(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201691328 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.10.31

(22) Дата подачи заявки
2013.12.27

(51) Int. Cl. ***C07K 7/64*** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) БЕТА-ШПИЛЕЧНЫЕ ПЕПТИДОМИМЕТИКИ В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЭЛАСТАЗЫ

(86) **PCT/EP2013/078072**
(87) **WO 2015/096872 2015.07.02**

(71) Заявитель:
ПОЛИФОР АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Гомберт Фран Отто, Обрехт Даниэль (CH), Селье-Кесслер Одиль (FR)

(74) Представитель:
Квашнин В.П. (RU)

(57) β-Шпилечные пептидомиметики общей формулы цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-) и их фармацевтически приемлемые соли, причем Xaa^1, Xaa^2, Xaa^4, Xaa^6, Xaa^7, Xaa^8, Xaa^9, Xaa^{10}, Xaa^{11}, Xaa^{12} и Xaa^{13} представляют собой аминокислотные остатки, которые определены в описании изобретения и в формуле изобретения, имеют ингибирующие свойства в отношении эластазы, особенно в отношении человеческой нейтрофильной эластазы, и могут применяться для профилактики инфекций или заболеваний, связанных с такими инфекциями, у здоровых субъектов или для уменьшения инфекций у инфицированных пациентов. Соединения согласно настоящему изобретению могут также применяться, когда рак, или иммунологические заболевания, или легочные заболевания, или сердечно-сосудистые заболевания, или нейродегенеративные заболевания, или воспаление, или заболевания, связанные с воспалением, опосредованы или являются результатом эластазной активности. Эти пептидомиметики могут быть получены способом, который основан на смешанной стратегии твердофазного синтеза и синтеза в растворе.

201691328 A1

201691328 A1

БЕТА-ШПИЛЕЧНЫЕ ПЕПТИДОМИМЕТИКИ В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЭЛАСТАЗЫ

Описание

Настоящее изобретение обеспечивает β-шпилечные пептидомиметики, которые полезны в качестве ингибиторов протеазных ферментов и охватываются в общем описанием, но конкретно не раскрываются в WO2006/087001 A1.

β- шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению представляют собой соединения общей формулы цикло(Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-), и их фармацевтически приемлемые соли, причем Xaa^1, Xaa^2, Xaa^4, Xaa^6, Xaa^7, Xaa^8, Xaa^9, Xaa^{10}, Xaa^{11}, Xaa^{12} и Xaa^{13} представляют собой аминокислотные остатки определенных типов, которые определены в описании настоящего изобретения и в формуле изобретения.

Эти β-шпилечные пептидомиметики полезны в качестве ингибиторов протеазных ферментов и имеют особую ценность в качестве ингибиторов определенных серинпротеаз, таких как эластаза.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает эффективный способ, посредством которого эти соединения, если желательно, могут быть получены в формате библиотеки.

β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению показывают высокую ингибирующую активность против нейтрофильной эластазы человека, при этом имея низкую ингибирующую активность против протеиназы 3 и неожиданно низкую ингибирующую активность против свиной панкреатической эластазы (PPE). Эти благоприятные профили активность/селективность зависят от

соответствующего выбора определенных типов α-, β- или γ-аминокислотных остатков и их положений в моноциклическом пептидомиметике.

Ингибиторы протеаз показывают перспективные терапевтические применения при лечении заболеваний, таких как рак (R. P. Beckett, A. Davidson, A. H. Drummond, M. Whittaker, *Drug Disc. Today* **1996**, *1*, 16-26; L. L. Johnson, R. Dyer, D. J. Hupe, *Curr. Opin. Chem. Biol*. **1998**, *2*, 466-71; D. Leung, G. Abbenante, и D. P. Fairlie, *J. Med. Chem*. **2000**, *43*, 305-341, T. Rockway, *Expert Opin. Ther. Patents* **2003**, *13*, 773-786), паразитические, грибковые и вирусные инфекции [например, бильгарциоз (M. M. Becker, S. A. Harrop, J. P. Dalton, B. H. Kalinna, D. P. McManus, D. P. Brindley, *J. Biol. Chem*. **1995**, *270*, 24496-501); *C. albicans* (C. Abad-Zapetero, R. Goldman, S. W. Muchmore, C. Hutchins, K. Stewart, J. Navaza, C. D. Payne, T. L. Ray, *Protein Sci*. **1996**, *5*, 640-52), ВИЧ (A. Wlodawer, J. W. Erickson, *Annu. Rev. Biochem*. **1993**, *62*, 543-85; P. L. Darke, J. R. Huff, *Adv. Pharmacol*. **1994**, *5*, 399-454), гепатит (J. L. Kim, K. A. Morgenstern, , C. Lin, T. Fox, M. D. Dwyer, J. A. Landro, S. P. Chambers , W. Markland, C. A. Lepre, E. T. O'Malley, S. L. Harbeson, C. M. Rice, M. A. Murcko, P. R. Caron, J. A. Thomson, *Cell*, **1996**, *87*, 343-55; R. A. Love, H. E. Parge, J. A. Wickersham, Z. Hostomsky, N. Habuka, E. W. Moomaw, T. Adachi, Z. Hostomska, *Cell*, **1996**, *87*, 331-342), герпес (W. Gibson, M. R. Hall, Drug. Des. Discov. 1997, 15, 39-47)], и воспалительные, иммунологические, респираторные (P. R. Bernstein, P. D. Edwards, J. C. Williams, *Prog. Med. Chem*. **1994**, *31*, 59-120; T. E. Hugli, Trends Biotechnol. **1996**, *14*, 409-12,), сердечнососудистые (M. T. Stubbs, W. A. Bode, *Thromb. Res*. **1993**, *69*, 1-58; H. Fukami et al, *Current Pharmaceutical Design* **1998**, *4*, 439-453), и нейродегенеративные нарушения, включая синдром Альцгеймера (R. Vassar, B. D. Bennett, S. Babu-Kahn, S. Kahn, E. A. Mendiaz, *Science*, **1999**, *286*, 735-41), ангиогенез (M. Kaatinen et al, *Atherosklerosis* **1996**, *123* 1-2, 123-131), и рассеянный склероз (M. Z. Ibrahim et al, *J. Neuroimmunol* **1996**, *70*, 131-138.

Большинство протеаз связывают их субстраты в расширенной или β-нитевой конформациях, таким образом, хорошие ингибиторы должны быть способны имитировать такую конформацию. β-шпилечные миметики, таким образом,

идеально подходят к замку пептидных последовательностей в расширенной конформации.

Среди протеаз, серинпротеазы представляют собой важные терапевтические мишени. Серинпротеазы классифицируются по их специфичности к субстрату, в частности по типу остатка, обнаруженного при P1, как либо трипсин-подобные (положительно заряженные остатки Lys/Arg, предпочтительные при P1), эластаза-подобные (малые гидрофобные остатки Ala/Val при P1), или химотрипсин-подобные (большие гидрофобные остатки Phe/Tyr/Leu при P1). Серинпротеазы, для которых данные рентген-кристаллографии протеазного ингибитора доступны в базе данных PDB (PDB: www.rcsb.org/pdb) включают трипсин, α-химотрипсин, γ-химотрипсин, человеческую нейтрофильную эластазу, свиную панкреатическую эластазу, тромбин, субтилизин, человеческую цитомегаловирусную протеазу A, ахромобактер протеазу 1, человеческий катепсин G, глютаминовая кислота-специфическую протеазу, карбопептидазу D, фактор свертывания крови VIIa, свиной фактор свёртывания крови 1XA, мезентерикопептидазу, ВИЧ протеазу и термитазу. Другие серинпротеазы, которые представляют терапевтический интерес, включают триптазу, комплемент конвертазу, протеазу гепатита C-NS3. Ингибиторы тромбина (например, J. L. Metha, L. Y. Chen, W. W. Nichols, C. Mattsson, D. Gustaffson, T. G. P. Saldeen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31*, 345-51; C. Lila, P. Gloanec, L. Cadet, Y. Herve, J. Fournier, F. Leborgne, T. J. Verbeuren, G. DeNanteuil, *Synth. Comm.* **1998**, *28*, 4419-29) и фактор Xa (например, J. P. Vacca, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1998**, *33*, 81-90) применялись в клинических оценках в качестве анти-тромболитиков, ингибиторы эластазы (J. R. Williams, R. C. Falcone, C. Knee, R. L. Stein, A. M. Strimpler, B. Reaves, R. E. Giles, R. D. Krell, *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *144*, 875-83) применялись в клинических исследованиях эмфиземы и других легочных заболеваний, тогда как триптазные ингибиторы применялись в фазе II клинических исследований астмы (C. Seife, *Science* **1997**, *277*, 1602-3), урокиназные ингибиторы рака молочных желез и химазные ингибиторы для заболеваний, связанных с сердцем. Наконец, катепсин G, эластаза и протеиназа 3 непосредственно участвуют в модуляции активностей цитокинов и их рецепторов. Особенно в местах воспаления, высокая концентрация этих трех

нейтрофильных серинпротеаз (NSP) высвобождаются в результате инфильтрации полиморфноядерных клеток в близкой временной корреляции с повышенными уровнями воспалительных цитокинов, явно показывая, что эти протеазы участвуют в контроле биоактивности и доступности цитокинов (U. Bank, S. Ansorge, *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 177-90). Таким образом, высокоселективные ингибиторы эластазы представляют собой ценные мишени для кандидатов в новые лекарственные средства для лечения инфекционных воспалительных заболеваний, включая заболевания легких, такие как хроническое обструктивное заболевание легких, синдром острой дыхательной недостаточности, фиброзно-кистозная дегенерация и ишемическое реперфузионное повреждение, и в неинфекционных процессах, таких как гломерулонефрит, артрит и буллёзный пемфигоид (H. Ohbayashi, *Epert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 965-980; B. Korkmaz, T. Moreau, F. Gauthier, *Biochimie* **2008**, *90*, 227).

Из множества встречающихся белковых серинпротеазных ингибиторов, одним является циклический пептид из 14 аминокислот из семян подсолнечника, называемый подсолнечковым ингибитором трипсина (**SFTI-1**) (S. Luckett, R. Santiago Garcia, J. J. Barker, A. V. Konarev, P. R. Shewry, A. R. Clarke, R. L. Brady, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 525-533; Y.-Q. Long, S.-L. Lee, C.-Y. Lin, I. J. Enyedy, S. Wang, P. Li, R. B. Dickson, P. P. Roller, *Biorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2515-2519), который показывает как подобие последовательности, так и подобие конформации с трипсин-реакционноспособной петлей серинпротеазных ингибиторов семейства Баумана-Бирка. Ингибитор адаптируется к β-шпилечной конформации при связывании с активным сайтом бычьим β-трипсином. **SFTI-1** ингибировал β-трипсин (K_i<0.1 нМ), катепсин G (K_i ~0.15 нМ), эластазу (K_i ~105 мкмМ), химотрипсин (K_i ~7.4 мкМ) и тромбин (K_i ~136 мМ).

