



(12) PATENT

(19) NO

(11) 329867

(13) B1

NORGE

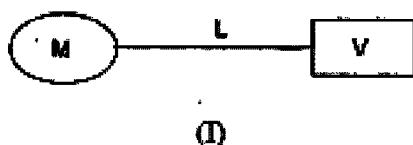
(51) Int Cl.
C07J 43/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 11/08 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/04 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
Med flere

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20050575	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.07.08 PCT/IB2003/03792
(22)	Inng.dag	2005.02.02	(85)	Videreføringsdag	2005.02.02
(24)	Løpedag	2003.07.08	(30)	Prioritet	2002.07.08, US, 395190
(41)	Alm.tilgj	2005.03.15			
(45)	Meddelt	2011.01.17			
(73)	Innehaver	GlaxoSmithKline istrazivacki centar Zagreb doo, Prilaz baruna Filipovica 29, HR-10000 ZAGREB, Kroatia Mladen Mercep, Majstora Radonje 10, HR-10000 ZAGREB, Kroatia Milan Mesic, Slavenskog 8, HR-10000 ZAGREB, Kroatia Linda Tomaskovic, Lascinska 119, HR-10000 ZAGREB, Kroatia Stribor Markovic, Sarajevska 2A, HR-47000 KARLOVAC, Kroatia			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Hybridmolekyler av makrolider med steroide/ikke-steroide, anti-inflammatorisk aktive molekyler, farmasøytisk preparat inneholdende en slik forbindelse samt anvendelse av forbindelsen			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives

a) nye forbindelser med formel (I):



Der

M betyr en makroliddel avledet fra et makrolid med evnen til akkumulering i inflammatoriske celler, V betyr et anti-inflammatorisk steroid eller en ikke-steroid subenhet, eller en antineoplastisk eller en antiviral subenhet; og L betyr en linkergruppe som kovalent forbinder M og V;

b) dens farmakologisk akseptable salter, prodmgs og solvater,

c) fremgangsmåter og mellomprodukter for deres fremstilling, samt

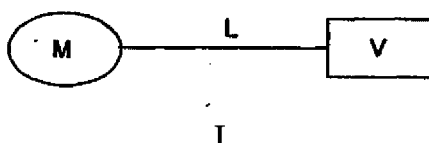
d) deres anvendelse ved behandling av inflammatoriske/neoplastiske/virale sykdommer og tilstander i mennesker og dyr.

1

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår

(a) nye forbindelser som representeres ved strukturen I:



5

der M betyr en makrolid subenhet med egenskapen å akkumulere i inflammatoriske celler, V betyr en anti-inflammatorisk subenhet, enten steroid eller ikke steroid subenhet og L betyr en linkergruppe som kovalent forbindelser M og V,

10

(b) farmasøytisk akseptable salter og solvater,

(c) farmasøytisk preparat omfattende en slik forbindelse

15

(d) deres anvendelse for fremstilling av et medikament for behandling av inflammatoriske forstyrrelser eller tilstander.

20

Slike forbindelser kan virke som promedikamenter og transportere forbindelsen til målcellen og fri den inne i en slik målcelle i høyere konsentrasjon enn det som vanligvis kan oppnås ved forbindelsen alene, eller de kan være aktive i den respektive hybridform, som administrert. Disse forbindelser og deres ovenfor nevnte anvendelser virker derfor til å løse det tekniske problem med økning av effektiviteten og/eller reduksjonen av bivirkninger hos en eller flere av de ovenfor nevnte aktive bestanddeler ved å

25

Oppfinnelsens bakgrunn

Anti-inflammatoriske medikamenter kan klassifiseres i de av steroid og av ikke-steroid type. De steroid-inflammatoriske forbindelser er fremdeles de mest effektive ved behandling av inflammatoriske sykdommer og tilstander som: astma, kronisk obstruktiv pulmonær sykdom, inflammatorisk nesesykdommer som allergisk rhinitt, nasalpolypper, intestinalsykdommer som Crohns sykdom, colitt, ulcerativ colitt, dermatologisk inflammasjoner som eksem, psoriasis, allergisk dermatitt, neurodermatitt, pruritt, konjunktivitt, autoimmune sykdommer som rheumatoid artritt og inhibering av

35

ondartede sykdommer, inkludert leukemier, lymfomer, transplantasjonsimmunitet.

Videre benyttes adjunkt kjemoterapeutiske midler ved behandling av forskjellige myelomer og andre ondartede sykdommer i det hemotopoietiske system. I tillegg til utmerket potens og effektivitet, har medikamenter av denne type også tallrike ugunstige bivirkninger, f.eks. steroider som. på karbohydratmetabolismen, kalsiumresorpsjon, sekresjon av endogene korticosteroider så vel som på de fysiologiske funksjoner av hypofysen, adrenal cortex og thymus. Nylig utviklede steroider er meget effektive mot inflammatoriske tilstander og prosesser fordi de inhiberer mange inflammasjonsmediatorer, mens deres systemiske bivirkninger reduseres. Patentpublikasjonene WO 94/13690, WO 94/14834, WO 92/13873 og WO 82/13872 beskriver såkalte "myke" steroider eller hydrolyserbare korticosteroider som er konstruert for topisk påføring på inflammasjonssetet, mens deres systemiske bivirkninger er redusert på grunn av instabilitet av "myke" steroider i serum der det aktive steroid meget hurtig hydrolyserer til den aktive form. Et ideelt steroid, uten ugunstige bivirkninger ved langtids- og kontinuerlig behandling slik det er nødvendig for kontroll av sykdommer som astma eller Crohns sykdom, er imidlertid ennå ikke funnet. Således foreligger det et akutt behov for steroider med en forbedret, terapeutisk profil, og/eller færre eller mildere bivirkninger.

Ikke-steroider, anti-inflammatoriske medikamenter med forskjellige virkningsmekanismer virker på spesielle inflammasjonsmediatorer og gir således en terapeutisk effekt. På grunn av forskjeller ikke bare i virkningsmekanismen, men også når det gjelder de spesielle inhiberte inflammasjonsmediatorer, har steroider og ikke-steroider medikamenter forskjellige profiler for anti-inflammasjonseffekter og således kan visse medikamenter være mer egnet enn andre for spesielle tilstander. De fleste ikke-steroider, anti-inflammatoriske medikamenter er imidlertid ikke absolutt spesifikke og deres anvendelse ledsages av ugunstige bivirkninger når de benyttes i større doseringer eller over lengre tid. Det er kjent at mange ikke-steroider, anti-inflammatoriske medikamenter virker som inhibitorer for endogent COX-1-enzym, som er meget viktig for å opprettholde integriteten i mageslimhinnen. Anvendelsen av disse medikamenter forårsaker således ofte skader på mageslimhinnen eller sågar blødning (Warner T. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7563-7568). Derfor er midler som selektivt inhiberer COX-2, men ikke COX-1 foretrukket for behandling av inflammatoriske sykdommer. I tillegg er visse anti-inflammatoriske forbindelser (som teofyllin) kjent for å ha en meget snever, terapeutisk indeks, noe som begrenser deres anvendelse.

I den senere tid er det ikke-steroider, anti-inflammatoriske medikament celeksoib som spesifikt blokkerer COX-2, godkjent av FDA for bruk ved behandling av reumatoid

artritt (Luong et al. *Ann. Pharmacother.* **2000**, *34*, 743-760). COX-2 uttrykkes også i mange cancre og precancerøse lesjoner, og det er stadig sterkere tegn på at selektive COX-2-inhibitorer kan være brukbare for terapi og forebyggelse av colorektale og andre cancre (Taketo, M. M., *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1609-1620, Fournier et. al., *J.*
 5 *Cell Biochem. Suppl.* **2000**, *34*, 97-102).

I 1975 ble TNF- α definert som en endotoksin-indusert serumfaktor som forårsaket tumornekrose in vitro og in vivo (Carswell E. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 3666-3670). I tillegg til antitumoraktivitet av TNF- α flere andre biologiske
 10 aktiviteter som er viktig ved homeostase så vel som ved patofysiologiske tilstander. Hovedkildene for TNF- α er monocytter-makrofager, T-lymfocytter og mastceller.

Det funn at anti-TNF- α antistoffer (cA2) er effektive ved behandling av pasienter som lider av rheumatoid artritt (RA) (Elliot M. et al. *Lancet* **1994**, *344*, 1105-1110) intensi-
 15 verte interessen for å finne nye TNF- α inhibitorer som mulige potente medikamenter mot RA. Rheumatoid artritt er en autoimmun, kronisk inflammatorisk sykdom som karakteriseres ved irreversible, patologiske forandringer i leddene. I tillegg til RA, er TNF- α antagonister også anvendbare i forbindelse med flere andre, patologiske
 20 tilstander og sykdommer som spondylitt, osteoartritt, gikt og andre artrittiske tilstander, sepsis, septisk sjokk, toksisk sjokksyndrom, atopisk dermatitt, kontakt dermatitt, psoriasis, glomerulonefritt, lupus erytematose, skleroderma, astma, kakheksi, kronisk obstruktiv lungesykdom, kongestiv hjertesvikt, insulinresistens, lungefibrose, multippel-sklerose, Crohns sykdom, ulcerativ colitt, virale infeksjoner og AIDS.

25 Hepatitt er en inflammasjon i leveren primært forårsaket av en virus, og mindre vanlig, av visse medikasjoner eller toksiner (f.eks. alkohol). Den virale infeksjon erverves ofte ved eksponering til kontaminert blod. De som mest sannsynlig vil kontraktere virusen er intravenøse medikamentbrukere som deler kontaminerte nåler, selv om seksuell kontakt med en person som har en form for hepatitt også kan spre sykdommen. I enkelte tilfelle
 30 eksponeres arbeidere i helsesektoren til kontaminert blod og personer som trenger gjentatte transfusjoner av blod har ervervet en form for hepatitt.

