват, комплекс або проліки;

у приготуванні засобу для лікування або попередження алергічної астми, постійного алергічного риніту, сезонного алергічного риніту, atopічного дерматиту, контактної гіперчутливості (включаючи контактний дерматит), кон'юнктивіту, особливо алергічного кон'юнктивіту, еозинофільного бронхіту, харчової алергії, еозинофільного гастроентериту, запального захворювання кишечника, виразкового коліту і хвороби Крона, мастоцитозу, а також інших PGD_2 -опосередкованих хвороб, наприклад, аутоімунних захворювань, наприклад, синдрому IgE-гіперімунноглобулінемії і системного червоного вовчачка, псоріазу, запалення сальних залоз, розсіяного склерозу, відторгнення алотрансплантату, реперфузійної травми, хронічного обструктивного легеневого захворювання, а також, у деяких випадках, ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту й остеоартриту.

WO-A-9950268, WO-A-0032180, WO-A-0151849 і WO-A-0164205 усі відносяться до сполук, які аналогічні сполукам загальної формули (I). Однак ці сполуки заявлені як інгібітори альдозоредуктази, що корисні при лікуванні цукрового діабету (WO-A-9950268, WO-A-0032180 і WO-A-0164205), або як гіпоурикемічний засіб (WO-A-0151849). У будь-якому з цих документів відсутня вказівка на те, що ці сполуки могли б бути корисними для лікування хвороб і станів, опосередкованих PGD_2 у CRTH2 -рецепторі. Переважні сполуки, описані в цих документах з попереднього рівня техніки, головним чином, мають бензотіазольний замісник в положенні, еквівалентному R^8 загальної формули (I).

US 4,363,912 відноситься до сполук, аналогічних запропонованим відповідно до даного винаходу і заявлених як інгібітори синтетази тромбосану і як корисні при лікуванні таких станів, як тромбоз, ішемічна хвороба серця й інсульт. Ці сполуки мають піридинну групу в положенні, еквівалентному R^8 загальної формули (I).

WO-A-9603376 відносяться до сполук, що заявлені як інгібітори sPLA_2 , які корисні при лікуванні бронхіальної астми й алергічного риніту. Усі ці сполуки мають амідні або гидразидні замісники замість похідного карбонової кислоти в сполуках відповідно до даного винаходу.

JP 2001247570 відноситься до способу одержання 3-бензотіазолметиліндолоцтової кислоти, яка заявлена як інгібітор альдозоредуктази.

US 4,859,692 відноситься до сполук, що заявлені як антагоністи лейкотрієну, які корисні при лікуванні таких станів, як астма, сінна лихоманка й алергічний риніт, а також запальних станів, наприклад, бронхіту, atopічної і ектопічної екземи. Сполуки, описані в цьому документі, аналогічні сполукам загальної формули (I), але загальна формула (I) конкретно виключає сполуки, у яких R^8 - феніл, заміщений групою $-\text{COOH}$, який є єдиною ділянкою сполучення. Крім того, у публікації J. Med. Chem., 6(33), 1781 - 1790 (1990), авторами якої є автори згаданої попередньої патентної заявки, говориться про те, що сполуки з оцтовокислою групою на азоті індолу не мають значної пептидолейкотрієнової активності. З урахуванням цього, найбільший подив викликає той факт, що сполуки відповідно до винаходу, які усі мають оцтовокислу групу на азоті індолу, виявилися корисними при лікуванні таких станів, як астма, сінна лихоманка й алергічний риніт.

US 4,273,782 відноситься до сполук, аналогічних сполукам загальної формули (I), які заявлені як корисні при лікуванні таких станів як тромбоз, ішемічна хвороба серця, минуле порушення мозкового кровообігу, мігрень і судинні ускладнення, викликані діабетом. У цьому документі немає жодного згадування про стани, опосередковані дією PGD_2 у CRTH2 -рецепторі. Усі сполуки цього відомого з попереднього рівня техніки документа мають імідазольну групу в положенні, еквівалентному R^8 загальної формули (I).

US 3,557,142 відноситься до 3-заміщених 1-індолкарбонових кислот і складних ефірів, які заявлені як корисні при лікуванні запальних станів.

WO-A-03/097598 відноситься до сполук, які є антагоністами CRTH2 -рецептора. Вони не мають замісника ароматичного ряду в положенні, еквівалентному R^8 загальної формули (I).

Публікація Cross et al, J. Med. Chem. 29, 342-346 (1986) відноситься до способу приготування сполук, аналогічних сполукам загальної формули (I), з відповідних складних ефірів, аналогічних сполукам загальної формули (II). Ці сполуки оголошені як інгібітори тромбосан-синтетази й усі мають імідазольну групу в положенні, еквівалентному R^8 загальної формули (I).

EP-A-0539117 відноситься до антагоністів лейкотрієну, які аналогічні по своїй структурі сполукам загальної формули (I).

US 2003/0153751 відноситься до сполук, які є інгібіторами sPLA_2 . Незважаючи на те, що їхня структурна формула охоплює сполуки, які аналогічні сполукам загальної формули (I), усі підтверджені прикладами сполуки мають громіздкі замісники в 2- і 5-положеннях індольної системи і, таким чином, дуже відрізняються від сполук відповідно до даного винаходу.

У US 2004/011648 розкриті сполуки, які аналогічні сполукам загальної формули (I) і які є інгібіторами РАН. У цьому документі відсутня вказівка на те, що ці сполуки могли б мати активність антагоніста CRTH2 .

WO 2004/058164 відноситься до сполук, які заявлені як модулятори астми й алергічного запалення. Єдині сполуки, у відношенні яких вказується активність, зовсім відрізняються по своїй структурі від сполук загальної формули (I).

Сполуки, що зв'язуються з CRTH2-рецептором, розкриті в WO-A-03/097042 і WO-A-03/097598. Ці сполуки являють собою індолілоцтові кислоти, але в WO-A-03/097042 індолева система розчиняється в 2- і 3-положеннях 5- -7-членного карбоксильного кільця. В WO-A-03/097042 в 3-положенні індолу знаходиться піролідінова група.

WO-A-03/101981 і WO-A-03/101961 обидві відносяться до сполук, які заявлені як антагоністи CRTH2, але які відрізняються за своєю структурою від сполук загальної формули (I), оскільки є група -S або -SO₂, що зв'язана з 3-положенням індолу замість групи CH₂ сполук загальної формули (I).

У даному описі "алкіл d-Ce" відноситься до насиченого вуглеводню з нерозгалуженим або розгалуженим ланцюгом, що має від одного до шести атомів вуглецю і необов'язково заміщений одним або більше галоїдних замісників або однією або більше циклоалкілними групами C₃-C₇. Приклади включають метил, етил, n-пропіл, ізопропіл, t-бутил, n-гексил, трифторметил, 2-хлоретил, метилениклопропіл, метилениклобутил і метилениклопентил.

