

Даний винахід відноситься до фармацевтично активної сполуки, що інгібує вітронектиновий рецептор і є корисною при лікуванні запальних, ракових і серцевосудинних захворювань, таких як атеросклероз та рестеноз, а також захворювань, фактором яких є розсмоктування кістки, таких як остеопороз.

Інтегрини представляють собою надродину рецепторів клітинної адгезії, які є трансмембранними глікопротеїнами, що експресуються багатьма клітинами. Дані рецептори поверхневої адгезії клітин включають  $\alpha\text{IIb}/\text{IIIa}$  (фібриногеновий рецептор) і  $\alpha_v\beta_3$  (вітронектиновий рецептор). Фібриногеновий рецептор  $\alpha\text{IIb}/\text{IIIa}$  експресується на поверхні тромбоцита й опосередковує агрегацію тромбоцитів та утворення гемостатичного згустку в місці рани, що кровоточить Philips et al., Blood., 1988, 71, 831. Вітронектиновий рецептор  $\alpha_v\beta_3$  експресується на цілому ряді клітин, включаючи ендотеліальні, клітини гладких м'язів, клітини остеокластів та пухлинні клітини і, таким чином, має множинну функцій. Рецептор  $\alpha_v\beta_3$ , що експресується на мембрані клітин остеокластів, опосередковує адгезію остеокластів до кісткової матриці, що представляє собою ключову стадію в процесі розсмоктування кістки, Ross et al., J. Biol. Chem., 1987, 262, 7703. Захворюванням, що характеризується надлишковим розсмоктуванням кістки, є остеопороз. Рецептор  $\alpha_v\beta_3$ , що експресується на клітинах гладких м'язів аорти людини, опосередковує їхню міграцію в неоинтиму (внутрішню вистилку органу), що представляє собою процес, який може привести до рестенозу після кризьшкірної коронарної ангіопластики, Brown et al., Cardiovascular Res., 1994, 28, 1815. Крім того, Brooks et al., Cell, 1994, 79, 1157, показали, що антагоніст здатний промотувати зменшення пухлини за рахунок індукування апоптозу розвитку кровоносних судин. Таким чином, агенти, що блокують вітронектиновий рецептор, могли б виявитися корисними при лікуванні захворювань, таких як остеопороз, рестеноз та рак.

В даний час відомо, що вітронектиновий рецептор відноситься до трьох різних інтегринів, що позначаються як  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , Horton et al., Int. J. Exp. Pathol., 1990, 71, 741.  $\alpha_v\beta_1$  зв'язує фібронектин та вітронектин.  $\alpha_v\beta_3$  зв'язує цілий ряд лігандів, включаючи фібрин, фібриноген, ламінін, тромбоспондин, вітронектин, фактор Віллебранда (Willebrand), остеопонтин та кістковий сіалопротеїн I.  $\alpha_v\beta_5$  зв'язує вітронектин. Було показано, що вітронектиновий рецептор  $\alpha_v\beta_5$  є включеним у клітинну адгезію цілого ряду типів клітин, включаючи ендотеліальні клітини мікросудин, (Davis et al., J. Cell. Biol., 1993, 51, 206), було підтверджено його роль в ангіогенезі (розвитку кровоносних судин). Даний інтегрин експресується на кровоносних судинах грануляційної тканини рани у людини, але не в нормальній шкірі.

Відомо, що вітронектиновий рецептор зв'язується з білками кісткової матриці, що містять трипептидний повторюваний фрагмент Arg-Gly-Asp (або RGD). Таким чином, Horton et al., Exp. Cell Res., 1991, 195, 368, відкрили, що пептид, який містить RGD, та антитіло анти-вітронектинового рецептора (23C6), інгібують розсмоктування дентину і розходження клітин за допомогою остеокластів. Крім того, Sato et al., J. Cell Biol., 1990, 111, 1713 описали, що ехистатин, пептид зміїної отрути, що містить послідовність RGD, є сильним інгібітором розсмоктування кістки в тканинній культурі та інгібує приєднання остеокластів до кістки.

В даний час встановлено, що певна сполука є сильним інгібітором  $\alpha_v\beta_3$  та  $\alpha_v\beta_5$  рецепторів. Зокрема, було встановлено, що така сполука є більш сильним інгібітором вітронектинового рецептора, ніж фібриногенового рецептора.

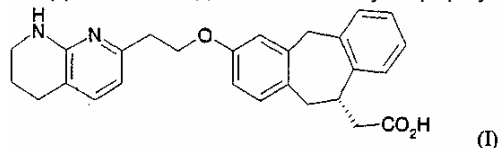
Даний винахід включає сполуку формули (I), яка описана далі, що має фармакологічну активність для інгібування вітронектинового рецептора і може використовуватись при лікуванні запальних, ракових та серцевосудинних захворювань, таких як атеросклероз та рестеноз, а також захворювань, фактором яких є розсмоктування кісток, таких як остеопороз.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що включає сполуку формули (I) і фармацевтичний носій.

Даний винахід також відноситься до способу лікування захворювань, що опосередковані вітронектиновим рецептором. У конкретному аспекті, сполука згідно з даним винаходом є корисною для лікування атеросклерозу, рестенозу, запалення, раку і захворювань, фактором яких є розсмоктування кістки, таких як остеопороз.

Даний винахід включає нову сполуку, що є більш сильним інгібітором вітронектинового рецептора, ніж фібриногенового рецептора. Нова сполука включає дибензоциклогептенове ядро, в якому в одному з ароматичних шестичленних кілець дибензоциклогептена присутній азотовмісний замісник, а аліфатичний замісник, що містить кислотний фрагмент, присутній у семичленному кільці дибензоциклогептену. Передбачається, що система дибензоциклогептенових кілець орієнтує бічні ланцюги замісників у шести- і семичленних кільцях таким чином, що вони можуть сприятливим способом взаємодіяти з вітронектиновим рецептором. Бажано, щоб між кислотною групою аліфатичного замісника в семичленному кільці дибензоциклогептену та азотом у заміснику, що містить азот одного з ароматичних шестичленних кілець дибензоциклогептену було приблизно від дванадцятих до чотирнадцятих проміжних ковалентних зв'язків по найкоротшому внутрішньомолекулярному шляху.

Даний винахід включає сполуки формули (I):



або його фармацевтично прийнятну сіль.

Сполука формули (I) інгібує зв'язування вітронектину та інших пептидів, що містять RGD, з вітронектиновим рецептором. Інгібування вітронектинового рецептора на остеокластах інгібує остеокластне розсмоктування кістки і є корисним при лікуванні захворювань, де розсмоктування кістки є патологією, а саме таких як остеопороз і остеоартрит.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу стимулювання утворення кісткової тканини, що включає введення сполуки формули (I), яка викликає збільшення вивільнення остеокальцину. Збільшення продукування кісткової тканини є безсумнівною перевагою при хворобливих станах, де спостерігається нестача мінералізованої кісткової маси або потрібне повторне моделювання кістки, таких як загоєння

перелому та профілактика переломів кісток, захворювання та метаболічні порушення, що приводять до втрати структури кістки, також виграють від такого лікування. Наприклад, введення сполуки згідно з даним винаходом може принести користь при гіперпаратиріодизмі, хворобі Пагета, гіперкальцемії злоякісної пухлини, остеолітичних патологічних змінах, викликаних кістковими метастазами, втраті кісток внаслідок іммобілізації або нестачі статевих гормонів, хвороби Беккетта, остеомалії (розм'якшенні кісток), гіперостозі та спадковому системному остеопетрозі.

Крім того, оскільки сполука згідно з даним винаходом інгібує вітронектинові рецептори на клітинах різних типів, зазначена сполука може бути корисною при лікуванні запальних захворювань, таких як ревматоїдний артрит та псоріаз, та серцево-судинних захворювань, таких як атеросклероз та рестеноз. Сполука формули (I) згідно з даним винаходом може бути корисною для лікування або профілактики інших захворювань, включаючи, але не обмежуючись ними, тромбоемболічне захворювання, астму, алергії, респіраторний дистрес-синдром (дихальна недостатність) у дорослих, хворобливий стан трансплантат-проти-хазяїна, відторгнення органа-трансплантата, септичний шок, екзему, контактний дерматит, запальне захворювання кишечника та інші аутоімунні захворювання. Сполука згідно з даним винаходом також може бути корисною для загоєння ран.

Сполука згідно з даним винаходом також є корисною для лікування, включаючи профілактику, ангіогенних захворювань. Термін «ангіогенні захворювання», як такий, що використовується у даному описі, включає стани, що передбачають аномальне неоновотворення кровоносних судин (неоваскуляризацію). У тому випадку, якщо ріст нових кровоносних судин є причиною або вносить певний внесок у патологію, зв'язану з захворюванням, інгібування ангіогенезу (розвитку кровоносних судин) буде знижувати руйнівну дію захворювання. Прикладом такого цільового захворювання є діабетична ретинопатія. Там, де ріст нових кровоносних судин потрібен для підтримки росту шкідливої тканини, інгібування ангіогенезу буде знижувати підтримку постачання тканини кров'ю і, отже, вносити певний внесок у зниження маси тканини на основі вимоги підтримки постачання кров'ю. Приклади включають ріст пухлин, де неоваскуляризація є постійною вимогою для росту пухлини і відновлення метастазів щільної пухлини. Таким чином, сполука згідно з даним винаходом інгібує ангіогенез пухлинної тканини, запобігаючи, таким чином, метастазам пухлини та росту пухлини.

Таким чином, у відповідності зі способами даного винаходу, інгібування ангіогенезу з використанням сполуки згідно з даним винаходом може зменшувати інтенсивність симптомів захворювання і, у деяких випадках, може вилікувати захворювання.

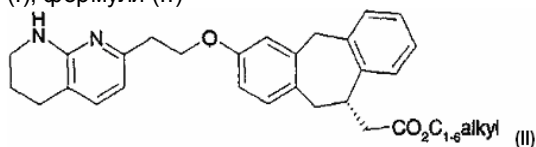
Іншою терапевтичною метою сполуки згідно з даним винаходом є захворювання ока, що характеризуються неоваскуляризацією. Такі захворювання ока включають неосудинні захворювання рогівки, такі як трансплантація рогівки, герпесний кератит, сифілітичний кератит, патологічна шкірна складка і неосудинний паннус (поверхневий дифузний судинний кератит), порушення, зв'язані з застосуванням контактних лінз. Додатково захворювання ока також включають вікову плямисту дегенерацію, визначений очний гістоплазмоз, ретинопатію передчасної і неосудинної глаукоми.

Далі даний винахід забезпечує спосіб інгібування росту пухлини, що включає введення постадійно або у фізичній комбінації сполуки формули (I) і протипухлинного агента, такого як топотекан і цисплатин.

Нова сполука згідно з даним винаходом представляє собою (S)-10,11-дигідро-3-[2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етокси]-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-оцтову кислоту або її фармацевтично прийнятну сіль.

Відповідно до дійсного винаходу (S)-конфігурація сполуки формули (I) є найбільш бажаною.

Даний винахід також включає пролікарські засоби сполуки згідно з даним винаходом. Під пролікарськими засобами маються на увазі будь-які ковалентно зв'язані носії, що вивільняють активний вихідний лікарський засіб відповідно до формули (I) *in vivo*. Таким чином, іншим аспектом даного винаходу є нові пролікарські засоби, що також представляють собою проміжні сполуки при одержанні сполуки формули (I), формули (II)



або їх фармацевтично прийнятну сіль.

У даному описі для описування сполуки згідно з даним винаходом використані скорочення і символи, що звичайно використовуються в галузі пептидів та в галузі хімії. Звичайно, скорочення амінокислот визначаються правилами Спільної Комісії ІЮПАК-ІЮБ (IUPAC-IUB) по біохімічній номенклатурі, що описані у Eur. J. Biochem., 158, 9 (1984).