β-шпилечная конформация соединений цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-) основана на β-шпилечной петле из пептида природного происхождения, объединенного с D-аминокислотным остатком в положении 12, при присутствии консервативных аминокислотных остатков Thr и Ser в положении 3 и 5, соответственно.

Связанные с матрицей β-шпилечные пептидомиметики были описаны в литературе (D. Obrecht, M. Altorfer, J. A. Robinson, *Adv. Med. Chem*. **1999**, *4*, 1-68; J. A. Robinson, *Syn. Lett.* **2000**, *4*, 429-441), и ингибирующие серинпротеазу закрепленные на матрице пептидомиметики и способы их синтеза были описаны в международных заявках на патент WO2003/054000 A1, WO2006/087001 A1 и в A. Descours, K. Moehle, A. Renard, J. A. Robinson, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 318-323, но ранее описанные молекулы не проявляют такие предпочтительные профили активность/селективность.

Была установлена способность получать β-шпилечные пептидомиметики, применяя комбинаторные и параллельные способы синтеза (L. Jiang, K. Moehle, B. Dhanapal, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Helv. Chim. Acta*. **2000**, *83*, 3097-3112). Способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают синтез и скрининг больших библиотек шпилечных миметиков, что, в свою очередь, значительно облегчает изучение структуры-активности, и следовательно открывает новые молекулы с весьма эффективной и селективной ингибирующей активностью в отношении серинпротеаз, особенно с такими предпочтительными профилями активность/селективность, как описано в настоящей заявке, имеющие свойства соединений, подходящих для новых лекарственных средств.

β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению представляют собой соединения общей формулы

цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-)(**I**),

и их фармацевтически приемлемые соли,

в которой

Xaa^1 представляет собой OctGly; Arg; hArg; Cha; Glu(Фенэтил); или Dab(Бутаноил);

Xaa^{2} представляет собой Glu; Val; Leu; Nle; Phe; hPhe; DiHPhe; Tyr; hTyr; или Trp;

Xaa^{4} представляет собой Ala; AllylGly; Abu; или Val;

Xaa^{6} представляет собой Ile; или OctGly;

Xaa^{7} представляет собой Pro;

Xaa^{8} представляет собой Pro;

Xaa^{9} представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys; или Asn;

Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; hSer; hSer(Me); Thr; alloThr; Asn; Gln; hGln; Dap; Tyr; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Glu; Asp; Ala; Val; или Lys;

при условии, что

- если Xaa^{1} представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;
  Xaa^{4} представляет собой Ala; или Abu;
  Xaa^{6} представляет собой Ile; или OctGly;
  Xaa^{10} представляет собой Lys;
  Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; или Gln;
  Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Ala; Val; или Lys;

- и/или если Xaa^6 представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^1 представляет собой OctGly; Arg; или Cha;
  Xaa^2 представляет собой Glu; или Nle;
  Xaa^4 представляет собой Ala; или Abu;
  Xaa^{10} представляет собой Lys;
  Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; Gln;
  Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Ala; Val; или Lys;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
  Xaa^1 представляет собой Arg; hArg; или Glu(Фенэтил).

Согласно настоящему изобретению эти β-шпилечные пептидомиметики могут быть получены способом, который включает

(a) связывание соответствующим образом функционализированной твердой подложки с соответствующим образом N-защищенной производной той аминокислоты, которая в желаемом конечном продукте соответствует Xaa^n, где n равно 13, 8, 7, 6, 5 или 4, причем любая функциональная группа, которая может присутствовать в указанной N-защищенной аминокислотной производной, подобным образом, защищена соответствующим образом;

(b) удаление N-защитной группы из продукта, полученного таким образом;

(c) связывание продукта, полученного таким образом, с соответствующим образом N-защищенной производной той аминокислоты, которая в желаемом конечном продукте соответствует Xaa^{n-1}, причем любая функциональная группа, которая может присутствовать в указанной N-защищенной аминокислотной производной, подобным образом, защищена соответствующим образом;

(d) удаление N-защитной группы из продукта, полученного на стадии (c);

(e) осуществление стадий по существу в соответствии со стадиями (c) и (d), применяя соответствующим образом N-защищенные производные аминокислот, которые в желаемом конечном продукте находятся в положениях n-2 - 1, причем любая функциональная группа (группы), которые могут присутствовать в указанных N-защищенных аминокислотных производных, подобным образом, являются защищенными соответствующим образом;

(f) если n не равно 13, далее осуществляются стадии, по существу, в соответствии со стадиями (c) и (d), применяя соответствующим образом N-защищенные производные аминокислот, которые в желаемом конечном продукте находятся в положениях 13 - n + 1, причем любая функциональная группа (группы), которые могут присутствовать в указанных N-защищенных аминокислотных производных, подобным образом, являются защищенными соответствующим образом;

(g) если желательно, перед удалением N-защитной группы из продукта, полученного на стадиях (e) или (f), селективно удаляется защита одной или нескольких защищенных функциональных групп, присутствующих в молекуле, и соответствующим образом замещается реакционноактивная группа (группы), высвободившиеся таким образом, путем присоединения одной или нескольких составляющих, полученных из кислот, аминокислот и аминов, и удаляется N-защитная группа из полученного продукта;

(h) отделение продукта, полученного таким образом, от твердой подложки;

(i) циклизация продукта, отщепленного от твердой подложки;

(j) удаление любых защитных групп, присутствующих при функциональных группах любых членов цепи аминокислотных остатков; и

(k) если желательно, превращение продукта, полученного таким образом, в фармацевтически приемлемую соль, или превращение фармацевтически приемлемой, или неприемлемой, соли, полученной таким образом, в соответствующее свободное соединение или в другую фармацевтически приемлемую соль.

Далее приводится перечень аминокислот, которые или остатки которых, являются подходящими в целях согласно настоящему изобретению, причем аббревиатуры соответствуют в общем адаптированной стандартной практике:

Трехбуквенный код		однобуквенный код
Ala	L-аланин	A
Val	L-валин	V
Leu	L-лейцин	L
Phe	L-фенилаланин	F
His	L-гистидин	H
Tyr	L-тирозин	Y
Trp	L-триптофан	W
Lys	L-лизин	K
Arg	L-аогинин	R
Ser	L-серин	S
Thr	L-теонин	T
Asp	L-аспарагиновая кислота	D
Asn	L-аспарагин	N
Glu	L-глутаминовая кислота	E
Gln	L-глутамин	Q
Pro	L-пролин	P

AllylGly	L-аллилглицин
Abu	L-α-аминомасляная кислота
OctGly	L-октилглицин
Cha	L-циклогексилаланин
Nle	L-норлейцин
hLeu	L-гомо-лейцин
hPhe	L- гомо -фенилаланин
DiHPhe	L-дигомо-фенилаланин, (2S)-2-амино-5-фенилпентановая кислота
hTyr	L- гомо -тирозин
Dap	L-2,3-диаминопропионовая кислота
hArg	L- гомо -аргинин
hSer	L- гомо -серин
hSer(Me)	L- гомо -O-метилсерин
alloThr	(2S, 3S)-2-амино-3-гидрокси-масляная кислота
hGln	L- гомо -глутамин
Glu(Фенэтил)	(2S)-2-амино-5-фенэтиламино-5-оксопентановая кислота
Dab(Бутаноил)	(2S)-2-амино-4-бутанамидо-бутановая кислота
Tic	(3S)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота

В конкретном варианте выполнения настоящего изобретения β-шпилечные пептидомиметики представляют собой соединения общей формулы I, и их фармацевтически приемлемые соли, в которых

Xaa^1 представляет собой OctGly; Arg; hArg; или Glu(Фенэтил);
Xaa^2 представляет собой Glu; Nle; hTyr; или Val;
Xaa^4 представляет собой Ala; или AllylGly;
Xaa^6 представляет собой Ile;
Xaa^7 представляет собой Pro;
Xaa^8 представляет собой Pro;
Xaa^9 представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys;

Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; Thr; Asn; Tyr; hGln; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro;

При условии, что

- если Xaa^{1} представляет собой OctGly, тогда
- Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;
- Xaa^{4} представляет собой Ala;
- Xaa^{6} представляет собой Ile;
- Xaa^{10} представляет собой Lys;
- Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; или Asn
- Xaa^{13} представляет собой Pro;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
- Xaa^{1} представляет собой Arg; hArg или Glu(Фенэтил).

В другом конкретном варианте выполнения настоящего изобретения β-шпилечные пептидомиметики представляют собой соединения общей формулы I, и их фармацевтически приемлемые соли, в которых

Xaa^{1} представляет собой OctGly; Arg; или Glu(Фенэтил);

Xaa^{2} представляет собой Glu; Nle; hTyr; или Val;

Xaa^{4} представляет собой Ala;

Xaa^{6} представляет собой Ile;

Xaa^{7} представляет собой Pro;

Xaa^{8} представляет собой Pro;

Xaa^{9} представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys;

Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; Tyr; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro;

При условии, что

- если Xaa^{1} представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
  Xaa^{1} представляет собой Arg.

В другом конкретном варианте выполнения настоящего изобретения β-шпилечные пептидомиметики представляют собой соединения общей формулы I, и их фармацевтически приемлемые соли, в которых

Xaa^{1} представляет собой Arg; или hArg;
Xaa^{2} представляет собой Glu; Val; или hTyr;
Xaa^{4} представляет собой Ala; или AllylGly;
Xaa^{6} представляет собой Ile;
Xaa^{7} представляет собой Pro;
Xaa^{8} представляет собой Pro;
Xaa^{9} представляет собой Gln; или Tyr;
Xaa^{10} представляет собой Lys;
Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; Thr; или hGln;
Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и
Xaa^{13} представляет собой Pro.

В другом конкретном варианте выполнения настоящего изобретения β-шпилечные пептидомиметики представляют собой соединения общей формулы I, и их фармацевтически приемлемые соли, выбранные из

цикло(-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Asn-^{D}Pro-Pro-);

цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Ser-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-hTyr-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Nle-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-His-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Glu(Фенэтил)-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-).