"Алкіл C₁-C₄" і "алкіл C₁-C₁₈" мають такі ж значення за винятком того, що вони містять від одного до чотирьох і від одного до вісімнадцяти атомів вуглецю відповідно.

Циклоалкіл C₃-C₇ відноситься до насиченого 3- -7-членного карбоциклічного кільця. Приклади таких груп включають циклопропіл, циклобутил, циклопентил і циклогексил.

У даному описі "галоген" відноситься до фтору, хлору, бромов або йоду.

Терміни "складова ароматичного ряду" і "арил" у контексті даного опису відносяться до системи ароматичних кілець, що має в кільці від 5 до 14 атомів вуглецю й містить до трьох кілець, одне або більше з яких може бути замінене атомом азоту, кисню або сірки. Прикладами складової ароматичного ряду є системи бензольного, піридинового, нафталінового, біфенільного, хінолінового, ізохінолінового, хіназолінового, тіазольного, бензотіазольного, бензоксазолінового, бензімідазолінового, індолю, індазолінового і імідазолінового кілець.

Підходящі фармацевтично і ветеринарно прийнятні солі сполук загальних формул (I) і (II) включають основні солі приєднання, наприклад, натрію, калію, кальцію, алюмінію, цинку, магнію, і інші солі металів, а також холіну, діетаноламіну, етаноламіну, етилдіаміну й інші добре відомі основні солі приєднання.

У тих випадках, коли це доцільно, фармацевтично і ветеринарно прийнятні солі можуть також включати солі органічних кислот, особливо карбонових кислот, включаючи, але не обмежуючись ними, трифторацетат, лактат, глюконат, цитрат, тартрат, малеат, малат, пантотенат, адипат, альгінат, аспарат, бензоат, бутират, диглюконат, циклопентанат, глюкопентанат, гліцерофосфат, оксалат, гептаноат, гексаноат, фумарат, нікотинат, памоат, пектинат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, тартрат, лактобіонат, піволат, камфорат, ундеканат і сукцинат, органічних сульфонових кислот, наприклад, метансульфонат, етансульфонат, 2-гідроксіетансульфонат, камфорсульфонат, 2-нафталінсульфонат, p-хлорбензолсульфонат і p-толуолсульфонат; і неорганічних кислот, наприклад, хлоргідрат, бромгідрат, сульфат, бісульфат, хемісульфат, тіоціанат, персульфат, фосфорна і сульфонева кислоти.

Солі, які є фармацевтично або ветеринарно неприйнятними, усе-таки можуть являти цінність як проміжні продукти.

Проліки являють собою будь-які ковалентно зв'язані сполуки, що вивільняють активну вихідну лікарську речовину відповідно до загальної формули (I) in vivo. Приклади проліків включають складні алкілові ефіри сполук загальної формули (I), наприклад, складні ефіри загальної формули (II), представленої нижче.

Якщо в сполуці відповідно до винаходу є присутнім хіральний центр або яка-небудь інша форма ізомерного центру, передбачається, що усі форми такого ізомеру або ізомерів, включаючи енантіомери і діастереоізомери, у даному описі охоплені. Сполуки відповідно до винаходу, що містять хіральний центр, можуть бути використані як рацемічна суміш, енантіомерно збагачена суміш, може бути збагачена з використанням добре відомої технології, у результаті чого може бути використаний окремий енантіомер.

У сполуках загальної формули (I) наведені нижче групи, незалежно або в комбінації, переважно представляють:

R¹ - галоген або водень;

R² - галоген або водень;

R³ - галоген або водень;

R⁴ - галоген або водень.

У більш переважних сполуках R¹, R³ і R⁴ - водень, а R² - галоген, зокрема фтор.

У переважних сполуках загальної формули (I) кожна з R⁵ і R⁶ - незалежно водень або алкіл C₁-C₄. Однак у більш активних сполуках, щонайменше, одна, а переважно обидві R⁵ і R⁶, - водень.

Аналогічним чином, переважно R⁹ - водень або алкіл C₁-C₄, найбільше переважно водень.

Сполуки загальної формули (I) переважно мають групу R⁷, вибрану з H або алкілу C₁-C₆; найбільш підходящим варіантом є той, коли R⁷ - метил.

У переважних сполуках загальної формули (I) R⁸ - феніл, нафталініл, хінолініл, хіноксалініл, тіазоліл, біфеніл або бензотіазоліл, кожний з яких може необов'язково бути заміщений одним або більше замісниками, як це визначено вище.

Більш конкретно, переважно, щоб R⁸ була фенілом, що заміщений в 4-положенні, або нафталін-2-ілом, хінолін-2-ілом, хіноксалін-2-ілом, тіазол-2-ілом або бензотіазол-2-ілом, кожний з яких може необов'язково бути заміщений одним або більше замісниками, як це визначено вище.

Коли R⁸-складова заміщена, переважні замісники включають галоген, алкіл C₁-C₄, галогеналкіл C₁-C₄, алкокси, алкілсульфоніл C₁-C₄ і гідрокси.

Особливо переважні замісники для R⁸-складової включають хлор, фтор, метил, етил, t-бутил, трифторметил, метокси, метилсульфоніл і гідрокси.

Серед найбільш переважних сполук присутні такі:

1. {3-[1-(4-хлорфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота

2. {5-фтор-2-метил-3-[1-(4-трифторметилфеніл)-етил]-індол-1-іл]-оцтова кислота

3. {3-[1-(4-трет-бутилфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 4. {5-фтор-3-[1-(4-метансульфонілфеніл)-етил]-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 5. [5-фтор-2-метил-3-(1-нафталін-2-ілетил)-індол-1-іл]-оцтова кислота
 6. (5-фтор-2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 7. (5-фтор-2-метил-3-нафталін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 8. [5-фтор-3-(8-гідроксихінолін-2-ілметил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 9. (5-фтор-2-метил-3-хіноксалін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 10. [5-фтор-3-(4-метоксибензил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 11. етиловий ефір (5-фтор-2-метил-3-тіазол-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтової кислоти
 12. [3-(4-фторбензил)-5-фтор-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 13. (3-бензотіазол-2-ілметил-5-фтор-2-метиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 14. [5-фтор-2-метил-3-(4-трифторметилбензил)-індол-1-іл]-оцтова кислота
 15. [5-фтор-2-метил-3-(4-трет-бутилбензил)-індол-1-іл]-оцтова кислота
 16. (3-біфеніл-4-ілметил-5-фтор-2-метиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 17. [5-фтор-3-(4-метансульфонілбензил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 18. [5-фтор-3-(6-фторхінолін-2-ілметил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 19. (±)-3-(1-бензотіазол-2-ілетил)-5-фтор-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
 20. [3-(4,5,7-трифторбензотіазол-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтова кислота (лідорестат)
 21. (2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота
 22. (5-фтор-2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота;
- або складні алкілові C_1-C_6 , арилові, алкілові $(CH_2)_mOC(=O)C_1-C_6$, $(CH_2)_m(R^{13})_2$, $CH((CH_2)_m(C=O)R^{14})_2$ ефіри будь-якої зі згаданих вище сполук; де
- m - 1 або 2;
 R^{13} - водень або метил;
 R^{14} - алкіл C_1-C_{18} .