$\text{C}_{1-6}$ алкіл, як використовується в даному описі, позначає необов'язково заміщену алільну групу з 1-6 атомів вуглецю, і включає метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, н-бутил, ізобутил, трет-бутил, пентил, н-пентил, ізопентил, неопентил та гексил та їх найпростіші аліфатичні ізомери.

Будь-який  $\text{C}_{1-6}$ алкіл необов'язково може бути заміщений групою  $\text{R}^x$ , що може знаходитись при будь-якому атомі вуглецю, що приводить до стабільної структури, та доступна для звичайних синтетичних способів. Прийнятними групами  $\text{R}^x$  є  $\text{C}_{1-4}$ алкіл,  $\text{OR}''$ ,  $\text{SR}''$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілсульфоніл,  $\text{C}_{1-4}$ алкілсульфоксил,  $-\text{CN}$ ,  $\text{N}(\text{R}'')_2$ ,  $\text{CH}_2\text{N}(\text{R}'')_2$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}''$ ,  $-\text{CON}(\text{R}'')_2$ ,  $-\text{COR}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}''$ , F, Cl, Br, I або  $\text{CF}_3\text{S}(\text{O})_r$ , де r дорівнює 0, 1 або 2, а  $\text{R}''$  представляє собою H або  $\text{C}_{1-6}$ алкіл.

Деякі групи радикалів скорочені в даному описі. t-Bu відноситься до третинного бутильного радикалу, Вос відноситься до трет-бутилоксикарбонільного радикалу, Fmoc відноситься до флуоренілметоксикарбонільного радикалу, Ph відноситься до фенільного радикалу, Cbz відноситься до бензилоксикарбонільного радикалу, Bn відноситься до бензильного радикалу, Me відноситься до метилу, Et відноситься до етилу, Ac відноситься до ацетилу, Alk відноситься до  $\text{C}_{1-4}$ алкілу, Nph відноситься до 1- або 2-нафтилу та sHex відноситься до циклогексилу. Tet відноситься до 5-тетразолілу.

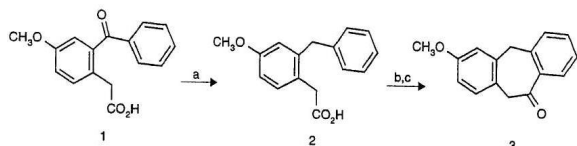
У даному описі скорочено названі деякі реагенти. DCC відноситься до дициклогексилкарбодіміду,

DMAP відноситься до диметиламіпіридину, DIEA відноситься до діізопропілетиламіну, EDC відноситься до гідрохлориду 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіміду, HOBt відноситься до 1-гідроксибензотриазолу, THF відноситься до тетрагідрофурану, DIEA відноситься до діізопропілетиламіну, DEAD відноситься до диетилазодикарбоксилату,  $\text{PPh}_3$  відноситься до трифенілфосфіну, DIAD відноситься до діізопропілазодикарбоксилату, DME відноситься до диметоксиетану, DMF відноситься до диметилформаміду, NBS відноситься до N-бромсукциніміду, Pd/C відноситься до каталізатора - паладію-на-вугіллі, PPA відноситься до поліфосфорної кислоти, DPPA відноситься до дифенілфосфорилазиду, BOP відноситься до гексафторфосфату бензотриазол-1-ілокси-трис(диметиламіно)фосфонію, HF відноситься до фтористоводневої кислоти, TEA відноситься до триетиламіну, ТФОК відноситься до трифтороцтової кислоти, РСС відноситься до хлорхромату піридинію.

Сполука формули (I) може бути одержана способами, описаними Bondinell et al., у публікації РСТ заявки №W097/01540 (Міжнародна заявка №PCT/US96/11108), опублікованої 16 січня 1997 року, повний опис якої включено в даний опис як посилання.

Крім того, сполуку формули (I) одержують способами, аналогічними описаним на схемах, що докладно обговорені нижче.

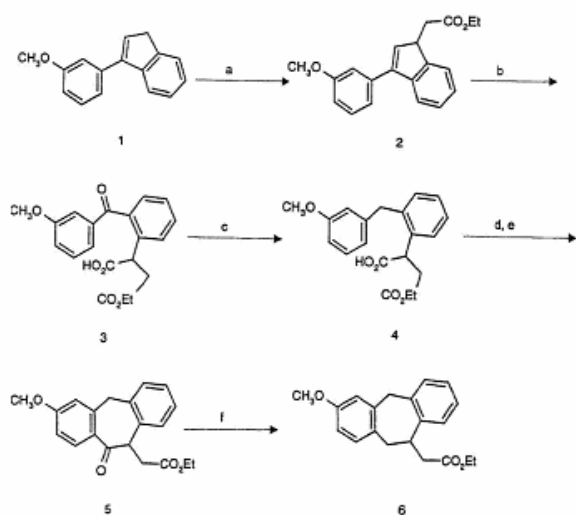
Схема I



a) 10% Pd/C, HOAc; b)  $\text{SOCl}_2$ , толуол; c)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

На схемі I докладно представлено одержання проміжної сполуки, корисної для одержання сполуки формули (I)

Схема II

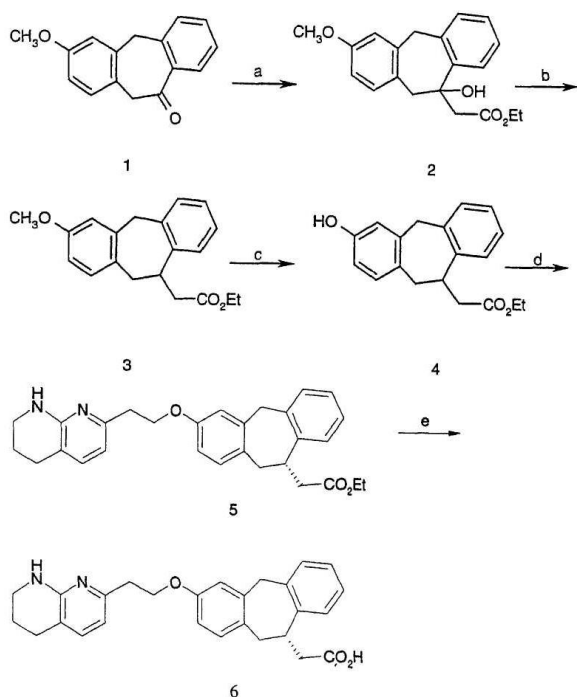


a)  $\text{Li}(\text{TMS})_2$ , етилбромацетат; b) реагент Джонса,  $\text{OsO}_4$ ; c)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, HOAc;

d)  $\text{C}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , DMF; e)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , кімнатна температура; f)  $\text{H}_2$ , 10% Pd/C, HOAc.

На схемі II також докладно подано одержання проміжної сполуки, корисної для одержання сполуки формули (I)

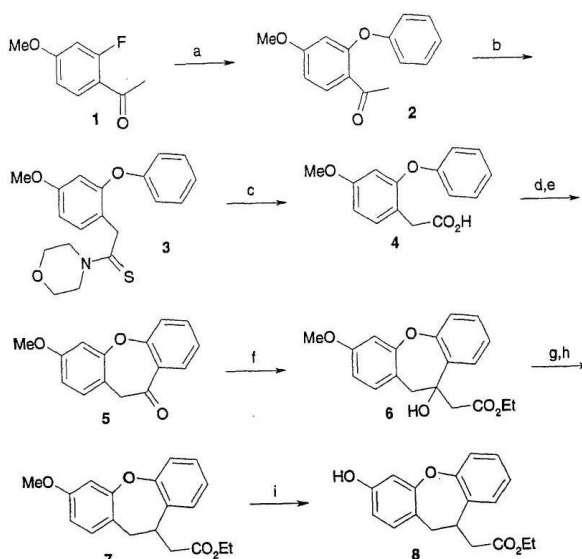
Схема III



a) EtOAc/LiHMDS, ТГФ; b) H<sub>2</sub>, 10% Pd/C, конц. HCl, HOAc; (c) EtSH, AlCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) 2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8 нафтиридин-2-іл)етанол, діізопропілазодикарбоксилат, (Ph)<sub>3</sub>; (e) 1,0н LiOH, EtOH; HCl.

На схемі III докладно представлене одержання сполуки формули (I). Взаємодія III-1 (яка є сполукою 3 схеми I) у реакції альдольного типу з енолятом етил-ацетату, що може бути генерований з етилацетату під дією прийнятої амідної основи, наприклад, діізопропіламіді літію (LDA) або біс(триметилсиліл)аміді літію (LiHMDS), дає III-2. Часто для альдольної реакції вибирають як розчинник ТГФ, хоча часто використовують ТГФ у присутності різних добавок, наприклад, HMPA або TMEDA. Відновлення III-2 з одержанням III-3 (яка є сполукою 6 схеми II) може бути здійснено гідруванням над придатним каталізатором, наприклад, металевим палладієм на активованому вугіллі (Pd/C), у прийнятному розчиннику, такому як оцтова кислота, у присутності мінеральної кислоти, такої як HCl. Альтернативно, дане відновлення можна здійснити обробкою III-2 триетилсиланом у присутності ефірату трьохфтористого бору з використанням загального способу Orfanopoulos і Smolou (Synth. Commun., 1988, 833). Видалення простої ефірної метальної групи в III-3 з одержанням III-4 можна здійснити за допомогою BBr<sub>3</sub> в інертному розчиннику, наприклад, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> або взаємодією з етантіолом і AlCl<sub>3</sub> в інертному розчиннику, переважно CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Інші корисні способи видалення простої ефірної метальної групи описані в Greene «Protective Groups in Organic Synthesis» (опублікованої John Wiley and Sons). Сполука 4 схеми 3(III-4) взаємодіє з 2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)етанолом, даючи III-5. Реакція протікає під дією комплексу, утвореного діізопропілазодикарбоксилатом і трифенілфосфіном, і проходить в апротонному розчиннику, наприклад, ТГФ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> або ДМФ. Етиловий складний ефір III-5 гідролізують з використанням водяної основи, наприклад, LiOH у водяному ТГФ або NaOH у водяному метанолі або етанолі, і проміжну карбоксилатну сіль підкислюють прийнятною кислотою, наприклад, ТФУК або HCl, для одержання карбонової кислоти III-6. Альтернативно, при бажанні, проміжна карбоксилатная сіль може бути виділена, або карбоксилатная сіль вільної карбонової кислоти може бути отримана способами, добре відомими фахівцям у даній галузі.

Схема IV



(a) PhOH, Cu,  $K_2CO_3$ ; (b) сірка, морфолін; (c) KOH,  $H_2O$ , i-PrOH; (d)  $SOCl_2$ , бензол; (e)  $AlCl_3$ ,  $CH_2Cl_2$ ; (f) EtOAc,  $Li(TMS)_2$ , TMEDA, ТГФ; (g)  $Et_3SiH \cdot BF_3 \cdot OEt_2$ ,  $CH_2Cl_2$ ; (h)  $H_2$ , Pd/C, EtOH; (i)  $BBr_3$ ,  $CH_2Cl_2$ .