В другом конкретном варианте выполнения настоящего изобретения β-шпилечные пептидомиметики представляют собой соединения общей формулы I, и их фармацевтически приемлемые соли, выбранные из

цикло (-Arg-Glu-Thr-AllylGly-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Ser-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-hArg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-hLeu-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-hGln-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-hTyr-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-).

Способ согласно настоящему изобретению может быть преимущественно проведен как параллельный синтез, чтобы получить библиотеки β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению. Такие параллельные матричные синтезы позволяют получать массивы многочисленных (как правило, от 24 до 192, обычно 96) соединений, как описано выше с выходами от умеренных до высоких и определенной чистоты, сводя к минимуму образование димерных и полимерных продуктов. Правильный выбор функционализованного твердого носителя (т. е. твердого носителя плюс линкерная молекула) и сайта циклизации играют, таким образом, ключевую роль.

Функционализированный твердый носитель удобно получать из поперечносшитого полистирола предпочтительно с 1-5% дивинилбензола; полистирола, покрытого полиэтилегликолевыми спейсерами (Tentagel™); и полиакриламидной смолы (см. также D. Obrecht, J.-M. Villalgordo, "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries", *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Vol. 17, Pergamon, Elsevier Science, 1998).

Твердый носитель функционализируется с помощью линкера, т. е. бифункциональной спейсерной молекулы, которая содержит на одном конце якорную группу для прикрепления к твердому носителю, и на другом конце избирательно расщепляемую функциональную группу, используемую для последующих химических превращений и процессов отщепления. Для целей настоящего изобретения используются два типа линкеров:

Линкеры типа 1 предназначены, чтобы высвобождать амидную группу в кислых условиях (Rink H, Tetrahedron Lett. 1987, 28, 3783-3790). Линкеры этого вида образуют амиды карбоксильной группы аминокислот; примерами смол, функционализированных такими линкерными структурами, являются 4-[(((2,4-диметоксифенил)Fmoc-аминометил)феноксиацетамидо)аминометил] PS смола, 4-[(((2,4-диметоксифенил)Fmoc-аминометил)феноксиацетамидо)аминометил] бензгидриламин PS-смола (амидная полистироловая MBHA смола Ринка), и 4 [(((2,4 диметоксифенил)Fmoc-аминометил)феноксиацетамидо)аминометил] бензгидриламиновая PS смола (амидная полистироловая BHA смола Ринка). Предпочтительно, чтобы носитель был получен из полистирола, поперечно сшитого с дивинилбензолом (наиболее предпочтительно 1-5%), и функционализирован при помощи 4-(((2,4-диметоксифенил)Fmoc-аминометил)феноксиацетамидо) линкера.

Линкеры типа 2 предназначены, чтобы в конечном счете высвобождать карбоксильную группу в кислых условиях. Линкеры такого рода образуют кислотно-лабильные сложные эфиры с карбоксильной группой аминокислот, как

правило, лабильные в кислых условиях бензильные, бензгидрильные и тритильные сложные эфиры; примеры таких линкерных структур включают 2-метокси-4-гидроксиметилфенокси (Sasrin™ linker), 4-(2,4-диметоксифенил гидроксиметил)фенокси (линкер Ринка), 4-(4-гидроксиметил-3-метоксифенокси)бутановая кислота (линкер HMPB), тритильный и 2-хлортритильный. Предпочтительно, чтобы носитель был получен из полистирола, поперечно сшитого наиболее предпочтительно с 1-5% дивинилбензола, и функционализированного при помощи 2-хлоротритильного линкера.

При проведении параллельного матричного синтеза способ согласно настоящему изобретению может быть успешно осуществлен, как описано ниже, но это будет естественным образом очевидно специалистам в данной области техники, каким образом эти методики должны будут модифицироваться в случае, если необходимо синтезировать одно конкретное соединение по настоящему изобретению.

Ряд реакционных сосудов, число которых равно суммарному числу соединений, которые должны быть синтезированы параллельным методом, загружают от 25 до 1000 мг, предпочтительно 60 мг, подходящего функционализированного твердого носителя, предпочтительно от 1 до 5% поперечно сшитого полистирола или смолы Tentagel.

Применяемый растворитель должен привести к набуханию смолы и включает, но не ограничивается этим, дихлорометан (DCM), диметилформамид (DMF), N-метилпирролидон (NMP), диоксан, толуол, тетрагидрофуран (THF), этанол (EtOH), трифтороэтанол (TFE), изопропиловый спирт и им подобные. Смеси растворителей, содержащие по меньшей мере один компонент полярного растворителя (например, 20% TFE/DCM, 35% THF/NMP) являются полезными для обеспечения высокой реакционной способности и сольватации связанных со смолой пептидных цепей (G.B. Fields, C.G. Fields, *J. Am. Chem. Soc*. 1991, *113*, 4202-4207).

С разработкой различных линкеров, которые высвобождают С-концевую карбоксильную группу в мягких кислых условиях, не воздействующих на кислотно-лабильные группы, которые защищают функциональные группы в боковой цепи(ях), был сделан значительный прогресс в синтезе защищенных пептидных фрагментов. Линкер - производное 2-метокси-4-гидроксибензилового спирта (Sasrin™ linker, Mergler et al., *Tetrahedron Lett.* 1988, 29 4005-4008) расщепляется разбавленной трифторуксусной кислотой (0,5-1% TFA в DCM) и устойчив в условиях удаления защитных групп Fmoc в течение пептидного синтеза, причем дополнительные защитные группы на основе Boc/tBu совместимы с этой схемой защиты. Другие линкеры, которые подходят для способа согласно изобретению, включают суперкислотно-лабильный 4-(2,4-диметоксифенилгидроксиметил)-фенокси линкер (линкер Ринка, H. Rink, *Tetrahedron Lett.* 1987, *28*, 3787-3790), когда удаление пептида требует 10% уксусную кислоту в DCM или 0,2% трифторуксусную кислоту в DCM; линкер - производное 4-(4-гидроксиметил-3-метоксифенокси)бутановой кислоты (HMPB-linker, Flörsheimer & Riniker, 1991, Peptides 1990: Proceedings of the Twenty-First European Peptide Symposium, 131), который также отщепляется 1% TFA/DCM, давая пептидный фрагмент, содержащий все кислотно-лабильные защитные группы боковой цепи; и дополнительно, 2-хлоротритилхлоридный линкер (Barlos et al., *Tetrahedron Lett.* 1989, *30*, 3943-3946), который обеспечивает отщепление пептида, при использовании смеси ледяная уксусная кислота/трифторуксная кислота/DCM (1:2:7), в течение 30 мин.

Подходящие защитные группы для аминокислот и, соответственно, для их остатков представляют собой, например,

- для аминогруппы (которая присутствует, например, также в боковой цепи лизина)

Cbz бензилоксикарбонил;

Boc трет-бутилоксикарбонил;

Fmoc 9-фторенилметоксикарбонил;

Alloc аллилоксикарбонил;

Teoc триметилсилилэтоксикарбонил;

Tcc трихлороэтоксикарбонил;

Nps о-нитрофенилсульфонил;

Trt трифенилметил или тритил;

- для карбоксильной группы (которая, например, также присутствует в боковой цепи аспарагиновой и глутаминовой кислот) посредством превращения в сложные эфиры со спиртовыми компонентами:

tBu трет-бутил;

Bn бензил;

Me метил;

Ph фенил;

Pac фенацил;

аллил;

Tse триметилсилилэтил;

Tce трихлороэтил;

- для гуанидиновой группы (которая, например, присутствует в боковой цепи аргинина)

Pmc 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил;

Ts тозил (т. е. п-толуолсульфонил);

Cbz бензилоксикарбонил;

Pbf пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил;

- для гидроксигруппы, которая, например, также присутствует в боковой цепи треонина и серина)

tBu трет-бутил;

Bn бензил;

Trt тритил.

9-Флуоренилметоксикарбонил-(Fmoc)-защищенные производные аминокислот предпочтительно используются в качестве составных элементов для

конструирования петлевидных β-шпилечных миметиков согласно настоящему изобретению. Для удаления защитной группы, т. е. отщепления Fmoc-группы, могут быть использованы 20% пиперидин в DMF или 2% Dbu/2% пиперидин в DMF или 2% Dbu/2% пиперидин в DMF, а также 25% гексафторизопропанол в CH_2Cl_2.

Количество реагента, т. е. производного аминокислоты, составляет обычно от 1 до 20 эквивалентов, в расчете миллиэквивалент на грамм (мэкв/г) загрузки функционализированного твердого носителя (обычно от 0,1 до 2,85 мэкв/г полистироловой смолы), первоначально взвешенной в реакционной пробирке. Можно использовать дополнительные эквиваленты реагентов, если потребуется, чтобы довести реакцию до завершения в течение приемлемого времени. Предпочтительными рабочими станциями (при этом, однако, не ограничиваясь ими) являются Labsource's Combichem station, Protein Technologies' Symphony и MultiSyn Tech's-Syro synthesizer, последний дополнительно оснащен транспортным устройством и резервуарным блоком в течение процесса отщепления полностью защищенного линейного пептида от твердого носителя. Все синтезаторы способны обеспечить контролируемую среду, например, реакции может осуществляться при температурах, отличных от комнатной температуры, а также в атмосфере инертного газа, если это необходимо.