Det er identifisert tre hovedtyper av viral hepatitt, nemlig hepatitt A, hepatitt B og hepatitt C, selv om minst fire andre virus kan forårsake hepatitt. Hepatitt A er en meget
 35 infektøs form for hepatitt og er den vanligste form for denne sykdom. Hepatitt A overføres vanligvis ved kontaminert næring eller vann. Symptomene på hepatitt A

ligner ofte de til intestinal influensa og en overveiende andel av personer med hepatitt A kommer seg fullstendig.

Akutt hepatitt B er potensielt en mer alvorlig form for viral leverinfeksjon. Dens symptomer er i stor grad de samme som for hepatitt A, men symptomene er alvorligere og varer lenger. Det primære initialsymptom på hepatitt A og hepatitt B inkluderer dårlig appetitt, kvalme, oppkast og feber. I de senere trinn av hepatitt kan urinen bli mørk og persistent og gjenopptreden gulfarging utvikles. I rundt 20% av tilfellene utvikles til slutt hepatitisk cirrhosis (leverar). Cirrhose som et resultat av hepatitt kan diagnostiseres via en blodprøve for å evaluere leverfunksjonen. Til slutt blir en lever som er påvirket av cirrhose også øm. Hepatitt C er kjent som den vesentlige kausative årsak til ikke-A- og ikke-B-hepatitt, deler fellessymptomer med hepatitt A og B, og pasienter utvikler kroniske infeksjoner som til syvende og sist kan føre til levercirrhose.

Makrolider som makrolid-antibiotika akkumulerer i forskjellige celler hos individer som administreres slike molekyler, særlig i fagocytceller som mononukleære, perifere blodceller, polymorfonukleære celler, peritoneale og alveolære makrofager så vel som i væsken som omgir det bronkoalveolære epitel (se Glaude R.P. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 **1989**, 277-282; Olsen K.M. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 **1996**, 2582-2585). Videre er relativt svake, inflammatoriske effekter av visse makrolider beskrevet, således er f.eks. den anti-inflammatoriske effekt av erytromycin-derivater (*J. Antimicrob. Chemother.*, 41 **1998** 37-46; WO 00/42055) and azitromycin-derivativer beskrevet (EP 0283055). Anti-inflammatoriske effekter av visse makrolider er også kjent fra in vitro- og in vivo-studier i forsøksdyremodeller så som zimosan-indusert peritonitt i mus (*J. Antimicrob. Chemother.*, 30 **1992** 339-348) and endotoksin-indusert, neutrofil akkumulering i rottetrakea (*J. Immunol.* 159 **1997** 3395-4005). Den modulerende effekt av makrolider på cytokiner som interleukin 8 (IL-8) (*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156 **1997** 266-271) eller interleukin 5 (IL-5) (EP 0775489 og EP 0771564) er også kjent. I tillegg kan den gunstige, farmakokinetiske profil for makrolider øke vevskonsentrasjonen for en forbindelse, f.eks. i leveren eller øke forholdet hvite blodlegemer:plasma (Girard A.E. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 **1987** 1948-54; Widlfeuer A. et al, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 **1996**, 75-79).

For å oppnå forbindelser med forbedret/ny aktivitetsprofil mot sykdommer der selektiv aktivitet trengs, er flere forskjellige aktive substanser forbundet med makrolider med forskjellige typer linkere. Noen eksempler på hybrider/konjugater/chimerer av erytromycin-A-derivater og nukleobaser (uracil og thymin) eller thymidin-avledede nukleo-

sider er rapportert (Costa A.M. et al., *Tetrahedron Lett.* 41, **2000**, 3371-3375). Imidlertid viste slike konstrukter ingen aktivitet/selektivitet mot et ønsket mål. I tillegg er makrolidkonstrukter der linkerens vil være av peptidtypen, ikke rapportert.

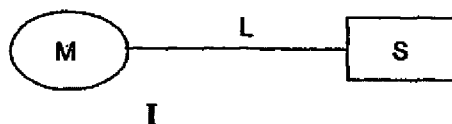
- 5 Peptidlinkeren som innføres i foreliggende hybridmolekyler gjør det mulig for disse å virke som promedikamenter for å friggi V-delen ved spesifikk, lysosomal spaltning i målcellen. Tilsvarende linkere er beskrevet for andre små molekyler (i det foreliggende tilfellet representert ved hybrider av en anti-inflammatorisk forbindelse) og et makromolekyl eller en polymer (Duncan R. et al. i Robinson J.R. og Lee V.H. (utg.)
- 10 *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, 2. utgave, **1987** 581-607, Subr V. et al, *J. Controlled Rel.* 18 **1992** 123-132).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- Forbindelser som representeres ved formel I skiller seg fra kjente forbindelser, ved
- 15 deres struktur tillater dem å akkumulere i organer det siktes på og i celler som bevirker den inflammatoriske immunrespons eller tumor eller infeksjon som krever behandling. Slik innvirkning av forbindelsene med formel I skyldes makroliddelen M som har farmakokinetiske egenskaper til å akkumuleres i immunsystemceller og særlig fagocytter. Dette muliggjør at forbindelsene med formel I kan virke overveiende hvis
- 20 ikke utelukkende på inflammasjons- eller infeksjonssetet ved å "ri" makrolidet inn i selve inflammasjonscellen som rekrutteres til locus for inflammasjon, eller infeksjon, der den aktive bestanddel kan utøve sin virkning. På en slik måte blir systemiske bivirkninger av steroide eller ikke steroide, anti-inflammatoriske substanser redusert vesentlig eller sågar eliminert. Etter topisk eller systemisk applikasjon, vil
- 25 hybridmolekylene ifølge oppfinnelsen (og/eller, hvis frigivbare, deres standarddeler) hurtig akkumulere ved inflammasjonssetet eller i tumoren eller de infiserte celler eller nær disse.

Søker har nylig funnet at visse forbindelser innenfor formel I:

30

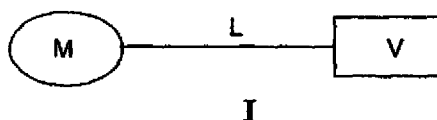


utøver en forbedret terapeutisk effekt ved behandling av inflammasjonssykdommer, lidelser og tilstander. Symbolet M i strukturen ovenfor representerer en makrolid-subenhet som har egenskaper å kunne akkumuleres i inflammatoriske celler, S betyr en

anti-inflammatorisk subenhet og L betyr en linker som kovalent forbinder M og S. Foreliggende søkeres samtidig inngitte PCT/HR02/00001 beskriver forbindelser med en steroidsubenhet S forbundet via kjeden L til posisjon N/9a i 9-dihydro-9-deokso-9a-aza-9a-homoertromycin eller til posisjon C/3 i et des-kladinosylazitromycinderivat eller til posisjon C/2' i desoksaminsukker. Imidlertid er hybridforbindelser med steroidsubenheten bundet til peptidlinkeren i posisjon N/9a av 9-dihydro-9-deokso-9a-aza-9a-homoerytromycin, som også har den ovenfor nevnte terapeutiske virkning, så langt ikke beskrevet.

10 Foreliggende oppfinnelse er rettet mot

(a) nye "hybrid"-forbindelser som representert ved formel I:



15 der M betyr en makrolidsubenhet som har egenskaper av å akkumuleres i inflammatoriske celler, V betyr en anti-inflammatorisk steroid eller ikke-steroid-enhet, som definert nedenfor, og L betyr en linkergruppe som kovalent forbinder L og V;

(b) preparater inneholdende en eller flere av de foregående forbindelser i en mengde effektivt til å bekjempe inflammasjon eller malignant tumor eller virus og derved behandle lidelser og tilstander som involverer inflammasjon, i pattedyr, inkludert mennesker; og

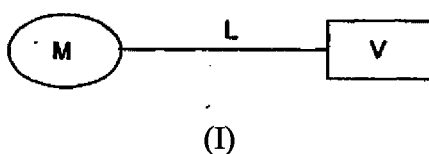
(c) anvendelse av disse forbindelser for fremstilling av et preparat for behandling av slike lidelser og tilstander.

25

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer fortrinnsvis en forbedret terapeutisk effekt og/eller en forbedret bivirkningsprofil.