Комерційно доступний 2-фтор-4-метоксиацетофенон (IV-1) взаємодіє зі спиртом, наприклад, фенолом, у присутності металевої міді і придатної основи, наприклад,  $K_2CO_3$ , даючи диарильовий простий ефір IV-2. При обробці сіркою і прийнятим первинним або вторинним аміном, переважно морфоліном, відповідно до загального способу Harris (J. Med. Chem., 1982, 25, 855), IV-2 перетворюється на IV-3 по класичній реакції Willgerdt-Kindler. Отриманий таким способом тіоамід гідролізують до відповідної карбонової кислоти IV-4 взаємодією з гідроксидом лужного металу, придатним є KOH, у водяному спиртовому розчиннику, такому як водяний MeOH, EtOH або i-PrOH. Карбонову кислоту IV-4 перетворюють у відповідний хлорангідрид кислоти реакцією або з  $SOCl_2$ , або з оксалилхлоридом в умовах, добре відомих фахівцям у даній галузі. Обробка такого хлорангідриду кислоти прийнятим каталізатором Фріделя-Крафтса, таким як  $AlCl_3$  або  $SnCl_4$ , в інертному розчиннику, такому як  $CH_2Cl_2$  або  $CS_2$ , дає циклічний кетон IV-5. Альтернативно, кислота IV-4 може бути безпосередньо перетворена в кетон IV-5 у кислих умовах, наприклад, під дією поліфосфорної кислоти. Взаємодія IV-5 у реакції альдольного типу з енолятом етилацетату, що може бути генерований з етилацетату під дією прийнятої амідної основи, наприклад, діізопропіламіду літію (LDA) або біс(триметилсилі)аміду літію ( $LiHMDS$ ), дає IV-6. Часто для альдольної реакції вибирають як розчинник ТГФ, хоча часто використовують ТГФ у присутності різних добавок, наприклад, HMPA або TMEDA. Відновлення IV-6 з одержанням IV-7 може бути здійснене при обробці IV-6 триетил-силаном у присутності ефірату трьохфтористого бору з використанням загального способу Orfanopoulos і Smonou (Synth. Commun., 1988, 833). Будь-які олефінові побічні продукти, що утворюються в результаті елімінування спирту, відновлюють гідруванням над прийнятим каталізатором, наприклад, металевим палладієм на активованому вугіллі (Pd/C), у прийнятному розчиннику, такому як MeOH або EtOH. Альтернативно, відновлення IV-6 з одержанням IV-7 можна проводити гідруванням у присутності мінеральної кислоти, такої як HCl. Звичайно, дана реакція каталізується Pd/C, і оптимальним є її проведення в оцтовій кислоті. Видалення простої ефірної метальної групи в IV-7 з одержанням IV-8 можна здійснити за допомогою  $BBr_3$  в інертному розчиннику, наприклад,  $CH_2Cl_2$  або взаємодією з етантіолом та  $AlCl_3$  в інертному розчиннику, бажано  $CH_2Cl_2$ . Інші корисні способи видалення простої ефірної метальної групи описані в Greene «Protective Groups in Organic Synthesis» (опублікованої John Wiley and Sons). IV-8 згодом перетворюють у сполуку формули (I) у відповідності зі способом, що коротко описаний для схеми III.

Кисотно-адитивні солі сполуки одержують стандартним способом у прийнятному розчиннику з вихідної сполуки і надлишку кислоти, такої як хлористоводнева, бромистоводнева, фтористоводнева, сірчана, фосфорна, оцтова, трифтороцтова, малеїнова, бурштинова або метансульфонова. Деякі сполуки утворюють внутрішні солі або цвितтеріони, що також можуть бути прийнятними. Катіонні солі одержують обробкою вихідної сполуки надлишком лужного реагенту, такого як гідроксид, карбонат або алкоксид, що містить прийнятий катіон, або прийнятим органічним аміном. Катіони, такі як  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  та  $NH_4^+$  є специфічними катіонами, що присутні у фармацевтично прийнятих солях.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, що включає сполуку формули (I) та фармацевтично прийнятний носій. Відповідно, сполука формули (I) може бути використана при одержанні лікарського засобу. Фармацевтичні композиції сполуки формули (I), отриманої як описано раніше, можуть бути одержані у вигляді розчинів або ліофілізованих порошків для парентерального введення. Вміст вологи порошків може бути відновлений перед вживанням додаванням прийнятного розріджувача або іншого фармацевтично прийнятного носія. Рідкі препаративні форми можуть бути забуферені ізотонічними водними розчинами. Прикладами прийнятих розріджувачів є ізотонічний фізіологічний розчин, стандартна 5% декстроза у воді або забуферений розчин ацетату натрію або амонію. Така препаративна форма є особливо прийнятною для парентерального введення, але також може використовуватись для перорального введення або інгалятора, що містить контрольовану дозу, або розпилювача для інсуфляції. Може бути бажаним додавання експіциєнтів, таких як полівінілпірролідон, желатин, гідроксицелюлози, аравійської камеді, поліетиленгліколю, маніту, хлориду натрію або цитрату натрію.

Альтернативно, дані сполуки можуть бути інкапсульовані, таблетовані або отримані у вигляді емульсії

або сиропу для перорального введення. Фармацевтично прийнятні тверді або рідкі носії можуть бути додані для посилення або стабілізації композиції або для полегшення одержання композиції. Тверді носії включають крохмаль, лактозу, дигідрат сульфату кальцію, білу глину, стеарат магнію або стеаринової кислоти, тальк, пектин, аравійську камедь, агар або желатину. Рідкі носії включають сироп, арахісову олію, маслинову олію, фізіологічний розчин і воду. Носій також може включати матеріал уповільненого вивільнення, такий як гліцерилмоностеарат або гліцеридистеарат, сам по собі або у поєднанні з воском. Кількість твердого носія з змінною величиною, але переважно вона складає від приблизно 20мг до приблизно 1г на одиничну препаративну лікарську форму. Фармацевтичні препаративні форми одержують відповідно до звичайних способів фармацевтики, включаючи роздрібнення, змішування, гранулювання та пресування, при необхідності, для таблетованих форм; або роздрібнення, змішування і наповнення для твердих желатинових капсульованих форм. При використанні рідкого носія, препаративна форма буде у формі сиропу, еліксиру, емульсії, водяної або неводяної суспензії. Таку рідку препаративну форму можна безпосередньо вводити перорально або нею можна заповнювати м'яку желатинову капсулу.

Для ректального введення сполуку даного винаходу можна поєднувати з ексципієнтами, такими як олія какао, гліцерин, желатин або поліетиленгліколі, та формувати у вигляді суппозиторія.

Описана тут сполука є антагоністом вітронектинового рецептора і може використовуватися при лікуванні захворювань, де базова патологія властива ліганду або клітині, що взаємодіє з вітронектиновим рецептором. Наприклад, дана сполука корисна при лікуванні захворювань, де патологію створює втрата кісткової матриці. Таким чином, вказана сполука корисна для лікування остеопорозу, гіперпаратироїдизму, хвороби Пагета, гіперкальцемії злоякісної пухлини, остеолітичних патологічних змін, викликаних кістковими метастазами, при втраті кісток внаслідок іммобілізації або нестачі статевих гормонів. Також передбачається, що сполука даного винаходу корисна як протипухлинний, антиангіогенний, протизапальний і протиметастазний агент і може використовуватись при лікуванні атеросклерозу і рестенозу.

Сполуку вводять пацієнту або перорально, або парентерально, таким чином, щоб концентрація лікарського засобу була достатньою для інгібування розсмоктування кісток або інших подібних показань. Фармацевтичну композицію, що містить сполуку, вводять у пероральній дозі від приблизно 0,1 до приблизно 50мг/кг способом, сумісним із станом пацієнта. Переважно пероральна доза буде складати від приблизно 0,5 до приблизно 20мг/кг. При гострій терапії кращим є парентеральне введення. Внутрішньовенне уливання пептида в 5%-ній декстрозі у воді або в звичайному фізіологічному розчині або у вигляді подібної композиції з прийнятними ексципієнтами є найбільш ефективним, хоча також можна використовувати внутрішньом'язову болюсну ін'єкцію. Звичайно парентеральна доза буде складати від приблизно 0,01 до приблизно 100мг/кг; переважно між 0,1 і 20мг/кг. Сполуку вводять від одного до чотирьох разів на день на рівні, необхідному для досягнення загальної денної дози від приблизно 0,4 до приблизно 400мг/кг/день. Точний рівень і спосіб, яким вводять сполуку, легко можуть бути визначені звичайним фахівцем у даній галузі шляхом порівняння рівня концентрації агента в крові з концентрацією, необхідною для досягнення терапевтичного ефекту.

У даному винаході також розроблений спосіб лікування остеопорозу або інгібування втрати кісток, що включає введення послідовно або у фізичній комбінації сполуки формули (I) та інших інгібіторів розсмоктування кісток, таких як бісфосфонати (тобто аллендронат), гормонозамісна терапія, антиестрогени або кальцитонін. Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування з використанням сполуки даного винаходу та анаболічного агента, такого як кісткоморфогенний білок, іпрофлавіон, що використовується для профілактики втрати кісток та/або для збільшення кісткової маси.

Додатково, даний винахід забезпечує спосіб інгібування росту пухлини, що включає введення послідовно або у фізичній комбінації сполуки формули (I) та протипухлинного агента. Сполука класу аналогів камптотецину, така як топотекан, іринотекан і 9-амінокамптотецин, і координаційні комплекси платини, такі як цисплатин, ормаплатин і тетраплатин, представляють собою добре відомі групи протипухлинних агентів. Сполуки класу аналогів камптотецину описані в патентах США №№ 5004758, 4604463, 4473692, 4545880, 4342776, 4513138, 4399276, публікаціях заявок на європейський патент №№ 0418099 і 0088642, Wani et al., J. Med. Chem., 1986, 29, 2358, Wani et al., J. Med. Chem., 1980, 23, 554, Wan et al., J. Med. Chem., 1987, 30, 1774 та Nitta et al., Proc. 14th International Congr. Chemotherapy., 1985, Anticancer Section 1, 28, повний опис кожної з даних публікацій включено в даний опис як посилання. Координаційний комплекс платини, цисплатин, доступний під назвою Platinol® від Bristol Myers-Squibb Corporation. Корисні композиції для цисплатину описані в патентах США №№ 5562925 і 4310515, повний опис яких включено в даний опис як посилання.

У способі інгібування росту пухлини, що включає введення, послідовно або у фізичній комбінації, сполуки формули (I) та протипухлинного агента, координаційну сполуку платини, наприклад, цисплатин, можна вводити шляхом повільної внутрішньовенної ін'єкції. Кращим носієм є суміш декстроза/фізіологічний розчин, що містить манніт. Схема дозування координаційної сполуки платини може складати від приблизно 1 до приблизно 500мг на квадратний метр (мг/м<sup>2</sup>) площі поверхні тіла на курс лікування. Введення координаційної сполуки платини можна проводити від одного до двох разів на тиждень і тижневі лікування можуть повторюватись декілька разів. При використанні сполуки класу аналогів камптотецину в парентеральному введенні, у курсі терапії звичайно використовують від приблизно 0,1 до приблизно 300мг/м<sup>2</sup> площі поверхні тіла на день протягом приблизно п'ятих послідовних днів. Найбільш бажаним є курс терапії, що використовується для топотекану, і складає від приблизно 1,0 до приблизно 2,0мг/м<sup>2</sup> площі поверхні тіла на день протягом п'ятих послідовних днів. Переважно, курс терапії повторюють принаймні один раз з інтервалом від приблизно 7 днів до приблизно 28 днів.

Фармацевтичні композиції можуть бути складені таким чином, щоб містити сполуку формули (I) і протипухлинний агент у тому самому контейнері, але кращою є рецептура з різними контейнерами. Коли обидва агенти представлені у вигляді розчину, вони можуть міститися в системі для введення/ін'єкції для одночасного введення або у зведеному упаковці.

Для зручного введення сполуки формули (I) та протипухлинного агента в той самий або в різний час готують набір, що включає один контейнер, такий як коробка, картонна коробка або інший контейнер,

індивідуальні пляшки, пакети, ампули або інші контейнери, кожний з яких містить ефективну кількість сполуки формули (I) для парентерального введення, як описано вище, і ефективну кількість протипухлинного агента для парентерального введення, як описано вище. Такий набір може включати, наприклад, обидва фармацевтичні агенти в окремих контейнерах або в тому самому контейнері, необов'язково у вигляді ліофілізованих вкладишів, та контейнерів з розчинами для відновлення вмісту вологи. Варіація даного набору включає розчин для відновлення вмісту вологи та ліофілізований вкладиш у двох відсіках одного контейнера, що вимагає змішування перед використанням. При такому компонуванні протипухлинний агент та сполука згідно з даним винаходом можуть бути спакзовані окремо, як, наприклад, у двох контейнерах, або ліофілізовані спільно у вигляді порошку та забезпечені в одному контейнері.