Для образования амидной связи требуется активация α-карбоксильной группы для стадии ацилирования. Когда эта активация осуществляется с помощью широко используемых карбодиимидов, таких как дициклогексилкарбодиимид (DCC, Sheehan & Hess, J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 1067-1068) или диизопропилкарбодиимид (DIC, Sarantakis et al Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976, 73, 336-342), получающаяся дициклогексилмочевина и, соответственно, диизопропилмочевина являются нерастворимыми и, соответственно, растворимыми в обычно используемых растворителях. В одном из вариантов карбодиимидного метода 1-гидроксибензотриазол (HOBt, König & Geiger, Chem. Ber. 1970, 103, 788-798) включается в качестве добавки в конденсирующую смесь. HOBt предотвращает дегидратацию, подавляет рацемизацию активированных

аминокислот и действует в качестве катализатора для ускорения медленных реакций связывания. Некоторые фосфониевые реагенты были использованы в качестве прямых реагентов сочетания, таких как бензотриазол-1-ил-окси-трис-(диметиламино)-фосфония гексафторфосфат (BOP, Castro et al., Tetrahedron Lett. 1975, 14, 1219-1222; Synthesis 1976, 751-752), или бензотриазол-1-ил-окси-трис-пирролидинофосфония гексафторфосфат (Py BOP, Coste et al., *Tetrahedron Lett.* 1990, *31*, 205-208), или 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3 тетраметилуроний тетрафторборат (TBTU), или гексафторфосфат (HBTU, Knorr et al., *Tetrahedron Lett.* 1989, *30*, 1927-1930); эти фосфониевые реагенты также пригодны для образования in situ HOBt-эфиров с защищенными производными аминокислот. Совсем недавно также были использованы в качестве конденсирующих реагентов дифеноксифосфорилазид (DPPA) или O-(7-аза-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний тетрафторборат (TATU) или O-(7-аза-бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'- тетраметилуроний гексафторофосфат (HATU)/7-аза-1-гидроксибезотриазол (HOAt, Carpino et al., *Tetrahedron Lett.* 1994, *35*, 2279-2281) или (6-хлор-1H-бензотриазол 1-ил) N,N,N',N'-1,1,3,3 тетраметилуроний тетрафторборат (TCTU), или гексафторфосфат (HCTU, Marder, Shivo and Albericio: HCTU and TCTU: New Coupling Reagents: Development and Industrial Applications, Poster Presentation, Gordon Conference February 2002), а также 1,1,3,3-бис(тетраметилен)хлоруроний гексафторфосфат (PyClU), особенно для конденсации N-метилированных аминокислот (J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 1967) или пентафторфенил дифенил-фосфинат (S. Chen, J. Xu, *Tetrahedron Lett.* 1991, *32*, 6711).

В связи с тем, что почти количественные выходы реакции конденсации являются существенными, желательно иметь экспериментальные данные о завершении реакции. Нингидриновый тест (Kaiser et al., *Anal. Biochemistry* 1970, *34*, 595), где положительный колориметрический ответ на аликвоты связанного со смолой пептида или пептида качественно показывает присутствие первичного амина, может быть легко и быстро выполнен после каждой стадии конденсации. Fmoc-химия позволяет спектрофотометрическое детектирование хромофора Fmoc,

когда он высвобождается с основанием (Meienhofer et al., *Int. J. Peptide Protein Res.* 1979, *13*, 35-42).

Связанный со смолой промежуточный продукт внутри каждого реакционного сосуда промывают от избытка оставшихся реагентов, растворителей, а также побочных продуктов повторным воздействием чистого растворителя(ей) одним из двух следующих способов:

1) Реакционные сосуды заполняются растворителем (предпочтительно 5 мл), встряхиваются в течение 5 - 300 минут, предпочтительно 15 минут, и откачиваются до удаления растворителя;

2) Реакционные сосуды заполняются растворителем (предпочтительно 5 мл) и откачиваются в получающие сосуды, такие как тестовая пробирка или ампула.

Процедуры промывания повторяются до около 50 раз (предпочтительно около 10 раз), контролируя эффективность удаления реагента, растворителя и побочных продуктов такими способами, как ТСХ, ГХ или проверкой промывочных жидкостей.

Вышеописанный порядок реакции соединения, связанного со смолой, с реагентами в реакционных ячейках с последующим удалением избытка реагентов, побочных продуктов и растворителей повторяется при каждом последующем превращении, пока не будет получен конечный полностью защищенный линейный пептид, связанный со смолой.

Перед этим полностью защищенный линейный пептид отщепляется от твердого носителя, возможно, если желательно, удаляется селективно одна или несколько защищенных функциональных групп, присутствующих в молекуле, и соответствующим образом замещенная реакционноспособная группа(ы) таким образом, освобождается. С этой целью, рассматриваемая функциональная

группа(ы) изначально должна быть защищена защитной группой, которую можно селективно удалить, не затрагивая остальные присутствующие защитные группы. Alloc (аллилоксикарбонил) является примером такой аминозащищающей группой, тогда как Allyl является примером карбоксильной защитной группы. Обе защитные группы могут быть селективно удалены, например, посредством Pd° и фенилсилана в CH_2Cl_2, не влияя на остальные защитные группы, такие как Fmoc, присутствующие в молекуле. Реакционноспособная группа, высвобождающаяся таким образом, может быть затем быть обработана агентом, подходящим для введения заместителя. Таким образом, например, аминогруппа может быть ацилирована посредством ацилирующего агента, соответствующего вводимому ацильному заместителю, тогда как карбоксильная группа может быть дериватизирована путем введения аминозаместителя. Предпочтительно, Alloc или Аллил будет удаляться путем применения 0.2 экв. тетракис(трифенил-фосфин)палладия (0) (10 мМ) в сухом CH_2Cl_2 и 10 экв. фенилсилана в течение 15 минут при комнатной температуре. После фильтрации и промывки смолы удаление защиты завершается путем повторения процедуры со свежим раствором реагентов. В случае высвободившейся аминогруппы последующее связывание подходящим образом защищенной аминокислоты и карбоновой кислоты может быть осуществлено, например, путем применения реагентов/реакционных условий для образования амидной связи, как описано выше.

Отщепление полностью защищенного линейного пептида от твердой подложки достигается путем воздействия на загруженную смолу раствора реагента, применяемого для отщепления (предпочтительно 3 - 5 мл). Температурный контроль, встряхивание и мониторинг реакции осуществляются, как описано выше. Посредством транспортного устройства реакционные сосуды соединяются с резервуаром, содержащим пробирки для осуществления сбора растворов отщепленных продуктов. Смолы, оставшиеся в реакционных сосудах, затем промываются 2-5 раз, как описано выше, с помощью 3-5 мл подходящего растворителя для экстракции (промывки) настолько большого количества отщепленных продуктов, насколько возможно. Растворы продукта, полученные таким образом, объединяются, соблюдая меры предосторожности, чтобы

избежать поперечного смешивания. Отдельные растворы/экстракты затем обрабатываются как требуется, чтобы выделить конечные соединения. Типичные обработки включают, но без ограничения к этому, выпаривание, концентрацию, экстракцию жидкость/жидкость, подкисление, подщелачивание, нейтрализацию или дополнительные реакции в растворе.

Растворы, содержащие производные полностью защищенного линейного пептида, которые были отщеплены от твердого носителя и нейтрализованы основанием, упаривают. Циклизацию затем осуществляют в растворе, используя растворители, такие как DCM, DMF, диоксан, THF и тому подобное. Различные конденсирующие реагенты, которые упоминались выше в качестве активаторов для формирования амидной связи, могут быть использованы для циклизации. Продолжительность циклизации составляет около 6-48 часов, предпочтительно около 16 часов. За ходом реакции следят, например, с помощью ОФ-ВЭЖХ (обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии). Затем растворитель удаляют упариванием, производное полностью защищенного циклического пептида растворяют в растворителе, который не смешивается с водой, таком как DCM, и раствор экстрагируют водой или смесью смешивающихся с водой растворителей, чтобы удалить любой избыток конденсирующего агента.

И, наконец, производное полностью защищенного пептида обрабатывают 95% TFA, 2,5% H_2O, 2,5% TIS, или другой комбинацией акцепторов для эффективного отщепления защитных групп. Время реакции отщепления обычно составляет от 30 минут до 12 часов, предпочтительно около 2,5 часов.

Альтернативно, отсоединение и полное удаление защиты полностью защищенного пептида от твердой подложки может быть достигнуто вручную в стеклянных сосудах.

После полного удаления защиты, например, следующие способы могут применяться для дальнейшей обработки:

1) Летучие вещества выпариваются до сухости, и неочищенный пептид растворяется в 20% AcOH в воде и экстрагируется с помощью изопропилового простого эфира или других растворителей, которые являются подходящими для этого. Водный слой собирается и выпаривается до сухости, и пептид с полностью удаленной защитой, цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-), получают в качестве конечного продукта;

2) Смесь после удаления защиты концентрируется в вакууме. После осаждения пептида с полностью удаленной защитой в диэтиловом простом эфире при предпочтительно 0 °C, твердое вещество промывается до около 10 раз, предпочтительно 3 раза, высушивается, и пептид с полностью удаленной защитой, цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-), получают в качестве конечного продукта.

В зависимости от его чистоты, конечный продукт, как получено выше, может непосредственно применяться для биологических анализов или должен быть далее очищен, например, посредством препаративной ВЭЖХ.

Как упомянуто ранее, после этого возможно, если желательно, превратить циклический продукт с полностью удаленной защитой, полученный таким образом, в его фармацевтически приемлемую соль, или превратить фармацевтически приемлемую, или неприемлемую, соль, полученную таким образом, в соответствующее свободное соединение или в другую фармацевтически приемлемую соль. Любые эти действия могут быть осуществлены способами, хорошо известными в данной области техники.

β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут применяться в широком диапазоне применений, где воспалительные заболевания или легочные заболевания или инфекции или иммунологические заболевания или сердечнососудистые заболевания или нейродегенеративные заболевания опосредованы и являются результатом серинпротеазной активностью. Для

контроля или профилактики болезней или заболеваний, подлежащих лечению протеазными ингибиторами, β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут вводиться как таковые или могут применяться в виде подходящей композиции вместе с носителями, разбавителями или эксципиентами, хорошо известными в данной области техники.

При применении для лечения, профилактики, модуляции или модификации заболеваний, таких как дефицит альфа-1-антитрипсина (AATD), эмфизема лёгких, ревматоидный артрит, остеоартрит, атеросклероз, псориаз, фиброзно-кистозная дегенерация (CF), хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), идиопатический легочный фиброз (IPF), бронхоэктаз, бронходилатация, хронический бронхит, расеяный склероз, острое респираторное заболевание (ARDS), острое повреждение лёгких (ALI), лёгочная гипертензия (PH), артериальная лёгочная гипертензия (PAH), панкреатит, астма, аллергический ринит, воспалительный дерматоз, постангиопластический рестеноз, системный воспалительный респираторный синдром (SIRS), ишемически-реперфузионное повреждение, гипертрофия сердца, миокардит, острый инфаркт миокарда (AMI), сердечная недостаточность, сердечный трансплантат, воспалительное заболевание кишечника (IBD), колит, болезнь Крона, слизистый колит или рак, такой как, но без ограничения к этому, рак легких, рак молочной железы, или рак, связанный с ангиогенезом или метастазом, β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут вводиться отдельно, в виде смесей нескольких β-шпилечных пептидомиметиков, в комбинации с другими противовоспалительными средствами, или противомикробными средствами или противораковыми средствами и/или в комбинации с другими фармацевтически активными средствами. β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут вводиться как таковые или в виде фармацевтических композиций.

