

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190428** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.21

(22) Дата подачи заявки
2019.08.19

(51) Int. Cl. **C07D 471/04** (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(54) АНТАГОНИСТЫ ИНТЕГРИНА

(31) 18189615.0; 18194258.2

(32) 2018.08.17; 2018.09.13

(33) EP

(86) PCT/EP2019/072185

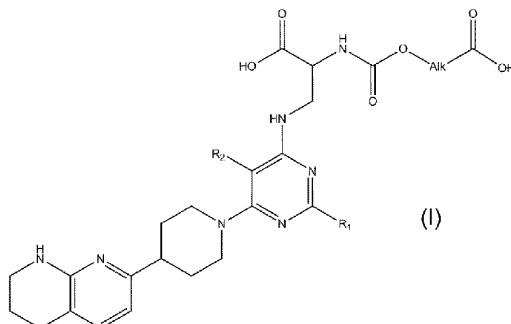
(87) WO 2020/043533 2020.03.05

(71) Заявитель:
ОКСЮРИОН НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Педерсен Ове, Вермассен Элке (BE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым антагонистам интегрин формулы (I) и их применению в качестве лекарственного средства, в частности для ингибирования неоваскуляризации.



A1

202190428

202190428

A1

АНТАГОНИСТЫ ИНТЕГРИНА

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым антагонистам интегрин и к применению этих соединений в качестве лекарственного средства, в частности, для ингибирования неоваскуляризации.

Предпосылки создания изобретения

Диабетический макулярный отек (DME) представляет собой скопление жидкости в желтом пятне у пациентов с диабетической ретинопатией (DR), которое может возникать на любой стадии заболевания. DR является одним из наиболее частых микрососудистых осложнений диабета. Угрожающая зрению DR (т.е. DME и пролиферативная диабетическая ретинопатия (PDR)) является ведущей причиной нарушения зрения и слепоты среди взрослого трудоспособного населения во всем мире. В глобальном масштабе, согласно оценкам, общая распространенность DR составляет 34,6% у людей с диабетом, в то время как общая распространенность DME оценивается примерно как 20% у людей с DR (Yau et al., 2012). Ожидают, что распространенность DME будет расти и дальше из-за увеличения распространенности диабета, старения населения и увеличения продолжительности жизни людей с диабетом: согласно оценкам, число взрослых людей, страдающих диабетом, во всем мире составляло 425 миллионов в 2017 году, и, как ожидают, оно увеличится до 629 миллионов к 2045 году.

Хотя точные механизмы, посредством которых диабет вызывает ретинопатию, остаются неясными, несколько исследований показали увеличение количества активных форм кислорода, конечных продуктов гликирования и цитокинов и хемокинов в кровотоке и стекловидном теле в связи с заболеванием. Воспаление сетчатки представляет собой главный ранний патологический признак DR. Воспалительные и сосудорасширяющие факторы могут изменять функцию эндотелия, приводя к разрушению гемато-ретиального барьера, что приводит к аккумуляции плазменных белков и липидов в макуле. Когда утолщение затрагивает фовеолярную зону или имеется угроза этого, у пациента появляются симптомы метаморфопсии и потери зрения.

Было обнаружено, что взаимодействие между стекловидным телом и сетчаткой участвует в развитии макулярного отека. В частности, когда стекловидное тело и макулярная область сетчатки плотно соединены, это может в значительной степени способствовать макулярному отеку. Среди пациентов с DR DME присутствовал только у 20% пациентов с задним отслоением стекловидного тела (PVD), по сравнению с 55% пациентов без PVD, что свидетельствует о сильном защитном эффекте PVD. Предполагаемый механизм потенциальной пользы PVD заключается в облегчении витреомакулярной тракции, однако предполагается, что и трансквитреальная оксигенация, и улучшенная диффузия фактора роста (вне премакулярного стекловидного тела) также потенциально могут иметь положительные эффекты.

Хороший контроль уровня глюкозы в крови, артериального давления и липидов крови имеет важное значение и может отсрочить начало DR и замедлить его прогрессирование. В некоторых случаях лечение включает фокальную/секторальную лазерную фотокоагуляцию с использованием небольших световых лазерных ожогов (50-100 мкм) до микроаневризм или диффузных участков утолщения. Однако это лечение может привести к таким осложнениям, как потеря центрального зрения, центральная скотома и ухудшение цветового зрения. Совсем недавно был разработан подпороговый микроимпульсный лазер как метод лечения, который теоретически позволяет избежать повреждения внутренней нейросенсорной сетчатки, тем самым уменьшая потенциальные осложнения.

В настоящее время доступно несколько фармакологических средств для лечения DME, включая ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и кортикостероиды. VEGF является мощным фактором проницаемости сосудов, способствующим утолщению желтого пятна и ухудшению зрения, связанному с DME. Анти-VEGF соединения уменьшают ангиогенез и проницаемость сосудов, вызывая регрессию неоваскуляризации и уменьшение отека. Несколько клинических исследований показали, что лечение анти-VEGF более эффективно, чем лечение фокальной/секторальной лазерной фотокоагуляцией, для уменьшения толщины центрального подполя (CST) и улучшения зрения у пациентов с DME. Нежелательные явления (АЕ), связанные с лечением анти-VEGF, являются редкими и в основном связаны с необходимостью повторных интравитреальных (IVT) инъекций в течение длительного периода времени.

Воспаление играет важную роль в патогенезе DME. Цитокины и хемокины, выделяемые лейкоцитами в крови, значительно увеличивают проницаемость сосудов, что приводит к накоплению большего количества жидкости под сетчаткой. Кортикостероидная терапия может подавлять медиаторы воспаления. Несколько клинических исследований показали, что кортикостероиды эффективны для уменьшения CST и улучшения зрения при DME. Хотя нагрузка лечения кортикостероидных имплантатов намного ниже по сравнению с анти-VEGF средствами, внутриглазные кортикостероиды связаны с повышенным риском развития катаракты и повышения внутриглазного давления. В целом, использование кортикостероидов посредством интравитреальных инъекций пациентам с DME зарезервировано в качестве терапии второй линии у тех, кто плохо отвечает на интравитреальные инъекции анти-VEGF, и противопоказано пациентам с основной глаукомой.

Из возможных способов лечения DME, перечисленных выше, анти-VEGF средства в настоящее время являются золотым стандартом лечения DME первой линии. Однако на сегодняшний день в большинстве отчетов об исследованиях сообщается, что у значительной части пациентов с DME, вплоть до 40%, наблюдаются стойкие отеки и потеря остроты зрения, несмотря на лечение анти-VEGF. Эти данные свидетельствуют о том, что другие пути, независимые от VEGF, способствуют развитию DME, и, таким образом, существует важная клиническая потребность в дополнительных эффективных

методах лечения DME.

Интегрины составляют семейство трансмембранных рецепторов клеточной поверхности, которые могут опосредовать взаимодействия клетка-клетка и клетка-внеклеточный матрикс. Интегрины участвуют в различных биологических процессах, включая дифференцировку клеток, адгезию, формирование, миграцию, подвижность, инвазию, пролиферацию и выживание. Из-за их роли в этих биологических процессах интегрины также связывают с различными патологическими состояниями, такими как рак и офтальмологические нарушения. Было показано, что в глазу интегрины играют важную роль в неоваскуляризации, проницаемости сосудов и витреоретинальной адгезии.

Интегрины представляют собой облигатные гетеродимерные рецепторы, состоящие из нековалентно связанных α и β субъединиц. Различные комбинации известных 18 α и 8 β субъединиц составляют семейство из 24 гетеродимерных интегринов, известных к настоящему времени. Рецепторы семейства интегринов можно в широком смысле разделить на 4 категории в зависимости от паттерна распознавания их лиганда: 1) связывание трипептида L-аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD), 2) связывание коллагена, 3) связывание ламинина и 4) лейкоцит-связывающие типы интегринов.

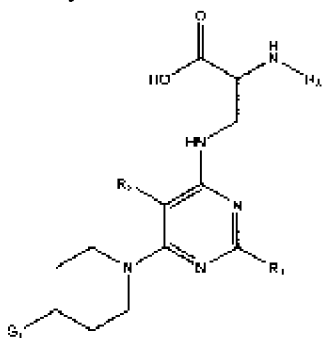
Взаимодействие интегринов с внеклеточным матриксом может привести к неоваскуляризации поверхности сетчатки, что в конечном итоге может распространиться на область стекловидного тела. Иммуногистологическое окрашивание тканей сетчатки человека, полученных от пациентов с PDR, показало, что активно пролиферирующие эндотелиальные клетки сосудов экспрессируют интегрины $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$, экспрессия которых не является высокой в покоеющихся эндотелиальных клетках (Friedlander et al., 1996; Ning et al., 2008). Кроме того, было показано, что $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_{\text{Lp}}\beta_5$ экспрессируются в фиброваскулярных эпиретинальных мембранах пациентов с активной PDR на фиброзной стадии (Ning et al., 2008; Abu El-Asrar, Missotten and Geboes, 2010), тогда как на индуцированной лазером модели CNV у мышей была показана сверхэкспрессия $\alpha 5\beta 1$ (Umeda et al., 2006). В соответствии с этим, некоторые доклинические исследования продемонстрировали, что ингибирование интегринов снижает лейкостаз и проницаемость сосудов сетчатки (Santulli et al., 2008; Pliaki et al., 2009; Rao et al., 2010). Антагонизм $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ предотвращал неоваскуляризацию сетчатки, но не повреждал уже существующие кровеносные сосуды (Friedlander et al., 1996; Hammes et al., 1996; Lahdenranta et al., 2007; Santulli et al., 2008), тогда как ингибирование $\alpha 5\beta 1$ ингибировало пролиферацию эндотелиальных клеток и продуцировало регресс хориоидальных неоваскулярных мембран в различных животных моделях (Ramakrishnan et al., 2006; Umeda et al., 2006).

Мотив RGD очень часто встречается во многих компонентах внеклеточного матрикса, включая витронектин, фибронектин и фибриноген. Следовательно, интегрины сильно связаны с белками внеклеточного матрикса, таким образом опосредуя адгезию клетка-внеклеточный матрикс, например, на витреоретинальном интерфейсе. Известно, что аналоги RGD мотива конкурируют за RGD мотив белков внеклеточного матрикса, нарушая взаимодействия интегрин с внеклеточным матриксом и, следовательно,

ослабляя прикрепления в экспериментах *in vitro* (Gehlsen et al., 1988; Pierschbacher and Ruoslahti, 1987; Zhou, Zhang and Yue 1996). В соответствии с этим, было показано, что интравитреальная инъекция растворимых RGD пептидов индуцирует PVD в глазах кроликов (Oliveira et al., 2002). Более того, у людей 3 интравитреальные инъекции антагониста интегрин ALG 1001 (Allegro Ophthalmics, LLC), как было показано, индуцируют тотальное PVD у 6 из 11 пациентов с DME без или частичным PVD на исходном уровне в первоначальном исследовании для подтверждения концепции. (Kupfermann, 2013; Boyer et al., 2014).