Коли обидва агенти забезпечуються у вигляді розчину, вони можуть міститися в системі для введення/ін'єкції для одночасного введення або у здвоєній упаковці. Наприклад, сполука формули (I) може бути у вигляді ін'єкційної форми для внутрішньовенного введення (i.v.) або ємність для введення може бути зв'язана в серію через трубки з протипухлинним агентом, що міститься в другій ємності для введення. З використанням такої системи пацієнт може одержувати спочатку ін'єкцію болюсного типу сполуки формули (I) з наступним введенням протипухлинного агента.

Сполука може бути випробувана в одному або декількох біологічних аналізах для визначення концентрації сполуки, що необхідна для досягнення даної фармакологічної дії.

Інгібування зв'язування вітронектину

Твердофазне [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 зв'язування з  $\alpha_v\beta_3$ :  $\alpha_v\beta_3$  плаценти людини або тромбоцита людини (0,1-0,3мг/мл) у буфері Т (що містить 2мМ CaCl<sub>2</sub> та 1% октилглюкозид) розводили буфером Т, що містить 1мМ CaCl<sub>2</sub>, 1мМ MnCl<sub>2</sub> (буфер А) та 0,05% NaN<sub>3</sub>, а потім відразу ж додавали у 96-коміркові планшети ELISA (твердофазний імуноферментний аналіз) Coming, New York, NY) із розрахунку 0,1мл на комірку. Додавали 0,1-0,2мкг  $\alpha_v\beta_3$  на комірку. Планшети інкубували протягом ночі при 4°C. Під час експерименту промивали один раз буфером А та інкубували з 0,1мл 3,5% бичачого сироваткового альбуміну (BCA) у тому ж буфері протягом 1 години при кімнатній температурі. Після інкубування комірки цілком відсмоктували і промивали двічі 0,2мл буфера А.

Сполуку розчиняли в 100% ДМСО, одержуючи 2мМ вихідного розчину, що розводили буфером зв'язування (15мМ Tris-HCl (рН 7,4), 100мМ NaCl, 1мМ CaCl<sub>2</sub>, 1мМ MnCl<sub>2</sub>, 1мМ MgCl<sub>2</sub>) до кінцевої концентрації 100мкМ. Вказаний розчин потім розводили до необхідної кінцевої концентрації сполуки. Різні концентрації антагоністів, що піддають тестуванню (0,001-100мкМ), додавали в комірки у триразовій послідовності з наступним доданням 5,0нМ [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 (65-86Кюрі/ммоль).

Планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі, після інкубування комірки цілком відсмоктували та промивали один раз 0,2мл охолодженого на льоду буфера А способом від комірки-до-комірки. Рецептори піддавали солюбілізації 0,1мл 1% SDS і зв'язаний [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 визначали за допомогою рідинного сцинтиляційного зчитування з доданням 3мл Ready Safe у рідинному сцинтиляційному лічильнику Beckman LS з 40%-ною ефективністю. Неспецифічне зв'язування [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 визначали в присутності 2мМ SK&F-107260, і воно логічно складало менше 1% від загального введення радіоактивного ліганда. IC<sub>50</sub> (концентрацію антагоніста, що інгібує 50% [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260) визначали за допомогою загальноприйнятого способу апроксимації нелінійної кривої по методу найменших квадратів, що модифікували по програмі LUNDON-2. K<sub>1</sub> (константи дисоціації антагоніста) розраховували по рівнянню:  $K_1 = IC_{50} / (1 + L / K_d)$ , де L і K<sub>d</sub> представляли собою концентрацію та константу дисоціації [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260, відповідно.

Сполука даного винаходу інгібує зв'язування вітронектину з SK&F-107260 при K<sub>1</sub> приблизно 1,7 наномолей.

Сполуку даного винаходу також тестували на in vitro та in vivo розсмоктування кістки в аналізах, прийнятих у даній галузі для оцінки інгібування утворення кістки, таких як аналіз утворення заглиблень, описаний в EP 528587, що також може бути виконаний з використанням остеокластів людини замість остеокластів щурів, та аналіз на основі оварієтотованої моделі щурів, описаної Wronski et al., Cell and Materials, 1991, Sup. 1, 69-74.

Аналіз міграції судинної клітини гладкого м'яза

Використовували клітини гладкого м'яза аорти щура або людини. Клітинну міграцію контролювали в Transwell камері клітинних культур з використанням полікарбонатної мембрани з порами 8мкм (Costar). Нижній рівень поверхні фільтра був вкритий вітронектином. Клітини суспендували в середовищі DMEM (модифіковане по способу Дюльбекко середовище Ігла), доповненому 0,2% бичачим сироватковим альбуміном, у концентрації 2,5-5,0x10<sup>6</sup>клітин/мл і попередньо обробляли сполуками, що піддають тестуванню, у різних концентраціях протягом 20 хвилин при 20°C. Розчинник сам по собі використовували як контроль. У верхній відсік камери поміщали 0,2мл суспензії клітин. Нижній відсік містив 0,6мл DMEM, доповненої 0,2% бичачим сироватковим альбуміном. Інкубування проводили при 37°C в атмосфері 95% повітря/5% CO<sub>2</sub> протягом 24 годин. Після інкубування клітини, що не мігрували, на верхній поверхні фільтра видаляли обережним зіскрібанням. Потім фільтр фіксували в метанолі та фарбували 10% барвником Гімза. Міграцію вимірювали або а) підрахунком числа клітин, що мігрували до нижньої поверхні фільтра, або б) екстракцією пофарбованих клітин 10%-ною оцтовою кислотою з наступним визначенням поглинання при 600нм.

Тиропаратироїдектомована модель щурів

Кожна експериментальна група складалась з 5-6 дорослих самців щурів Spargue-Dawley (маса тіла 250-400г). Щурів піддавали тиропаратироїдектомії (за допомогою приватного лікаря, Taconic Farms) за 7 днів перед використанням. Усі щури одержували замісну дозу тироксину кожні 3 дні. При одержанні щурів вимірювали циркуляційні рівні іонізованого кальцію в суцільній крові безпосередньо після її відбору пункцією хвостової вени в гепаринизовані пробірки. Щурів включали в експеримент, якщо рівень іонізованого Ca (який вимірювали кальцієвим рН аналізатором моделі Ciba-Corning 634) складав <1,2мМ/л. Кожному щуру вводили венозну та артеріальну петлю-катетер для доставки досліджуваної речовини та відбору проб крові, відповідно. Потім щурів саджали на дієту з їжі, що не містить кальцію, і деіонізованої

води. Вимірювали базові лінії рівня Ca і кожному щуру вводили або контроль-носії, або 1-34 пептид паратиреоїдного (паратитовидного) гормону людини (hPTH-34, доза 1,25мкг/кг/год. у фізіологічному розчині/0,1% бичачий сироватковий альбумін, Bachem, Ca), або суміш hPTH-34 та речовини, що тестують, шляхом безперервного внутрішньовенного введення через венозний катетер з використанням зовнішнього шприцевого насоса. Кальцемічну відповідну реакцію кожного щура вимірювали з двочасовими інтервалами упродовж періоду введення протягом 6-8 годин.

Аналізи розсмоктування та адгезії остеокласта людини

Аналізи поглиблень розсмоктування та адгезії були виконані та стандартизовані з використанням нормальних остеокластів людини, отриманих з тканини остеокластами. Аналіз 1 розробляли для вимірювання об'ємів остеокластних поглиблень за допомогою лазерної конфокальної мікроскопії. Аналіз 2, в якому колагенові фрагменти (що вивільняються у процесі розсмоктування) вимірюють конкурентним ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз), розробляли як більш високий пропускний фільтр.

Аналіз 1 (з використанням лазерної конфокальної мікроскопії)

Аліквоти суспензій клітин, отриманих з остеокластами людини, видаляють з місця зберігання в рідкому азоті, швидко нагрівають при 37°C і промивають у середовищі RPMI-1640 за допомогою центрифугування (1000об/хв, 5 хвилин при 4°C).

Середовище відсмоктують та замінують на Анти-HLA-DR антитіло миші, потім розводять 1:3 у RPMI-1640 середовищі. Суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду при частоту перемішуванні.

Клітини промивають x 2 холодним RPMI-1640 з наступним центрифугуванням (1000об/хв., 5 хвилин при 4°C), а потім клітини переносять у стерильну 15мл центрифужну пробірку. Підраховують число моноядерних клітин в удосконаленій камері Neubauer. Достатню кількість магнітних кульок (5/моноядерну клітину), вкритих козячим антимишиним Ig (Dyna, Great Neck, NY), видаляють з ємності зберігання та поміщають у 5мл свіжого середовища (це вимиває токсичний азидний консервант). Середовище видаляють за допомогою іммобілізації кульок на магніті та заміни на свіже середовище.

Кульки змішують з клітинами і суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду. Суспензію часто перемішують.

Покриті кульками клітини іммобілізують на магніті та клітини, що залишилися (остеокласт-збагачена фракція), декантують у стерильну 50мл центрифужну пробірку.

До покритих кульками клітинам додають свіже середовище для одержання будь-яких захоплених остеокластів. Цей процес промивання повторюють x 10. Покриті кульками клітини відкидають.

Підраховують видимі остеокласти в лічильній камері з використанням флуоресцеїндиацетату для мічення живих клітин. Для додання зразка в камеру використовують одноразову пластикову пастерівську піпетку з великим внутрішнім діаметром.

Остеокласти осаджують центрифугуванням та щільність доводять до прийнятного числа в EMEM середовищі (число остеокластів змінюється в залежності від пухлини), доповненим 10% навколоплодною телячою сироваткою та 1,7г/літр бікарбонату натрію.

Змл аліквоти клітинної суспензії (на сполуку обробки) декантують у 15мл центрифужну пробірку. Клітини осаджують центрифугуванням.

У кожную пробірку додають Змл прийнятої сполуки обробки (розведеної до 50мкМ у середовищі EMEM). Також включають прийнятні контрольні носії, позитивний контроль (антивітронектинове мишаче моноклональне антитіло [87MEM1], розведене до 100мкг/мл) та ізотипний контроль (IgG<sub>2a</sub>, розведене до 100мкг/мл). Зразки інкубують при 37°C протягом 30 хвилин.

0,5мл аліквоти клітин висівають на стерильні зрізи дентину в 48-комірковому планшеті та інкубують при 37°C протягом 2 годин. Кожну обробку проводять у чотириразовій повторності.

Зрізи промивають у шести змінних об'ємах теплої PBS (10мл/комірку в 6-комірковому планшеті) та потім поміщають у свіже середовище, що містить сполуку обробки або контрольні зразки. Зразки інкубують при 37°C протягом 48 годин.

Методика тарtrat-стійкої кислоти фосфатази (TRAP) (селективний барвник для клітин остеокластної лінії)

Зрізи кістки, що містять приєднані остеокласти, промивають у забуференому фосфатом фізіологічному розчині та фіксують у 2% глутаральдегіді (у 0,2М какоділаті натрію) протягом 5 хвилин.

Потім їх знову промивають у воді та інкубують протягом 4 хвилин у TRAP буфері при 37°C (0,5мг/мл нафтол AS-BI фосфат, розчинений у N,N-диметилформаміді і змішаний з 0,25М цитратним буфером (pH 4,5), що містить 10мМ тартрату натрію).

Після промивання холодною водою середовища занурюють у холодний ацетатний буфер (0,1М, pH 6,2), що містить 1мг/мл стійкого червоного гранатового та інкубують при 4°C протягом 4 хвилин. Надлишок буфера відсмоктують та зрізи висушують на повітрі після промивання водою.

TRAP-позитивні остеокласти (цегляно-червоний/пурпурний осад) підраховують за допомогою світлопольної мікроскопії та потім видаляють з поверхні дентину за допомогою ультразвуку.

Об'єми заглиблень визначали з використанням конфокального мікроскопа Nikon/Lasertec ILM21W.

Аналіз 2 (зчитування даних з використанням ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз))

Остеокласти людини збагачували та готували для дослідження сполуки, як описано в перших 9 стадіях аналізу 1. Для наочності дані стадії повторені нижче.