Фармацевтические композиции, содержащие β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены с помощью обычных процессов смешения, растворения, гранулирования, изготовления таблеток,

покрытых оболочкой, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, захвата (в полимер) или лиофилизации. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены обычным способом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных средств, которые облегчают превращение активных β-шпилечных пептидомиметиков в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически. Правильное композиций зависит от выбранного способа введения.

Для местного введения β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде растворов, гелей, мазей, кремов, суспензий и т. д., которые хорошо известны в данной области техники.

Препараты для системного введения включают такие препараты, которые предназначены для введения путем инъекции, например, подкожной, внутривенной, внутримышечной, интратекальной или внутрибрюшинной инъекции, а также такие препараты, которые предназначены для трансдермального, трансмукозального перорального или легочного введения.

Для инъекций β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде адекватных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хинка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Растворы могут содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут перед использованием смешиваться в форме порошка для комбинации с подходящим носителем, например стерильной апирогеной водой.

Для трансмукозального введения в композициях используются пенетранты, известные в данной области техники, соответствующие барьеру, через который должны проникнуть.

Для перорального введения соединения могут быть легко приготовлены путем комбинирования активных β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области техники. Такие носители позволяют ввести β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению в таблетки, пилюли, драже, капсулы, жидкости, гели, сиропы, взвеси, суспензии и т. п. для перорального приема пациентом, подлежащего лечению. Для пероральных препаратов, таких как, например, порошки, капсулы и таблетки, подходящие наполнители включают наполнители, такие как сахара, например, лактоза, сахароза, маннит и сорбит; целлюлозные препараты, такие как кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, камедь трагаканта, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу и/или поливинилпирролидон (PVP); гранулирующие агенты и связующие агенты. Если желательно, могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как сшитые поливинилпирролидоны, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Если желательно, твердые лекарственные формы могут быть покрыты сахаром или покрыты кишечнорастворимой оболочкой с использованием стандартных методик.

Для пероральных жидких препаратов, таких как, например, суспензии, эликсиры и растворы, подходящие носители, вспомогательные вещества или разбавители включают воду, гликоли, масла, спирты и т. п. Кроме того, могут быть добавлены вкусовые агенты, консерванты, красители и т. п.

Для буккального введения композиция может принимать форму таблеток, таблеток для рассасывания и т. д., составленных обычным образом.

Для введения посредством ингаляции β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению обычно вводят в виде аэрозольного спрея из упаковок под давлением или распылителя с применением подходящего пропеллента, например дихлордифторметана, трихлордифторметана, диоксида углерода или

другого подходящего газа. В случае аэрозоля под давлением единица дозы может быть определена посредством обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи, например, желатиновые, могут быть составлены для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащими порошкообразную смесь β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению и подходящую порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Соединения также могут быть составлены в композициях для ректального или вагинального введения, таких как суппозитории, вместе с соответствующей основой суппозиториев, такой как масло какао или другие глицериды.

В дополнение к композициям, описанным выше, β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению также могут быть приготовлены в виде депо-препаратов. Такие длительно действующие препараты могут быть введены путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Для изготовления таких депо-препаратов β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут быть комбинированы с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых солей.

Кроме того, могут быть использованы другие фармацевтические системы доставки такие, как липосомы и эмульсии, хорошо известные в данной области техники. Также могут быть использованы некоторые органические растворители, такие как диметилсульфоксид. Кроме того, β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут быть доставлены с использованием системы с замедленным высвобождением, такой как полупроницаемые матрицы из твердых полимеров, содержащих терапевтический агент (например, для покрытых стентов). Различные материалы с замедленным высвобождением были созданы и хорошо известны специалистам в данной области техники. Капсулы с замедленным высвобождением могут, в зависимости от их химической природы, высвобождать соединения в течение от нескольких недель до более чем 100 дней.

В зависимости от химической природы и биологической стабильности терапевтического агента могут быть использованы дополнительные стратегии для стабилизации белка.

Так как β-шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению могут содержать заряженные остатки, они могут быть включены в любую из описанных выше композиций, как таковые или в виде фармацевтически приемлемых солей. Фармацевтически приемлемые соли, как правило, более растворимы в водных и других протонных растворителях, чем соответствующие свободные формы.

Особенно подходящие фармацевтически приемлемые соли включают соли с карбоновыми, фосфоновыми, сульфоновыми и сульфаминовыми кислотами, как например, уксусная кислота, пропионовая кислота, октановая кислота, декановая кислота, додекановая кислота, гликолевая кислота, молочная кислота, фумаровая кислота, сукциновая кислота, адипиновая кислота, пимелиновая кислота, пробковая кислота, азелаиновая кислота, яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, аминокислотами, такими как глутаминовая кислота или аспарагиновая кислота, малеиновой кислотой, гидроксималеиновой кислотой, метилмалеиновой кислотой, циклогексанкарбоновой кислотой, адамантанкарбоновой кислотой, бензойной кислотой, салициловой кислотой, 4-аминосалициловой кислотой, фталевой кислотой, фенилуксусной кислотой, миндальной кислотой, коричной кислотой, метан- или этан-сульфоновой кислотой, 2-гидроксиэтансульфоновой кислотой, этан-1,2-дисульфоновой кислотой, бензолсуцльфоновой кислотой, 2-нафталинсульфоновой кислотой, 1,5-нафталиндисульфоновой кислотой, 2-, 3- или 4-метил-бензолсульфоновой кислотой, метилсерной кислотой, этилсерной кислотой, додецилсерной кислотой, N-циклогексилсульфаминовой кислотой, N-метил-, N-этил- или N-пропил-сульфаминовой кислотой, и другими органическими протоновыми кислотами, такими как аскорбиновая кислота. Подходящими неорганическими кислотами являются, например, галогенводородными кислотами, такими как соляная кислота, серная кислота и фосфорная кислота.

β-Шпилечные пептидомиметики согласно настоящему изобретению или их композиции, как правило, будут использоваться в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. Следует понимать, что используемое количество будет зависеть от конкретного применения.

Для местного введения для лечения или профилактики заболеваний, поддающихся лечению с помощью бета-шпилечных миметиков, терапевтически эффективная доза может быть определена, применяя, например, in vitro анализы, приведенные в примерах. Лечение может применяться когда заболевание является очевидным, или даже когда оно не является очевидным. Специалист в данной области техники способен определить эффективные количества для лечения местных заболеваний, без проведения затруднительных экспериментов.

Для системного введения терапевтически эффективная доза может быть оценена первоначально в анализах in vitro. Например, доза может быть выбрана на моделях животных для достижения диапазона концентраций циркулирующего β - шпилечного пептидомиметика, который включает IC_{50}, как определенный в клеточной культуре (т. е. концентрация испытуемого соединения, которая является летальной для 50% клеточной культуры). Такая информация может быть использована для более точного определения доз у человека.

Начальные дозы также могут быть определены из данных in vivo, например, на животных моделях, с использованием методов, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники может легко оптимизировать введение человеку на основе данных, полученных на животных.

Количества доз для применения в качестве агентов, ингибирующих серинпротеазу, можно регулировать индивидуально для обеспечения уровней в плазме β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению, которые достаточны для поддержания терапевтического эффекта. Терапевтически эффективные уровни в сыворотке могут быть достигнуты посредством введения нескольких доз в день.

В случаях местного введения или селективного поглощения эффективная локальная концентрация β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению может быть не связана с концентрацией в плазме. Любой специалист, имеющий обычную квалификацию в данной области техники, сможет оптимизировать терапевтически эффективные локальные дозы без чрезмерного экспериментирования.

Вводимое количество β-шпилечных пептидомиметиков будет, конечно, зависеть от субъекта, которого лечат, от массы субъекта, тяжести заболевания, способа введения и решения лечащего врача.

Как правило, терапевтически эффективная доза β-шпилечных пептидомиметиков, описанных в настоящем документе, обеспечит терапевтический эффект, не вызывая существенной токсичности.

Токсичность β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению может быть определена с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, путем определения LD_{50} (дозы, летальной для 50% популяции) или LD_{100} (дозы, летальной для 100% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс. Предпочтительными являются соединения, которые проявляют высокие терапевтические индексы. Данные, полученные на этих клеточных культурах и исследований на животных, могут быть использованы при разработке диапазон доз, которые не проявляют токсичность при применении у людей. Дозировка β-шпилечных пептидомиметиков согласно настоящему изобретению заключается предпочтительно в пределах диапазона циркулирующих концентраций, которые включают эффективную дозу с отсутствием токсичности или небольшой токсичности. Дозировка может варьироваться в пределах диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и способа введения. Точный состав, способ введения и доза может быть выбрана лечащим врачом с учетом

состояния пациента (см, например, Fingl et al. **1975**, In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ch.1, p.1).

Настоящее изобретение может также включать соединения, которые идентичны соединениям общей формулы цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-), за исключением того, что один или более атомов замещены атомом, имеющим чисто атомной массы или массу, отличные от числа атомной массы или массы, как правило, обнаруживаемых в природе, например, соединения, обогащенные ^2H (D), ^3H, ^{11}C, ^{14}C, ^{129}I и т.д. Эти изотопные аналоги и их фармацевтические соли и композиции рассматриваются в качестве полезных агентов для лечения и/или диагностики, например, но без ограничения к этому, где точная регулировка *in vivo* периода полураспада могла бы привести к оптимизации режима дозирования.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но они не должны быть истолкованы как ограничивающие его объем каким-либо образом.

Примеры

1. Пептидный синтез

Связывание первого защищенного аминокислотного остатка со смолой

1 г (1.4 ммоль) 2-хлортритилхлоридной смолы (1.4 ммоль/г; 100 – 200 меш, сополи(стирол-1% DVB) полимерный матрикс; Barlos et al. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946) заполнили в высушенную колбу. Смолу суспендировали в CH_2Cl_2 (5 мл) и позволили ей набухать при комнатной температуре при постоянном встряхивании в течение 30 минут. Раствор 0.98 ммоль (0.7 экв.) первого подходящим образом защищенного аминокислотного остатка (смотрите ниже) в CH_2Cl_2 (5 мл) смешали с 960 мкл (4 экв.) диизопропилэтиламина (DIEA) добавили. После встряхивания реакционной смеси в течение 4 часов при 25 °C,

смолу отфильтровали и последовательно промыли CH_2Cl_2 (1x), DMF (1x) и CH_2Cl_2 (1x). Раствор CH_2Cl_2/MeOH/DIEA (17/2/1, 10 мл) добавили к смоле, и суспензию встряхивали в течение 30 минут. После фильтрации смолу промыли в следующем порядке CH_2Cl_2 (1x), DMF (1x), CH_2Cl_2 (1x), MeOH (1x), CH_2Cl_2 (1x), MeOH (1x), CH_2Cl_2 (2x), Et_2O (2x) и высушивали под вакуумом в течение 6 часов.