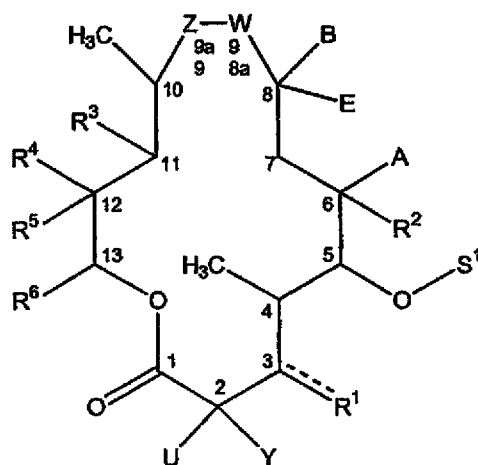
Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgende en forbindelse kjennetegnet ved formel

30 (I)



der

M representerer en makrolid-subenhet som har egenskapen å akkumulere i inflammatoriske celler, hvori M representerer en gruppe med formel (II):



(II)

der

- (i) Z og W uavhengig er $>C=O$, $>CH_2$, $>CH-NR_tR_s$, $>N-R_N$, $>C=N-R_M$ eller en binding,

der

R_t og R_s uavhengig er H eller C_{1-10} alkyl;

R_M er hydroksy, C_{1-10} alkoksy, substituert C_{1-10} alkoksy eller OR^P ;

R_N er hydrogen, R^P , C_{1-10} alkyl, C_{2-10} alkenyl, C_{2-10} alkynyl, C_{1-10} alkoksy,

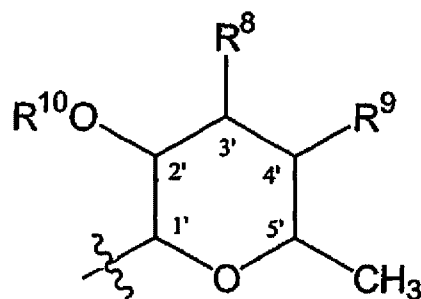
C_{1-10} alkoksyalkyl eller $-CO(=X)-NR_tR_s$; der X er $=O$ eller $=S$;

forutsatt at Z og W ikke samtidig kan være $>C=O$, $>CH_2$, $>CH-NR_tR_s$, $>N-R_N$, $>C=N-R_M$ eller en binding;

- (ii) U og Y uavhengig er hydrogen, halogen, C_{1-10} alkyl eller hydroksy- C_{1-10} alkyl;

- (iii) R^1 er hydroksy, OR^P , $-O-S^2$ -gruppe eller en $=O$;

(iv) S^1 er en sukkerdel med formelen:



5

der

R^8 og R^9 begge er hydrogen eller sammen danner en binding, eller R^9 er hydrogen og R^8 er $-N(CH_3)R^y$, der

R^y er R^p , R^z eller $-C(O)R^z$, der R^z er hydrogen eller C_{1-10} alkyl eller

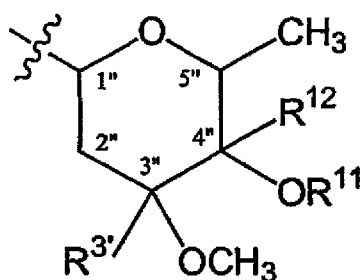
10 C_{2-10} alkenyl eller C_{2-10} alkynyl eller C_{3-8} cykloalkyl eller C_{6-14} aryl eller

C_{2-10} heteroaryl eller C_{1-10} alkyl substitueret med C_{2-7} alkyl, C_{2-7} alkenyl,

C_{2-7} alkynyl, C_{6-14} aryl eller C_{2-10} heteroaryl

R^{10} er hydrogen eller R^p ;

15 (v) S^2 er en sukkerdel med formelen:



der

20 $R^{3'}$ er hydrogen eller metyl;

R^{11} er hydrogen, R^p eller $O-R^{11}$ er en gruppe som med R^{12} og med $C/4''$ -karbonatomet danner en $>C=O$ - eller epoksygruppe;

R^{12} er hydrogen eller en gruppe som med $O-R^{11}$ -gruppen og med $C/4''$ -karbonatomet danner en $>C=O$ - eller epoksygruppe;

25

- (vi) R^2 er hydrogen, hydroksy, OR^p eller C_{1-10} alkoksy;
- (vii) A er hydrogen eller metyl;
- 5 (viii) B er metyl eller epoksy;
- (ix) E er hydrogen eller halogen;
- (x) R^3 er hydroksy, OR^p , C_{1-10} alkoksy eller R^3 er en gruppe som med R^5 og med
 10 C/11- og C/12-karbonatomene danner et syklisk karbonat eller karbamat; eller, hvis W eller Z er $>N-R_N$, er R^3 en gruppe som med W eller Z danner et syklisk karbamat;
- (xi) R^4 er C_{1-4} -alkyl;
- 15 (xii) R^5 er hydrogen, hydroksy, OR^p , C_{1-4} -alkoksy eller en gruppe som med R^3 og med C/11- og C/12-karbonatomene danner et syklisk karbonat eller karbamat;
- (xiii) R^6 er hydrogen eller C_{1-4} -alkyl;
- 20 der M har et bindingssete gjennom hvilket det er forbundet til V via en linkergruppe L; forutsatt at bindingssetet er ett eller flere av de følgende:
- a. en hvilken som helst reaktiv hydroksy-, nitrogen- eller epoksygruppe lokalisert
 25 på S^1 , S^2 eller et aglykon-oksygen hvis S^1 og/eller S^2 er spaltet av;
 - b. en reaktiv $>N-R_N$ - eller $-NR_tR_s$ - eller $=O$ -gruppe lokalisert på Z eller W;
 - c. en reaktiv hydroksygruppe lokalisert på en hvilken som helst av R^1 , R^2 , R^3 og R^5 ;
 - d. en hvilken som helst annen gruppe som først kan derivatiseres til en hydroksy-
 30 eller $-NR_tR_s$ -gruppe, og R^p er hydroksyl- eller aminobeskyttende gruppe;

V representere en anti-inflammatorisk subenhet valgt fra gruppen bestående av steroid-
 anti-inflammatorisk subenhet og en ikke-steroid-anti-inflammatorisk subenhet, og
 35 L er et linker-molekyl hvortil hver av M og V er kovalent bundet, der L representerer et polypeptid valgt fra gruppen bestående av:

Gly-Fe-Leu, Gly-Gly-Fe, Gly-Fe-Fe, Gly-Fe-Gly, Gly-Leu-Gly, Gly-Val-Ala, Gly-Fe-Ala, Gly-Leu-Fe, Gly-Leu-Ala, Ala-Val-Ala, Gly-Gly-Fe-Leu, Gly-Fe-Leu-Gly, Gly-Fe-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Fe-Fe-Leu, Gly-Leu-Leu-Gly, Gly-Fe-Tyr-Ala, Gly-Fe-Gly-Fe, Ala-Gly-Val-Fe og Gly-Fe-Fe-Gly;

5

og farmasøytisk akseptable salter og solvater derav, og individuelle diastereomerer derav.

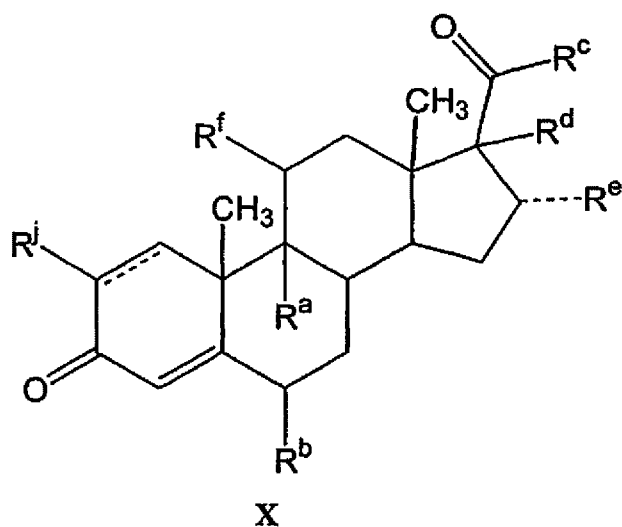
Det er viktig at makrolidsubenheten stammer fra et makrolid som har evnen til akkumuler-
 10 lering i immunsystemets celler som rekrutteres til inflammasjonsetet, særlig fagocytiske celler. De fleste laktoniske forbindelser som er definert ovenfor er kjent for å ha denne egenskap. For eksempel gjelder dette 14-leddede makrolider som erythromycin og dennes derivater; 15-leddede makrolider som azitromycin og dennes derivater så vel som 8a- og 9a-laktamer og dennes derivater.

15

Ytterligere eksempler på makrolider som akkumuleres i spesifikke klasser av celler kan
 fines hos: Pascual A. et al., Clin. Microbiol. Infect. 2001, 7, 65-69. (Uptake and
 intracellular activity of ketolide HMR 3647 in human fagocytic and non-fagocytic
 cells); Hand W. L. et al., Int. J. Antimicrob. Agents, 2001, 18, 419-425. (Characteristics
 20 and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorfonuclear leukocytes); Amsden G. W., Int. J. Antimicrob. Agents, 2001, 18, 11-15. (Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics); Johnson J. D. et al., J. Lab. Clin. Med. 1980, 95, 429-439. (Antibiotic uptake by alveolar macrofages); Wildfeuer A. et al., Antimicrob. Agents Chemother. 1996, 40, 75-79. (Uptake of azithromycin by various
 25 cells and its intracellular activity under in vivo conditions); Scoreaux B. et al., Poult. Sci. 1998, 77, 1510-1521. (Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in chicken fagocytes); Mtairag E. M. et al., J. Antimicrob. Chemother. 1994, 33, 523-536. (Investigation of dirithromycin and erythromycylamine uptake by human neutrofiles in vitro); Anderson R. et al., J. Antimicrob. Chemother.
 30 1988, 22, 923-933. (An in-vitro evaluation of the cellular uptake and intrafagocytic bioactivity of clarithromycin (A-56268, TE-031), a new macrolide antimicrobial agent); Tasaka Y. et al., Jpn. J. Antibiot. 1988, 41, 836-840. (Rokitamycin uptake by alveolar macrofages); Harf R. et al., J. Antimicrob. Chemother. 1988, 22, 135-140. (Spiramycin uptake by alveolar macrofages). US Provisional SN 60/394 671 og 60/394 670, begge
 35 av 8. juli 2002 beskriver forskjellige makrolidlinkerkomplekser som også kan benyttes innenfor foreliggende oppfinnelses kontekst.