Аліквоти суспензій клітин, отриманих з остеокластами людини, видаляють з місця зберігання в рідкому азоті, швидко нагрівають при 37°C та промивають x 1 у середовищі RPMI-1640 за допомогою центрифугування (1000об/хв., 5 хвилин при 4°C).

Середовище відсмоктують та замінують на Анти-HLA-DR антитіло миші, потім розводять 1:3 у RPMI-1640 середовищі. Суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду і часто перемішують.

Клітини промивають x 2 холодним RPMI-1640 з наступним центрифугуванням (1000об/хв., 5 хвилин при 4°C), а потім клітини переносять у стерильну 15мл центрифужну пробірку. Підраховують число моноядерних клітин в удосконаленій лічильній камері Neubauer.

Достатня кількість магнітних кульок (5/моноядерну клітину), вкритих козячим антимишиним Ig (Dyna, Great Neck, NY), видаляють з ємності зберігання і поміщають у 5мл свіжого середовища (це вимиває

токсичний азидний консервант). Середовище видаляють за допомогою іммобілізації кульок на магніті та замінюють на свіже середовище.

Кульки змішують з клітинами і суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду. Суспензію часто перемішують.

Покриті кульками клітини іммобілізують на магніті, а клітини, що залишилися, (остеокласт-збагачена фракція) декантують у стерильну 50мл центрифужну пробірку.

До покритих кульками клітин додають свіже середовище для одержання будь-яких захоплених остеокластів. Цей процес промивання повторюють x 10. Покриті кульками клітини видаляють.

Підраховують видимі остеокласти у лічильній камері з використанням флуоресцеїндиацетату для мічення живих клітин. Для додання зразка в камеру використовують одноразову пластикову пастерівську піпетку з великим внутрішнім діаметром.

Остеокласти осаджують центрифугуванням і щільність доводять до прийнятного числа в ЕМЕМ середовищі (число остеокластів змінюється в залежності від пухлини), доповненим 10% навколоплодною телячою сироваткою та 1,7г/літр бікарбонату натрію.

На протигагу способі, описаному вище в аналізі 1, сполуку досліджують у чотирьох дозах для одержання IC<sub>50</sub>, як описано нижче.

Препарати остеокластів попередньо інкубують протягом 30 хвилин при 37°C з сполукою (4 дози), що досліджується, або контролем. Потім їх висівають на зрізи бичачої кортикальної кістки в комірках 48-коміркового планшета для тканинних культур та інкубують ще протягом 2 годин при 37°C.

Зрізи кістки промивають шість разів теплим забуференим фосфатом фізіологічним розчином (PBS) для видалення клітин, що прикріпилися, а потім повертають у комірки 48-коміркового планшета, що містять свіжу сполуку або контроль.

Планшет для тканинних культур потім інкубують протягом 48 годин при 37°C.

Супернатанти (надосадова рідина) з кожної комірки відсмоктують в індивідуальні пробірки та досліджують конкурентним ELISA, що виявляє с-телопептид колагену типу I, що вивільняється під час процесу розсмоктування. Цей ELISA є комерційно доступним (Osteometer, Данія) і містить кроляче антитіло, що специфічно взаємодіє з послідовністю, що складається з 8-амінокислот (Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg), яка є присутньою на карбокси-термінальному телопептиді α1-ланцюга колагену типу I. Результати виражають у % інгібування розсмоктування в порівнянні з контролем-носієм.

Аналіз адгезії остеокластів людини

Остеокласти людини збагачували і готували для дослідження сполуки, як описано в перших 9 стадіях аналізу 1. Для наочності дані стадії повторені нижче.

Аліквоти суспензій клітин, отриманих з остеокластами людини, видаляють з місця зберігання в рідкому азоті, швидко нагрівають при 37°C та промивають x 1 у середовищі RPMI-1640 за допомогою центрифугування (1000об/хв., 5 хвилин при 4°C). Середовище відсмоктують та замінюють на мишине Анти-HLA-DR антитіло, потім розводять 1:3 у RPMI-1640 середовищі. Суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду і часто перемішують.

Клітини промивають x 2 холодним RPMI-1640 з наступним центрифугуванням (1000об/хв., 5 хвилин при 4°C), а потім клітини переносять у стерильну 15мл центрифужну пробірку. Підраховують число моноядерних клітин в удосконаленій рахунковій камері Neubauer.

Достатня кількість магнітних кульок (5/моноядерну клітину), вкритих козячим антимишим Ig (Dyna, Great Neck, NY), видаляють з ємності зберігання і поміщають у 5мл свіжого середовища (це вимиває токсичний азидний консервант). Середовище видаляють за допомогою іммобілізації кульок на магніті та заміни на свіже середовище.

Кульки змішують з клітинами і суспензію інкубують протягом 30 хвилин на льоду. Суспензію часто перемішують.

Покриті кульками клітини іммобілізують на магніті та клітини, що залишилися (остеокласт-збагачена фракція), декантують у стерильну 50мл центрифужну пробірку.

До вкритих кульками клітин додають свіже середовище для видалення будь-яких захоплених остеокластів. Цей процес промивання повторюють x 10. Покриті кульками клітини видаляють.

Підраховують видимі остеокласти в рахунковій камері з використанням флуоресцеїндиацетату для мічення живих клітин. Для додання зразка в камеру використовують одноразову пластикову пастерівську піпетку з великим внутрішнім діаметром. Остеокласти осаджують центрифугуванням і щільність доводять до прийнятного числа в ЕМЕМ середовищі (число остеокластів змінюється від пухлини до пухлини), доповненим 10% навколоплодною телячою сироваткою та 1,7г/літр бікарбонату натрію.

Отримані з остеокластами остеокласти попередньо інкубують зі сполукою (4 дози) або контролем при 37°C протягом 30 хвилин.

Потім клітини висівають на покриті остеопонтином предметні скельця (людський або щурячий остеопонтин, 2мкг/мл) та інкубують протягом 2 годин при 37°C.

Неприкріплені клітини видаляють інтенсивним промиванням предметних скельць у забуференому фосфатом фізіологічному розчині та клітини, що залишилися на предметних скельцях, фіксують в ацетоні.

Остеокласти забарвлюють для тартрат-стійкої кислоти фосфатази (TRAP), селективного маркера для клітин даного фенотипу (дивись стадії 15-17) та підраховують під світловим мікроскопом. Результати виражають у % інгібування адгезії у порівнянні з контролем-носієм.

Аналіз адгезії клітин

Клітини і клітинні культури

Ембріональні клітини людини (HEK283 клітини), отримані з АТСС (Американська колекція типових культур (Депозитний № CRL 1573)), вирощували в мінімальному незамінному середовищі Earl (EMEM), що містить солі Earl, 10% бичачої навколоплодної сироватки, 1% глутаміну та 1% пеніциліну-стрептоміцину.

Конструкта та трансфектанти

Фрагмент EcoRI-KpnI розміром 3,2кб α<sub>v</sub> субодиниці та фрагменту розміром 2,4кб XbaI-XhoI β<sub>3</sub> субодиниці вбудовували в ECoRI-EcoRV сайти клонування pCDN вектора (Aiyar et al., 1994), що містить CMV промотор і G418 селективний маркер, за допомогою лігування по «тупим» кінцям полінуклеотидного ланцюга. Для

стабільної експресії  $80 \times 10^6$  HEK293 клітин електротрансформували за допомогою  $\alpha_v\beta_3$  конструктів (20мкг ДНК кожної субодиниці) з використанням гена Pulser (Hensley et al., 1994) та поміщали в 100мм планшети ( $5 \times 10^5$  клітин/планшет). Через 48 годин поживне середовище збагачували 450мкг/мл Geneticin (G418 сульфат, GIBCO-BRL, Bethesda, MD). Клітини витримували в селекційному середовищі до того моменту, поки колонії не ставали досить великими для аналізу.

Імуноцитохімічний аналіз трансфектованих клітин

Для визначення того факту, чи експресують HEK293 трансфектанти вітронектиновий рецептор, клітини іміобілізували на скляних предметних скельцях для мікроскопа за допомогою центрифугування, фіксували в ацетоні протягом 2 хвилин при кімнатній температурі та висушували на повітрі. Специфічна реакційна спроможність з 23C6, моноклональним антитілом, специфічним для  $\alpha_v\beta_3$  комплексу, була продемонстрована з використанням стандартного непрямого імуофлуоресцентного методу.

96-лункові планшети ELISA Corning попередньо покривали протягом ночі при  $4^\circ\text{C}$  0,1мл вітронектину людини (0,2мкг/мл на середовищі RPMI). Під час експерименту планшети одноразово промивали середовищем RPMI та блокували 3,5% БСА в середовищі RPMI протягом 1 години при кімнатній температурі. Трансфектовані 293 клітини повторно суспендували в середовищі RPMI, доповненому 20мМ Hepes, pH 7,4 та 0,1% БСА при щільності  $0,5 \times 10^6$  клітин/мл. У кожную комірку додавали 0,1мл клітинної суспензії та інкубували протягом 1 години при  $37^\circ\text{C}$  у присутності або при відсутності різних  $\alpha_v\beta_3$  антагоністів. Після інкубації додавали 0,025мл 10%-ного розчину формальдегіду, pH 7,4 та клітини фіксували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Планшети промивали 3 рази 0,2мл середовища RPMI та прикріплені клітини забарвлювали 0,1мл 0,5% толуїдину синього протягом 20 хвилин при кімнатній температурі. Надлишок барвника видаляли інтенсивним промиванням деіонізованою водою. Толуїдин синій, включений у клітини, елюювали додаванням 0,1мл 50% етанолу, що містить 50мМ HCl. Клітинну адгезію оцінювали кількісно при оптичній щільності 600нм за допомогою рідера для мікротитровочних планшетів (Titertek Multiscan MC, Sterling, VA).

Твердофазний аналіз  $\alpha_v\beta_3$  зв'язування

Вітронектиновий рецептор  $\alpha_v\beta_3$  очищали з плаценти людини. Препарат рецептора розводили в 50мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100мМ NaCl, 1мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1мМ  $\text{MnCl}_2$ , 1мМ  $\text{MgCl}_2$  (буфер А) і відразу ж додавали в 96-коміркові планшети ELISA із розрахунку 0,1мл на комірку. У кожную комірку додавали 0,1-0,2мкг  $\alpha_v\beta_3$ . Планшети інкубували протягом ночі при  $4^\circ\text{C}$ . Під час експерименту комірки промивали один раз буфером А та інкубували з 0,1мл 3,5% бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та у тому ж буфері протягом 1 години при кімнатній температурі. Після інкубування комірки цілком відсмоктували і промивали двічі 0,2мл буфера А.

У конкурентному [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260 аналізі різні концентрації досліджуваних антагоністів (0,001-100мк) добавляли у комірки з наступним додаванням 5,0н [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260. Планшети інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі, після інкубування комірки цілком відсмоктували і промивали одноразово 0,2мл охолодженим на льоду буфером А способом від комірки- до комірки. Рецептори солубілізували з 0,1мл 1% SDS і зв'язаний [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260 визначали за допомогою рідинного сцинтиляційного зчитування з додаванням 3мл Ready Safe у рідинному сцинтиляційному лічильнику Beckman LS 6800 з 40%-ною ефективністю. Неспецифічне зв'язування [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260 визначали в присутності 2мМ SK&F-107260, і воно логічно складало менше 1% загального введення радіоактивного ліганду.  $\text{IC}_{50}$  (концентрація антагоніста, що інгібує 50% зв'язування [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260) визначали за допомогою загальноприйнятого способу апроксимації нелінійної кривої по методу найменших квадратів, що модифікували по програмі LUNDON-2.  $K_i$  (константи дисоціації антагоніста) розраховували по рівнянню Cheng і Prasoff:  $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + L/K_d)$ , де L і  $K_d$  представляли собою концентрацію та константу дисоціації [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260, відповідно.