Загрузка, как правило, составляла 0.6-0.7 ммоль/г.

Следующие предварительно загруженные смолы были получены: Fmoc-Ser(tBu)-O-2-хлортритильная смола и Fmoc-Pro-O-2-хлортритильная смола.

Синтез осуществляли применяя синтезатор пептидов Syro (MultiSynTech), применяя 24-96 реакционных сосудов. В каждый сосуд поместили 0.04 ммоль вышеуказанной смолы, и смола набухала в CH_2Cl_2 и DMF в течение 15 минут, соответственно. Следующие реакционные циклы были запрограммированы и осуществлены:

Стадия	**Реагент**	**Время**
1	DMF, промывка	5x1 мин
2	20% пиперидин/DMF	1x5 мин, 1x15 мин
3	DMF, промывка	5x1 мин
4	3.6 экв. Fmoc аминокислота, 3.6 экв. HOAt/DMF	
	+3.6 экв. DIC/DMF	1x40 мин
5	DMF, промывка	1x1 мин
6	3.6 экв. Fmoc аминокислота, 3.6 экв. HOAt/DMF	
	+3.6 экв. HATU	
	+7.2 экв. DIPEA	1x40 мин

Если иного не указано, конечное связывание аминокислоты сопровождалось удалением защиты Fmoc посредством применения стадий 1-3 вышеописанного реакционного цикла.

Соответствующим образом защищенные аминокислотные строительные блоки являются коммерчески доступными или могут быть синтезированы, как известно в данной области техники.

Присоединение фенэтиламина к боковой цепи, несущей карбоксильную группу

Методика А

Присоединение фенэтиламина к линейным пептидам с селективно удаленной защитой на смоле:

Для удаления аллил-защитной группы от функциональной карбоксильной группы, присутствующей в пептиде, связанном со смолой, последняя (0.04 ммоль) набухала в свеже дистиллированном CH_2Cl_2 в течение по меньшей мере 15 минут с последующим добавлением 0.2 экв. тетракис(трифенил-фосфин)палладия(0) (10 mM) в сухом CH_2Cl_2 и 10 экв. фенилсилана. После смешивания реакционной смеси в течение 15 минут при комнатной температуре, смолу отфильтровали, и свежий раствор реагентов добавили для повторения методики. После последовательной промывки смолы с помощью CH_2Cl_2, DMF и Et_2O, смола снова набухала в CH_2Cl_2, и присоединение фенэтиламина осуществили путем последовательного добавления смеси 3.6 экв. желаемой кислоты и 3.6 экв. HOAt, растворенного в DMF, и 3.6 экв. DIC, растворенного в DMF, реакционной смеси позволили отстояться в течение 1 часа, прерываясь только изредка на перемешивание. После фильтрации и промывки смолы трижды с помощью DMF, связывание повторили путем повторения методики со свежим раствором смеси 3.6 экв. той же желаемой кислоты и 3.6 экв. HOAt, растворенного в DMF, и смеси 3.6 экв. HATU и 7.2 экв. DIPEA в DMF.

Циклизация и обработка пептидов с циклизованной основной цепью

Отщепление полностью защищенного пептидного фрагмента

После завершения синтеза, смолу (0.04 ммоль) суспендировали в 1 мл (0.13 ммоль, 3.4 экв.) 1% TFA в CH_2Cl_2 (*об./об.*) в течение 3 минут, отфильтровали, и фильтрат нейтрализовали с помощью 1 мл (0.58 ммоль, 14.6 экв.) 10% DIEA в CH_2Cl_2 (*об./об.*). Эту методику повторили трижды для обеспечения завершения отщепления. Фильтрат выпарили до сухости, и образец продукта, подвергнутый полному удалению защиты путем применения расщепляющей смеси, содержащей 95% трифторуксусной кислоты (TFA), 2.5% воды и 2.5% триизопропилсилана (TIS), проанализировали посредством обращеннофазной ВЭЖХ (C_{18} колонка) и ESI-MS для контроля эффективности синтеза линейного пептида.

Циклизация линейного пептида

Полностью защищенный линейный пептид (0.04 ммоль) растворили в DMF (4 мкмоль/мл). Затем добавили 30.4 мг (0.08 ммоль, 2 экв.) HATU, 10.9 мг (0.08 ммоль, 2 экв.) HOAt и 28 мкл (0.16 ммоль, 4 экв.) DIEA, и смесь перемешивали на вортексе при 25°C в течение 16 часов и затем концентрировали под высоким вакуумом. Остаток распределили между CH_2Cl_2 и H_2O/CH_3CN (90/10: *об./об.*). Фазу CH_2Cl_2 выпарили с получением полностью защищенного циклического пептида.

Полное удаление защиты циклического пептида

Полученный циклический пептид растворили в 3 мл расщепляющей смеси, содержащей 82.5% трифторуксусной кислоты (TFA), 5% воды, 5% тиоанизола, 5% фенола и 2.5% этандитиола (EDT). Смеси позволили отстояться при 25 °C в течение 2.5 часов, и затем концентрировали под вакуумом. После осаждения циклического пептида с полностью удаленной защитой в диэтиловом простом

эфире (Et_2O) при 0 °C, твердое вещество дважды промыли с помощью Et_2O и высушили.

После очистки неочищенных продуктов посредством препаративной ВЭЖХ, пептиды лиофилизировали (порошки белого цвета) и проанализировали посредством следующих аналитических способов:

Аналитический способ A для Примеров 5-10, 16-18:

Время удерживания для аналитической ВЭЖХ (RT, в минутах) определяли, применяя колонку Ascentis Express C18, 50 x 3.0 мм, (cod. 53811-U- Supelco) со следующими растворителями A (H_2O + 0.1% TFA) и B (CH_3CN + 0.01% TFA) и градиентом: 0-0.05 мин: 97% A, 3% B; 4.95 мин: 3% A, 97% B; 5.35 мин: 3% A, 97% B; 5.40 мин: 97% A, 3% B. Скорость потока = 1.3 мл/мин; UV_Vis = 220 нм.

Аналитический способ B для Примеров 1-4:

Время удерживания для аналитической ВЭЖХ (RT, в минутах) определяли, применяя колонку Ascentis Express C18, 50 x 3.0 мм, (cod. 53811-U- Supelco) со следующими растворителями A (H_2O + 0.1% TFA) и B (CH_3CN + 0.01% TFA) и градиентом: 0-0.05 мин: 97% A, 3% B; 3.40 мин: 33% A, 67% B; 3.45 мин: 3% A, 97% B; 3.65 мин: 3% A, 97% B; 3.70 мин: 97% A, 3% B. Скорость потока = 1.3 мл/мин; UV_Vis = 220 нм.

Аналитический способ C для Примеров 11-15:

Время удерживания для аналитической ВЭЖХ (RT, в минутах) определяли, применяя колонку Xselect CSH C18 XP, 100 x 3.0 мм, (cod. 186006107, Waters) со следующими растворителями A (H_2O + 0.1% TFA) и B (CH_3CN + 0.01% TFA) и градиентом: 0-0.05 мин: 95% A, 5% B; 10.05 мин: 3% A, 97% B; 12.05 мин: 3% A, 97% B; 12.10 мин: 95% A, 5% B. Скорость потока = 0.6 мл/мин; UV_Vis = 220 нм.

Примеры 1-13 показаны в Таблице 1. Пептиды были синтезированы следующим образом: Исходной смолой была Fmoc-Ser(tBu)-O-2-хлортритильная смола, которая была получена, как описано выше. К этой смоле Xaa^4 был привит, наконец, в положении 4. Линейный пептид был синтезирован на твердой подложке согласно методике, описанной выше, в следующей последовательности: смола-Ser^5-Xaa^4-Thr^3-Xaa^2-Xaa^1-Xaa^{13}-Xaa^{12}-Xaa^{11}-Xaa^{10}- Xaa^9-Xaa^8-Xaa^7-Xaa^6. После конечного удаления защиты Fmoc, как описано выше, пептид был отщеплен от смолы, циклизован, была удалена защита и проведена очистка, как указано выше.

Время удерживания для ВЭЖХ и УФ-чистота, как определено с применением аналитических способов, как описано выше, показаны в Таблице 1.

Примеры 14, 16 показаны в Таблице 1. Пептиды были синтезированы следующим образом: Исходной смолой была Fmoc-Pro-O-2-хлортритильная смола, которая была получена, как описано выше. К этой смоле Xaa^{12} был привит, наконец, в положении 12. Линейный пептид был синтезирован на твердой подложке согласно методике, описанной выше, в следующей последовательности: Resin-Pro^{13}-Xaa^{12}-Xaa^{11}-Xaa^{10}-Xaa^9-Xaa^8-Xaa^7-Xaa^6-Ser^5-Xaa^4-Thr^3-Xaa^2-Xaa^1.
После конечного удаления защиты Fmoc, как описано выше, пептид был отщеплен от смолы, циклизован, была удалена защита и проведена очистка, как указано выше.

Время удерживания для ВЭЖХ и УФ-чистота, как определено с применением аналитических способов, как описано выше, показаны в Таблице 1.

Пример 15 показан в Таблице 1. Пептид был синтезирован следующим образом: Исходной смолой была Fmoc-Pro-O-2-хлортритильная смола, которая была получена, как описано выше. К этой смоле Xaa^{12} был привит, наконец, в положении 12. Линейный пептид был синтезирован на твердой подложке согласно методике, описанной выше, в следующей последовательности: смола-Pro^{13}-Xaa^{12}-Xaa^{11}-Xaa^{10}-Xaa^9-Xaa^8-Xaa^7-Xaa^6-Ser^5-Xaa^4-Ser^3-Xaa^2- Glu^1. Перед

последним удалением Fmoc применяли методику A для присоединения фенилэтиламина к боковой цепи Glu^1. После конечного удаления защиты Fmoc, как описано выше, пептид был отщеплен от смолы, циклизован, была удалена защита и проведена очистка, как указано выше.

Время удерживания для ВЭЖХ и УФ-чистота, как определено с применением аналитических способов, как описано выше, показаны в Таблице 1.