Эти наблюдения подтверждают предпочтение использования антагониста пан-интегрин, который нацелен на различные типы интегринов, которые лежат в основе различных аспектов заболевания, подлежащего лечению, в первую очередь $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$. Сложность заключается в том, что такие антагонисты пан-интегрин часто будут также противодействовать другим RGD-связывающим интегринам, что может вызывать побочные эффекты. Наиболее заметным является интегрин тромбоцитов, $\alpha_{IIb}\beta_3$, антагонизм которого может мешать активации и агрегации тромбоцитов.

Публикации патентных заявок WO2011/119282 A1, WO2011/094285 A1, US2006/0052398 A1 и US2008/058348 A1 раскрывают соединения в качестве потенциальных антагонистов интегрин или в качестве потенциальных антагонистов рецепторов витронектина. Соединения, раскрытые в этих патентных заявках, можно обобщенно указать как в основном соответствующие Формуле А



Формула А

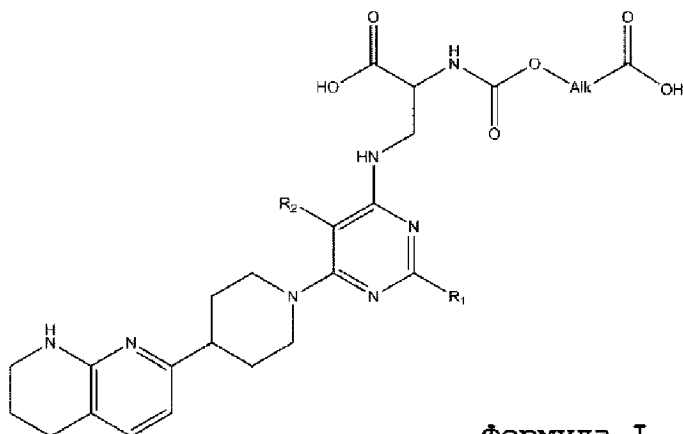
где, как правило, G_1 представляет собой замещенный пиридин или тетрагидронафтиридин, R_1 и R_2 представляют собой водород, метил или этил, и R_3 представляет собой гидрофобную головную группу. В частности, в приведенных в качестве примера соединениях с подтвержденной активностью R_3 включает алкил, циклоалкил или (гетеро)ароматическую концевую группу.

Существует необходимость в новых антагонистах интегрин, в частности антагонистов интегрин, которые действуют одновременно на разные типы интегринов, которые вовлечены в пути заболевания, такие как $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$, но которые имеют пониженный риск влияния на агрегацию тромбоцитов через их эффект на $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает соединения в соответствии с формулой (I) или их фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сольват,

изомер или смесь,



Формула I

где

R_1 и R_2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, метила или этила; и Alk представляет собой C_{1-4} алкилен.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей соединение по настоящему изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Настоящее изобретение также относится к соединениям для применения в качестве лекарственного средства. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение соединений для ингибирования патологической неоваскуляризации.

Настоящее изобретение также относится к соединениям для применения в лечении и/или профилактике глазных расстройств, таких как диабетический макулярный отек и диабетическая ретинопатия.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает EC_{50} значения для соединений cpd1, cpd2, cpd3 и сравнительных соединений cpdA и cpdB в отношении интегрин $\alpha_v\beta_3$ по сравнению с $\alpha_{IIb}\beta_3$ (более низкие значения указывают на более высокую специфичность в отношении $\alpha_v\beta_3$).

Фиг. 2 показывает ингибирование прорастания сосудов соединением cpd3 в анализе мышинного хориоидального эксплантата.

Подробное описание изобретения

Кроме того, должно быть понятно, что все определения и предпочтения, описанные выше для соединений по изобретению, в равной степени применимы к этому варианту осуществления и всем другим вариантам осуществления, как описано ниже.

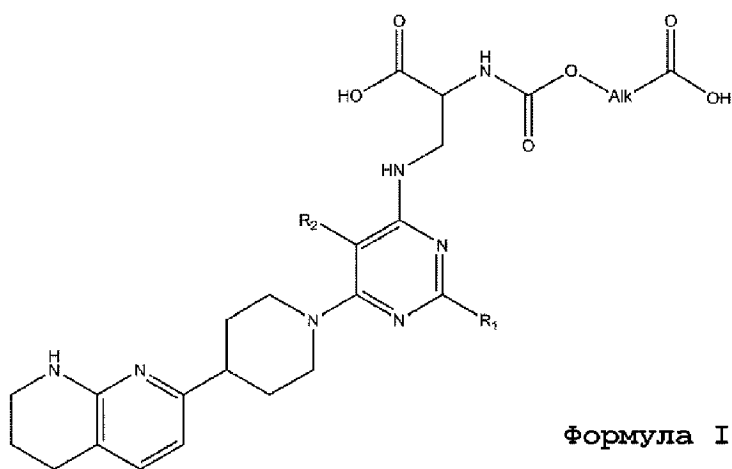
Если не указано иное, выше и ниже в описании используются следующие определения.

Термин “алкилен”, отдельно или в комбинации, означает образованный из алкана дирадикал, который может представлять собой алкилен с прямой цепью или разветвленный алкилен, содержащий от 1 до 4 атомов углерода. Прямая или разветвленная алкиленовая группа присоединена в любой доступной точке с

образованием стабильного соединения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, C_{A-B} алкилен означает линейный или разветвленный алкиленовый дирадикал, имеющий от А до В атомов углерода, например C_{1-4} алкилен означает алкиленовый дирадикал с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 4 атомов углерода, такой как, например, метилен, этилен, 1-пропилен, 2-пропилен, 1-бутилен, 2-бутилен, 2-метил-1-пропилен.

Если указаны проценты, это относится к масс./масс. процентам, если контекст явно не диктует иное.

Как описано выше, настоящее изобретение обеспечивает соединения в соответствии с формулой (I) или их фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сольват, изомер или смесь,



Формула I

где

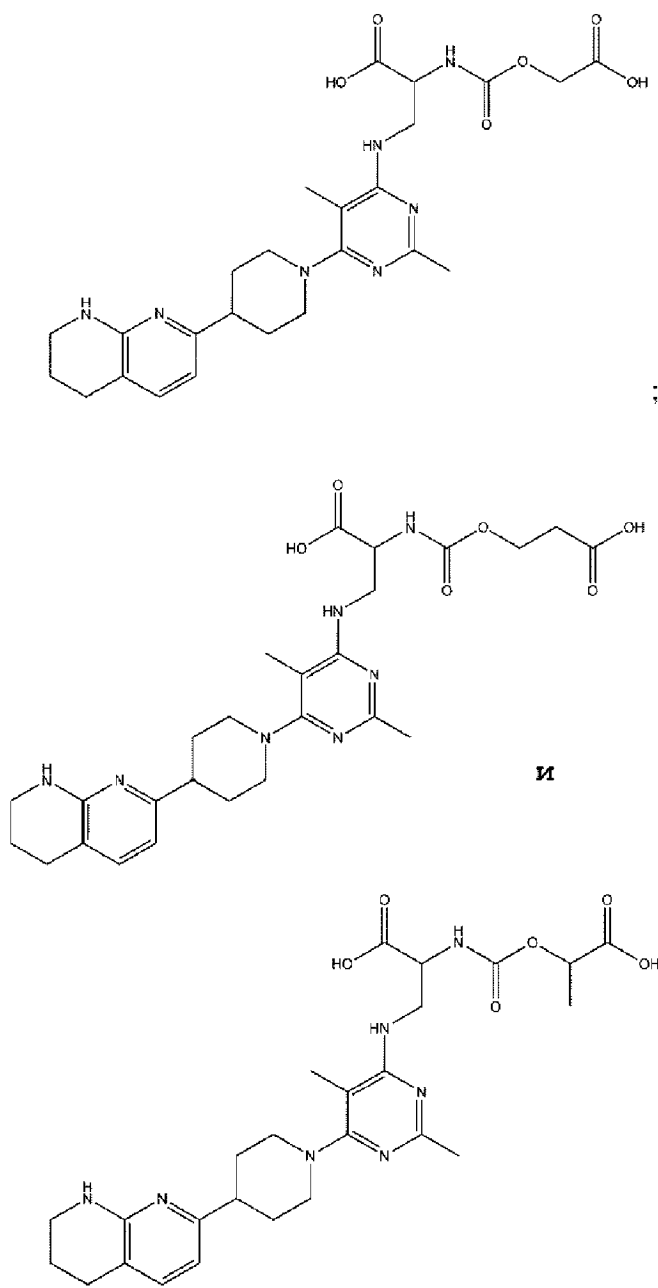
R_1 и R_2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, метила или этила; и Alk представляет собой C_{1-4} алкилен.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, либо R_1 и R_2 оба представляют собой метил, либо R_1 представляет собой водород, а R_2 представляет собой этил.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления, настоящее изобретение обеспечивает такие соединения, где R_1 и R_2 оба представляют собой метил.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения, Alk представляет собой C_{1-2} алкилен.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, соединение выбрано из группы, состоящей из



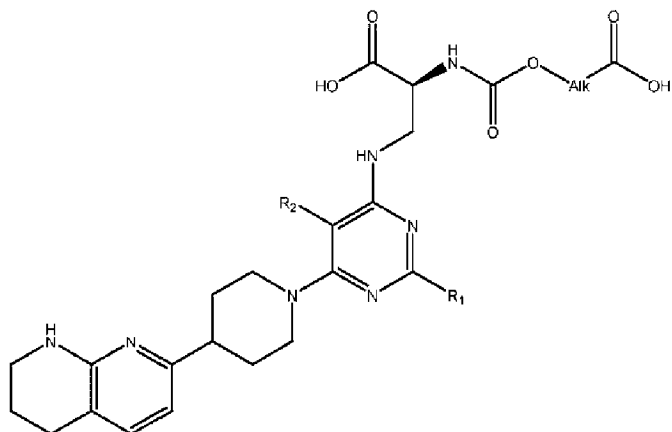
или фармацевтически приемлемой соли, фармацевтически приемлемого сольвата, изомера или смеси такого соединения.

Соединение по настоящему изобретению, подробно описанное выше, может иметь хиральный центр и существует в виде стереохимически изомерных форм. Термин “стереохимически изомерные формы” в контексте настоящей заявки определяет все возможные соединения, состоящие из одних и тех же атомов, связанных одной и той же последовательностью связей, но имеющие разные трехмерные структуры, которые не являются взаимозаменяемыми, которые противовоспалительное соединение, определенное в настоящем изобретении, может иметь.

Если не оговорено или не указано иное, химическое обозначение соединений, подробно описанных выше, охватывает смесь всех возможных стереохимически изомерных форм, которыми могут обладать указанные соединения. Указанная смесь может содержать все диастереомеры и/или энантиомеры основной молекулярной

структуры указанных соединений для использования. Предполагается, что все стереохимически изомерные формы соединений по настоящему изобретению как в чистой форме, так и в смеси друг с другом охватываются объемом настоящего изобретения.