- Videre kan nærværet av akkumuleringsegenskapen i immunsystemceller som rekrut-
teres til inflammasjonssetet, særlig fagocytiske celler, lett fastslås av fagfolk på
området ved å benytte en av de kjente analyser for dette formål. For eksempel kan man
5 benytte den prosedyre som i detalj er beskrevet av Olsen, K.M. et al., *Anitmicrob.*
Agents & Chemother. **1996**, *40*, 2582-2585. Kort sagt kan celler som skal testes, f.eks.
polymorfonukleære lymfocytter, oppnås fra veneblod hos friske frivillige ved Ficoll-
Hypaque-sentrifugering fulgt av 2% dekstran-sedimentering. Erytrocytter fjernes ved
osmotisk lysering og PMN evalueres ved trypan-blå-eksklusjon. Alternativt kan andre
10 cellefraksjoner separeres og testes på tilsvarende måte. Tritierte makrolidforbindelser
(f.eks. 10 µM) inkuberes med $2,5 \times 10^6$ celler i 120 minutter (37°C, 5% CO₂, 90% rela-
tiv fuktighet) og cellene fjernes deretter fra forbindelsesholdig supernatant ved senti-
fugering, f.eks. gjennom en silikonolje-parafinsjikt (86 vol-%: 14 vol-%). Mengden for-
bindelse bestemmes, f.eks. ved scintillasjonstelling, og en bedømmelse som signifikant
15 ligger over bakgrunnen indikerer akkumulering av makrolidet i cellene som testes, se
Bryskier et al., *Macrolides, Chemistry, Farmacology and Clinical Use*; Arnette
Blackwell: Paris, **1993** pp 375-386 , på side 381, kolonne 2, linje 3. Alternativt er for-
bindelsen ikke radiomerket, men mengden forbindelse kan bestemmes ved HPLC.
- 20 Andre analysemetoder som kan benyttes er beskrevet av Bryskier, A. J. et al.,
Macrolides, Chemistry, Farmacology and Clinical Use; Arnette Blackwell: Paris, **1993**
pp 375-386. Det skal særlig henvises til bestemmelsen av fagocytisk opptak på side
380-381 og til den spesielle beskrivelse hva angår opptak og lokalisering av makrolider
på sidene 381, 383 og 385 og tabellene på side 382 og 383.
- 25 Når V er en steroidsubenhet, har den fortrinnsvis formel X:

12



der

R^a og R^b uavhengig av hverandre er hydrogen eller halogen;

- 5 R^c er hydroksy, C_1 - C_{10} -alkoksy (fortrinnsvis metoksy), C_1 - C_{10} - alkyl, tiokarbamoyl, karbamoyl eller en valensbinding;

- R^d og R^e uavhengig av hverandre er hydrogen, OH, CH_3 eller C_1 - C_4 -alkoksy (fortrinnsvis metoksy eller n-propoksy) eller hver er en gruppe som danner en 1,3-
10 dioksolanring med den andre eller en valensbinding;

R^f er hydrogen, hydroksy, klor, eller =O som danner en ketogruppe med karbonatomet den er festet til;

- 15 R^j er hydrogen eller halogen;
og deres farmasøytisk akseptable salter og solvater.

- Alternativt er innenfor oppfinnelsens ramme er steroidsubenheter beskrevet i WO 94/14834, der de i stedet for gruppen $=CH-C(O)-R^c$ har gruppen $=CH-S(O)_n-R^c$ der
20 n er et helt tall fra og med 0 til og med 2, den henvises til WO 94/14834, særlig sidene 2-3.

- Mer spesielt er steroider som er brukbare som en kilde for steroidsubenheter uten begrensning korticosteroider (som glukokorticoider og mineralokorticoider) og
25 androgener. Ikke-begrensende eksempler på korticosteroider inkluderer kortisol, kortison, klobetasol, hydrokortison, fludrokortison, fludroksykortid, flumetason, flunisolid, fluokinolon,, fluokinonid, fluokortolon, fluormetolon, prednison,

prednisolon, 6-[REDACTED]netylprednisolon, triamkinolon, alklometason, beklometason, [REDACTED] metason, budesonid, deksametason, amkinonid, kortivazol, desonid, desoksimetason, diflukortolon, difluprednat, fluklorolon og diklorison, fluperiniden, flutikason, halkinonid, meprednison, metylprednisolon, parametason, prednazolin, prednyliden, 5 tiksocortol, triamkinolon, og syrederivater derav, f.eks. acetat, propionat, dipropionat, valerat, fosfat, isonikotinat, metasulfonbenzoat, tebutat og hemisuccinat.

V kan være en ikke-steroid, anti-inflammatorisk subenhet, dvs. en del et ikke-steroid, anti-inflammatorisk medikament (NSAID) inkludert de som inhiberer cyklooksygenase, 10 enzymet som er ansvarlig for biosyntesen av prostaglandiner og visse autokoid-inhibitorer, inkludert inhibitorer av de forskjellige isoenzymer av cyklooksygenase (inkludert, men ikke begrenset til, cyklooksygenase-1 og -2), og som inhibitorer av både cyklooksygenase og lipoksygenase relaterer til ikke-steroid, anti-inflammatorisk medikament (NSAID), som de kommersielt tilgjengelige NSAID'er aceklofenac, 15 acemetacin, acetaminofen, acetaminosalol, acetylsalicylsyre, acetyl-salicylsyre-2-amino-4-pikolinsyre, 5-aminoacetylsalicylsyre, alklofenac, aminoprofen, amfenac, ampyron, ampiroksicam, anileridin, bendazac, benoksaprofen, bermoprofen, [REDACTED] pisa-bolol, bromfenac, 5-bromosalicylsyreacetat, bromosaligenin, buklokssyre, butibufen, karprofen, celecoksib, kromoglykat, kinmetacin, klindanac, klopircacil, natriumdiklofenac, 20 diflunisal, ditazol, droksicam, enfenaminsyre, etodolac, etofenamat, felbinac, fenbufen, fenklozinsyre, fendosal, fenoprofen, fentiazac, fepradinol, flufenac, flufenaminsyre, fluniksin, flunoksaprofen, flurbiprofen, glutametacin, glykolsalicylsyre, ibufenac, ibuprofen, ibuproksam, indometacin, indoprofen, isofezolac, isoksepac, isoksikam, ketoprofen, ketorolac, lornoksicam, loksoprofen, meklofenaminsyre, mefenaminsyre, 25 meloksicam, mesalamin, metiazinsyre, mofezolac, montelukast, nabumeton, naproksen, nifluminsyre, nimesulid, olsalazin, oksaceprol, oksaprozin, oksyfenbutazon, paracetamol, parsalimid, perisoksal, fenylacetylsalicylat, fenylbutazon, fenylsalicylat, pyrazolac, piroksicam, pirprofen, pranoprofen, protizininsyre, reserveratol, salacetamid, salicylamid, salicylamid-O-acetylsyre, salicylsvovelsyre, salicin, salicylamid, salsalat, 30 sulindac, suprofen, suksibutazon, tamoksifen, tenoksicam, tiaprofensyre, tiaramid, tiklopridin, tinoridin, tolfenaminsyre, tolmetin, tropesin, xenbucin, ximoprofen, zalto-profen, zomepirac, tomoksiprol, zafirlukast og cyklosporin.

Ytterligere NSAID-genera og spesielle NSAID-forbindelser er beskrevet i US 35 6 297 260 (særlig i de generiske formler i patentets krav 1 og den spesifikke liste av NSAID'er som inneholdes der og i krav 3, og tiazulidin-NSAID'er som beskrevet i WO 01/87890.

Foretrukne NSAID'er er acetylsalicylsyre, indometacin, naproksen, ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, sulindac, etodolac, ketorolac, suprofen, fluniksin, natrium-diclofenac og tolmetin.

5

Uthevede bindinger i formlene som finnes her angir bindinger som ligger over papirplanet; strek-trukne bindinger angir bindinger under papirplanet, mens stiple bindinger representerer en binding som kan være enten under eller over papirplanet. Parallelle full-trukne og stiplede linjer representerer enten en enkelt- eller en dobbelt-
10 binding. Hvis ikke annet uttrykkelig er sagt, har de følgende uttrykk, de følgende betydninger:

"Alkyl" betyr en rett eller forgrenet, mettet monovalent hydrokarbonrest med 1 til 10 karbonatomer og fortrinnsvis 1 til 6 karbonatomer. De foretrukne rettkjedede eller
15 forgrenede alkyl er inkluderer metyl, etyl, propyl, *iso*-propyl, butyl, *sec*-butyl og *tert*-butyl. Metyl er mest foretrukket. Den foretrukne definisjon av alkyl gjelder også grupper der alkyl er en bestanddel som alkoksy.

"Alkenyl" betyr en rett eller forgrenet, monovalent karbonrest med 2 til 10, fortrinnsvis
20 2 til 6 karbonatomer som har minst en dobbelt karbon-karbon-binding. Etenyl, propenyl, butenyl og cykloheksenyl er foretrukne.

"Alkynyl" betyr en rett eller forgrenet, monovalent hydrokarbonrest med en rett eller forgrenet kjede med 2 til 10, fortrinnsvis 2 til 6 karbonatomer og inneholdende minst 1
25 og fortrinnsvis ikke mer enn 3 trippel-karbon-karbonbindinger. Etynyl, propynyl og butynyl er foretrukket.

"Cykloalkyl" betyr en cyklisk gruppe med 3 til 8 karbonatomer med en enkelt ring, eventuelt fusert til en aryl- eller heteroarylgruppe. Foretrukne cykloalkyl er cyklo-
30 pentyl og cykloheksyl.

"Heterocyklisk" betyr en mettet eller en umettet gruppe med en enkelt eller flere ringer med fra 1 til 10 karbonatomer og fra 1 til 4 heteroatomer valgt blant nitrogen, svovel eller oksygen, der i et kondensert ringsystem den andre ring eller de andre ringer kan
35 være aryl eller heteroaryl.