Примеры 17-18 показаны в Таблице 1. Пептиды были синтезированы следующим образом: Исходной смолой была Fmoc-Pro-O-2-хлортритильная смола, которая была получена, как описано выше. К этой смоле Xaa^7 был привит, наконец, в положении 7. Линейный пептид был синтезирован на твердой подложке согласно методике, описанной выше, в следующей последовательности: Resin-Pro^8-Xaa^7-Xaa^6-Ser^5-Xaa^4-Thr^3-Xaa^2-Xaa^1-Xaa^{13}-Xaa^{12}-Xaa^{11}-Xaa^{10}-Xaa^9.
После конечного удаления защиты Fmoc, как описано выше, пептид был отщеплен от смолы, циклизован, была удалена защита и проведена очистка, как указано выше.

Время удерживания для ВЭЖХ и УФ-чистота, как определено с применением аналитических способов, как описано выше, показаны в Таблице 1.

Таблица 1: Примеры

Пример	Xaa[1] [a]	Xaa[2] [a]	Xaa[3] [a]	Xaa[4] [a]	Xaa[5] [a]	Xaa[6] [a]	Xaa[7] [a]	Xaa[8] [a]	Xaa[9] [a]	Xaa[10] [a]	Xaa[11] [a]	Xaa[12] [a]	Xaa[13] [a]	чистота [%]	MS [b]	RT [мин]
1	OctGly	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Asn	^{D}Pro	Pro	76	1430.2	2.30[c]
2	OctGly	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Tyr	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	61	1452.2	2.63[c]
3	OctGly	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Ser	^{D}Pro	Pro	73	1403.1	2.36[c]
4	OctGly	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	72	1417.1	2.47[c]
5	Arg	hTyr	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Tyr	^{D}Pro	Pro	77	757.5	1.72
6	Arg	Nle	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Tyr	^{D}Pro	Pro	79	725.4	1.81
7	Arg	Glu	Thr	AllylGly	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	70	715.5	1.63
8	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Tyr	Lys	Ser	^{D}Pro	Pro	88	712.9	1.58
9	hArg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	74	709.4	1.49
10	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	hLeu	^{D}Pro	Pro	70	1429.8	1.67
11	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	86	702.4	3.04[d]
12	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Tyr	Lys	hGln	^{D}Pro	Pro	94	740.4	3.19[d]
13	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Tyr	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	88	720.0	3.28[d]
14	Arg	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Tyr	Lys	His	^{D}Pro	Pro	67	737.9	3.00[d]
15	Glu(Phen)[e]	Glu	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Tyr	^{D}Pro	Pro	77	771.5	4.39[d]
16	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	77	687.5	1.75

Таблица 1, продолжение: Примеры

Пример	**Xaa^{1}** a)	**Xaa^{2}** a)	**Xaa^{3}** a)	**Xaa^{4}** a)	**Xaa^{5}** a)	**Xaa^{6}** a)	**Xaa^{7}** a)	**Xaa^{8}** a)	**Xaa^{9}** a)	**Xaa^{10}** a)	**Xaa^{11}** a)	**Xaa^{12}** a)	**Xaa^{13}** a)	**чистота [%]**	**MS** b)	**RT** [мин]
17	Arg	hTyr	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Thr	^{D}Pro	Pro	77	726.5	1.76
18	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Lys	Tyr	^{D}Pro	Pro	78	718.5	1.79

a) Перечень аббревиатур аминокислот приведен выше.

b) MS: либо $[M+1H]^{1+}$, либо $[M+2H]^{2+}$.

c) Аналитический способ B

d) Аналитический способ C

e) Glu(Phen) = Glu(Фенэтил)

2. Биологические методы

2.1. Получение пептидных образцов

Лиофилизированные пептиды взвешивали на микровесах (Mettler MT5) и растворяли DMSO до конечной концентрации 10 мМ. Сток-растворы хранили при +4 °С, защищали от света. Биологические анализы осуществляли при условиях анализа, включающих менее 1% DMSO, если иного не указано.

2.2 Ингибирование человеческой нейтрофильной эластазы

Способность пептидов согласно настоящему изобретению ингибировать способность к гидролизу человеческой нейтрофильной эластазы (Serva Electrophoresis, Germany), применяя синтетический тетрапептидный субстрат MeOSuc-AAPV-pNA (Bachem, Switzerland), определили следующим образом:

Вышеуказанный субстрат (0.3 мМ) и человеческую нейтрофильную эластазу (10 нМ) инкубировали при 37°С с серийными разбавлениями пептидов (1% DMSO конечный) в аналитическом буфере (50 мМ Tris, pH 8, 300 мМ NaCl, 0.01% Tween20). Высвобождение pNA сопровождалось контролем изменения поглощения при 405 нм в течение 30 минут. Контрольные анализы с тем же набором анализа, как указано выше, но без пептида, проводили линейно. Данные доза-ответ заполнили в 4-параметрическое уравнение Хилла, получая значение IC_{50} с применением Graphpad (Prism 5).

2.3 Ингибирование свиной панкреатической эластазы

Способность пептидов согласно настоящему изобретению ингибировать способность к гидролизу свиной панкреатической эластазы (Sigma, USA), применяя синтетический трипептидный субстрат MeOSuc-AAA-pNA (Bachem, Switzerland) , определили следующим образом:

Вышеуказанный субстрат (1 мМ) и свиную панкреатическую эластазу (15 нМ) инкубировали при 37°C с серийными разбавлениями пептидов (0.5% DMSO конечный) в аналитическом буфере (50 мМ Tris, pH8, 100mM NaCl, 0.01% Tween20). Высвобождение pNA сопровождалось контролем изменения поглощения при 405 нм в течение 30 минут. Контрольные анализы с тем же набором анализа, как указано выше, но без пептида, проводили линейно. Данные доза-ответ заполнили в 4-параметрическое уравнение Хилла, получая значение IC_{50} с применением Graphpad (Prism 5).

2.4 Ингибирование человеческой протеиназы 3

Инактивацию человеческой пртеиназы 3 (Elastin Products Company, USA) посредством пептидов согласно настоящему изобретению, применяя синтетический трипептидный субстрат Boc-Ala-Ala-Nva-SBzl (Elastin Products Company, USA), определяли следующим образом:

Вышеуказанный субстрат (1 мМ), 4,4′-дитиодипиридин (250 мкмМ) и человеческую протеиназу 3 (10 нМ) инкубировали при 37°C с серийными разбавлениями пептидов (0.5% DMSO конечный) в аналитическом буфере (50 мМ Tris, pH7.4, 150 мМ NaCl, 0.01% Tween20). Реакционный процесс сопровождался контролем изменения поглощения при 340 нм в течение 30 минут Контрольные анализы с тем же набором анализа, как указано выше, но без пептида, проводили линейно. Данные доза-ответ заполнили в 4-параметрическое уравнение Хилла, получая значение IC_{50} с применением Graphpad (Prism 5).

3. Результаты

Результаты экспериментов, описанных в пунктах 2.2 - 2.4, приведенных выше, приведены в Таблице 2, показанной далее.

Таблица 2:

Пример	Человеческая нейтрофильная эластаза (hNE) IC50 [нМ]	hNE IC50 SD [нМ]	Свиная панкреатическая эластаза (PPE) IC50 [мкмМ]	PPE IC50 SD [мкмМ]	Человеческая протеиназа 3 (hPr3) IC50 [мкмМ]	hPr3 IC50 SD [мкмМ]	hNE/PPE селективность	hNE/hPr3 селективность
1	5.3	0.3	1.55	0.47	1.81	0.1	292	342
2	5.4	1.0	0.53	0.13	1.52	0.79	98	282
3	5.5	0.4	0.79	0.28	1.44	0.14	144	262
4	7.9	3.7	2.75	0.44	2.15	0.88	348	272
5	12.7	0.7	1.75	0.01	1.71	0.66	138	135
6	15.5	0.8	2.69	0.26	2.37	0.26	174	153
7	14.9	0.1	59.0	4.5	80.2	28	3960	5383
8	16.4	7.9	45.2	1.3	88.1	16.8	2756	5372
9	23.7	7.4	83.4	2.2	70.1	46.5	3519	2958
10	30	7.5	>100	н.о.	>100	н.о.	>3333	>3333
11	12.5	1.1	>100	н.о.	>100	н.о.	>8000	>8000
12	10.0	5.2	>100	н.о.	>100	н.о.	>10000	>10000
13	30.6	6.5	>100	н.о.	>100	н.о.	>3268	>3268
14	20.3	9.2	4.65	0.9	77.6	15.4	229	3823

Таблица 2, продолжение:

Пример	**Человеческая нейтрофильная эластаза (hNE) IC50 [нМ]**	**hNE IC50 SD [нМ]**	**Свиная панкреатическая эластаза (PPE) IC50 [мкмМ]**	**PPE IC50 SD [мкмМ]**	**Человеческая протеиназа 3 (hPr3) IC50 [мкмМ]**	**hPr3 IC50 SD [мкмМ]**	**hNE/PPE селективность**	**hNE/hPr3 селективность**
15	18.6	9.2	1.62	0.4	6.69	2.4	87	360
16	26.4	11.6	>100	н.о.	>100	н.о.	>3788	>3788
17	15.6	9.2	66.4	7.8	83.9	11.4	4256	5378
18	6.9	2.9	7.2	1.8	1.8	0.1	1043	261

н.о. = не определено

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептидное соединение с циклизованной основной цепью, состоящее из 13 аминокислотных остатков, общей формулы

цикло(-Xaa^1-Xaa^2-Thr^3-Xaa^4-Ser^5-Xaa^6-Xaa^7-Xaa^8-Xaa^9-Xaa^{10}-Xaa^{11}-Xaa^{12}-Xaa^{13}-)(**I**),

и его фармацевтически приемлемые соли,

в которой

Xaa^1 представляет собой OctGly; Arg; hArg; Cha; Glu(Фенэтил); или Dab(Бутаноил);

Xaa^2 представляет собой Glu; Val; Leu; Nle; Phe; hPhe; DiHPhe; Tyr; hTyr; или Trp;

Xaa^4 представляет собой Ala; AllylGly; Abu; или Val;

Xaa^6 представляет собой Ile; или OctGly;

Xaa^7 представляет собой Pro;

Xaa^8 представляет собой Pro;

Xaa^9 представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys; или Asn;

Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; hSer; hSer(Me); Thr; alloThr; Asn; Gln; hGln; Dap; Tyr; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Glu; Asp; Ala; Val; или Lys;

при условии, что

- если Xaa^{1} представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;
  Xaa^{4} представляет собой Ala; или Abu;
  Xaa^{6} представляет собой Ile; или OctGly;
  Xaa^{10} представляет собой Lys;
  Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; или Gln;
  Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Ala; Val; или Lys;

- и/или, если Xaa^{6} представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^{1} представляет собой OctGly;Arg; или Cha;
  Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;
  Xaa^{4} представляет собой Ala; или Abu;
  Xaa^{10} представляет собой Lys;
  Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; Gln;
  Xaa^{13} представляет собой Pro; Tic; Ala; Val; или Lys;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
  Xaa^{1} представляет собой Arg; hArg; или Glu(Фенэтил).