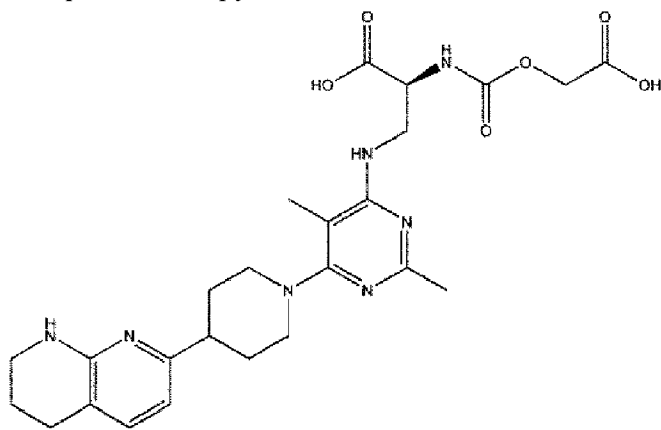
В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает (S) энантиомерные формы соединений в соответствии с формулой I. Поэтому в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает соединение в соответствии с формулой II,

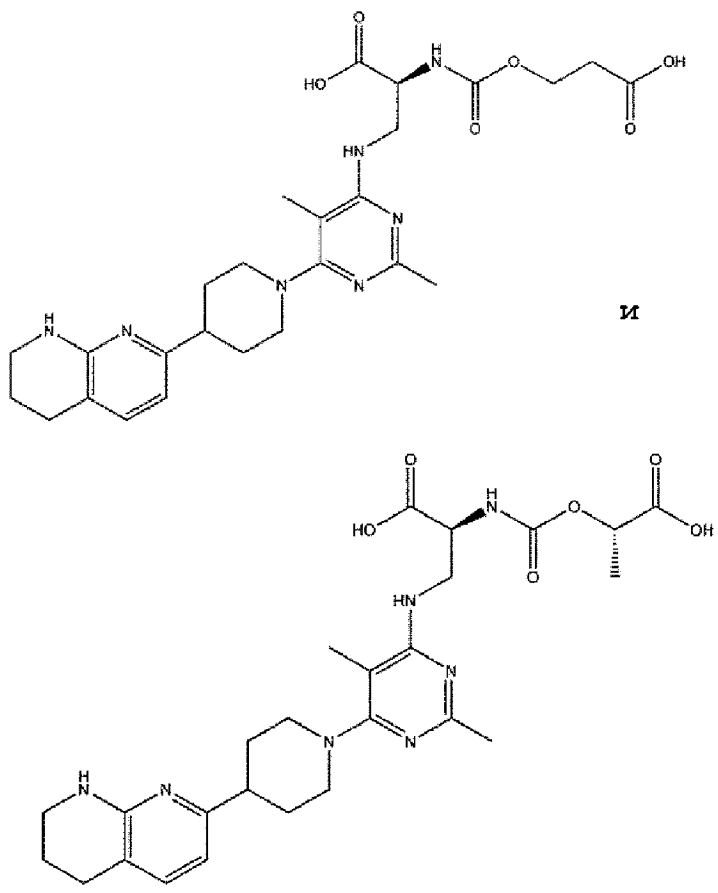


Формула II

где R_1 , R_2 и Alk имеют значение, определенное в настоящей заявке.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает соединение, выбранное из группы, состоящей из





или его фармацевтически приемлемую соль, фармацевтически приемлемый сольват, изомер или смесь.

Для терапевтического применения соли соединений для применения по настоящему изобретению, как подробно описано выше, представляют собой такие, в которых противоион является фармацевтически приемлемым, и эти соли можно назвать фармацевтически приемлемыми кислотно- и основно-аддитивными солями. Однако соли кислот и оснований, которые не являются фармацевтически приемлемыми, также могут найти применение, например, при получении или очистке фармацевтически приемлемого соединения. Все соли, независимо от того, являются они фармацевтически приемлемыми или нет, входят в объем настоящего изобретения.

Подразумевается, что фармацевтически приемлемые кислотно- и основно-аддитивные соли, как отмечается выше, включают терапевтически активные нетоксичные формы кислотно- и основно-аддитивных солей, которые могут образовывать соединения для применения по настоящему изобретению, как подробно описано выше. Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли легко можно получить обработкой основной формы такой подходящей кислотой в анионной форме. Подходящие анионы включают, например, трифторацетат, ацетат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, битартрат, бромид, эдетат кальция, камсиат, карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эсилат, фумарат, глюцептат, глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид,

гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, муцинат, напсилат, нитрат, памоат (эмбонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат, триэтиодид и т.п. Выбранный противоион может быть введен с использованием ионообменных смол. И наоборот, указанные солевые формы можно преобразовать обработкой подходящим основанием в форму свободного основания. Предпочтительной солью является гидрохлоридная соль соединений, описанных в настоящей заявке.

Соединения для использования, как указано в настоящей заявке, содержащие кислотный протон, также могут быть преобразованы в формы их нетоксичных солей присоединения металлов или аминов обработкой соответствующими органическими и неорганическими основаниями в катионной форме. Подходящие основные соли включают соли, образованные органическими катионами, такими как бензатин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, меглумин, прокаин и т.п.; и соли, которые образованы с катионами металлов, такими как алюминий, кальций, литий, магний, калий, натрий, цинк и т.п. И наоборот, указанные солевые формы можно преобразовать обработкой соответствующей кислотой в свободную форму.

Термин “аддитивная соль”, используемый в настоящей заявке выше, также включает сольваты, которые могут образовывать соединения для применения, как указано в настоящей заявке, а также их соли. Такие сольваты представляют собой, например, гидраты, алкоголяты и т.п.

Как будет понятно из раскрытия в настоящей заявке, настоящее изобретение, в частности, обеспечивает выделенные соединения и выделенные композиции. Соединения, в частности, получают путем синтеза *in vitro*, например, химического синтеза. В другом варианте осуществления соединения по изобретению имеют чистоту по меньшей мере 85%, в частности по меньшей мере 90%, более конкретно по меньшей мере 95%. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения по настоящему изобретению, который включает химический синтез соединения по настоящему изобретению и упаковку синтезированного соединения в стерильный контейнер. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения по изобретению, который включает химический синтез соединения с чистотой по меньшей мере 85%, в частности по меньшей мере 90%, более конкретно по меньшей мере 95%. Предпочтительно, синтезированное соединение впоследствии упаковывают в стерильный контейнер.

Композиции

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, композиции, включающей соединение, определенное выше и определенное в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящей заявке.

Далее в тексте выражение “соединение” или “соединение в соответствии с изобретением” следует понимать, для целей настоящего изобретения, как во

множественном, так и в единственном числе, т.е. композиция по изобретению может включать одно или более одного "соединения в соответствии с изобретением".

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую соединение по любому из пунктов формулы изобретения и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Примеры фармацевтически приемлемых композиций, а также способы их получения можно найти, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (например, 20th Edition; Lippincott, Williams & Wilkins, 2000) или в любом фармакопейном справочнике (например, США, Европейской или Международной Фармакопеи).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую водный буфер, в котором растворено соединение по изобретению. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую водный буфер, в котором растворено соединение по изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, состоящую из водного буфера, соединения по изобретению и одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую антагонист интегрин, где по меньшей мере 90% соединений, являющихся антагонистами интегрин, в композиции представляют собой соединение в соответствии с изобретением. Предпочтительно по меньшей мере 95%, в частности по меньшей мере 99% соединений, являющихся антагонистами интегрин по изобретению, представляют собой соединение в соответствии с изобретением. В другом конкретном варианте осуществления композиции по изобретению по существу не содержат другого антагониста интегрин, такого как соединение А. Еще в одном варианте осуществления соотношение соединения по изобретению и других соединений, являющихся антагонистами интегрин, таких как соединение А, составляет больше чем 98:2, конкретно больше чем 99:1, более конкретно больше чем 99,9:0,1. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, описанную в настоящей заявке, где композиция по существу не содержит соединения А, в частности, где композиция включает меньше чем 3%, в частности меньше чем 2%, предпочтительно меньше чем 1% соединения А, более конкретно при условии, что композиция не включает соединение А.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую первый активный ингредиент и второй активный ингредиент, где первый активный ингредиент представляет собой антагонист интегрин в соответствии с изобретением, и где композиция по существу не содержит антагониста интегрин, отличного от первого активного компонента. Еще в одном варианте осуществления второй активный ингредиент представляет собой соединение, которое связывается с VEGF или рецептором VEGF и ингибирует их активность.

Антагонист интегрина или соединение, являющееся антагонистом интегрина, в настоящей заявке предпочтительно относится к соединению, имеющему полумаксимальную эффективную концентрацию (EC50) против рецепторов интегрина менее 1 мМ, в частности EC50 против рецептора интегрина $\alpha_v\beta_3$. Подходящие методы определения значений EC50 известны специалистам. Одним из конкретных методов определения значения для конкретного соединения является конкурентный анализ ELISA, в котором исследуемый рецептор интегрина (в частности, рецептор интегрина $\alpha_v\beta_3$ человека) наносят на многолуночный планшет с использованием 4 мкг/мл раствора и лунки блокируют 5% раствором бычьего сывороточного альбумина. Концентрацию фибронектина для использования в анализе определяют экспериментально в отдельном эксперименте путем тестирования связывания различных концентраций фибронектина с нанесенным исследуемым интегрином, при этом концентрация фибронектина для анализа является такой, которая обеспечивает 80% от максимального связывания. Затем определенную концентрацию фибронектина человека добавляют в покрытые и заблокированные лунки в присутствии возрастающих концентраций соединения. После 2 часов инкубации при 37°C лунки промывают и связанный фибронектин определяют при помощи специального реагента, такого как выявляемые антитела против фибронектина. Затем осуществляют количественный анализ данных для определения значений EC50, т.е. концентрации соединения, которая снижает связывание фибронектина с нанесенным на планшет рецептором на 50%.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую водный буфер и соединение по изобретению. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую водный буфер, соединение по настоящему изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, состоящую из водного буфера, соединения по изобретению и одного или нескольких фармацевтически приемлемых носителей.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую от 0,1 до 1000 мг соединения по изобретению на мл композиции, в частности от 1 до 500 мг/мл, более конкретно от 1 до 100 мг/мл. Еще в одном варианте осуществления композиция включает 10-100 мг/мл, например 20-75 мг/мл.

Соединения и/или композиции для применения в качестве лекарственного средства

Настоящее изобретение также относится к соединению для применения в качестве лекарственного средства.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению для применения в ингибировании неоваскуляризации.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к

соединению для применения в лечении и/или профилактике рака. В частности, для ингибирования роста и/или метастазирования рака.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению для применения в лечении и/или профилактике глазного расстройства. В частности, для лечения и/или профилактики неоваскуляризации в глазу. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические соединения и композиции для лечения, уменьшения тяжести, облегчения или ингибирования прогрессирования (патологической) глазной неоваскуляризации. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические соединения и композиции для лечения, уменьшения тяжести, облегчения или ингибирования прогрессирования глазного расстройства, являющегося результатом, или имеющего этиологию, глазной неоваскуляризации.

Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению для применения в лечении и/или профилактике глазных расстройств, где указанное глазное расстройство выбрано из группы, состоящей из влажной возрастной макулярной дегенерации, отслоения сетчатки, заднего увеита, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации радужной оболочки, диабетического макулярного отека и диабетической ретинопатии.

Еще в одном варианте осуществления обеспечиваются соединения по изобретению для применения в качестве антагониста интегрина, в частности антагониста рецептора витронектина, *in vitro* или *in vivo*. В конкретном варианте осуществления интегрин представляет собой RGD-связывающий интегрин. В другом варианте осуществления интегрин представляет собой интегрин, включающий $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ или $\alpha_5\beta_1$ субъединицу. В более конкретном варианте осуществления интегрин представляет собой рецептор $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ или $\alpha_5\beta_1$.

В другом варианте осуществления соединения по настоящему изобретению предназначены для применения для уменьшения проницаемости сосудов, предпочтительно для уменьшения проницаемости сосудов сетчатки. Еще в одном варианте осуществления соединения по изобретению предназначены для применения при лечении и/или профилактике отека, в частности макулярного отека, более конкретно диабетического макулярного отека.

В другом варианте осуществления обеспечиваются соединения по изобретению для применения при индукции заднего отслоения стекловидного тела (PVD). В другом варианте осуществления соединения по настоящему изобретению предназначены для лечения витреомакулярной тракции.

Как указано выше, настоящее изобретение относится к новым соединениям, их фармацевтически приемлемым солям, фармацевтически приемлемым сольватам, изомерам или их смесям. Соединение по настоящему изобретению также может быть сформулировано в виде различных фармацевтических форм для целей введения. В качестве подходящих композиций можно назвать все композиции, обычно используемые для системного введения лекарственных средств. Для получения фармацевтических

композиций по настоящему изобретению эффективное количество конкретного соединения, необязательно в форме аддитивной соли или комплекса с металлом, в качестве активного ингредиента объединяют в виде тесной смеси с фармацевтически приемлемым носителем, при этом носитель может принимать самые разные формы в зависимости от формы препарата, желаемой для введения. Эти фармацевтические композиции желательны в виде стандартной лекарственной формы, подходящей, в частности, для перорального, ректального, чрескожного введения, парентеральной или интравитреальной инъекции. Например, при получении композиций в пероральной лекарственной форме можно использовать любую из обычных фармацевтических сред, такую как, например, вода, гликоли, масла, спирты и т.п., в случае пероральных жидких препаратов, таких как суспензии, сиропы, эликсиры, эмульсии и растворы; или твердые носители, такие как крахмалы, сахара, каолин, смазывающие вещества, связующие, разрыхлители и т.п. в случае порошков, пилюль, капсул и таблеток.

Особенно выгодно формулировать вышеуказанные композиции в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и равномерного дозирования. Стандартная лекарственная форма в контексте настоящей заявки относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз, где каждая единица содержит заранее определенное количество активного ингредиента, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в ассоциации с требуемым фармацевтическим носителем. Примерами таких стандартных лекарственных форм являются таблетки (включая таблетки с насечками или таблетки с покрытием), капсулы, пилюли, суппозитории, пакетики с порошком, облатки, растворы или суспензии для инъекций и т.п., а также их отдельные кратные дозы.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает упаковку, включающую соединение по настоящему изобретению и листок с инструкциями по введению соединения пациенту, страдающему офтальмологическим расстройством, указанным в настоящей заявке, в частности пациенту, имеющему влажную возрастную макулярную дегенерацию, диабетическую ретинопатию или диабетический макулярный отек, более конкретно диабетическую ретинопатию или диабетический макулярный отек.

Для осуществления лечения и/или профилактики соединения или композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить пациенту любым способом, который приводит к доставке терапевтического средства к месту офтальмологического состояния, например, путем введения в глаз. В другом варианте осуществления применение, лечение и/или профилактика включает контактирование стекловидного тела и/или внутриглазной жидкости с эффективным количеством композиции, включающей соединение по изобретению. Введение можно осуществлять глазным путем, таким как местный, субконъюнктивальный, субтеноновый, внутриглазной, посредством глазных имплантатов и т.д. Местное введение может включать введение в глаз одной или нескольких капель композиции, включающей соединение по настоящему изобретению. Доставку в области

внутри глаза *in situ* можно осуществлять посредством инъекции, канюли или другого инвазивного устройства, предназначенного для введения точно отмеренных количеств желаемой офтальмологической композиции в конкретную полость или ткань внутри глаза (например, заднюю камеру или сетчатку). Внутриглазную инъекцию можно вводить в стекловидное тело (интравитреальное введение), под конъюнктиву (субконъюнктивальное введение), за глазом (ретробульбарное введение), в склеру или под теноновую капсулу (суб-теноновое введение). Также рассматриваются другие внутриглазные пути введения и места и формы инъекций, которые входят в объем изобретения. В предпочтительном варианте осуществления лечение и/или профилактика включает введение соединения путем интравитреальной инъекции. Предпочтительно это осуществляют с использованием самозаполняющихся калибровочных игл или любого другого подходящим образом откалиброванного устройства доставки. Инъекцию в глаз можно осуществлять через плоскую часть ресничного тела через самозаполняющуюся иглу.

При введении композиции путем интравитреальной инъекции активные вещества должны быть концентрированными, чтобы минимизировать объем для инъекции. Предпочтительно объем для инъекции составляет меньше чем около 5 мл. Такие объемы могут потребовать компенсирующего дренирования витреальной жидкости, чтобы предотвратить повышение внутриглазного давления и утечку введенной жидкости через отверстие, образованное иглой для доставки. Более предпочтительно, вводимый объем составляет примерно от 10 до 200 мл. Наиболее предпочтительно объем для инъекции составляет от 30 до 100 мл, в частности около 50 мл.

Что касается предпочтительных способов введения, фармацевтически приемлемая соль, фармацевтически приемлемый сольват, изомер или их смесь также представляют собой офтальмологически приемлемую соль, офтальмологически приемлемый сольват, изомер или их смесь. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает соединение и один или несколько офтальмологически приемлемых носителей. Интересно, что соединения по изобретению, как было обнаружено, обладают высокой растворимостью в воде более 100 мг/мл, в то время как соединения предшествующего уровня техники имеют растворимость в воде, которая составляет одноразрядное число мг/мл, или более низкую. В предпочтительном варианте осуществления раскрытая в настоящей заявке композиция по изобретению представляет собой водный раствор, включающий соединение по изобретению. В другом варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает набор из частей, включающий контейнер, включающий соединение по изобретению, и другой контейнер, включающий водный буфер для растворения соединения по изобретению.

Как будет понятно специалистам, раскрытая в настоящей заявке композиция предпочтительно представляет собой стерильную композицию. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает стерильный контейнер, включающий соединение или композицию по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления стерильный контейнер представляет собой флакон, содержащий

соединение или композицию по настоящему изобретению. Флакон может содержать соединение в виде порошка или раствора, предпочтительно водного раствора. В более конкретном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает стерильный флакон, содержащий водный раствор соединения изобретения. В еще более конкретном варианте осуществления описанный в настоящей заявке флакон включает часть, которая предназначена для прокалывания иглой шприца. В альтернативном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает набор, включающий флакон с соединением по изобретению в форме порошка и контейнер, содержащий водный раствор, в частности водный буферный раствор. В другом варианте осуществления стерильный контейнер представляет собой шприц, предварительно заполненный фармацевтической композицией по изобретению, в частности водным раствором, содержащим соединение по изобретению. В еще одном варианте осуществления стерильный контейнер представляет собой контейнер, содержащий по меньшей мере одну таблетку, включающую фармацевтическую композицию по изобретению. В частности, блистерная упаковка или флакон, содержащий несколько таблеток, включающих соединение по изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В одном конкретном варианте осуществления описанный флакон содержит менее 5 мл, в частности менее 4 мл, более конкретно менее 3 мл раствора, включающего соединение по изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение также относится к соединению для применения, где лечение, ингибирование и/или профилактика вышеуказанных расстройств дополнительно включает введение соединения, которое связывается с VEGF или рецептором VEGF и ингибирует их активность. Это соединение может быть ингибитором VEGF, антителом к рецептору VEGF или его антиген-связывающим фрагментом, или антителом к VEGF или его антиген-связывающим фрагментом. Подходящие примеры таких соединений включают бевацизумаб, ранибизумаб, бролуцизумаб или конберцепт. Другим возможным дополнительным соединением является ловушка VEGF, включающая домен связывания VEGF, такая как афлиберцепт.

Настоящее изобретение также относится к комбинации, включающей соединение по настоящему изобретению и дополнительное соединение, которое связывается с VEGF или рецептором VEGF и ингибирует их активность. Как указано выше, это дополнительное соединение может быть ингибитором VEGF, антителом к рецептору VEGF или его антиген-связывающим фрагментом, или антителом к VEGF или его антиген-связывающим фрагментом, таким как бевацизумаб, ранибизумаб, бролуцизумаб или конберцепт. Другим возможным дополнительным соединением является ловушка VEGF, включающая домен связывания VEGF, такая как афлиберцепт.

Когда делается ссылка на комбинацию активных ингредиентов, активные ингредиенты могут быть представлены в единой композиции или в отдельной композиции. Кроме того, комбинация активных ингредиентов также включает активные ингредиенты, которые связаны нековалентно или ковалентно.

Настоящее изобретение также относится к комбинации, определенной выше, для применения в качестве лекарственного средства или для ингибирования, лечения и/или профилактики патологической неоваскуляризации, рака или глазного расстройства, такого как влажная возрастная макулярная дегенерация, отслоение сетчатки, задний увеит, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация радужной оболочки, диабетический макулярный отек и диабетическая ретинопатия.

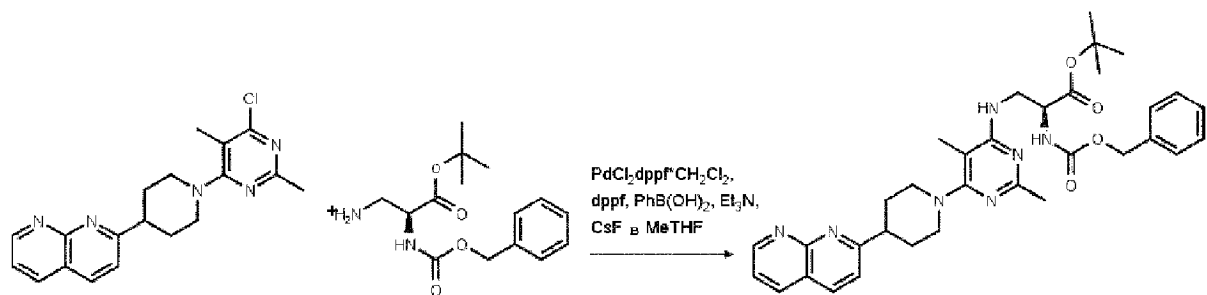
Настоящее изобретение также обеспечивает способ антагонизации интегрина, в частности рецептора витронектина, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение соединения по изобретению. Более конкретно, изобретение обеспечивает способы для ингибирования ангиогенеза у субъекта. Настоящее изобретение также относится к способу для ингибирования (патологической) неоваскуляризации у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение соединения по настоящему изобретению. Еще в одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ для ингибирования глазной неоваскуляризации у субъекта, при этом способ включает введение соединения по изобретению субъекту. Еще в одном конкретном варианте осуществления способ включает введение соединения или композиции по изобретению в глаз субъекта, например, путем интравитреальной инъекции. В частности, способ включает интравитреальную инъекцию композиции, описанной в настоящей заявке.