“Aminosyre” henviser til en hvilken som helst forbindelse inneholdende både en amino-gruppe og en karboksylsyregruppe. Aminogruppen kan opptre i en posisjon ved siden av karboksylfunksjonen som i  aminosyrer, eller kan være lokalisert i molekylet.

Aminosyren kan også inneholde ytterligere funksjonelle grupper som amino, tio,
 5 karboksyl, karboksamid, imidazol, osv. Aminosyren kan være syntetisk eller naturlig forekommende eller en modifisert, naturlig forekommende aminosyre som norvalin eller norleucin.

Symbolet **K** benyttes noen ganger for å henvise til delen av L-gruppen som er forbundet
 10 med **M**, eller til **V** etter hvert som konteksten krever.

Ved fremstillingen av forbindelsene representert ved strukturen **I**, med spesifiserte, farmakologiske aktivitet, blir disse nye forbindelser fremstilt som mellomprodukter ved fremstillingen av farmakologisk aktive forbindelser. Foreliggende oppfinnelse angår
 15 også slike mellomprodukter.

Oppfinnelsen omfatter også farmasøytisk akseptable salter av de her beskrevne forbindelser. Farmasøytisk egnede salter av forbindelsene ifølge oppfinnelsen inkluderer salter med uorganiske syrer (som salt-, hydrobrom-, fosfor-, metafosfor-, salpeter- eller
 20 svovelsyre) eller organiske syrer (som vin-, eddik-, metansulfon-, trifluoreddik-, sitron-, malein-, melke-, fumar-, benzo-, rav-, metansulfon-, oksal- eller p-toluensulfonsyre).

Oppfinnelsen omfatter også solvater og fortrinnsvis hydrater, av forbindelsene med formel **I** eller deres salter.

25 Forbindelsene med formel **I** har ett eller flere chirale sentra og, avhengig av arten av de individuelle substituenten, kan de også ha geometriske isomerer. Isomerer som skiller seg når det gjelder arrangementet av atomene i rommet kalles ”stereoisomerer”. Stereoisomerer som ikke er speilbilder av hverandre angis som ”diastereoisomerer” og de som er speilbilder av hverandre som ikke kan legges på hverandre ”enantiomerer”. Når en
 30 forbindelse har et chiralt senter, er et par av enantiomerer mulige. En enantiomer kan karakteriseres ved den absolutte konfigurasjon av sitt asymmetriske senter og beskrives ved R- og S-sekvenseringsreglene til Cahn og Prelog, eller ved den måte på hvilken molekylet dreier planet for polarisert lys og angis som dekstroroterende eller levoroterende (dvs. som (+)- henholdsvis (-)-isomerer). En chiral forbindelse kan eksistere
 35 som enten en individuell enantiomer eller som en blanding av enantiomerer. En blanding inneholdende like andeler av enantiomerene kalles en ”racemisk blanding”.

Foreliggende oppfinnelse omfatter alle individuelle isomerer av forbindelsene med formel I. Beskrivelsen eller navngivningen av en spesiell forbindelse i beskrivelsen og de foreliggende krav er ment å inkludere både individuelle enantiomerer og blandinger, racemiske eller andre, derav. Metoder for bestemmelse av stereokjemien og oppløs-
 5 ningen av stereoisomerer er velkjente i teknikken.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også stereoisomerer av syn-anti-typen, slik man møter dem når en oksim- eller en tilsvarende gruppe er til stede. Gruppen med den høyeste Cahn Ingold Prelog-prioritet festet til et av de terminale dobbelt-bundne atomer
 10 av oksimet, sammenlignes med oksimets hydroksylgruppe. Stereoisomerer angis som Z (zusammen = sammen) eller Syn hvis oksimhydroksylet ligger på samme side av referanseplanet som går gjennom C=N-dobbelbindingen som gruppen med høyest prioritet; den andre stereoisomer angis som E (entgegen = motsatt) eller Anti.

15 En "farmasøytisk akseptabel eksipient" eller tilsvarende betyr en eksipient som er brukbar ved fremstilling av et farmasøytisk preparat og som er generelt sikkert, ikke toksisk og hverken biologisk eller på annen måte uønsket, og inkluderer en eksipient som er akseptabel for veterinæranvendelse og for farmasøytisk humananvendelse. En "farmasøytisk akseptabel eksipient" slik uttrykket benyttes i foreliggende søknad
 20 inkluderer både en og mer enn en slik eksipient.

"Behandling" eller tilsvarende av en tilstand, lidelse eller sykdom inkluderer:

- (1) forebyggelse eller forsinkelse av opptreden av minst et klinisk symptom på en
 25 tilstand, lidelse eller sykdom som utvikler seg i et pattedyr som kan være påvirket av eller predisponert for en slik tilstand, lidelse eller sykdom, men som ennå ikke erfarer eller viser kliniske eller subkliniske symptomer,
- (2) inhibering av tilstanden, lidelsen eller sykdommen, dvs. å stanse eller redusere
 30 utviklingen av sykdommen eller minst et klinisk eller subklinisk symptom på den, eller
- (3) lindring av sykdommen, dvs. forårsake regresjon av tilstanden, lidelsen eller sykdommen eller minst ett av de kliniske eller subkliniske symptomer på den.

35

Fordelen hos et individ som er under behandling er enten statistisk signifikant eller i det minste følbart for pasienten eller registrerbart for legen.

En "terapeutisk effektiv mengde" betyr den mengde av en forbindelse som, administrert til et pattedyr for behandling av en tilstand, lidelse eller en sykdom, er tilstrekkelig til å bevirke slik behandling (slik ordet er definert ovenfor). Den "terapeutisk effektive
 5 mengde" vil variere avhengig av forbindelse, sykdommens alvor og alder, vekt, fysisk tilstand og respons hos pattedyret som behandles.

De klassiske symptomet på akutt inflammasjon er rødhet, forhøyet temperatur, opphovning, smerte i det påvirkede området og tap av funksjon for det påvirkede organ.

10

Symptomer og tegn på inflammasjon forbundet med spesifikke tilstand inkluderer:

- rhematoid artritt - smerte, svelling, varme og ømhet i det involverte ledd; generell og morgenstivhet;
- insulin-avhengig diabetes mellitus - insulitt; denne tilstand kan føre til en
 15 varietet av komplikasjon med en inflammatorisk komponent, inkludert: retinopati, neuropati, nefropati; koronar arteriesykdom, perifer vaskulær sykdom og cerebrovaskulær sykdom;
- autoimmun thyroiditt - svakhet, konstipasjon, kortpustethet, hovent ansikt, hender og føtter, perifer ødem, bradykardia;
- 20 ■ multippelsklerose - spastisitet, uklart syn, vertigo, lemsvakhet, parestesi;
- uveoretinitt - redusert nattsyn, tap av perifert syn;
- lupus erytematose – leddsmerte, utslett, fotosensitivitet, feber, muskelsmerte, hovne hender og føtter, unormal urinanalyse (hematuri, cylinduri, proteinuri), glomerulonefritt, kognitiv dysfunksjon, kartrombose, perikarditt;
- 25 ■ skleroderma – Raynauds sykdom; opphovning av hender, armer, ben og ansikt; hudfortykning; smerte, opphovning og stivhet i fingre og knær, gastrointestinal dysfunksjon, restriktiv lungesykdom; perikarditt; renalsvikt;
- andre artrittiske tilstander med en inflammatorisk komponent som reumatoid spondylitt, osteoartritt, septisk artritt og polyartritt – feber, smerte, opphovning
 30 og svelling, ømhet;
- andre inflammatoriske hjernelidelser som meningitt, Alzheimers sykdom, AIDS dementia encefalitt – fotofobi, kognitiv dysfunksjon, hukommelsestap;
- andre inflammatoriske øye-inflammasjoner som retinitt – redusert visuell akuitet;

- inflammatoriske hudlidelser som eksem og dermatitt (f.eks. atopisk eller kontaktdermatitt), psoriasis, brannsåar induisert ved UV-stråling som solstråler og tilsvarende UV-kilder – erytem, smerte, flassing eller skalldannelse, opphovning og ømhet;
- 5 ■ inflammatorisk tarmsykdom som Crohns sykdom, ulcerativ colitt – smerte, diaré, konstipasjon, rektalblødning, feber, artritt;
- astma – kortpustethet, hvesing;
- andre allergiske lidelser som allergisk rhinitt – nysing, kløe, rennende nese;
- tilstander forbundet med akutt trauma som cerebralskade etter slag – sensorisk tap, motortap, kognitivt tap;
- 10 ■ hjertevevskade på grunn av myokardialt ischemi – smerte, kortpustethet;
- lungeskade slik det inntreffer ved adult respiratorisk distress-syndrom – kortpustethet, hyperventilering, redusert oksygenering, pulmonære infiltrater;
- inflammasjon i forbindelse med infeksjon som sepsis, septisk sjokk, toksisk sjokksyndrom – feber, respiratorisk svikt, tachykardia, hypotensjon, leukocytose;
- 15 ■ andre inflammatoriske tilstander forbundet med spesielle organer eller vev, som nefritt (f.eks. glomerulonefritt) – oliguri, abnormal urinanalyse;
- betent blindtarm – feber, smerte, ømhet, leukocytose;
- 20 gikt – smerte, ømhet, svelling og erytem i de involverte ledd, øket serum- og/eller urinær urinsyre;
- betent galleblære – abdominal smerte og ømhet, feber, kvalme, leukocytose;
- kronisk obstruktiv pulmonær sykdom – kortpustethet, hvesing;
- kongestiv hjertesvik – kortpustethet, ralling, perifer ødem;
- 25 type II diabetes – endeorgankomplikasjoner inkludert kardiovaskulær, okulær, renal og perifer vaskulær sykdom;
- lunge fibrose – hyperventilering, kortpustethet, redusert oksygenering;
- vaskulær sykdom som aterosklerose og restenose – smerte, følelsetap, redusert puls, funksjonstap; og
- 30 alloimmunitet som fører til transplantreksjon – smerte, ømhet, feber.