Інгібування RGD-опосередкованого GPIIb-IIIa зв'язування

Очищення GPIIb-IIIa

Десять одиниць виділених промитих тромбоцитів людини (отримані від Red Cross) лізували обережним струшуванням у 3% октилглюкозиді, 20мМ Tris-HCl, pH 7,4, 140мМ NaCl, 2мМ  $\text{CaCl}_2$  при  $4^\circ\text{C}$  протягом 2 годин. Лізат центрифугували при 100000g протягом 1 години. Отриманий супернатант вносили у 5мл колонку 4В з лентил-лектин-сефарозою (E.Y.Labs), попередньо врівноважену 20мМ Tris-HCl, pH 7,4, 100мМ NaCl, 2мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1% октилглюкозидом (буфер А). Після 2 годин інкубування колонку промивали 50мл холодного буфера А. Одержаний лектином GPIIb-IIIa елюювали буфером А, що містить 10% декстрази. Усі процедури здійснювали при  $4^\circ\text{C}$ . Отриманий GPIIb-IIIa мав чистоту >95%, що було продемонстровано за допомогою SDS-поліакриламідного гелевого електрофореза.

Вбудовування GPIIb-IIIa у ліпосоми

Суміш фосфатидилсерину (70%) та фосфатидилхоліну (30%) (Avanti Polar Lipids) висушували на стінках скляної пробірки в струмі азоту. Очищений GPIIb-IIIa розводили до кінцевої концентрації 0,5мг/мл та змішували з фосфоліпідами у співвідношенні білок:фосфоліпід, що складає 1:3 (мас:мас). Суміш повторно суспендували та оброблювали ультразвуком в ультразвуковій бані протягом 5 хвилин. Потім суміш піддавали діалізу протягом ночі з використанням діалізної колонки з відсіканням молекулярної ваги 12000-14000 проти 1000-кратного надлишку 20мМ Tris-HCl, pH 7,4, 100мМ NaCl, 2мМ  $\text{CaCl}_2$  (з двома замінами). Ліпосоми, що містять GPIIb-IIIa, центрифугували при 12000g протягом 15 хвилин і повторно суспендували в буфері для діалізу при кінцевій концентрації білка приблизно 1мг/мол. Ліпосоми зберігали при  $-70^\circ\text{C}$  до споживання.

Конкурентне зв'язування з GPIIb-IIIa

Зв'язування з фібриногеновим рецептором (GPIIb-IIIa) аналізували за допомогою способу непрямого конкурентного зв'язування з використанням [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260 як ліганда RGD-типу. Аналіз зв'язування проводили в 96-комірковому фільтраційному планшетному пристрої (Millipore Corporation, Bedford, MA) з використанням 0,22мкм гідрофільних дурапористих мембран. Комірки попередньо покривали 0,2мл 10мкг/мл полілізину (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) при кімнатній температурі протягом 1 години для блокування неспецифічного зв'язування. У комірки у чотирьох повторностях додавали різні концентрації досліджуваних бензазепінів. [ $^3\text{H}$ ]-SK&F-107260 вносили в кожную комірку в кінцевій концентрації 4,5нМ з

наступним доданням 1мкг ліпосом, що містять очищений тромбоцитний GPIIb-IIIa. Суміші інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. GPIIb-IIIa-зв'язаний [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 відокремлювали від незв'язаного фільтруванням з використанням фільтраційного розподільника Millipore з наступним промиванням охолодженням на льоду буфером (2 рази, кожний 0,2мл). Зв'язану радіоактивність, що залишилася на фільтрах, зчитували в 1,5мл Ready Solve (Beckman Instruments, Fullerton, CA) у рідинному сцинтиляційному лічильнику Beckman (модель LS6800) з 40% ефективністю. Неспецифічне зв'язування визначали в присутності 2мк неміченого SK&F-107260 і воно складало логічно менше 0,14% загальної радіоактивності, доданої до зразків. Всі отримані точки даних представляють собою середнє значення від чотириразових визначень.

Дані конкурентного зв'язування аналізували за допомогою апроксимації кривої нелінійним методом найменших квадратів, даний спосіб дає IC<sub>50</sub> антагоністів (концентрація антагоніста, що інгібує при рівновазі специфічне зв'язування [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260 на 50%).

IC<sub>50</sub> знаходиться у взаємозв'язку з рівноважними константами дисоціації (K<sub>d</sub>) антагоніста на основі рівняння Cheng і Pra-soff:  $K_i = C_{50} / (1 + L / K_d)$ , де L представляє собою концентрацію [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260, використану в аналізі конкурентного зв'язування (4,5нМ), а K<sub>d</sub> представляє собою константу дисоціації [<sup>3</sup>H]-SK&F-107260, що складає 4,5нМ при визначенні за допомогою аналізу Scatchard.

Ефективність сполуки формули (I) самої по собі або у сполученні з протипухлинним агентом може бути визначена з використанням декількох моделей мишиних пухлин, що трансплантуються. Докладний опис даних моделей дивись в патентах США №№ 5004788 та 5633016.

Наведені далі приклади не призначені для обмеження будь-яким способом згідно з об'ємом даного винаходу, а наведені лише для ілюстрації того, яким способом одержують і використовують сполуку даного винаходу. Багато інших варіантів здійснення винаходу легко доступні фахівцям у даній галузі.

#### Приклади

##### Загальна частина

Спектри протонного ядерного магнітного резонансу (<sup>1</sup>H ЯМР) реєстрували при 300МГц, хімічні зміни представлені в мільйонних частках (б) у слабкому полі щодо тетраметилсилану (ТМС), що використовувався як внутрішній стандарт. Скорочення для даних ЯМР наступні: с=синглет, д=дублет, т=триплет, кв=квартет, м=мультиплет, дд=дублет дублетів, дт=дублет триплетів, вид=видимий, ушир=уширений. J показує ЯМР константи спин-спінової взаємодії, виміряні в Герцах. CDCl<sub>3</sub> представляє собою дейтерохлороформ, DMSO-d<sub>6</sub> представляє собою гексадейтеродиметилсульфоксид, CD<sub>3</sub>OD представляє собою тетрадейтерометанол. Мас-спектри були отримані з використанням іонізаційних способів електророзпилення (ES). Елементні аналізи проводили Quantitative technologies Inc., White-house, NJ. Температури плавлення одержували на пристрої для визначення температур плавлення Thomas-Hoover і не корегували. Всі температури представлені в градусах Цельсія. Для тонкошарової хроматографії використовували тонкошарові пластини Analtech Silica gel GF і E. Merck Silica gel 60 F-254. Флеш-хроматографію проводили на силікагелі E. merck Kieselgel 60 (230-400меш). Аналітичну і препаративну високоефективну рідинну хроматографію проводили на хроматографах Beckman. ODS відноситься до октадецилсилільної похідної силікагелевого хроматографічного носія. YMC ODS-AQ® представляє собою ODS хроматографічний носій, та є зареєстрованою торговою маркою YMC Co. Ltd., Kyoto, Японія. PRP-1® представляє собою полімерний (стирол-дивінілбензолний) хроматографічний носій та є зареєстрованою торговою маркою Hamilton Co., Reno, Nevada. Celite® представляє собою фільтруючу допоміжну добавку на основі промитого кислотою діатомового діоксиду кремнію, та є зареєстрованою торговою маркою Manville Corp., Denver, Colorado.

##### Одержання 1

##### Одержання 2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етанолу

##### а) 2-Метил-8-(трет-бутоксикарбоніл)-5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин

Суміш 2-метил-1,8-нафтиридину (J. Chem. Soc. (C) 1966, 315; 5,13г, 35,58ммоль), 10% Pd/C (1,14г, 1,07ммоль) та абсолютний EtOH (70мл) піддавали дезоксигенізації з використанням трьох циклів вакуумування/заповнення H<sub>2</sub>, потім інтенсивно перемішували при під'єднаному балоні з H<sub>2</sub>. Через 18,5 години суміш фільтрували через целіт® і шар на фільтрі послідовно промивали абсолютними EtOH та EtOAc. Фільтрат концентрували досуха, залишок повторно концентрували з EtOAc, одержуючи не зовсім білу тверду речовину (5,25г).

Розчин вищевказаної речовини (5,25г), ди-трет-бутилкарбонату (15,53г, 71,16ммоль) та CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10мл) концентрували на ротарному випарнику для видалення розчинника, а маслянистий залишок нагрівали в атмосфері N<sub>2</sub> на масляній бані, установлєній на 55-60°C. Через 45 годин реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і залишок піддавали флеш-хроматографії на силікагелі (40% EtOAc/гексани). Вказану в заголовку сполуку (4,90г, 55%) одержували у вигляді світло-жовтої твердої речовини:

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,27 (д, J=7,6Гц, 1H) 6,81 (д, J=7,6Гц, 1H), 3,69-3,79 (м, 2H), 2,65-2,75 (м, 2H), 2,48 (с, 3H), 1,83-1,98 (м, 2H), 1,52 (с, 9H); Мас-спектр (ES) m/e 249 (M+H)<sup>+</sup>.

##### б) Етил [8-(трет-бутоксикарбоніл)-5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл]ацетат

До розчину діізопропіламіну (7,24мл, 55,3ммоль) у сухому ТГФ (50мл) додавали по краплях при 0°C n-BuLi (2,5М у гексанах, 22мл, 55,3ммоль). Через 15 хвилин даний розчин додавали по краплях до розчину 2-метил-8-(трет-бутоксикарбоніл)-5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридину (4,9г, 19,7ммоль) і діетилкарбонату (8,86мл, 73,0ммоль) у сухому ТГФ (50мл) при -78°C. Через 30 хвилин суміш гасили насиченим розчином NH<sub>4</sub>Cl (100мл), нагрівали до кімнатної температури та екстрагували EtOAc (3x200мл). Об'єднані органічні екстракти висушували над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували та концентрували при зниженому тиску. Залишок піддавали хроматографії на силікагелі (40% EtOAc/гексани), одержуючи зазначену в заголовку сполуку у вигляді світло-жовтої олії: мас-спектр (ES) m/e 321 (M+H)<sup>+</sup>.

##### с) 2-(5,6,7,8-Тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етанол

До розчину етил [8-(трет-бутоксикарбоніл)-5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл]ацетату (5,72г, 17,85ммоль) у сухому ТГФ (80мл) при кімнатній температурі додавали LiBH<sub>4</sub> (2,0М в ТГФ, 10,7мл, 21,42ммоль) та отриману суміш нагрівали при кипінні зі зворотним холодильником. Через 18 годин суміш охолоджували до 0°C та обережно гасили H<sub>2</sub>O (100мл). Через 10 хвилин суміш екстрагували EtOAc

(3x100мл). Поєднані органічні екстракти висушували над  $\text{MgSO}_4$ , фільтрували та концентрували при зниженому тиску.