Настоящее изобретение также обеспечивает соединения и композиции, описанные в настоящей заявке, для применения в получении лекарственного средства для профилактики и/или лечения расстройства, описанного в настоящей заявке.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1- Синтез соединений по изобретению

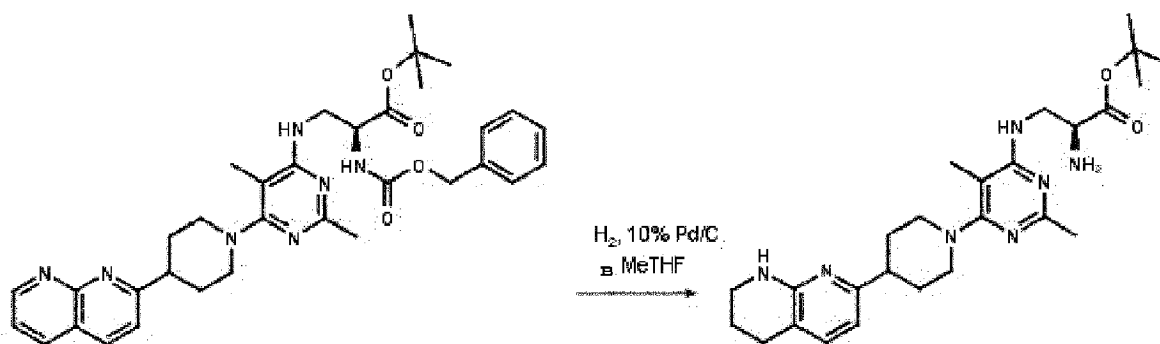
Синтез бензил N-[(2S)-1-(трет-бутоксипропан-2-ил)-3-({2,5-диметил-6-[4-(1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-1-гидроксипропан-2-ил]карбамата



2-[1-(6-хлор-2,5-диметилпиримидин-4-ил)пиперидин-4-ил]-1,8-нафтиридин и трет-бутил (2S)-3-амино-2-{[(бензилокси)карбонил]амино}пропаноат получали в соответствии со способом, описанным в US2008/0058348 A1, который включен в настоящую заявку посредством ссылки. Обе молекулы подвергали взаимодействию в реакции аминирования Бухвальда-Хартвига, катализируемой комплексом дихлор[1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен]палладия(II) с дихлорметаном (1:1), 1,1-ферроцендиил-бис дифенилфосфином, фенилбороновой кислотой, триэтиламино и фторидом цезия в 2-

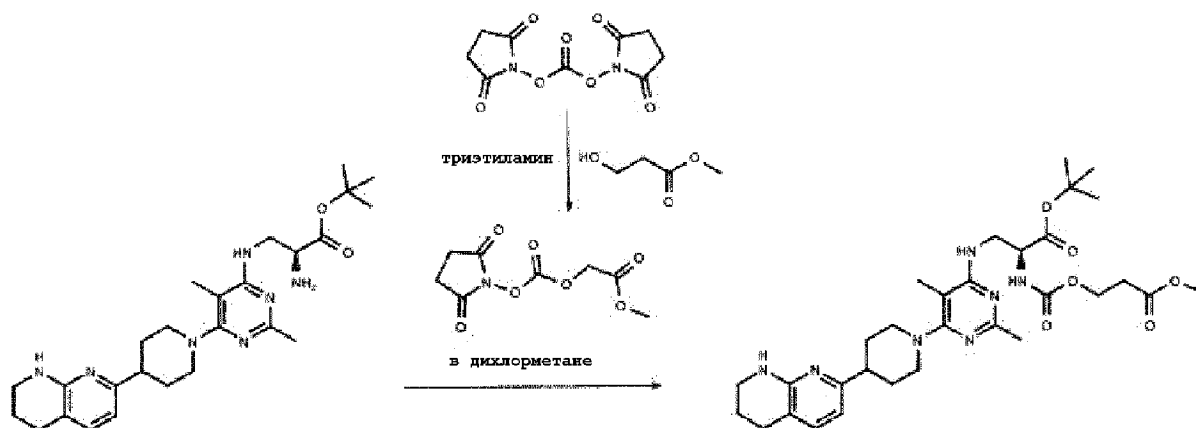
метилтетрагидрофуране. Реакционную смесь фильтровали через целит и экстрагировали водным раствором хлористоводородной кислоты. Водный экстракт was нейтрализовали водным раствором ацетата натрия и экстрагировали дихлорметаном, затем промывали водным раствором бикарбоната натрия и сушили над сульфатом натрия с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на диоксиде кремния с использованием толуола/этилацетата в качестве элюента. Хроматографированное вещество растворяли в этилацетате и снова очищали кристаллизацией в виде соли (-)-дибензоил-L-винной кислоты. С использованием водного раствора бикарбоната натрия соль винной кислоты удаляли с получением очищенного продукта.

Синтез трет-бутил (2S)-2-амино-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноата



Бензил N-[(2S)-1-(трет-бутокс)-3-({2,5-диметил-6-[4-(1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-1-гидроксипропан-2-ил]карбамат гидрировали над палладием на активированном угле в 2-метилтетрагидрофуране. Катализатор удаляли фильтрованием через целит. Растворитель выпаривали с получением желаемого продукта.

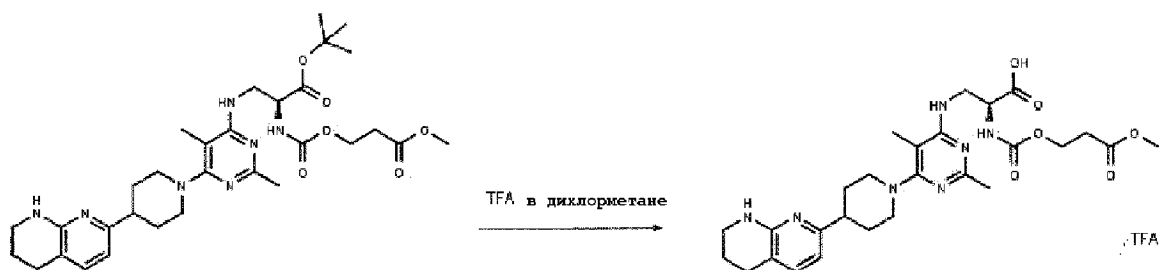
Синтез трет-бутил (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-[[3-метокси-3-оксопропоксикарбонил]амино}пропаноата



N,N-дисукуцинимидилкарбонат подвергали взаимодействию, в присутствии

триэтиламина, с метил 3-гидроксипропаноатом в дихлорметане с получением метил 2-({[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]карбонил}окси)ацетата. Добавляли трет-бутил (2S)-2-амино-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноат с получением желаемого продукта. Реакционную смесь промывали водным раствором хлористоводородной кислоты и водным раствором бикарбоната натрия и затем сушили над сульфатом натрия с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией на диоксиде кремния с использованием этилацетате/н-гептана/триэтиламина в качестве элюента.

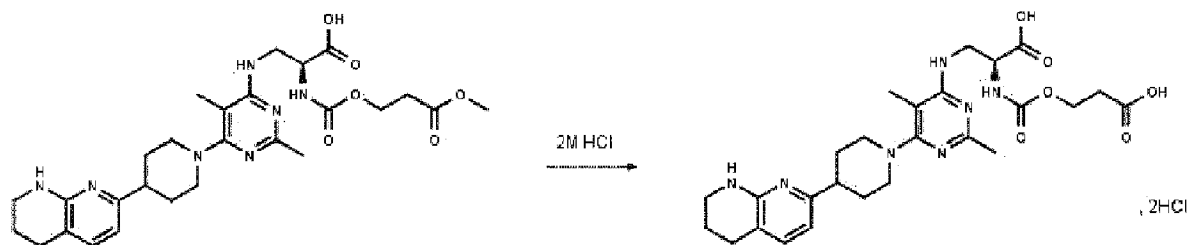
Синтез (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-{{(3-метокси-3-оксопропокси)карбонил}амино}пропановой кислоты трифторацетата



Трет-бутил (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-{{(2-метокси-2-оксоэтокси)карбонил}амино}пропаноат растворяли в дихлорметане и обрабатывали трифторуксусной кислотой. Реакционную смесь промывали насыщенным солевым раствором и растворитель выпаривали с получением желаемого продукта в виде соли трифторуксусной кислоты. Полученное соединение далее указано как сравнительное соединение А (cpd A).

Электронное распыление (ES) MS низкого разрешения m/z : 556 [(M+1), 100%]

Синтез (2S)-2-{{(2-карбоксиэтокси)карбонил}амино}-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропановой кислоты

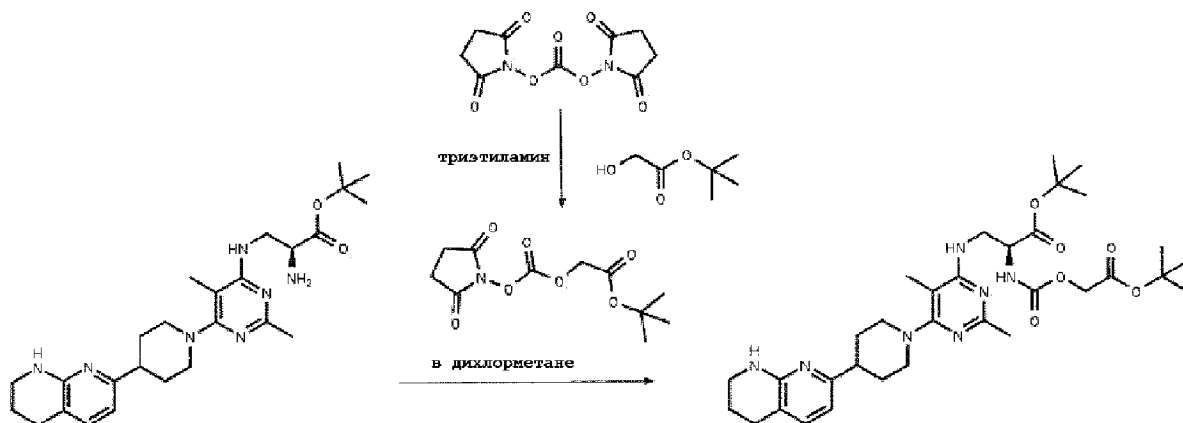


Трифторацетат (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-{{(3-метокси-3-оксопропокси)карбонил}амино}пропановой кислоты растворяли в 2М водном растворе хлористоводородной кислоты. После завершения реакции растворитель выпаривали с

получением желаемого продукта. (2S)-2-{{(2-карбоксиэтокси)карбонил}амино}-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропановая кислота далее указана как соединение 1 (срd 1).