Незважаючи на те, що деякі сполуки загальної формули (I) відомі з попереднього рівня техніки, інші представляють новий вибір, оскільки вони не підтверджені прикладами, а групи в положенні R^8 не зазначені як переважні. Крім того, ці сполуки, як це не дивно, показані в даному винаході як такі, що мають активність як антагоністи PGD_2 у $CPTH2$ -рецепторі.

Таким чином, відповідно до додаткового аспекту даного винаходу запропонована сполука загальної формули (I), де $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ і R^9 - як це визначено вище, а R^8 -фенільна, нафталінільна, тіазольна, біфенільна, хінолінільна або хіноксалінільна група, будь-яка з яких може бути заміщена одним або більше замісниками з галогенів, алкільних C_1-C_6 , алкільних $-O(C_1-C_6)$, $-SO_2R^{11}$ або $-OH$ груп;

за умови, що:

R^8 не є незаміщеним фенілом або фенілом, заміщеним $-COOH$;

якщо будь-які дві з R^1, R^2, R^3 і R^4 - водень, жодна з інших пар з R^1, R^2, R^3 і R^4 не є алкілом C_3-C_6 ;

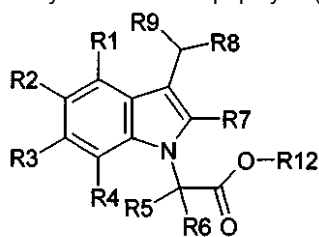
коли усі з R^1, R^2, R^3 і R^4 - водень, R^8 не є 4-хлорфенілом.

У цих нових сполуках переважними групами R^8 є феніл, що заміщений в 4-положенні, або нафталін-2-іл, хінолін-2-іл, хіноксалін-2-іл або тіазол-2-іл, а переважними замісниками для цих груп є хлор, фтор, метил, етил, t-бутил, трифторметил, метокси, метансульфоніл і гідрокси.

Переважними групами $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ і R^9 є, як це визначено вище.

Серед найбільш переважних нових сполук сполуки, зазначені вище під номерами 19, 21 і 22, складають додатковий аспект даного винаходу. Сполука 20 розкрита в WO-A-9950268.

Сполука загальної формули (I) може бути отримана in vivo із проліків. Такими проліками може бути сполука загальної формули (II):



II

де $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8$ і R^9 - як це описано вище для загальної формули (I); R^{12} - алкіл C_1-C_6 , арил, алкіл $(CH_2)_mOC(=O)C_1-C_6$, $(CH_2)_m(R^{13})_2$, $CH((CH_2)_m(C=O)R^{14})_2$;

m - 1 або 2;

R^{13} - водень або метил;

R^{14} - алкіл C_1-C_{18} .

Таким чином, відповідно до додаткового аспекту даного винаходу запропонована сполука загальної формули (II), як це визначено вище, у приготуванні засобу для лікування або попередження захворювань і станів, опосередкованих PGD_2 у $CPTH2$ -рецепторі.

Приклади особливо підходящих груп R^{12} , коли сполука загальної формули (II) використовується як проліки, включають:

метил, етил, пропіл, феніл, $CH_2OC(=O)tBu$, $CH_2CH_2N(Me)_2$, $CH_2CH_2NH_2$ або $CH(CH_2O(C=O)R^{14})_2$, де R^{14} - як це визначено вище.

Сполуки загальної формули (II), де R^8 - фенільна, нафталінільна, біфенільна, хінолінільна або хіноксалінільна група, будь-яка з яких може бути заміщена одним або більш замісниками з галогенів, алкільних C_1-C_6 ,

алкільних $-O(C_1-C_6)$, $-SO_2R^{11}$ або $-OH$ груп;

за умови, що:

R^8 не є незаміщеним фенілом або фенілом, заміщеним $-COOH$;

коли будь-які дві з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 - водень, жодна з інших пар з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 не є алкілом C_3-C_6 ;

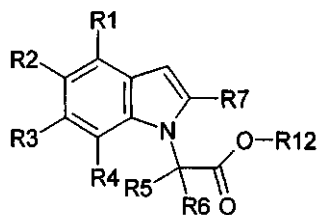
коли усі з R^1 , R^2 , R^3 і R^4 - водень, R^8 не є 4-хлорфенілом; є новими.

Деякими найбільш переважними сполуками загальної формули (II) є складні алкільові C_1-C_6 , арилові, алкільові $(CH_2)_mOC(=O)C_1-C_6$, $(CH_2)_m(R^{13})_2$, $CH((CH_2)_m(C=O)R^{14})_2$ ефіри сполук, зазначених вище під номерами 1-19, де m , R^{13} і R^{14} - як це визначено вище.

Коли сполука загальної формули (II) діє як проліки, воно пізніше трансформується в ліки під дією естерази в крові або в тканині пацієнта.

Як описано в WO-A-9950268, сполуки загальної формули (I) можуть бути приготовлені зі сполук загальної формули (II), де R^{12} - алкіл C_1-C_6 , шляхом гідролізу лугом, наприклад, гідроксидом натрію або літію. Реакція може мати місце у водному розчиннику або органічному розчиннику або в їхній суміші. Типовим розчинником, використовуваним для проведення реакції, є суміш тетрагідрофурану і води.

Сполуки загальної формули (II) можуть бути приготовлені зі сполук загальної формули (III):



III

де R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 і R^7 - як це визначено в загальній формулі (I), а R^{12} - як це визначено в загальній формулі (II); шляхом проведення реакції зі сполукою загальної формули (IV):

$R^9C(=O)R^8$ (IV)

де R^9 - як це визначено для загальної формули (I);

в умовах кислотного відновного алкілювання. Сполуки загальних формул (III) і (IV) завжди доступні або можуть бути приготовлені способами, добре відомими фахівцям.

Інші способи готування сполук загальних формул (I) і (II) описані в WO-A-9950268 і WO-A-0151489.

Сполуки загальної формули (I) є антагоністами PGD_2 у $CRTH2$ -рецепторі, а сполуки загальної формули (II) є проліками для сполук загальної формули (I). Таким чином, сполуки загальних формул (I) і (II) корисні при здійсненні способу лікування захворювань і станів, опосередкованих PGD_2 у $CRTH2$ -рецепторі, причому зазначений спосіб включає введення пацієнтові, що потребує такого лікування, підходящої кількості сполуки загальної формули (I) або (II).