Вищевказаний залишок (4,9г) розчиняли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10мл). До розчину при кімнатній температурі за один прийом додавали 4н  $\text{HCl}$  у діоксані (20мл). Через 4 хвилини суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок поміщали в суміш 1:1  $\text{NaOH}$  і насиченого  $\text{NaCl}$  (100мл) та екстрагували  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x100мл). Поєднані органічні екстракти висушували над  $\text{MgSO}_4$ , фільтрували та концентрували при зниженому тиску, залишок піддавали хроматографії на силікагелі (10%  $\text{MeOH}$  у 1:1  $\text{EtOAc}/\text{CHCl}_3$ ), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (2,09г, 66%) у вигляді жовтої твердої речовини: мас-спектр (ES)  $m/e$  179 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

Одержання 2

Одержання етил (±)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н Дибензо[а,д]циклогептен-10-ацетату)

А) 6-Метокси-1-фенілінден

3,0М розчин фенілмагнійброміду в  $\text{Et}_2\text{O}$  (680мл, 2,04моля) в атмосфері аргону при температурі навколишнього середовища розводили при перемішуванні  $\text{Et}_2\text{O}$  (700мл) та додавали по краплях протягом 1 години розчин 6-метокси-1-інданону (277г, 1,71моля). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища і потім виливали при перемішуванні в насичений  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2,8л). Додавали  $\text{H}_2\text{O}$  (1,4л) і відокремлювали органічну фазу. Водяну фазу екстрагували  $\text{Et}_2\text{O}$  (2x1л) та поєднані органічні екстракти концентрували, одержуючи сирий (неочищений) 6-метокси-1-феніл-1-інданон (445г) у вигляді коричневої олії. Одержану олію розчиняли в толуолі (2,5л) та додавали моногідрат п-толуолсульфонової кислоти (12,3г, 0,065моля). Розчин перемішували та нагрівали при кипінні зі зворотним холодильником протягом 16 годин і при використанні пастки Діна-Старка з холодильником. Уловлювання  $\text{H}_2\text{O}$  було мінімальним через 2 години, та усього було зібрано 28мл. Розчин охолоджували та екстрагували послідовно 5% водним  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1л) та  $\text{H}_2\text{O}$  (2x1л). Органічний шар концентрували, одержуючи темно-коричневу олію (400г). Дану олію піддавали перегонці у вакуумі, одержуючи зазначену в заголовку сполуку (298,2г, 79%) у вигляді жовтої олії: температура кипіння 152-190°C/2 торр;  $\text{TCX}$  (10%  $\text{EtOAc}/\text{гексани}$ )  $R_f$  0,75.

б) 2-Бензоіл-4-метоксифенілоцтова кислота

Ацетон (4,2л) охолоджували до 10°C та додавали протягом 1,5 години розчин 6-метокси-1-фенілідену (271г, 1,22моля) в ацетоні (1,8л) паралельно з реактивом Джонса (Jones) (1,8л, отриманий з  $\text{CrO}_3$  (470г, 4,70моля),  $\text{H}_2\text{O}$  (1л) та концентрованою  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (405мл). До отриманої суміші додавали 4%-ний водний  $\text{OsO}_4$  (153 мл) двома порціями, одну на початку додавання, а другу - у середині процесу додавання, підтримуючи температуру реакційної суміші нижче 15°C. Після додання реакційну суміш нагрівали до 22°C і перемішували протягом 1,5 години, протягом даного часу спостерігалось слабе екзотермічне підвищення температури до 28°C. Потім реакційну суміш охолоджували до температури нижче 20°C і додавали ізопропанол (1л), спочатку по краплях і швидко після зменшення початкового екзотермічного підйому температури. Під час даної фази перемішування ставало утрудненим. Під час додання ізопропанолу температура досягала 32°C. Додавали  $\text{H}_2\text{O}$  (2л) і суміш переносили в ділільну лійку. Додатково додавали  $\text{H}_2\text{O}$  для розчинення хромової кислоти, що випала в осад, і суміш екстрагували  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2л). Органічний (верхній) шар відокремлювали та водяну фазу екстрагували  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x1л). Поєднані  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  екстракти промивали послідовно  $\text{H}_2\text{O}$  (2л) і насиченим розчином солі (2л), а потім концентрували, одержуючи вологу сіру тверду речовину (416г). Дану речовину розтирали з сумішшю ацетону та  $\text{EtOAc}$  і фільтрували, одержуючи зазначену в заголовку сполуку (225,4г, 71%) у вигляді не зовсім білої твердої речовини: температура плавлення 158-159°C.

с) 2-Бензил-4-метоксифенілоцтова кислота

2-Бензоіл-4-метоксифенілоцтову кислоту (215,5г, 0,8моля) розділяли на дві рівні порції і кожну з них розчиняли в крижаній  $\text{AsOH}$  (1,5л) у товстостінній колбі на 2,5л. У кожну додавали 5%  $\text{Pd/C}$  (10г, 0,0048моля) та кожну суміш струшували при температурі навколишнього середовища в атмосфері водню в апараті Парра. Через 2,5 години суміші фільтрували для видалення каталізатора і шар на фільтрі промивали  $\text{EtOAc}$ . Поєднані фільтрати концентрували, одержуючи зазначену в заголовку сполуку (215г, кількісно) у вигляді важкої жовтої олії, що кристалізується при зберіганні:  $^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5 7,05-7,35 (м, 6H), 6,77 (дд,  $J=8,3$ , 2,7Гц, 1H), 6,71 (д,  $J=2,7$ Гц, 1H), 4,00 (с, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,54 (с, 2H).

д) 10,11-Дигідро-3-метокси-5Н-добензо[а,д]циклогептен-10-он

Розчин 2-бензил-4-метоксифенілоцтової кислоти (215г сирової речовини, що містила 204,6г (0,8моля чистої речовини)) у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1л) перемішували в атмосфері аргону при температурі навколишнього середовища та додавали ДМФ (1мл), потім оксалилхлорид (400мл, 4,59моля). Оксалилхлорид додавали протягом 1 години, спочатку додаючи по краплях для контролю інтенсивного виділення газу. Розчин перемішували протягом 16 годин при температурі навколишнього середовища і потім концентрували, одержуючи сирий хлорангідрид кислоти (207,7г, 0,756моля, 95%) у вигляді жовтої рідини. Дану рідину розчиняли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при загальному об'ємі 500мл та розчин  $\text{AlCl}_3$  (100,8г, 0,756моля) додавали паралельно протягом 1 години до  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  при перемішуванні в атмосфері аргону при температурі навколишнього середовища. Після завершенні додавання температура складала 28°C. Реакційну суміш перемішували протягом 16 годин при температурі навколишнього середовища, за цей час відбувалося осадження твердої речовини. Додавали  $\text{H}_2\text{O}$ , спочатку по краплях, протягом 30 хвилин. Потім суміш розділяли і органічну фазу промивали послідовно  $\text{H}_2\text{O}$  (1л) та 5%-ним водним розчином  $\text{NaHCO}_3$  (1л). Потім розчин  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  концентрували, одержуючи жовту тверду речовину (175,3г). Перекристалізація з  $\text{EtOAc}/\text{гексаном}$  давала зазначену у заголовку сполуку (128г, 71%): температура плавлення 107-109°C.

е) Етил (±)-10,11-Дигідро-10-гідрокси-3-метокси-5Н-добензо[а,д]циклогептен-10-ацетат

1,0М розчин біс (триметилсиліл) аміді літію в гексанах (1282мл, 1,282моля) додавали до ТГФ (4,0л) при температурі -70°C в атмосфері аргону, потім додавали по краплях протягом 20 хвилин  $\text{EtOAc}$  (146мл, 1,49моля). Реакційну суміш залишали перемішуватися протягом 15 хвилин, потім протягом 20 хвилин додавали  $\text{N,N,N',N'}$ -тетраметилетилендіамін (378мл, 2,5моля). Реакційну суміш перемішували протягом 10 хвилин, потім додавали по краплям протягом 40 хвилин розчин 10,11-дигідро-3-метокси-5Н-добензо[а,д]циклогептен-10-ону (119,2г, 0,50моля) у безводному ТГФ (1,26л). У процесі проведення всіх операцій температуру підтримували нижче -65°C. Реакційну суміш перемішували протягом 20 хвилин при -65-70°C, а потім виливали в насичений водяний розчин  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (6,2л) при інтенсивному перемішуванні.

Органічний шар відокремлювали і водяну фазу екстрагували EtOAc (2x1л). Поєднані органічні екстракти промивали H<sub>2</sub>O (2x1л), а потім концентрували, одержуючи світло-коричневу олію (175г). При тонкошаровій хроматографії (20% EtOAc/гексани) спостерігали основний R<sub>f</sub> 0,5 (бажаний продукт) та мінорний R<sub>f</sub> 0,7 (виділений кетон). Сирий продукт піддавали хроматографії на силікагелі (2кг, 10% EtOAc/гексани), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (101г, 61%) у вигляді жовтої олії. <sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,63 (д, J=7,7Гц, 7,00-7,30 (м, 4H), 6,80 (д, J=2,6Гц, 1H), 6,69 (дд, J=8,2, 2,6Гц, 1H), 3,95-4,35 (м, 2H), 4,07 (с, 2H), 3,76 (с, 3H), 3,68 (с, 1H), 3,64 (д, J=14,2Гц, 1H), 3,35 (д, J=14,2Гц, 1H), 2,79 (д, J=16,0Гц, 1H), 2,66 (д, J=16,0Гц, 1H), 1,22 (т, J=7,2Гц, 3H).

г) Етил (±)-10,11-дигідро-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат

Етил(±)-10,11-дигідро-10-гідрокси-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат (101г, 0,31моля) розчиняли у крижаній оцтовій кислоті (1/8л) та додавали 12Н HCl (28,5мл, 0,34моля). Суміш поміщали у товстостінну колбу на 2,5л, що містить 5% Pd/C (20г, 0,0094моля), та отриману суміш струшували при 35°C в атмосфері водню на апараті Парра для гідрування, обладнаному нагрівачем. Через 18 годин реакційну суміш охолоджували до температури навколишнього середовища та каталізатор видаляли фільтруванням. Фільтрат концентрували, одержуючи світло-жовту олію. Її піддавали хроматографії на силікагелі (2кг, постадійно-градієнтне елюювання сумішшю від 5% до 10% EtOAc/гексани), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (69,1г, 72%) у вигляді олії: <sup>1</sup>H ЯМР (250МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,05-7,22 (м, 4H), 7,01 (д, J=8,2Гц, 1H), 6,76 (д, J=2,7Гц, 1H), 6,67 (дд, J=8,2, 2,7Гц, 1H), 4,30 (д, J=15,0Гц, 1H), 4,11-4,25 (м, 2H), 3,85 (д, J=15,0Гц, 1H), 3,70-3,90 (м, 1H), 3,77 (с, 3H), 3,31 (дд, J=15,0Гц, 1H), 2,93 (дд, J=15,0, 9,2Гц, 1H), 2,64 (дд, J=15,6, 5,0Гц, 1H), 2,52 (дд, J=15,6, 9,3Гц, 1H), 1,27 (т, J=7,1Гц, 3H).

д) Етил (±)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат

Розчин етил (±)-10,11-дигідро-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетату (8,5г, 0,027моля) у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150мл) охолоджували до -10°C при перемішуванні в атмосфері аргону. Додавали етантіол (10,7мл, 0,144моля), потім AlCl<sub>3</sub> (20,6г, 0,154моля) двома порціями за 15 хвилин. Після додавання спостерігали екзотермічний підйом температури до 0°C, а потім температуру підвищували до 25°C з використанням водяної бані. Реакційну суміш перемішували при 25-30°C протягом 2,25 годин, і в даний момент виливали в суміш. Органічний шар відокремлювали, додавали метанол (100мл) та суміш екстрагували CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x50мл). Поєднані CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> екстракти промивали H<sub>2</sub>O (250мл), а потім концентрували, одержуючи в'язку олію (8,6г). Цю олію поміщали в Et<sub>2</sub>O (150мл) та ефір кип'ятили, замінюючи його на гексан. Цільовий фенол спочатку відокремлювався у вигляді олії, що кристалізувалася при перемішуванні при температурі навколишнього середовища. Збирали дві порції твердої речовини, одержуючи зазначену в заголовку сполуку (7,1г, 89%): температура плавлення 110-112°C.

Одержання 3

Розділення енантіомерів етил (±)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетату за допомогою висоефективної рідинної хроматографії

а) Етил (R)-(+)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат та етил (S)-(-)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат

Етил(±)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетат розділяли на енантіомери з використанням наступних умов: колонка Daicel Chiracel OJo (21,2x250мм), рухлива фаза 20%-ний етанол у гексані, швидкість потоку 15мл/хв, УФ виявлення при 254нм, введення 140мг; t (час утримування) для етил (R)-(+)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетату=13,1 хвилини.