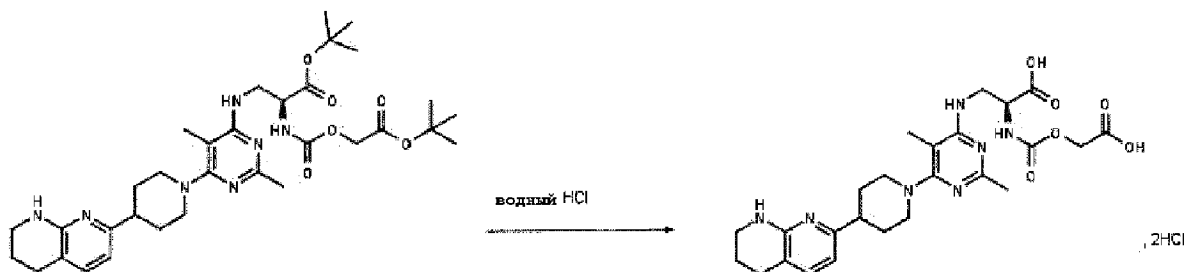
Электронное распыление (ES) MS низкого разрешения m/z : 542 [(M+1), 100%]

Синтез трет-бутил (2S)-2-({[2-(трет-бутокс)-2-оксоэтокси]карбонил}амино)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноата



N,N-дисуццинимидилкарбонат подвергали взаимодействию, в присутствии триэтиламина, с трет-бутил 2-гидроксиацетатом в дихлорметане с получением трет-бутил 2-({[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]карбонил}окси)ацетата. Добавляли трет-бутил (2S)-2-амино-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноат. После завершения реакции реакцию смесь промывали водным раствором хлороводородной кислоты и водным раствором бикарбоната натрия и затем сушили над сульфатом натрия с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на диоксиде кремния с использованием этилацетата/н-гептана/триэтиламина в качестве элюента.

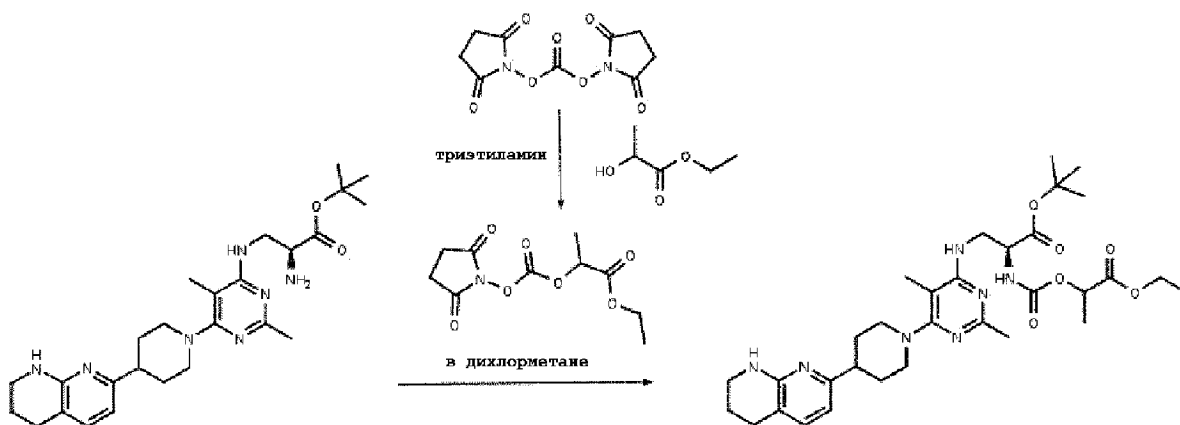
Синтез (2S)-2-([карбоксиметокси]карбонил)амино)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропановой кислоты дигидрохлорида (THR-687)



Трет-бутил (2S)-2-({[2-(трет-бутокс)-2-оксоэтокси]карбонил}амино)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноат гидролизовали водным раствором хлороводородной кислоты. Реакционную смесь промывали н-гептаном, затем упаривали с получением соединения 2 (срd2).

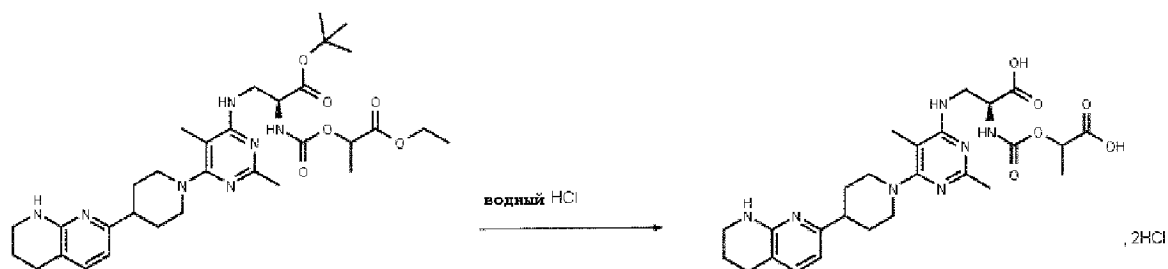
^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ : 7,64 (д 1H), 6,71 (д 1H), 4,63 (д 1H), 4,46 (д 1H), 4,57 (дд 1H), 4,06 (дд 1H), 3,85 (дд 1H), 3,77 (м 2H), 3,53 (дд 2H), 3,27 (м, 2H), 3,01 (тт 1H), 2,84 (дд 2H), 2,58, (с 3H), 2,10 (дд, 2H), 2,07, (с 3H), 1,99 (т, 2H), 1,95 (тд 2H)

Синтез трет-бутил (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-({[(1-этокси-1-оксопропан-2-ил)окси]карбонил}амино)пропаноата



N,N-дисукуцинимидилкарбонат подвергали взаимодействию, в присутствии триэтиламина, с этил 2-гидроксипропаноатом в дихлорметане с получением этил 2-({[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]карбонил}окси)пропаноата. Добавляли трет-бутил (2S)-2-амино-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропаноат. После завершения реакции реакцию смесь промывали водным раствором хлористоводородной кислоты и водным раствором бикарбоната натрия и затем сушили над сульфатом натрия с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией на диоксиде кремния с использованием дихлорметана/метанола в качестве элюента.

Синтез (2S)-2-({[(1-карбоксиэтокси)карбонил]амино}-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)пропановой кислоты, дигидрохлорида

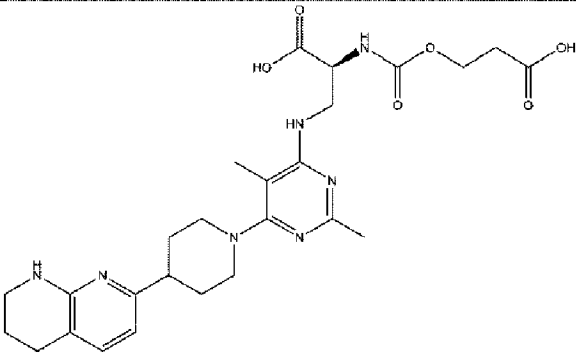
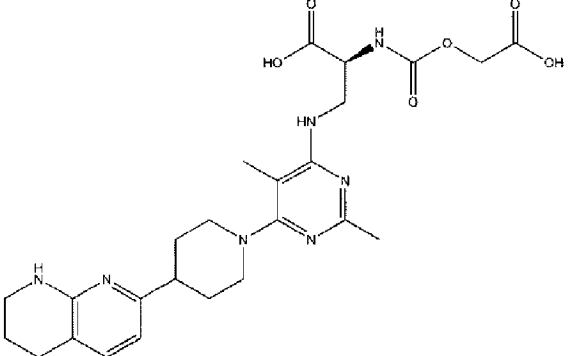
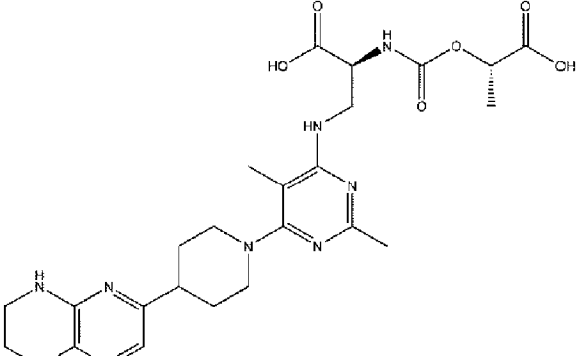


Трет-бутил (2S)-3-({2,5-диметил-6-[4-(5,6,7,8-тетрагидро-1,8-нафтиридин-2-ил)пиперидин-1-ил]пиримидин-4-ил}амино)-2-({[(1-этокси-1-оксопропан-2-ил)окси]карбонил}амино)пропаноат гидролизовали водным раствором хлористоводородной кислоты. Реакционную смесь промывали н-гептаном, затем упаривали с получением продукта, который далее указан как соединение 3 (cpd3).

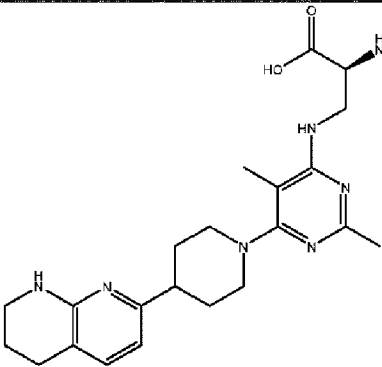
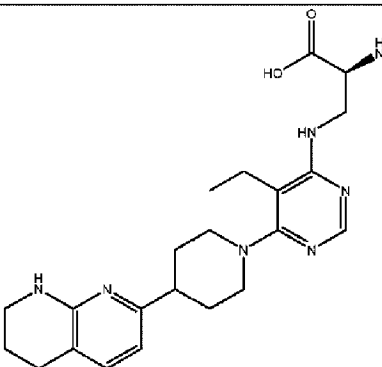
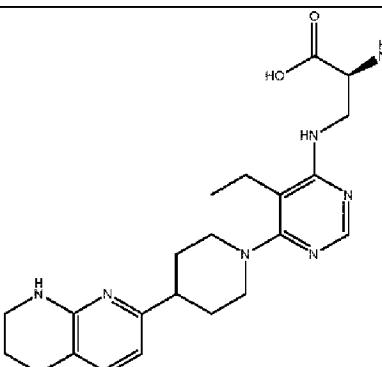
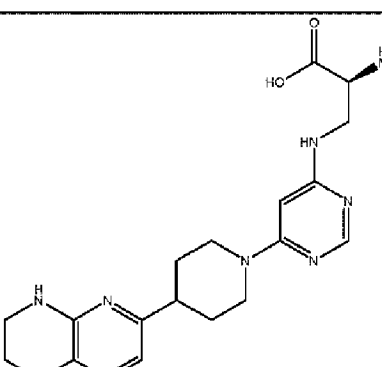
^1H ЯМР (400 МГц, D_2O) δ : 7,5 (д 1H), 6,5 (д 1H), 4,5 (м 1H), 4,2 (м 1H), 3,9 (дд 1H),

3,5-3,7 (м 3H), 3,4 (т 2H), 3,1 (т 2H), 2,8 (м 1H), 2,7 (т 2H), 2,4 (с 3H), 1,9 (с 3H), 1,9-2,0 (м 3H), 1,7-1,9 (м 4H), 1,3 (д 3H).