Subkliniske symptomer inkluderer diagnostiske markører for inflammasjon hvis opptreden kan komme foran manifestasjon av kliniske symptomer. En klasse subkliniske symptomer er immunologiske symptomer som invasjon eller akkumulering i et organ eller vev av proinflammatoriske lymfoidceller eller nærværet lokalt eller
 5 perifert av aktiverte, pro-inflammatoriske lymfoidceller som gjenkjenner et patogen eller et antigen som er spesifikt for organet eller vevet. Aktivering av lymfoidceller kan måles ved i og for seg kjente teknikker.

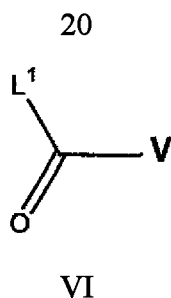
“Avlevering” av en terapeutisk effektiv mengde av en aktiv bestanddel til en spesiell
 10 lokasjon hos en vert betyr å forårsake en terapeutisk effektiv blodkonsentrasjon av den aktive bestanddel ved den spesielle lokasjon. Dette kan oppnås f.eks. ved lokal eller ved systemisk administrering av den aktive bestanddel til verten.

Generelt kan forbindelsene med formel I oppnås på følgende måte: En ende av kjeden
 15 forbindes først til makrolidet og så forbindes den andre ende av kjeden til V; eller en ende av kjeden bindes først til V og den andre ende så til makrolidet; eller til slutt kan en del av kjeden forbindes til makrolidet, mens den andre del av kjeden forbindes til V og så forbindes endene av kjededelene kjemisk for å danne kjeden L.

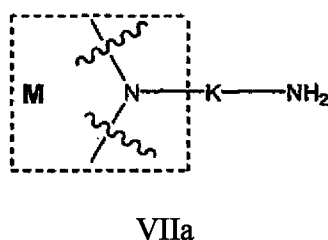
20 Det vil være klart for fagmannen på området at det kan være ønskelig å benytte beskyttede derivater av mellomproduktene som benyttes ved fremstilling av forbindelsene med formel I. Beskyttelsen og debeskyttelsen av funksjonelle grupper kan gjennomføres på i og for seg kjent måte. Hydroksyl- eller aminogrupper kan beskyttes med en hvilken som helst hydroksyl- eller aminobeskyttende gruppe, f.eks. som beskrevet av Green,
 25 T.W.; Wuts, P.G.M., *Protective Groups in Organic Synthesis*: John Wiley and Sons, New York, 1999. De aminobeskyttende grupper kan fjernes ved konvensjonelle teknikker. For eksempel kan acylgrupper som alkanoyl-, alkoksykarbonyl- og aroylgrupper fjernes ved solvolyse, f.eks. ved hydrolyse under sure eller basiske betingelser. Arylmetoksykarbonylgrupper (som benzyloksykarbonyl) kan spaltes ved
 30 hydrogenolyse i nærvær av en katalysator som palladium-på-kull.

Mer spesielt kan forbindelser innen formel I fremstilles ved de følgende prosesser:

a) Forbindelser med formel I, der X^2 er $-NHC(O)-$, kan oppnås ved å omsette en
 35 forbindelse med formel VI:



5 der L¹ betyr en avspaltbar gruppe (som hydroksy), med en fri aminogruppe av et makrolid representert ved formel VIIa:

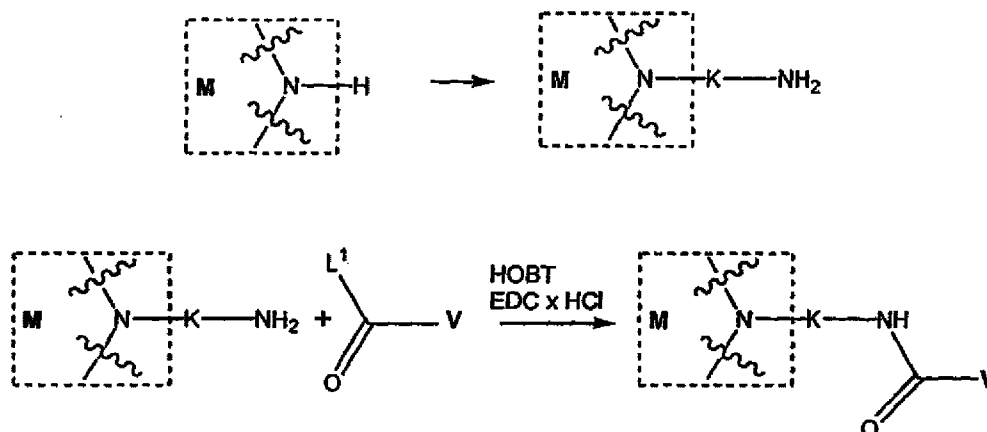


10 der K er delen av det forbindende molekyl L festet til makrolidsubenheten.

Reaksjonen gjennomføres generelt med syrederivater som har evnen til å aktivere karboksylsyregruppen som halogenider, blandede anhydrider og særlig karbodiimider som (3-dimetylaminopropyl)-3-etyl-karbodiimid (EDC) og benzotriazoler. Reaksjonen skjer i nærvær av en base, f.eks. en organisk base som trietylamin, ved romtemperatur under en inert atmosfære, som argon eller nitrogen. Reaksjonen kan kreve flere timer og opptil flere dager for å bli ferdig.

20 Når f.eks. L er $-K-NH_2$, kan forbindelsen med formel I dannes ved derivatisering av en $>NH$ -gruppe på makrolidringen til en $>N-K-NH_2$ -gruppe og så å omsette det derivatiserte makrolid med en forbindelse med formel VI som vist nedenfor:

21



For eksempel kan denne prosess gjennomføres når $>\text{NH}$ -gruppen i makrolidsubenheten av formel II er bundet til C/3'- eller N/9a-posisjonen.

5

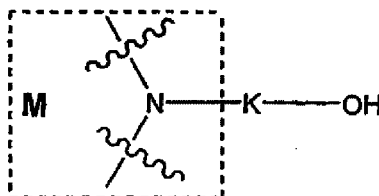
Forbindelsen som representeres ved formel VI er kommersielt tilgjengelig eller kan oppnås fra subenheten V ved i og for seg kjente metoder.

10 Fremstilling av utgangsmakrolidet med formel VIIa er beskrevet i PCT-HR 02/0001 det skal også henvises til US 4 474 768 samt til Bright, G.M. et al. i *J. Antibiot.* **1988**, 41, 1029-1047.

b) Forbindelser som representeres ved formel I, der X^2 er $-\text{OC}(\text{O})-$, kan oppnås ved å omsette en forbindelse med formel VI:

15

og den frie hydroksylgruppe av et makrolid representert ved formel VIIb:



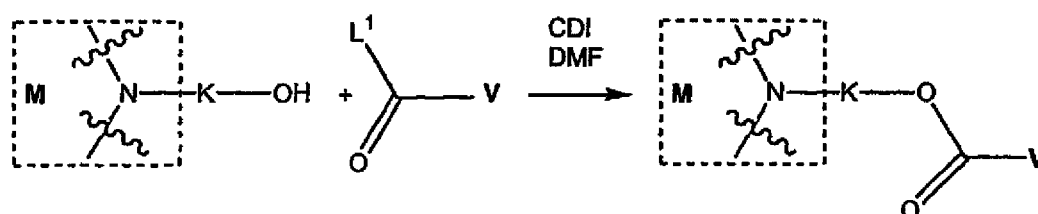
20 Reaksjonen gjennomføres generelt med syrederivater som har evnen til å aktivere karboksylsyregruppen, f.eks. halogenider som etylendiklorid (EDC), blandede anhydrider, særlig karbodiimider. Reaksjonen gjennomføres typisk ved romtemperatur under en inert atmosfære, f.eks. argon eller nitrogen. Reaksjonen kan kreve flere timer til flere dager for å bli ferdig.

25

Når f.eks. L er $-K-O-$, kan forbindelsen med formel I dannes ved

- (1) derivatisering av en $>NH$ -gruppe på et makrolid til en $>N-K-OH$ -gruppe og
- (2) omsetning av det derivatiserte makrolid med en forbindelse representert ved formel VI som vist nedenfor:

5



Bindingsgruppen $-K-OH$ kan være festet til det sekundære nitrogenatom av makrolidet som følger. Makrolidet omsettes med et alkenoylderivat som $CH_2=CH(CH_2)_{m-2}-C(O)O-$ alkyl (f.eks. metylakrylat). Estergruppen (dvs. $-C(O)O$ -alkyl) blir så redusert, f.eks. med et metallhydrid som $LiAlH_4$ i et vannfritt, organisk oppløsningsmiddel, for derved å gi makrolidet som har bindingsgruppen $-K-OH$ (dvs. $M-K-OH$). Reduksjonen gjennomføres karakteristisk ved lav temperatur og fortrinnsvis ved $0^\circ C$ eller lavere.

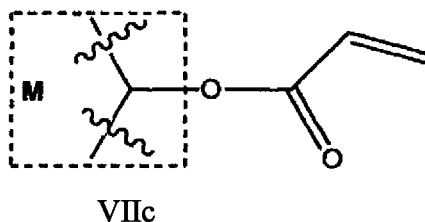
- 15 Denne prosess kan f.eks. også gjennomføres når $>NH$ -gruppen er festet til C/3'- eller N/9a-posisjonen av makrolidsubenhetene representert ved formel II.