Відповідно до додаткового аспекту даного винаходу запропонована нова сполука загальної формули (I) або (II) для використання в медицині, зокрема, для використання при лікуванні або попередженні захворювань і станів, опосередкованих PGD_2 у $CRTH2$ -рецепторі.

Як було згадано вище, до таких захворювань і станів відносяться алергічна астма, постійний алергічний риніт, сезонний алергічний риніт, атопічний дерматит, контактна гіперчутливість (включаючи контактний дерматит), кон'юнктивіт, особливо алергічний кон'юнктивіт, еозинофільний бронхіт, харчова алергія, еозинофільний гастроентерит, запальне захворювання кишечника, виразковий коліт і хвороба Крона, мастоцитоз, а також інші PGD_2 -опосередковані захворювання, наприклад, аутоімунні захворювання, наприклад, синдром IgE-гіперімунноглобулінемії і системний червоний вовчак, псоріаз, запалення сальних залоз, розсіяний склероз, відторгнення алотрансплантату, реперфузійна травма, хронічне обструктивне легеневе захворювання, а також, у деяких випадках, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит і остеоартрит.

Приготування лікарських засобів на основі сполук загальної формули (I) або (II) повинне здійснюватися відповідним чином у залежності від виду захворювань або станів, які вони покликані лікувати.

Таким чином, відповідно до додаткового аспекту даного винаходу запропонована фармацевтична композиція, що містить нову сполуку загальної формули (I) або (II) разом з фармацевтичним наповнювачем або носієм. Можуть бути присутніми також і інші активні речовини, застосування яких може бути знайдене доцільним або бажаним у відношенні захворювання або стану, що підлягає лікуванню.

Носій або, якщо є присутніми кілька носіїв, кожний з носіїв повинний бути прийнятний з погляду його сумісності з іншими інгредієнтами лікарської форми і не заподіювати шкоди реципієнтові.

Лікарські форми включають такі з них, що придатні для орального, ректального, назального, бронхіального (інгальованого), локального (включаючи очні краплі, трансбукальне і сублінгвальне введення), вагінального або парентерального (включаючи підшкірне, внутрішньом'язове, внутрішньовенне і внутрішньошкірне введення) застосування, і можуть бути приготовлені будь-якими способами, добре відомими в області фармацевтики.

Схема прийому буде залежати від стану, який підлягає лікуванню, однак переважні композиції складаються для орального, назального, бронхіального або локального застосування.

Композиція може бути приготовлена шляхом об'єднання згаданої вище активної речовини з носієм. Взагалі, лікарські форми приготуються шляхом рівномірного і тісного об'єднання активної речовини з рідкими носіями або дрібноподрібленими твердими носіями або з тими й іншими одночасно, а потім, якщо це необхідно, формується продукт. Даний винахід охоплює способи готування фармацевтичної композиції на основі нової сполуки загальної формули (I) або (II) у сполученні або комбінації з носієм або наповнювачем,

прийнятним з фармацевтичної або ветеринарної точки зору.

Лікарські форми для орального застосування відповідно до даного винаходу можуть бути присутніми у вигляді: дискретних одиниць, наприклад, капсул, саше або таблеток, кожна з яких містить задану кількість активної речовини; у вигляді порошку або гранул; у вигляді розчину або суспензії активної речовини у водному рідкому або безводному рідкому середовищі; або у вигляді рідкої емульсії олії у воді або у вигляді рідкої емульсії води в олії; або у вигляді болюса і так далі.

Для композицій для орального застосування (наприклад, таблеток і капсул) термін "прийнятний носій" включає такі загальновідомі наповнювачі, як, наприклад, зв'язуючі засоби, наприклад, сироп, гуміарабік, желатин, сорбіт, трагакант, полівінілпіролідон (Провідон (Povidone)), метилцелюлозу, етилцелюлозу, натрієву карбоксиметилцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу, сахарозу і крохмаль; такі наповнювачі і носії, як, наприклад, кукурудзяний крохмаль, желатин, лактозу, сахарозу, мікрокристалічну целюлозу, каолін, манітол, дикальційфосфат, хлорид натрію й альгінову кислоту; і змазувальні засоби, наприклад, стеарат магнію, стеарат натрію і стеарати інших металів, гліцеринстеарат стеаринової кислоти, силікон, воски на основі тальку, олії і колоїдальний діоксид кремнію. Можуть бути також використані смакові добавки, наприклад, перцева м'ята, вінтергрінова олія, вишнева есенція тощо. Може виявитися бажаним використання підфарбовуючого засобу з метою швидкої ідентифікації дозованої форми. Таблетки можуть бути також постачені покриттям способами, добре відомими в даній області техніки.

Таблетка може бути виготовлена методом пресування або формування, при необхідності з одним або більше допоміжними інгредієнтами. Пресовані таблетки можуть бути приготовлені у відповідній машині шляхом пресування активної речовини у вільно поточній формі, наприклад, у вигляді порошку або гранул, при необхідності змішаних зі сполучним засобом, змазувальним засобом, інертним розріджувачем, консервантом, поверхнево-активною або диспергуючою речовиною. Формовані таблетки можуть бути виготовлені у відповідній машині шляхом формування суміші порошкоподібної сполуки й інертного рідкого розріджувача. Таблетки можуть при необхідності бути постачені покриттям або шорсткістю і можуть бути приготовлені таким чином, щоб забезпечувати уповільнене або регульоване вивільнення активної речовини.

Інші лікарські форми, придатні для орального застосування, включають коржики, що містять активну речовину в смаковій добавці, як правило, у сахарозі і гуміарабіку або трагаканті; пастилки, що містять активну речовину в інертній основі, наприклад, у желатині або гліцерині, або у сахарозі і гуміарабіку; і засоби для полоскання рота, що містять активну речовину в підходящому рідкому носії.

Для локального застосування на шкірі сполуки загальної формули (I) або (II) можуть бути виготовлені у вигляді крему, мазі, желе, розчину або суспензії і так далі. Лікарські форми у вигляді крему або мазі, які можуть бути використані, являють собою звичайні лікарські форми, добре відомі в даній області техніки, наприклад, як це описано в стандартних посібниках з фармацевтики, наприклад, у British Pharmacopoeia (Британська фармакопея).