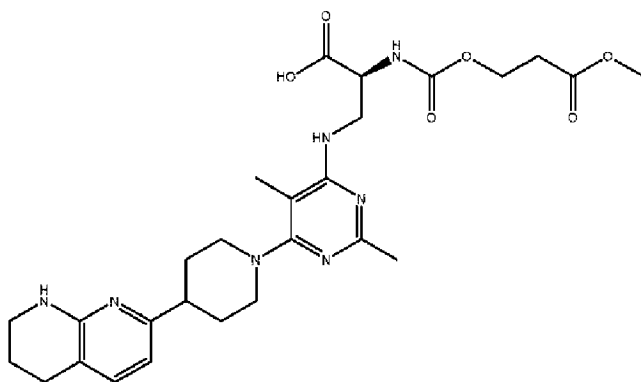
Соответственно, были получены следующие соединения по изобретению:

	Cpd1
	Cpd2
	Cpd3

Другими иллюстративными соединениями в соответствии с изобретением являются следующие:

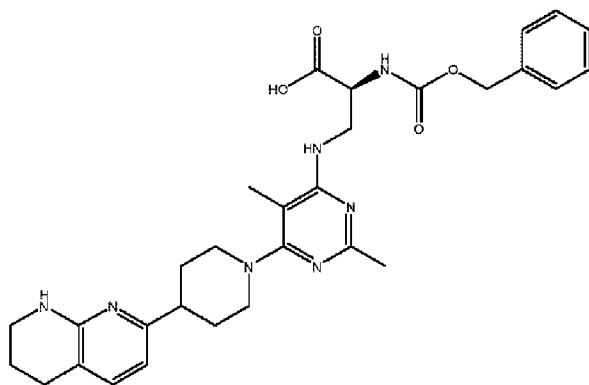
	Cpd4
	Cpd5
	Cpd6
	Cpd7

Соединение А (срd А) синтезировали как описано выше:



Соединение В (CpdB) синтезировали в соответствии с процедурами US2008058348

A1:



ПРИМЕР 2 - Антагонизм в отношении интегрин

Принцип используемого конкурентного анализа ELISA был следующим: (1) исследуемый рецептор интегрин наносили на 96-луночные планшеты и лунки блокировали, (2) затем в соответствующие лунки добавляли лиганд интегрин (фибронектин) в присутствии возрастающих концентраций данного антагониста интегрин, (3) через определенный промежуток времени лунки промывали и связанный лиганд определяли с использованием специфического реагента. Затем осуществляли количественный анализ данных для определения значений EC₅₀, т.е. концентрации антагониста интегрин, которая снижает связывание лиганда с нанесенным рецептором на 50%

EC50 для различных интегринов и антагонистов человеческого интегрин

	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$	$\alpha_5\beta_1$	$\alpha_{IIb}\beta_3$
cpd1	+++	+++	+++	+
cpd2	+++	+++	+++	+
cpd3	+++	+++	+++	+
cpdA	+++	+++	+++	+++
cpdB	++	+++	+++	+++

+++ : между 1 и 10нМ; ++: между 10 и 25 нМ; +: > 25нМ

Соединение формулы (I) ингибирует взаимодействия между интегринными и их лигандами. Было показано, что соединение формулы (I) антагонизирует некоторые рецепторы интегрин, включая $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$; с аффинностью с однократными значениями в наномолярном диапазоне. Было показано, что эти рецепторы интегрин играют роль в ангиогенезе ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$), сосудистой проницаемости ($\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$) и витреоретинальной адгезии ($\alpha_5\beta_1$).

Примечательно, что соединения по изобретению демонстрируют значительно более низкий антагонизм в отношении интегрин тромбоцитов $\alpha_{IIb}\beta_3$, который участвует в агрегации тромбоцитов. На Фиг. 1 представлены определенные отношения значений EC50 для $\alpha_v\beta_3$ по сравнению с $\alpha_{IIb}\beta_3$. Как следует из этих результатов, соединения по настоящему изобретению проявляют гораздо более низкую активность в отношении интегрин тромбоцитов по сравнению с интегрином $\alpha_v\beta_3$. Напротив, соединения, описанные в предшествующем уровне техники, демонстрируют значительно более высокую активность в отношении интегрин тромбоцитов по сравнению с интегрином $\alpha_v\beta_3$.

ПРИМЕР 3 - Анализ миграции клеток

Заживление ран эндотелиальными клетками опосредуется миграцией и пролиферацией эндотелиальных клеток, которые являются критическими компонентами процесса ангиогенеза, и обычно используются в качестве суррогатной модели ангиогенного потенциала *in vitro*. Анализ миграции клеток ORIS™ использовали с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC).

Клетки HUVEC (SCCE-001, каталожный номер 1000519, Merck Chemicals) культивировали в колбах T175 (каталожный номер 3531 12, falcon) в питательной среде EndoGro (SCME-003, Merck Chemicals) и расщепляли, когда они достигли конфлюентности 90-100%.

Для анализа клетки использовали при пассаже 2-4 после оттаивания и при 80-90% конфлюентности. В начале дня планшеты для анализа миграции клеток Oris™

(каталожный № CMAFN.I01, AMS Biotechnology), покрытые фибронектином, вынимали из холодильника и помещали в условия комнатной температуры на 1 час. Маски для детекции Oris Detection Masks промывали этанолом и наносили на дно 96-луночных планшетов, выравнивая Al-угол масок с Al-углом планшетов. Клетки собирали трипсинизацией (Кат. № 25300, Gibco), центрифугировали при 250 g в течение 5 мин и суспендировали при $0,4 \cdot 10^6$ на мл в полной питательной среде EndoGro. 100 мл клеточной суспензии добавляли в лунки и планшеты инкубировали в течение 6 часов при 37°C и 5% CO₂ для адгезии клеток.

По окончании инкубации закрывающий инструмент промывали этанолом и использовали для удаления пробок из всех лунок, кроме контрольных. 100 мл питательной среды, содержащей различные концентрации соединений (cpd2, cpd3, cpdB, циленгитид), добавляли в лунки и планшеты переносили на 24 часа в инкубатор при 37°C и 5% CO₂ для обеспечения миграции.

Непосредственно перед окончанием инкубации получали 4 мкг/мл раствор кальцеина АМ (каталожный номер 354217, Beckton Dickinson) в предварительно нагретом HBSS (каталожный номер 14025, Gibco). Пробки удаляли из контрольных лунок и среду осторожно удаляли из всех лунок с использованием многоканального устройства (без вакуумной аспирации). Лунки промывали 100 мкл DPBS. Затем добавляли 100 мкл раствора кальцеина АМ и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂. После инкубации флуоресценцию считывали при длинах волн возбуждения 494 нм и эмиссии 517 нм с использованием Flexstation и программного обеспечения SofiMax Pro 5.4.5 (Molecular Devices). Флуоресценцию считывали со дна планшетов с закрытой крышкой, чтобы они оставались стерильными. Затем маски удаляли и делали снимки при помощи флуоресцентного микроскопа Axiovert (Zeiss) с использованием отраженного света, GFP и 2,5x объектива.

Значения IC₅₀ для cpdB, cpd2 и cpd3 были ниже 1 мкМ. IC₅₀ для положительного контроля циленгитида составляла 100 мкМ. Можно сделать вывод, что соединения формулы (I) сохраняют сильную активность и ингибируют миграцию клеток со значениями IC₅₀ в наномолярном диапазоне.

ПРИМЕР 4 - Анализ с использованием мышинового хориоидального эксплантата

Анализ основан на модели эксплантата микрососудистого ангиогенеза у мышей, которая близко имитирует хориоидальный ангиогенез *in vivo*. Основным преимуществом этой органотипической культуральной модели является то, что клетки содержатся в своей нормальной среде, тем самым сохраняя межклеточные взаимодействия, сохраняя при этом более высокий уровень экспериментального контроля, чем в моделях на животных. Модель хориоидального эксплантата, или коротко ЕМСА модель, позволяет быстро оценить новые антиангиогенные терапевтические средства с дополнительным преимуществом, заключающимся в исключении потенциального отсутствия воздействия, которое часто встречается при тестировании малых молекул в глазах животных. Эксплантаты RPE-хориоидальной оболочки-склеры (далее указаны как хориоидальные

экспланты) погружают в трехмерный фибриноген/фибриновый гель. Добавление среды, содержащей сыворотку, вызывает экстенсивное прорастание эндотелиальных клеток в матрикс через 3-4 дня культивирования.

Животные

Все эксперименты осуществляли на самцах мышей C57BL/6J 4-5-недельного возраста (Charles River Laboratories France), содержащихся в стандартных лабораторных условиях в соответствии с нормальным циклом день/ночь с неограниченным доступом к пище и воде. Все эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по этике KU Leuven.

Рассечение ткани сосудистой оболочки и подготовка культуры эксплантата

После начальной оптимизации был установлен общий протокол. Вкратце, после эвтаназии мышей с использованием пентобарбитала (200 мг/кг, и/п, Dolethal, Vetoquinol) с последующей цервикальной дислокацией глаза немедленно удаляли изогнутыми щипцами и помещали в ледяной DPBS (каталожный номер 14190-136, Gihco). Под стереомикроскопом глаз помещали в каплю ледяного DPBS и удерживали на месте при помощи щипцов на ледяной чашке Петри. Роговицу и хрусталик удаляли через круговой разрез на лимбе (граница роговицы и склеры) при помощи пружинных ножниц Vannas (Fine Science Tools). Затем из оставшегося глазного яблока удаляли лишние мышцы и делали разрез от края задней камеры к головке зрительного нерва. После осторожного отделения комплекса RPE-хориоидальная оболочка-склера от сетчатки получали 6-8 эксплантатов на периферии этого комплекса с использованием иглы для перфорации (диаметр 750 мкм, Mediquip Surgical). Эксплантаты переносили в 48-луночный планшет (BD Biosciences), предварительно заполненный 350 мкл бессывороточной среды DMEM (каталожный номер 11995-065, Gibco) и 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (каталожный номер 15140-122, Gibco) и инкубировали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

Погружение хориоидального эксплантата в фибриноген/фибриновый гель и условия культивирования

Бычий фибриноген (3,1 мг/мл, каталожный номер F863, Sigma-Aldrich) растворяли в DMEM (каталожный номер 11995-065, Gibco), содержащей 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (каталожный номер 15140-122, Gibco), а затем фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм (Corning). Затем к раствору фибриногена добавляли 10 мкг/мл ингибитора сериновой протеазы апротинина (каталожный номер A6279, Sigma-Aldrich) для блокирования фибринолитической активности. После добавления 400 мЕд/мл бычьего тромбина (SRP6555, Sigma-Aldrich) этот раствор фибриногена-апротинина-тромбина быстро распределяли в 48-луночные планшеты (100 мкл на лунку) и оставляли для отверждения при 37°C в течение минимум 5 мин. Поверх покрытых фибрином лунок добавляли 175 мкл раствора фибриногена плюс апротинин с последующим переносом отдельных RPE-хориоидальных эксплантатов в 175 мкл среды DMEM с использованием срезанного наконечника. Наконец, в каждую лунку добавляли 1,4 мкл тромбина (400 мЕд/мл) и эту смесь оставляли для загустевания при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 часа.