Одержання 4

Одержання 10,11-дигідро-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-она

а) 2-Бензил-4-метоксифенілоцтова кислота

Розчин 2-бензоіл-4-метоксифенілоцтової кислоти (13,0г, 0,048моля), отриманої способом, описаним у J. Med. Chem., 1981, 24, 998, у крижаній оцтовій кислоті (600мл) обробляли в атмосфері аргону 4,3г 10% Pd/C та піддавали гідруванню при 50фунтах/дюйм (344,74КПа) протягом 17 годин. Суміш фільтрували з використанням celite® і фільтрат концентрували, після чого повторно концентрували з толуолом та хлористим метилом, одержуючи 14,2г зазначеної у заголовку сполуки: <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,52 (с, 2H), 3,75 (с, 3H), 4,0 (с, 3H), 6,7 (м, 2H), 7, 15 (м, 6H).

б) 10,11-Дигідро-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-он

Розчин 2-бензил-4-метоксифенілоцтової кислоти (14,2г, 0,055моля) у бензолі (120мл) та тіонілхлорид (28мл) нагрівали при кипінні зі зворотним холодильником протягом 1 години та концентрували. Хлорангідрид кислоти розчиняли в сухому хлористому метилені (40мл) та розчин додавали по краплях в атмосфері аргону до розчину AlCl<sub>3</sub> (14,7г, 0,11моля) у хлористому метилені (600мл). Реакційну суміш перемішували в атмосфері аргону протягом 2,5 годин при кімнатній температурі, потім гасили сумішшю лід-вода (200мл). Шари відокремлювали й органічну фазу промивали послідовно 10%-ним розчином NaOH, водою і розведеної HCl. Отриманий розчин розводили простим ефіром (200мл), сушили над MgSO<sub>4</sub> та концентрували, твердий залишок розтирали з сумішшю простий ефір/гексан (1:1) і збирали фільтруванням 9,25г зазначеної у заголовку сполуки: температура плавлення 105-106°C; <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,72 (с, 3H), 4,1 (с, 2H), 4, (с, 2H), 6,7 (д, 1H), 6,82 (с, 1H), 7,30 (м, 4H), 8,1 (д, 1H).

Одержання 5

Одержання етил (±)-10,11-дигідро-3-метокси-5Н-дibenзо[а,d]циклогептен-10-ацетату

а) Етил (±)-3-(3-метоксифеніл)інденацетат

До холодного розчину 3-(3-метоксифеніл)індену (4г, 18ммоль), отриманого згідно зі способом, описаним у J. Med. Chem., 1981, 24, 998, в ТГФ (15мл) при 0°C добавляли по краплях розчин LiN(TMS)<sub>2</sub> (20мл, 1М у ТГФ) протягом 5 хвилин. Отриманий розчин добавляли по краплях до розчину етилбромацетату (3,34г, 20ммоль) у ТГФ протягом 30 хвилин. Через 2,5 години суміш гасили насиченим розчином хлориду амонію і шари відокремлювали. Органічний шар сушили над MgSO<sub>4</sub> та концентрували, одержуючи сирий продукт, який очищали за допомогою колоночної хроматографії (SiO<sub>2</sub>/2-4% EtOAc/гексан), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (1,1г): <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,30 (т, 3H), 2,50 (м, 1H), 2,85 (м, 1H), 3,85 (с, 3H), 4,0 (м, 1H), 4,20 (кв, 2H), 6,6 (с, 1H), 6,9 (м, 1H), 7,2 (с, 1H), 7,35 (м, 6H).

б) Етил (±)-3-[(3-метоксибензоїл)]фенілсукцинат

Розчин етил (±)-3-(3-метоксифеніл)інденацетату (1,1г, 3,6ммоль) в ацетоні (30мл) обробляли 4%-ним водяним розчином тетраоксиду осмію (0,5мл) з наступним додаванням по краплях 1,2М реактиву Джонса (5мл, 6ммоль) відповідно до літературного способу (J. Org. Chem., 1993, 58, 4745). Після перемішування протягом ночі при кімнатній температурі темну реакційну суміш гасили ізопропанолом, після чого бісульфітом натрію (0,9г) та водою (30мл). Продукт екстрагували етилацетатом, промивали насиченим розчином солі, сушили над  $MgSO_4$  та концентрували, одержуючи твердий залишок. Розтирання з сумішшю 1:1 простий ефір/гексан давало 0,76г зазначеної в заголовку сполуки:  $^1H$  ЯМР (400МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,18 (т, 3H), 2,90 (м, 1H), 3,3 (м, 1H), 3,92 (с, 3H), 4,1 (кв, 2H), 4,4 (м, 1H), 4,4 (д, 1H), 7,25 (м, 2H), 7,5 (м, 6H).

с) Етил (±)-3-[(3-метоксибензил)]фенілсукцинат

Суміш етил (±)-3-[(3-метоксибензоїл)]фенілсукцинату (0,76г, 2,1ммоль) та 10% Pd/C (0,6г) у крижаній оцтовій кислоті (35мл) піддавали гідруванню при тиску 50фунтів/кв.дюйм (344,74КПа) протягом 17 годин. Суміш фільтрували через celite® і шар на фільтрі промивали оцтовою кислотою. Фільтрат концентрували, після чого повторно концентрували з толуолом та хлористим метиленом, одержуючи 0,65г зазначеної у заголовку сполуки:

$^1H$  ЯМР (400МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,20 (т, 3H), 2,20 (м, 1H), 3,0 (м, 1H), 3,74 (с, 3H), 4,1 (кв, 2H), 4,18 (кв, 2H), 4,4 (д, 1H), 6,2 (м, 2H), 7,22 (м, 6H).

д) Етил (±)-10,11-дигідро-3-метокси-11-оксо-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетат

До розчину етил (±)-3-[(3-метоксибензил)]фенілсукцинату (0,65г, 1,9ммоль) у сухому хлористому метилени 910мл, що перемішується на магнітній мішалці, додавали ДМФ (0,2мл) та оксалилхлорид (0,2мл, 2,28ммоль). Через 1,5 години розчин додавали по краплях до суспензії хлориду алюмінію (0,6г, 4,5ммоль) у сухому хлористому метилени (15мл). Суміш гасили через 2 години крижаною водою, шари відокремлювали та водяний шар екстрагували хлористим метиленом. Поєднані органічні шари висушували над  $MgSO_4$  та концентрували. Залишок очищали шляхом колоночної хроматографії ( $SiO_2$ /2-4% EtOAc/гексан), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (0,3г):  $^1H$  ЯМР (400МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,28 (т, 3H), 2,88 (м, 1H), 3,55 (м, 1H), 3,84 (с, 3H), 3,88 (д, 1H), 4,18 (кв, 2H), 4,85 (д, 1H), 4,95 (м, 1H), 5,8 (м, 2H), 7,22 (м, 4H), 8,1 (с, 1H).

е) Етил (±)-10,11-дигідро-3-метокси-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетат

Суміш етил(±)-10,11-дигідро-3-метокси-11-оксо-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетату (0,3г, 0,93ммоль) та 10% Pd/C (0,3г) у крижаній оцтовій кислоті (25мл) піддавали гідруванню при тиску 50фунтів/кв.дюйм (344,74КПа) протягом 18 годин. Суміш фільтрували через celite®, та шар на фільтрі промивали оцтовою кислотою. Фільтрат концентрували та повторно концентрували з толуолом і хлористим метиленом, одержуючи 0,25г зазначеної у заголовку сполуки:  $^1H$  ЯМР (400МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  1,28 (т, 3H), 2,60 (м, 2H), 2,90 (м, 1H), 3,30 (м, 1H), 3,80 (с, 3H), 3,85 (д, 1H), 4,18 (кв, 2H), 4,30 (д, 1H), 6,70 (м, 2H), 7,0 (д, 1H), 7,22 (м, 2H).

Наступний приклад ілюструє спосіб одержання біологічно активної сполуки згідно з даним винаходом з проміжних сполук, таких, що описані в попередніх способах одержання.

Приклад 1

Одержання (S)-10,11-дигідро-3-[2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етокси]-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-оцтової кислоти

а) Етил (S)-10,11-дигідро-3-[2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етокси]-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетат

До розчину етил (S)-10,11-дигідро-3-гідрокси-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетату (200мг, 0,67ммоль), 2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етанолу (241мг, 1,35ммоль) та  $PPh_3$  (354мг, 1,35ммоль) у сухому ТГФ (5мл) додавали дізопропілазодикарбосилат (0,27мл, 1,35ммоль) при 0°C. Суміш залишали нагріватися до кімнатної температури при нагрівання бані. Через 18 годин суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок піддавали хроматографії на силікагелі (1:4,5 гексани/ $Et_2O$ ), одержуючи зазначену в заголовку сполуку (94мг, 31%) у вигляді прозорої олії: мас-спектр (ES) m/e 457 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

б) (S)-10,11-Дигідро-3-[2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етокси]-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-оцтова кислота

До розчину етил (S)-10,11-дигідро-3-[2-(5,6,7,8-тетрагідро-1,8-нафтиридин-2-іл)-1-етокси]-5H-дibenзо[a,d]циклогептен-10-ацетату (131мг, 0,29ммоль) у суміші ТГФ/ $H_2O$  (2мл) додавали 1,0н LiOH (0,43мл, 0,43ммоль) та суміш нагрівали при 50°C. Через 18 годин суміш охолоджували до кімнатної температури та промивали  $Et_2O$  (2x2мл). Водяний шар підкислювали до pH 6 при використанні 10%-ної HCl. Отриманий молочновидний розчин пропустили через C-18-колонок поєднаного елюювання (градієнтне елюювання:  $H_2O$ , потім 20%  $CH_3CN/H_2O$ , потім  $CHCl_3$  як елюента). Фракції, що містять продукт, концентрували при зниженому тиску, отримуючи зазначену в заголовку сполуку (30мг, 24%) у вигляді білого порошку: мас-спектр (ES) m/e 429 ( $M+H$ )<sup>+</sup>. Аналіз: обчислене для  $C_{27}H_{28}N_2O_3$ , 0,95 HCl: C, 70,02; H, 6,30; N 6,05. Знайдено: C, 70,01; H, 6,33; N 5,71.

Приклад 2

Парентеральна композиція одиничної препаративної лікарської форми.

Препаративну форму, що містить 20мг сполуки згідно з прикладом 1 у вигляді стерильного сухого порошку, одержують наступним способом: 20мг сполуки розчиняють у 15мл дистильованої води. Розчин фільтрують у стерильних умовах у 25мл мультидозовочну ампулу та піддають ліофілізації. Вміст вологи у порошку відновлюють додаванням 30мл 5% декстрази у воду (D5W) для внутрішньовенної або внутрим'язової ін'єкції. Дозування, таким чином, визначають по об'єму, що вводять. Подальше розведення можна проводити, додаючи виміряний об'єм даного дозування до іншого об'єму D5W для ін'єкції, або виміряна доза може бути додана до іншого механізму відпуску лікарського засобу, такого як пляшка або ємність для IV краплинної інфузії або в інші ін'єкційно-інфузійні системи.

Приклад 3

Пероральна композиція одиничної препаративної лікарської форми.

Капсулу для перорального введення одержують змішуванням та роздрібненням 50мг сполуки згідно з прикладом 1 з 75мг лактози та 5мг стеарату магнію. Отриманий порошок просівають і заповнюють їм тверду

желатинову капсулу.

#### Приклад 4

Пероральна композиція одиничної препаративної лікарської форми.

Таблетку для перорального введення одержують змішуванням та гранулюванням 20мг сахарози, 150мг дигідрату сульфату кальцію та 50мг сполуки згідно з прикладом 1 з 10% розчином желатину. Вологі гранули просівають, сушать, змішують з 10мг крохмалю, 5мг тальку та 3мг стеаринової кислоти та пресують у таблетку.

Вищевказаний опис цілком розкриває, яким способом здійснити та використовувати даний винахід. Проте, даний винахід не обмежений описаними вище конкретними варіантами його здійснення, але включає всі модифікації в об'ємі наведеної далі формули винаходу. Різні посилання на журнали, патенти та інші публікації, що процитовані в даному описі, охоплюють стан даної галузі та включені в опис шляхом посилання, так якщо вони були б викладені цілком.