Сполуки загальної формули (I) або (II) можуть бути використані для лікування дихальних шляхів шляхом назального, бронхіального або трансбукального введення, наприклад, аерозолей або розчинів, які розпилюються, що можуть диспергувати фармакологічний активний інгредієнт у вигляді порошку або у вигляді крапель розчину або суспензії. Фармацевтичні композиції з властивостями диспергування порошку, як правило, містять, крім активного інгредієнта, рідкий витісняючий засіб із точкою кипіння нижче кімнатної температури і, якщо це бажано, допоміжні засоби, наприклад, рідкі або тверді неіоногенні або аніоногенні поверхнево-активні речовини і/або розріджувачі. Фармацевтичні композиції, у яких фармакологічний активний інгредієнт знаходиться в розчині, містять, крім цього, підходящий витісняючий засіб, і, крім того, якщо це необхідно, додатковий розчинник і/або стабілізуючий засіб. Замість витісняючого засобу може бути використане також стиснене повітря: з цією метою для його одержання можна використовувати підходящий компресорно-сильфонний пристрій.

Парентеральні лікарські форми взагалі будуть стерильними.

Як правило, доза сполуки буде складати приблизно від 0,01 до 100 мг/кг для того, щоб підтримувати концентрацію лікарського засобу в плазмі на рівні, що забезпечує ефективне інгібування PGD₂ у CRTH2-рецепторі. Точна кількість сполуки загальної формули (I) або (II), яка є терапевтично ефективною, і схема найкращого його введення легко визначаються середнім фахівцем шляхом порівняння рівня вмісту речовини в крові з її концентрацією, що вимагається для забезпечення терапевтичного ефекту.

Сполуки загальної формули (I) або (II) можуть бути використані в комбінації з однією або більше активних речовин, які корисні при лікуванні зазначених вище захворювань і станів, хоча такі активні речовини і не є обов'язково інгібіторами PGD₂ у CRTH2-рецепторі.

Таким чином, описана вище фармацевтична композиція може додатково містити одну або більше з цих активних речовин.

Запропоноване також використання сполуки загальної формули (I) або (II) у приготуванні засобу для лікування захворювань і станів, опосередкованих PGD₂ у CRTH2-рецепторі, відповідно до якого цей засіб містить також додаткову активну речовину, корисну для лікування таких захворювань і станів.

До числа таких додаткових активних речовин, що можуть мати зовсім інший принцип дії, відносяться вже існуючі препарати для лікування алергійних і інших запальних захворювань, що включають:

- агоністи β_2 , наприклад, салметерол;
- кортикостероїди, наприклад, флутиказон;
- антигістаміни, наприклад, лоратидин;
- антагоністи лейкотрієну, наприклад, монтелукаст;
- препарати на основі антитіл проти IgE, наприклад, омалізумаб;
- протиінфекційні препарати, наприклад, фузидова кислота (особливо для лікування атонічного дерматиту);
- протигрибкові препарати, наприклад, клотримазол (особливо для лікування atopічного дерматиту);
- імуносупресанти, наприклад, такролімус і особливо пімекролімус у випадку запального захворювання шкіри.

Антагоністи CRTH2 можуть бути також об'єднані з препаратами, що у даний час розробляються для запальних показань і включають:

інші антагоністи PGD₂, що діють в інших рецепторах, наприклад, DP антагоністи;

інгібітори фосфодіестерази 4 типу, наприклад, цилоніласт;

лікарські препарати, які модулюють продукування цитокіну, наприклад, інгібітори TNF-ферменту, що конвертує, (TACE);

лікарські препарати, які модулюють активність Th2-цитокінів IL-4 і IL-5, наприклад, блокуючі моноклональні антитіла і розчинні рецептори;

агоністи PPAR- α , наприклад, розіглітазон;

інгібітори 5-ліпоксигенази, наприклад, зилейтон.

Відповідно до ще одного аспекту даного винаходу запропонований продукт, що містить нову сполуку загальної формули (I) або (II) і одну або більше зазначених вище речовин у вигляді комбінованої лікарської форми для одночасного, роздільного або послідовного використання при лікуванні захворювання або стану, опосередкованого дією PGD₂ у CRTH2-рецепторі.

Нижче представлений більш докладний опис даного винаходу з посиланнями на приклади, що не є обмежуючим чинником.

Приклад 1 - Приготування сполук 1-19

1. Етиловий ефір {3-[1-(4-хлорфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл}-оцтової кислоти

Триетилсилан (0,34мл, 2,13ммоль) і трифтороцтову кислоту (0,10 мл, 1,29 ммоль) послідовно по краплях протягом 1 хвилини додали до перемішаного розчину етилового ефіру (5-фтор-2-метиліндол-1-іл)-оцтової кислоти (0,10г, 0,43ммоль) і 4-ацетилхлорбензолу (64мг, 0,41ммоль) у 1,2-дихлоретані (2мл) при 0°C. Потім суміш підігріли до кімнатної температури і піддали перемішуванню протягом 16 годин. Отриману суміш піддали концентруванню in vacuo, у результаті чого одержали залишок, який розділили між етилацетатом (10мл) і насиченим розчином бікарбонату натрію (10мл). Органічний шар відокремили, просушили і піддали концентруванню in vacuo, у результаті чого одержали залишок, який піддали очищенню методом випарної колонкової хроматографії (Flashmaster) на силікагелі з елюентом 10% етилацетат: гептан - 25% етилацетат: гептан, у результаті чого був отриманий етиловий ефір (57мг, 37%) у вигляді твердої речовини білого кольору, T_г=1,88 хвилин (92%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 374,30.

2. Сполука 1 - {3-[1-(4-хлорфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл}-оцтова кислота

Моногідрат гідроксиду літію (70мг, 1,67ммоль) однопорційно додали до перемішаного розчину етилового ефіру {3-[1-(4-хлорфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл}-оцтової кислоти (57мг, 0,15ммоль) у тетрагідрофурані:воді (5мл; 1:1) і піддали перемішуванню при кімнатній температурі протягом 2 годин. Розчин відрегулювали концентрованою хлористоводневою кислотою до pH=1, а продукт піддали екстрагуванню етилацетатом (3×10мл). Об'єднані органічні екстракти просушили і піддали концентруванню in vacuo, у результаті чого була отримана карбонова кислота (35мг, 67%) у вигляді твердої речовини не зовсім білого кольору.

δ_H (400МГц, CDCl₃) 7,26-7,21 (4H, m, Ar), 7,06 (1H, dd J 9,0, 4,2Гц, Ar), 6,97 (1H, dd J 10,0, 2,4Гц, Ar), 6,86 (1H, dt J 9,0, 2,4Гц, Ar), 4,80 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,35 (1H, q J 7,3Гц, CHCH₃), 2,29 (3H, s, CH₃), 1,73 (3H, d J 7,3Гц, CHCH₃); T_г=1,73 хвилин (90%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 346,09.

Сполуки 2-19, 21 і 22 були приготовлені з використанням методики, аналогічної застосовуваної для сполуки 1, але з вихідними матеріалами, підібраними відповідним чином.