Utgangsmakrolidet med formel VIIb er kjente forbindelser eller kan oppnås i henhold til prosedyrer som er beskrevet for analoge forbindelser, f.eks. som beskrevet av Costa, A.M. et al. i *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 3371-3375.

20

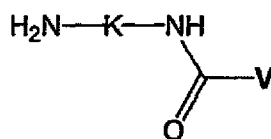
- c) Forbindelser representert ved formel I, der X^1 er $-OC(O)-$, Q er $-NH-$ og X^2 er $-NHC(O)-$, kan fremstilles ved å omsette et makrolid representert ved formel VIIc:

25



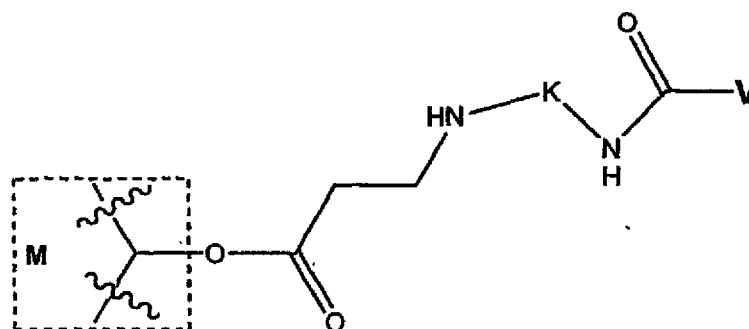
og en forbindelse representert ved formel VIIb:

23



VIb

5 for å oppnå



For eksempel kan denne prosess gjennomføres når OH-gruppen er festet ved C/6- eller C/4''-posisjonen av makrolidsubenheten representert ved formel II.

10

Makrolidet representert ved formel VIIc kan dannes ved omsetning av det tilsvarende halogenalkanoylchlorid på den frie OH-gruppe av makrolidet.

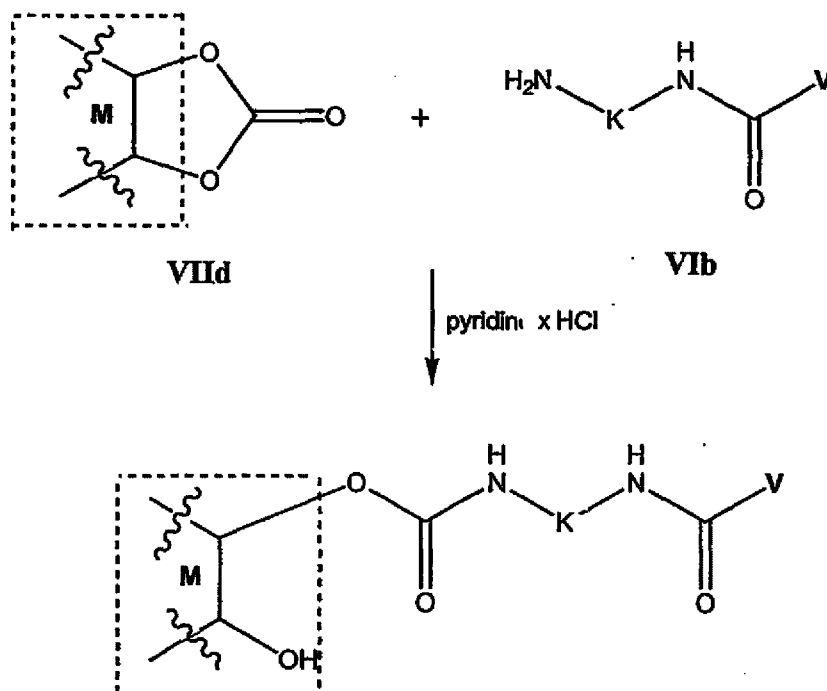
15

Forbindelsen representert ved formel VIb kan oppnås ved omsetning av et egnet amin (med bindingsgruppen -K-NH₂) med en forbindelse med formel VI.

- d) Forbindelser med formel I, der X¹ er -OC(O)NH- og X² er -NHC(O)- kan fremstilles ved å omsette et makrolid representert ved formel VIId og en forbindelse med formel VIb som vist nedenfor:

20

24



Denne prosess kan gjennomføres når to frie OH-grupper er festet, f.eks. ved C/11- og C/12-posisjon på makrolidsubheten representert ved formel II.

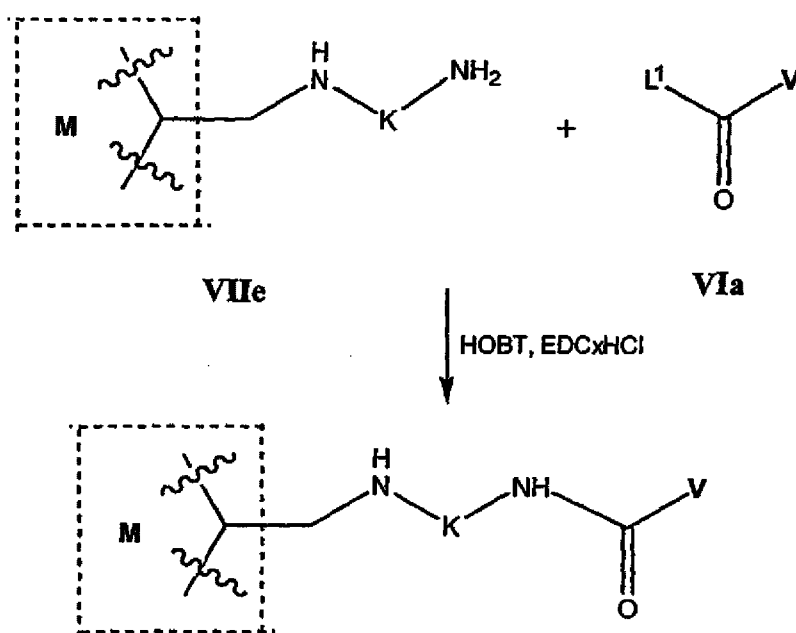
5

Makrolidreaktanten som representert ved formel VIIId kan dannes ved omsetning av etylkarbonatet på makrolidsubenheten med de to nabostilte hydroksysubstituenten;

- e) Forbindelser fremstilt ved formel I, der X^1 er $-\text{CH}_2-$, Q er $-\text{NH}-$ og X^2 er $-\text{NHC(O)}-$, kan fremstilles ved omsetning av et makrolid representert ved formel VIIe og en forbindelse med formel Via som vist nedenfor:

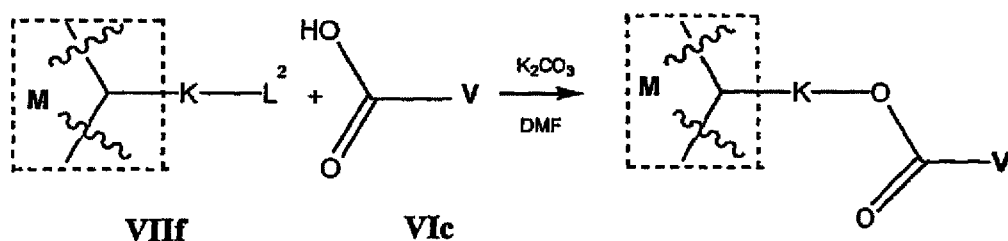
10

25



For eksempel kan denne prosess gjennomføres når OH-gruppen er bundet til C/4"-posisjonen av makrolidsubenheten representert ved formel II.

- 5 Reaktantmakrolidet som representeres ved formel VIIe kan dannes ved oksydering av det tilsvarende makrolid med en hydroksygruppe for å oppnå en substituent, ($>\text{C}=\text{O}$), konvertering til en epoksygruppe (C^{O}_2), og spalting av epoksygruppen med en egnet reaktant som etylendiamin.
- 10 f) Forbindelser med formel I kan fremstilles ved omsetning av et makrolid representert ved formel VIIf med en avspaltbar gruppe L^2 (som Br) og en subenhet V representert ved formel VIc som vist nedenfor:

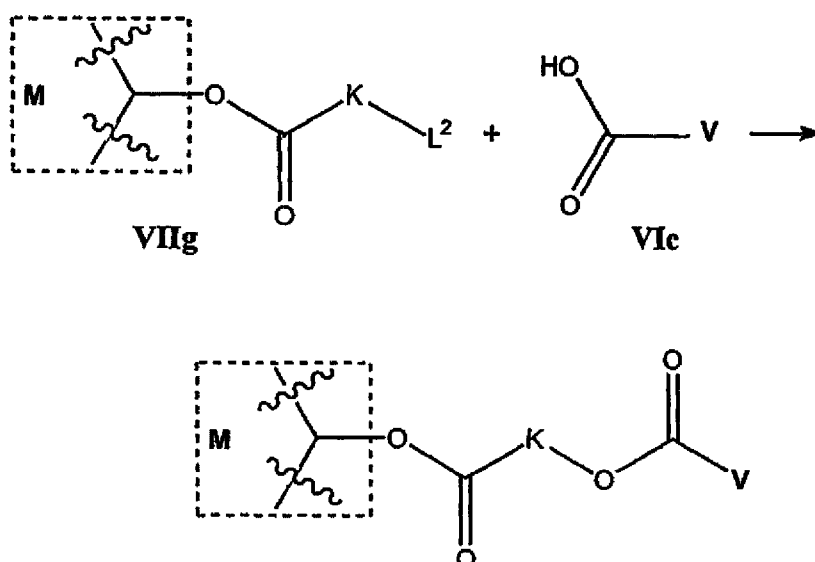


15

Utgangsmakrolidet med formel VIIf kan f.eks. fremstilles ved spalting av sukkergruppen bundet til C/3-posisjon på makrolidsubenheten representert ved formel II og så omsetning av makrolidet med en reagens med formel $\text{L}^3\text{-K-L}^2$, der L^2 og L^3 er avspaltbare grupper.