2. Соединение по п. 1 формулы I, в котором

Xaa^{1} представляет собой OctGly; Arg; hArg; или Glu(Фенэтил);
Xaa^{2} представляет собой Glu; Nle; hTyr; или Val;
Xaa^{4} представляет собой Ala; или AllylGly;
Xaa^{6} представляет собой Ile;
Xaa^{7} представляет собой Pro;

Xaa^8 представляет собой Pro;

Xaa^9 представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys;

Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; Thr; Asn; Tyr; hGln; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro;

при условии, что

- если Xaa^1 представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^2 представляет собой Glu; или Nle;
  Xaa^4 представляет собой Ala;
  Xaa^6 представляет собой Ile;
  Xaa^{10} представляет собой Lys;
  Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; или Asn
  Xaa^{13} представляет собой Pro;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
  Xaa^1 представляет собой Arg; hArg или Glu(Фенэтил).

3. Соединение по п. 1 формулы I, в котором

Xaa^1 представляет собой OctGly; Arg; или Glu(Фенэтил);

Xaa^2 представляет собой Glu; Nle; hTyr; или Val;

Xaa^4 представляет собой Ala;

Xaa^6 представляет собой Ile;

Xaa^7 представляет собой Pro;

Xaa^8 представляет собой Pro;

Xaa^9 представляет собой Gln; или Tyr;

Xaa^{10} представляет собой Lys;

Xaa^{11} представляет собой Ser; Thr; Asn; Tyr; или His;

Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и

Xaa^{13} представляет собой Pro;

при условии, что

- если Xaa^{1} представляет собой OctGly, тогда
  Xaa^{2} представляет собой Glu; или Nle;

и при дополнительном условии, что

- если Xaa^{11} представляет собой Tyr; или His, тогда
  Xaa^{1} представляет собой Arg.

4. Соединение по п. 1 формулы I, в котором

Xaa^{1} представляет собой Arg; или hArg;
Xaa^{2} представляет собой Glu; Val; или hTyr;
Xaa^{4} представляет собой Ala; или AllylGly;
Xaa^{6} представляет собой Ile;
Xaa^{7} представляет собой Pro;
Xaa^{8} представляет собой Pro;
Xaa^{9} представляет собой Gln; или Tyr;
Xaa^{10} представляет собой Lys;
Xaa^{11} представляет собой hLeu; Ser; Thr; или hGln;
Xaa^{12} представляет собой ^{D}Pro; и
Xaa^{13} представляет собой Pro.

5. Соединение по п.1, которое выбрано из

цикло(-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Asn-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Ser-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-OctGly-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-hTyr-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Nle-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);

цикло (-Arg-Glu-Thr-AllylGly-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Ser-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-hArg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-hLeu-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-hGln-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Tyr-Lys-His-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Glu(Фенэтил)-Glu-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-hTyr-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Thr-^{D}Pro-Pro-);
цикло (-Arg-Val-Thr-Ala-Ser-Ile-Pro-Pro-Gln-Lys-Tyr-^{D}Pro-Pro-).

6. Соединение по любому из п.п. 1-5 формулы I, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, для применения в качестве лекарственного средства.

7. Соединение по любому из п.п. 1 -5 формулы I, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, имеющее ингибирующую активность против эластазы, для лечения или профилактики рака легких; рака молочных желез; псориаза; дефицита альфа-1-антитрипсина; эмфиземы лёгких; фиброзно-кистозной дегенерации; хронического обструктивного заболевания легких; идиопатического легочного фиброза; бронхоэктаза; лёгочной гипертензии; артериальной лёгочной гипертензии; гипертрофии сердца; миокардита; острого инфаркта миокарда; ревматоидного артрита; остеоартрита; атеросклероза; рассеянного склероза; панкреатит; аллергического ринита; системного воспалительного респираторного синдрома; воспалительного дерматоза; воспалительного заболевания кишечника; или болезни Крона.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или смесь соединений по любому из п.п. 1 - 5 формулы I, в свободной форме или в форме

фармацевтически приемлемой соли, и фармацевтически инертный носитель, особенно в форме, подходящей для ингаляции, для перорального, местного, трансдермального, инъекционного, буккального, трансмукозального, ректального, легочного или ингаляционного введения, особенно в форме таблетки, драже, капсулы, раствора, жидкости, геля, пластыря, крема, мази, сиропа, взвеси, суспензии, порошка или суппозитория.

9. Применение соединения по любому из п.п. 1 -5 формулы I, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, в качестве фармацевтически активного вещества, имеющего селективную ингибирующую активность в отношении протеазы, в частности в отношении человеческой нейтрофильной эластазы, и/или противораковую активность и/или противовоспалительную активность и/или противоинфекционную активность и/или противосердечнососудистую активность и/или противоиммунологическую активность и/или противонейродегенеративную активность.

10. Применение соединения по любому из п.п. 1 - 5, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, или композиции по п. 8, в качестве лекарственного средства, имеющего ингибирующую активность против эластазы, для лечения или профилактики инфекций или заболеваний, связанных с такими инфекциями; или рака, такого рак легких, или рак молочных желез, опосредованного или являющегося результатом; или иммунологических заболеваний, таких как псориаз, опосредованных или являющихся результатом; или легочных заболеваний, таких как дефицит альфа-1-антитрипсина; эмфизема лёгких; фиброзно-кистозная дегенерация; хроническое обструктивное заболевание легких; идиопатический легочный фиброз; бронхоэктаз; лёгочная гипертензия, или артериальная лёгочная гипертензия, опосредованных или являющихся результатом; или сердечнососудистых заболеваний, таких как гипертрофия сердца, миокардит, или острый инфаркт миокарда, опосредованных или являющихся результатом; или нейродегенеративных заболеваний, опосредованных или являющихся результатом; или воспаления или заболеваний, связанных с воспалением, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит,

атеросклероз, рассеянный склероз, панкреатит, аллергический ринит, системный воспалительный респираторный синдром, воспалительный дерматоз, воспалительное заболевание кишечника или болезнь Крона, опосредованных или являющихся результатом эластазной активности; или где иммунологическая реакция опосредована или является результатом эластазной активности.

11. Применение соединения по любому из п.п. 1 - 5, в свободной форме или в форме фармацевтически приемлемой соли, для получения лекарственного средства, имеющего ингибирующую активность против эластазы, для лечения или профилактики инфекций или заболеваний, связанных с такими инфекциями; или рака, такого рак легких, или рак молочных желез, опосредованного или являющегося результатом; или иммунологических заболеваний, таких как псориаз, опосредованных или являющихся результатом; или легочных заболеваний, таких как дефицит альфа-1-антитрипсина; эмфизема лёгких; фиброзно-кистозная дегенерация; хроническое обструктивное заболевание легких; идиопатический легочный фиброз; бронхоэктаз; лёгочная гипертензия, или артериальная лёгочная гипертензия, опосредованных или являющихся результатом; или сердечнососудистых заболеваний, таких как гипертрофия сердца, миокардит, или острый инфаркт миокарда, опосредованных или являющихся результатом; или нейродегенеративных заболеваний, опосредованных или являющихся результатом; или воспаления или заболеваний, связанных с воспалением, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, атеросклероз, рассеянный склероз, панкреатит, аллергический ринит, системный воспалительный респираторный синдром, воспалительный дерматоз, воспалительное заболевание кишечника или болезнь Крона, опосредованных или являющихся результатом эластазной активности; или где иммунологическая реакция опосредована или является результатом эластазной активности.

12. Способ лечения инфекции или заболевания или нарушения, связанных с такой инфекцией, являющихся результатом; или рака, опосредованного или являющегося результатом; или иммунологических заболеваний, опосредованных или являющихся результатом; или легочных заболеваний, опосредованных или

являющихся результатом; или сердечнососудистых заболеваний, опосредованных или являющихся результатом; или нейродегенеративных заболеваний, опосредованных или являющихся результатом; или воспаления, опосредованного или являющегося результатом эластазной активности; или где иммунологическая реакция опосредована или является результатом эластазной активности, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически приемлемого количества соединения по любому из п.п. 1-5 или композиции по п. 8.

13. Способ получения соединения по любому из п.п. 1 - 5 формулы **I,** включающий стадии

(a) связывание соответствующим образом функционализированной твердой подложки с соответствующим образом N-защищенной производной той аминокислоты, которая в желаемом конечном продукте соответствует Xaa^n, где n равно 13, 8, 7, 6, 5 или 4, причем любая функциональная группа, которая может присутствовать в указанной N-защищенной аминокислотной производной, подобным образом, защищена соответствующим образом;

(b) удаление N-защитной группы из продукта, полученного таким образом;

(c) связывание продукта, полученного таким образом, с соответствующим образом N-защищенной производной той аминокислоты, которая в желаемом конечном продукте соответствует Xaa^{n-1}, причем любая функциональная группа, которая может присутствовать в указанной N-защищенной аминокислотной производной, подобным образом, защищена соответствующим образом;

(d) удаление N-защитной группы из продукта, полученного на стадии (c);

(e) осуществление стадий по существу в соответствии со стадиями (c) и (d), применяя соответствующим образом N-защищенные производные аминокислот, которые в желаемом конечном продукте находятся в положениях n-2 - 1, причем любая функциональная группа (группы), которые могут присутствовать в указанных N-защищенных аминокислотных производных, подобным образом, являются защищенными соответствующим образом;

(f) если n не равно 13, далее осуществляются стадии, по существу, в соответствии со стадиями (c) и (d), применяя соответствующим образом N-защищенные производные аминокислот, которые в желаемом конечном продукте находятся в положениях 13 - n + 1, причем любая функциональная группа (группы), которые могут присутствовать в указанных N-защищенных аминокислотных производных, подобным образом, являются защищенными соответствующим образом;

(g) отделение продукта, полученного таким образом, от твердой подложки;

(h) циклизация продукта, отщепленного от твердой подложки;

(i) удаление любых защитных групп, присутствующих при функциональных группах любых членов цепи аминокислотных остатков; и

(j) если желательно, превращение продукта, полученного таким образом, в фармацевтически приемлемую соль, или превращение фармацевтически приемлемой, или неприемлемой, соли, полученной таким образом, в соответствующее свободное соединение или в другую фармацевтически приемлемую соль.