Сполука 2 - {5-фтор-2-метил-3-[1-(4-трифторметилфеніл)-етил]-індол-1-іл}-оцтова кислота

δ_H (400МГц, CDCl₃) 7,50 (2H, d J 8,3 Гц, Ar), 7,39 (2H, d J 8,3Гц, Ar), 7,07 (1H, dd J 8,8, 4,1Гц, Ar), 6,98 (1H, dd J 10,0, 2,5Гц, Ar), 6,85 (1H, dt J 9,0, 2,5Гц, Ar), 4,80 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,42 (1H, q J 7,1Гц, CHCH₃), 2,29 (3H, s, CH₃), 1,77 (3H, d J 7,3Гц, CHCH₃); T_г=1,65 хвилин (96%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 380,15.

Сполука 3 - {3-[1-(4-трет-бутилфеніл)-етил]-5-фтор-2-метиліндол-1-іл}-оцтова кислота

δ_H (400МГц, CDCl₃) 7,32-7,21 (4H, m, Ar), 7,08-7,03 (2H, m, Ar), 6,89-6,83 (1H, m, Ar), 4,82 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,36 (1H, q J 7,3Гц, CHCH₃), 2,33 (3H, s, CH₃), 1,75 (3H, d J 7,3Гц, CHCH₃), 1,29 (9H, s, C(CH₃)₃); T_г=1,78 хвилин (97%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 368,21.

Сполука 4 - {5-фтор-3-[1-(4-метансульфонілфеніл)-етил]-2-метиліндол-1-іл}-оцтова кислота

δ_H (400МГц, CDCl₃) 7,81 (2H, d J 8,3Гц, Ar), 7,47 (2H, d J 8,1Гц, Ar), 7,06 (1H, dd J 8,8, 4,1Гц, Ar), 6,96 (1H, dd J 10,0, 2,5Гц, Ar), 6,85 (1H, dt J 9,0, 2,5Гц, Ar), 4,78 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,43 (1H, q J 7,1Гц, CHCH₃), 2,99 (3H, s, CH₃), 2,29 (3H, s, CH₃), 1,79 (3H, d J 7,3Гц, CHCH₃); T_г=1,34 хвилин (100%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 390,16.

Сполука 5 - [5-фтор-2-метил-3-(1-нафталін-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтова кислота

δ_H (400МГц, CDCl₃) 7,81-7,74 (3H, m, Ar), 7,69 (1H, d J 8,5Гц, Ar), 7,47-7,39 (2H, m, Ar), 7,39-7,33 (1H, m, Ar), 7,09-7,02 (2H, m, Ar), 6,86 (1H, dt J 9,0, 2,4Гц, Ar), 4,83 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,54 (1H, q J 7,3Гц, OCH₃), 2,32 (3H, s, CH₃), 1,86 (3H, d J 7,3Гц, CHCH₃); T_г=1,66 хвилин (97%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 362,19.

Сполука 6 - (5-фтор-2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 8,42 (1H, d J 9,0Гц, Ar), 8,23 (1H, d J 9,0Гц, Ar), 8,11 (1H, m, Ar), 7,97 (1H, m, Ar), 7,60 (1H, m, Ar), 7,51 (3H, m, Ar and Ar), 7,09 (1H, m, Ar), 5,19 (2H, s, CH₂), 4,56 (2H, CH₂), 2,63 (3H, s, CH₃); T_г=1,06 хвилин (100%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 349,35.

Сполука 7 - (5-фтор-2-метил-3-нафталін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 7,87 (4H, m, Ar), 7,47 (4H, m, Ar), 7,22 (1H, dd J 6,0, 1,5Гц, Ar), 6,91 (1H, ddd J 9,0, 2,5Гц, Ar), 5,04 (2H, s, CH₂), 4,23 (2H, s, CH₂), 2,42 (3H, s, CH₃); T_г=2,09 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 348,13.

Сполука 8 - [5-фтор-3-(8-гідроксхінолін-2-ілметил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 9,53 (1H, s, OH), 8,20 (1H, d J 8,0Гц, Ar), 7,42 (5H, m, Ar), 7,13 (1H, dd J 6,0, 1,5Гц, Ar), 6,91 (1H, dd J 9,0, 2,5Гц, Ar), 5,00 (2H, s, CH₂), 4,41 (2H, s, CH₂), 2,47 (3H, s, CH₃); T_г=1,13 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 365,12.

Сполука 9 - (5-фтор-2-метил-3-хіноксалін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 9,02 (1H, s, H-3 Ar), 8,30 (2H, m, Ar), 8,05 (2H, m, Ar), 7,53 (2H, m, Ar), 7,07 (1H, m,

Ar), 5,01 (2H, br s, CH₂), 4,64 (2H, s, CH₂), 2,64 (3H, s, CH₃); Tr=1,35 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 350,12.

Сполука 10 - [5-фтор-3-(4-метоксибензил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота
δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 7,39 (1H, m, Ar), 7,16 (3H, m, Ar), 6,91 (3H, m, Ar), 5,00 (2H, s, CH₂), 3,98 (2H, s, CH₂), 3,74 (3H, s, OCH₃), 2,36 (3H, s, CH₃); Tr=1,93 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 328,13.

Сполука 11 - етиловий ефір (5-фтор-2-метил-3-тіазол-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтової кислоти

Tr=1,09 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 305,26

Сполука 12 - [3-(4-фторбензил)-5-фтор-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота

Tr=1,63 хвилин (100%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 332,16.

Сполука 13 - [5-фтор-2-метил-3-(4-трифторметилбензил)-індол-1-іл]-оцтова кислота

Tr=1,66 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 366,06.

Сполука 14 - [5-фтор-2-метил-3-(4-трет-бутилбензил)-індол-1-іл]-оцтова кислота

Tr=1,73 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 354,21.

Сполука 15 - (3-біфеніл-4-ілметил-5-фтор-2-метиліндол-1-іл)-оцтова кислота

Tr=2,10 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 374,16.

Сполука 16 - [5-фтор-3-(4-метансульфонілбензил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота

Tr=1,35 хвилин, m/z (ES⁺)=376,05.

Сполука 17 - [5-фтор-3-(6-фторхінолін-2-ілметил)-2-метиліндол-1-іл]-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 8,20 (1H, d J 8,6Гц, Ar), 8,06 (1H, dd J 9,3, 5,6Гц, Ar), 7,70 (1H, dd J 9,4, 2,8Гц, Ar), 7,64 (1H, td J 8,8, 2,9Гц, Ar), 7,37-7,32 (2H, m, Ar), 7,26 (1H, dd J 9,9, 2,6Гц, Ar), 6,86 (1H, td J 9,2, 2,4Гц, Ar), 4,94 (2H, s, CH₂), 4,33 (2H, s, CH₂), 2,40 (3H, s, CCH₃); Tr=1,28 хвилин (100 %), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 367,50.