После загустевания 350 мкл DMEM, содержащей 10% FBS (SH30071.03, термоинактивированный. HyClone), и тестируемую молекулу(молекулы) (cpd3, cpdB и циленгитид) добавляли поверх геля и планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

Количественная оценка прорастания сосудов

Через 3-4 дня делали снимки в светлом поле при 2,5х увеличении при помощи инвертированного микроскопа Axio Vert.AI (Zeiss) с использованием программного обеспечения микроскопа ZEN lite 2012 (Zeiss). Анализ области разрастания сосудов осуществляли вручную на ZVI изображениях, в частности путем выделения тела эксплантата, а также общей площади разрастания сосудов (включая тело эксплантата) с использованием программного обеспечения Axiovision Rel 4.8 ("Measure > Outline", Zeiss). Дальнейший анализ осуществляли в Microsoft Excel, где площадь прорастания эндотелиальной органотипической культуры определяли количественно путем вычитания площади тканевого эксплантата из общей площади, занятой ростками. Поскольку абсолютные площади прорастания между независимыми экспериментами немного различаются, все данные в каждом эксперименте были нормализованы к условию обработки носителем, и были рассчитаны значения IC₅₀ (GraphPad Prism 5).

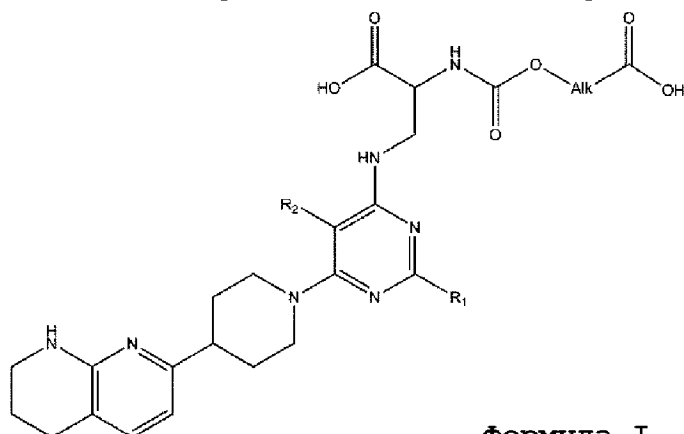
Результаты

Все антагонисты интегрина блокировали образование эндотелиального прорастания в зависимости от концентрации. Это согласуется с исследованиями, показывающими, что эндотелиальные клетки могут связываться с фибриногеном через специфичность распознавания ROD. Действительно, фибриноген содержит множество сайтов связывания для интегринов $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_5\beta_1$, которые, как известно, экспрессируются эндотелиальными клетками и являются важными регуляторами (патологического) ангиогенеза. Cpd3 и CpdB ингибировали разрастание сосудов со IC₅₀ значениями около 1 мкМ, тогда как для положительного контроля циленгитида измеренное значение IC₅₀ составляло около 300 мкМ. Репрезентативные изображения в светлом поле для cpd3 показаны на Фиг. 2. Эти результаты согласуются с результатами анализа миграции клеток, обсуждаемого в примере 3.

В заключение, соединения по настоящему изобретению представляют собой ингибиторы пан-интегрина, демонстрирующие сильный антагонизм против множества рецепторов интегрина, которые, как было показано, играют роль в ангиогенезе ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ и $\alpha_5\beta_1$), проницаемости сосудов ($\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$) и витреоретинальной адгезии ($\alpha_5\beta_1$). С другой стороны, по сравнению со сравнительными соединениями, соединения по изобретению демонстрируют гораздо более низкий антагонизм к интегринам тромбоцитов ($\alpha_{IIb}\beta_3$), тем самым снижая риск вмешательства в агрегацию тромбоцитов и увеличивая терапевтическое окно. Кроме того, было показано, что соединения по изобретению ингибируют миграцию клеток и уменьшают прорастание сосудов. Изобретение относится к новым антагонистам интегрина, которые полезны, среди прочего, для лечения неоваскулярных заболеваний.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение в соответствии с формулой (I) или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтически приемлемый сольват, изомер или смесь,



Формула I

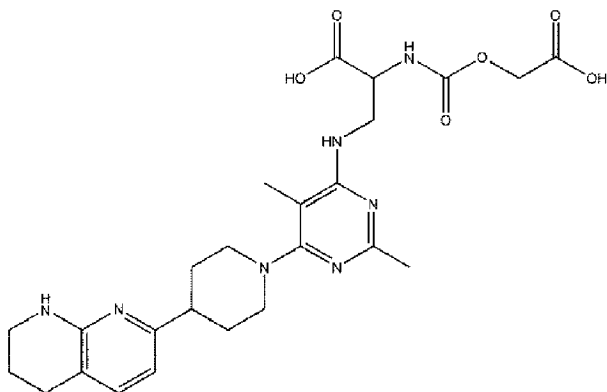
где

R_1 и R_2 независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, метила и этила; и Alk представляет собой C_{1-4} алкилен.

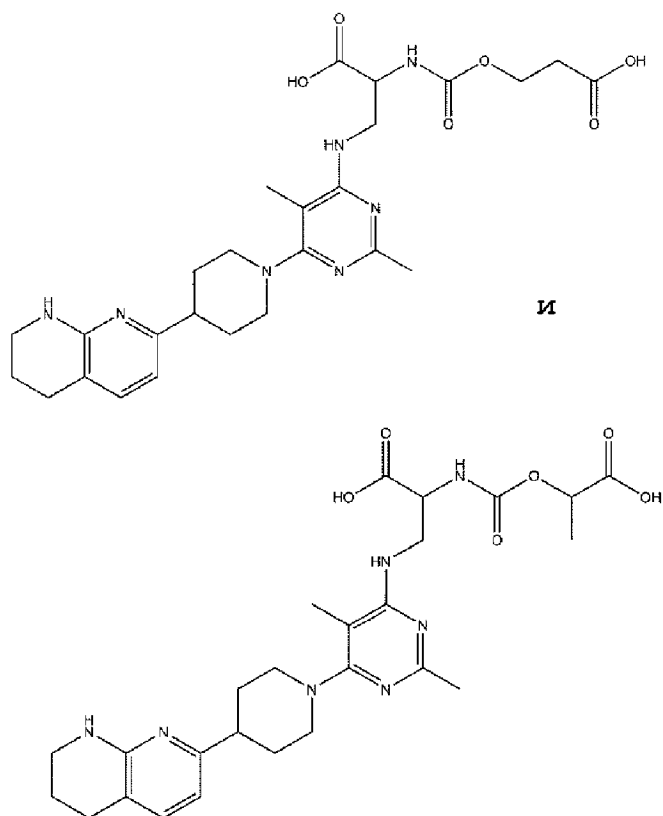
2. Соединение по п. 1, где оба R_1 и R_2 представляют собой метил.

3. Соединение по любому из пп. 1 или 2, где Alk представляет собой C_1 или C_2 алкилен.

4. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где соединение выбрано из группы, состоящей из:



;



5. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из предшествующих пунктов и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

6. Соединение по любому из пп. 1-4 для применения в качестве лекарственного средства.

7. Соединение для применения по п. 6 для применения в ингибировании неоваскуляризации.

8. Соединение для применения по п. 6 для применения в лечении и/или профилактике рака.

9. Соединение для применения по п. 6 для применения в лечении и/или профилактике глазного расстройства.

10. Соединение для применения по п. 9, где указанное глазное расстройство выбрано из группы, состоящей из влажной возрастной макулярной дегенерации, отслоения сетчатки, заднего увеита, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации радужной оболочки, диабетического макулярного отека и диабетической ретинопатии.

11. Соединение для применения по п. 9 или 10, где лечение и/или профилактика включает введение соединения путем интравитреальной инъекции.

12. Соединение для применения по любому из пп. 7-10, где ингибирование, лечение или профилактика дополнительно включает введение соединения, которое связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) или рецептором VEGF и ингибирует их активность.

13. Комбинация, включающая соединение по любому из пп. 1-4; и соединение,

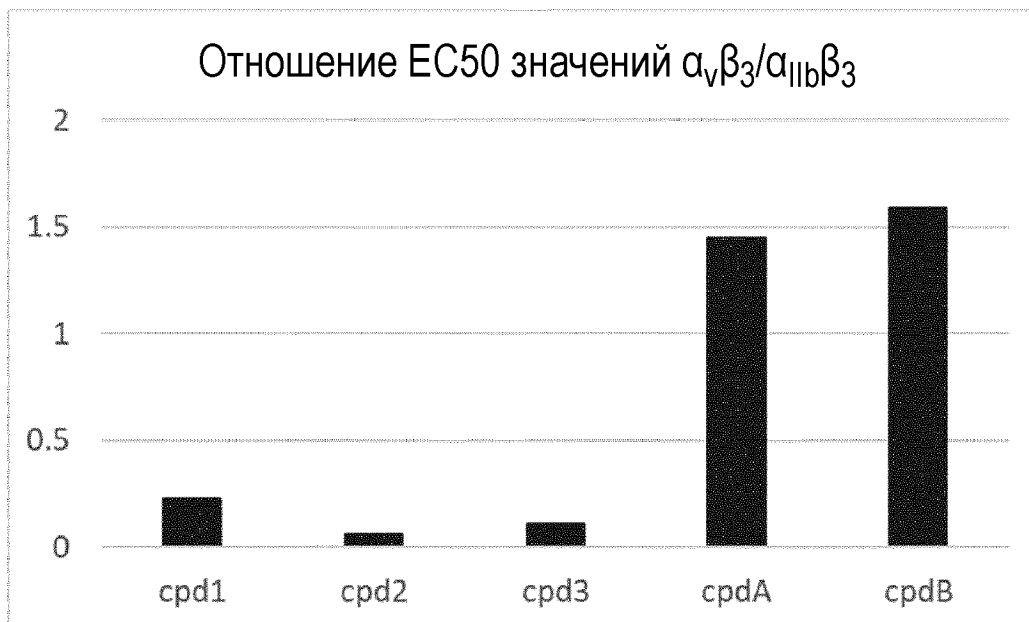
которое связывается с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) или рецептором VEGF и ингибирует их активность.

14. Комбинация по п. 13 для применения, определенного в любом из пп. 6-11.

15. Способ для ингибирования неоваскуляризации у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту соединения по любому из пп. 1-4.

1/1

ФИГ.1



ФИГ.2