Сполука 18 - (2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота [3-(4,5,7-трифторбензотіазол-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 8,16 (1H, d J 8,6Гц, Ar), 8,01 (1H, d J 8,5Гц, Ar), 7,88 (1H, d J 7,6Гц, Ar), 7,74 (1H, t J 7,0Гц, Ar), 7,54 (1H, t J 7,0Гц, Ar), 7,44 (1H, d J 8,0Гц, Ar), 7,26 (2H, app t J 8,9Гц, Ar), 7,00 (1H, t J 7,3Гц, Ar), 6,90 (1H, t J 7,3Гц, Ar), 4,72 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,35 (2H, s, CH₂), 2,40 (3H, s, CH₃); Tr=1,07 хвилин (100%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 331,33.

Сполука 19 - (5-хлор-2-метил-3-хінолін-2-ілметиліндол-1-іл)-оцтова кислота

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 8,21 (1H, d J 8,4Гц, Ar), 8,00 (1H, d J 8,4Гц, Ar), 7,89 (1H, d J 8,0Гц, Ar), 7,77-7,73 (1H, m, Ar), 7,57-7,53 (2H, m, Ar), 7,40 (1H, d J 8,7Гц, Ar), 7,29 (1H, d J 8,5Гц, Ar), 7,04 (1H, dd J 8,6, 2,1Гц, Ar), 5,00 (2H, s, CH₂CO₂H), 4,35 (2H, s, CH₂), 2,41 (3H, s, CH₃); Tr=1,17 хвилин (95%), m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 365,28.

Приклад 2 - Приготування сполуки 20

1. Етиловий ефір [3-(4,5,7-трифторбензотіазол-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтової кислоти

Ця сполука була приготовлена з використанням методики, викладеної в WO-A-0151489.

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 7,75-7,69 (1H, m, Ar), 7,56 (1H, d J 7,8Гц, Ar), 7,49 (1H, s, CH), 7,43 (1H, d J 8,2Гц, Ar), 7,19 (1H, app t J 7,0Гц, Ar), 7,08 (1H, app t J 7,1Гц, Ar), 5,17 (2H, s, CH₂), 4,69 (2H, s, CH₂); 4,17 (2H, q J 7,2Гц, CH₂CH₃), 1,23 (3H, t J 7,2Гц, CH₂CH₃); Tr=1,62 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 405,15.

2. Сполука 20 - [3-(4,5,7-трифторбензотіазол-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтова кислота

Гідроксид літію (31мг, 0,74ммоль) у воді (6мл) однопорційно додали до перемішаного розчину етилового ефіру [3-(4,5,7-трифторбензотіазол-2-ілметил)-індол-1-іл]-оцтової кислоти (73мг, 0,18ммоль) у тетрагідрофурані (6мл) при кімнатній температурі. Суміш піддали перемішуванню при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, після чого розчин відрегулювали розчином 1н. хлористоводневої кислоти до pH≈3. Потім водний шар піддали екстрагуванню етилацетатом (3×10мл), а об'єднані органічні екстракти промили соляним розчином (10мл), просушили і піддали концентруванню in vacuo, у результаті чого була отримана карбонову кислота (62мг, 92%) у вигляді твердої речовини жовтого кольору.

δ_H (400МГц, d₆-DMSO) 7,76-7,69 (1H, m, Ar), 7,56 (1H, d J 8,0Гц, Ar), 7,48 (1H, s, CH), 7,43 (1H, d J 8,3Гц, Ar), 7,18 (1H, app t J 7,1Гц, Ar), 7,07 (1H, app t J 7,1Гц, Ar), 5,05 (2H, s, CH₂), 4,68 (2H, s, CH₂); Tr=1,94 хвилин, m/z (ES⁺) (M+H)⁺ 377,00.

Приклад 3 - Вимірювання активності антагоніста CRTH2 Матеріали і методи

Матеріали

Кальцієвий барвник (Calcium-3) був придбаний у Molecular Devices (Wokingham, UK). Монопольне розчиплювальне середовище було отримане від Dainippon Pharmaceuticals (Osaka, Japan). Мікрогранули Масс, завантажені анти-CD16, були від Miltenyi biotec (Bisley, планшети з лізиновим покриттям Poly-D-lysine були отримані від Greiner (Gloucestershire, UK). [³H]PGD₂ був від Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK). [³H]SQ29548 був придбаний у Perkin Elmer Life Sciences (Buckinghamshire, UK). Всі інші реагенти були отримані в Sigma-Aldrich (Dorset, UK), якщо не зазначено інше.

Методики

Клітинна культура

Клітини яєчника китайського хом'ячка трансфікували CRTH2- або DP-рецепторами (CHO/CRTH2 і CHO/DP) і утримували в культурі в умовах зволоженої атмосфери при 37°C (5% CO₂) у мінімальному підтримуючому середовищі (MEM), доповненому 10%-ною сироваткою плоду корови, 2ммоль глутаміну і 1мг мл⁻¹ активного G418. Клітини переносили кожні 2-3 дні. Для тесту на зв'язування з радіоактивним лігандом клітини приготувляли в колбах з потрійними шарами або в квадратних кюветах площиною 175см² (для готування мембран). Для тесту на мобілізацію кальцію клітини вирощували в 96-лунковому планшеті за 24 години до проведення тесту при щільності 80000 клітин на лунку. Приготування клітинних мембран

Мембрани приготувляли або з клітин CHO/CRTH2 і CHO/DP, або з тромбоцитів (як джерела TP-рецепторів). Клітини CHO, вирощені до злиття, промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином (ЗФР) і відокремлювали з використанням розчину Версена (Versene) (15мл на колбу). Коли клітини вирощували в квадратній кюветі площиною 175см², їх збирали шляхом зскрібання в ЗФР. Суспензії клітин піддавали центрифугуванню (1700об./хв, 10 хвилин, 4°C) і повторно суспендували в 15мл буферного розчину (1×HBSS, доповненого 10ммоль HEPES, pH=7,3). Потім суспензії клітин гомогенізували з використанням

установки Ultra Turrax з настроюванням 4-6 протягом 20 секунд. Гомогенат піддавали центрифугуванню при 1700об./хв протягом 10 хвилин, а надосадову рідину збирали і піддавали центрифугуванню при 20000об./хв протягом 1 години при 4°C. Отриману краплю осаду повторно суспендували в буферному розчині і зберігали при -80°C в аліквотних частках 200-500мкл. Концентрацію білка визначали методом Бредфорда (Bradford) (1976) з використанням альбуміну сироватки великої рогатої худоби як стандарт. Тромбоцити промивали шляхом центрифугування при 600хг протягом 10 хвилин і повторно суспендували в охолоджену льодом перевірочному буферному розчині (10ммоль Tris-HCl, pH=7,4, 5ммоль глюкози, 120ммоль NaCl, 10ммоль індометацину) і піддали безпосередньому центрифугуванню при 20000об./хв протягом 30 хвилин при 4°C. Отриману краплю осаду оброблювали описаним вище способом. Тести на зв'язування з радіоактивним лігандом

Експерименти на зв'язування з [³H]PGD₂ (160Кі/ммоль) проводили на мембранах, приготовлених, як це описано вище. Тести проводили в буферному розчині з кінцевим Експерименти на зв'язування з [³H]PGD₂ (160Кі/ммоль) проводили на мембранах, приготовлених, як це описано вище. Тести проводили в буферному розчині з кінцевим об'ємом 100мкл (1XHBSS/HEPES 10ммоль, pH=7,3). Клітинні мембрани (15мкг) преінкубували при кімнатній температурі з варійованою концентрацією конкуруючого ліганду протягом 15 хвилин. Потім додавали [³H]PGD₂ (моль, кінцева концентрація), і інкубування продовжували протягом ще однієї години при кімнатній температурі. Реакцію завершували шляхом додавання в кожну лунку 200мкл охолодженого льодом перевірочного буферного розчину з наступною швидкою фільтрацією через скловолоконні фільтри Whatman GF/B з використанням харвестеру клітин Unifilter Cell (PerkinElmer Life Sciences) і шестиразовим промиванням у 300мкл охолодженого льодом буферного розчину. Планшети Unifilter просушували при кімнатній температурі протягом, щонайменше, 1 години, а радіоактивність, акумульовану на фільтрах, визначали з використанням лічильника Beta Trilux (PerkinElmer Life Sciences) з наступним додаванням 40мкл Optiphase Hi-Safe 3 (Wallac) сцинтиляційної рідини. Неспецифічне зв'язування визначали в присутності 10ммоль неміченого PGD₂. Тести проводили двократно.

Результати експериментів на зв'язування радіоактивного ліганду з CRTH2- і DP-рецепторами представлені в таблицях 1 і 2.

Таблиця 1

Дані про зв'язування з радіоактивним лігандом (Кі на CRTH2-рецепторі)

Сполуки	Кі (нмоль)
Сполука 4	5±4
Сполука 6	9±3
Сполука 8	6±4
Сполука 12	11±2
Сполука 16	7±2
Сполука 17	1,3±0,6
Сполука 20 (лідорестат)	886±248

Таблиця 2

Дані про зв'язування з радіоактивним лігандом (Кі на DP-рецепторі)

Сполуки	Кі (нмоль)
Сполука 4	30440±9805
Сполука 6	17870±7290
Сполука 8	7710±1780
Сполука 12	12220±2250
Сполука 17	7740±1442
Сполука 20 (лідорестат)	3960

Зв'язування TP-рецептора з радіоактивним лігандом здійснювали на мембранах, приготовлених із тромбоцитів. 15-40Мкг білка преінкубували у варійованих концентраціях конкуруючого ліганду протягом 15 хвилин при кімнатній температурі в перевірочному буферному розчині (10ммоль Tris-HCl, pH 7,4, 5 ммоль глюкози, 120ммоль NaCl, 10ммоль індометацину). Потім додавали [³H]SQ29548 (38Кі/ммоль, 10нмоль кінцева концентрація), і інкубування продовжували протягом додаткових 30 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію завершували шляхом додавання в кожну лунку 200мкл охолодженого льодом перевірочного буферного розчину з наступною швидкою фільтрацією через скловолоконні фільтри Whatman GF/B з використанням харвестеру клітин Unifilter Cell (PerkinElmer Life Sciences) і шестиразовим промиванням 300мкл охолодженого льодом буферного розчину. Радіоактивність визначали описаним вище способом.

Усі досліджені в ході аналізу сполуки зв'язувалися з TP-рецептором з низькою афінністю (Кі>1ммоль).

Сполуки загальної формули (I) зв'язувалися з CRTH2-рецептором, експресуючим у CHO-клітинах, у межах афінності, що змінюється від досить високої до помірної. Фактично, значення Кі, які визначали в конкуренції проти [³H]PGD₂, варіювалися від 500пмоль до 1ммоль. Сполуки загальної формули (I) не мали ніякої активності (або мали дуже слабку активність) у DP- і TP-рецепторах. Вибіркова здатність сполук загальної

формули (I) до зв'язування з CRTH2-рецептором перевищувала більш ніж у 200 разів для CRTH2-рецептора їх вибірково здатність до зв'язування з DP- і TP-рецепторами.

Тест на мобілізацію кальцію

Посів клітин здійснювали в 96-лункових планшетах з лізиним покриттям Poly-D-lysine при щільності 80000 клітин на лунку і інкубували їх при 37°C протягом ночі для того, щоб клітини могли злипнутися. Потім клітини двічі промивали HBSS і інкубували протягом 1 години при 37°C у 100мкл HBSS і 100мкл кальцієвого барвника (Calcium-3) (Molecular Devices), доповненого 4ммоль пробенециду. Зміни у флуоресценції контролювали через 50-секундні інтервали з додаванням агоністу на 17 секунд з використанням установки Flexstation (Molecular Devices).

Вплив агоністів CRTH2 на мобілізацію кальцію в клітинах CHO-CRTH2

PGD₂ викликав дозозалежне збільшення внутрішньоклітинної мобілізації Ca²⁺ у клітинах CHO/CRTH2 з EC₅₀=2,4±0,5нмоль (n=3). Вплив сполук загальної формули (I) на мобілізацію кальцію, індуковану PGD₂

PCO₂-стимульований перенос Ca²⁺ цілком інгібувався сполуками загальної формули (I), а значення IC₅₀ для кожної сполуки в кальцієвому тесті було порівнянними з його значенням Ki у тесті на зв'язування з радіоактивним лігандом. Значення IC₅₀ сполук загальної формули (I) варіювалися від 5нмоль до 1мкмоль. Результати для декількох сполук загальної формули (I) представлені в таблиці 3. Збільшення доз сполук загальної формули (I) викликало дозозалежний і рівнобіжний зсув кривої реакції на дозу PGD₂ у клітинах CHO/CRTH2, свідчаючи, таким чином, про те, що ці сполуки являють собою конкуруючі антагоністи CRTH2.

Антагоністичний ефект сполук загальної формули (I) представляється вибіркоvim до CRTH2, оскільки при ATP-стимульованому переносі Ca²⁺ інгібуюча дія не спостерігалася.

Таблиця 3

Інгібування PGD₂-індукованого переносу кальцію

Сполуки	Ki (нмоль)
Сполука 4	55±18
Сполука 6	30±6
Сполука 7	38±16
Сполука 8	11±6
Сполука 10	47±8
Сполука 12	108±29
Сполука 16	64±5
Сполука 17	10±5
Сполука 20 (лідорестат)	885±96