- g) Forbindelser med formel I kan fremstilles ved omsetning av et makrolid representert ved formel VIIg med en avspaltbar gruppe L^2 , f.eks. Br, og en subenhet V med formel VIc som vist nedenfor:

5



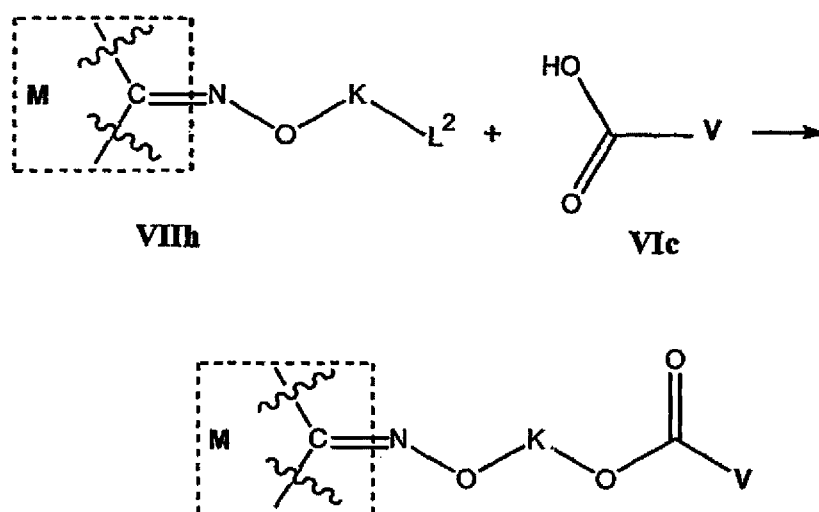
Utgangsmakrolidet med formel VIIg kan fremstilles ved omsetning av et makrolid med en fri OH-gruppe, f.eks. på C/2'-posisjonen av makrolidsubenheten representert ved formel II, med en reagens med formel $L^3\text{-K-L}^2$, der L^2 og L^3 er avspaltbare grupper.

10

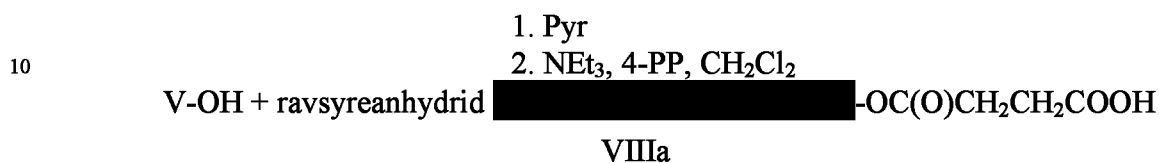
- h) Forbindelser representert ved formel I kan også fremstilles ved omsetning av et makrolid representert ved formel VIIh med en avspaltbar gruppe L^2 , f.eks. Br, og en subenhet med formel VIc som vist nedenfor:

15

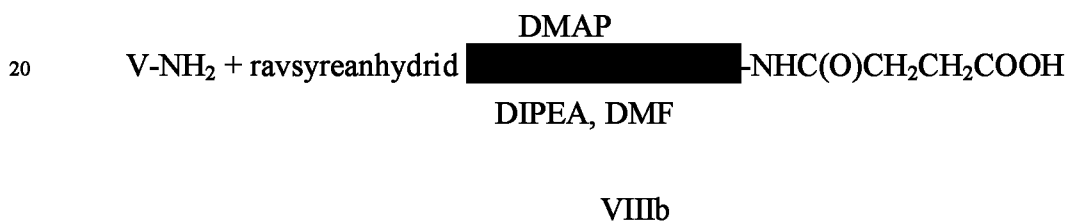
27



- i) Forbindelser representert ved formel I kan også fremstilles ved omsetning av en subenhet V representert ved formel VIIIa, fremstilt fra subenhet V med fri hydroksylgruppe (Huang C.M. et al., Chem.&Biol. 2000,7,453-461; Hess S. et al., Bioorg.&Med. Chem. 2001, 9, 1279-1291) og makrolid representert ved formel VIIa som vist nedenfor:



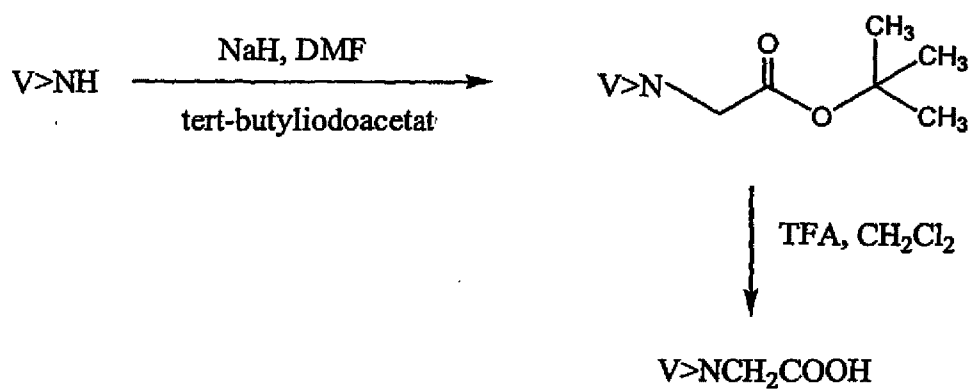
- j) Forbindelser representert ved formel I kan også fremstilles ved omsetning av en subenhet V representert ved formel VIIIb (Pandori M.W. et al., Chem.&Biol. 2002, 9, 567-573) eller VIIIc fremstilt fra subenhet V med fri aminogruppe (Hess S. et al., Bioorg.&Med. Chem., 2001, 9, 1279-1291) og et makrolid representert ved formel VIIa som vist nedenfor:



eller

25

28



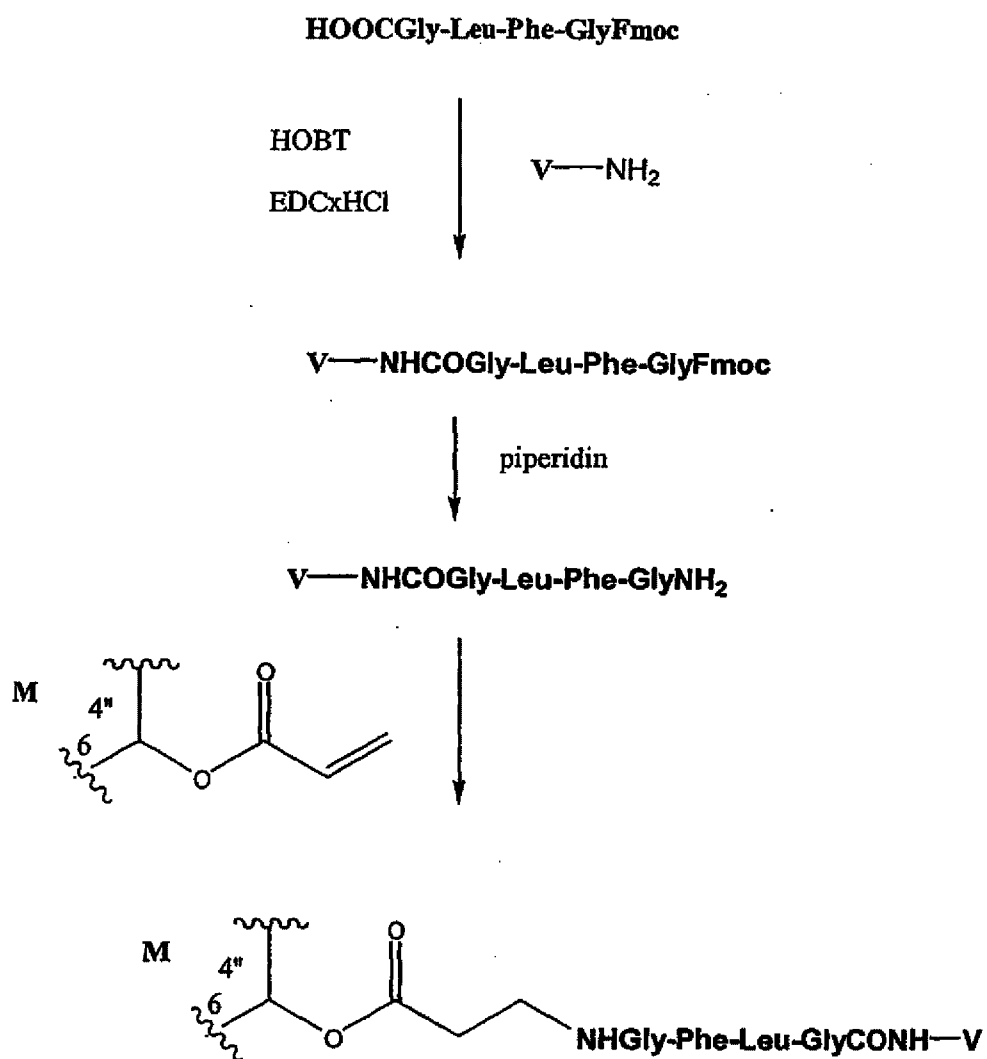
VIIIc

De følgende eksempler illustrerer fremstilling av forbindelsen med formel I.

5

En syntesevei for forbindelsen av formel I (V er en steroid eller ikke-steroidal anti-inflammatorisk subenhet med fri aminogruppe) når L er peptidlinker er illustrert ved det neste eksempel:

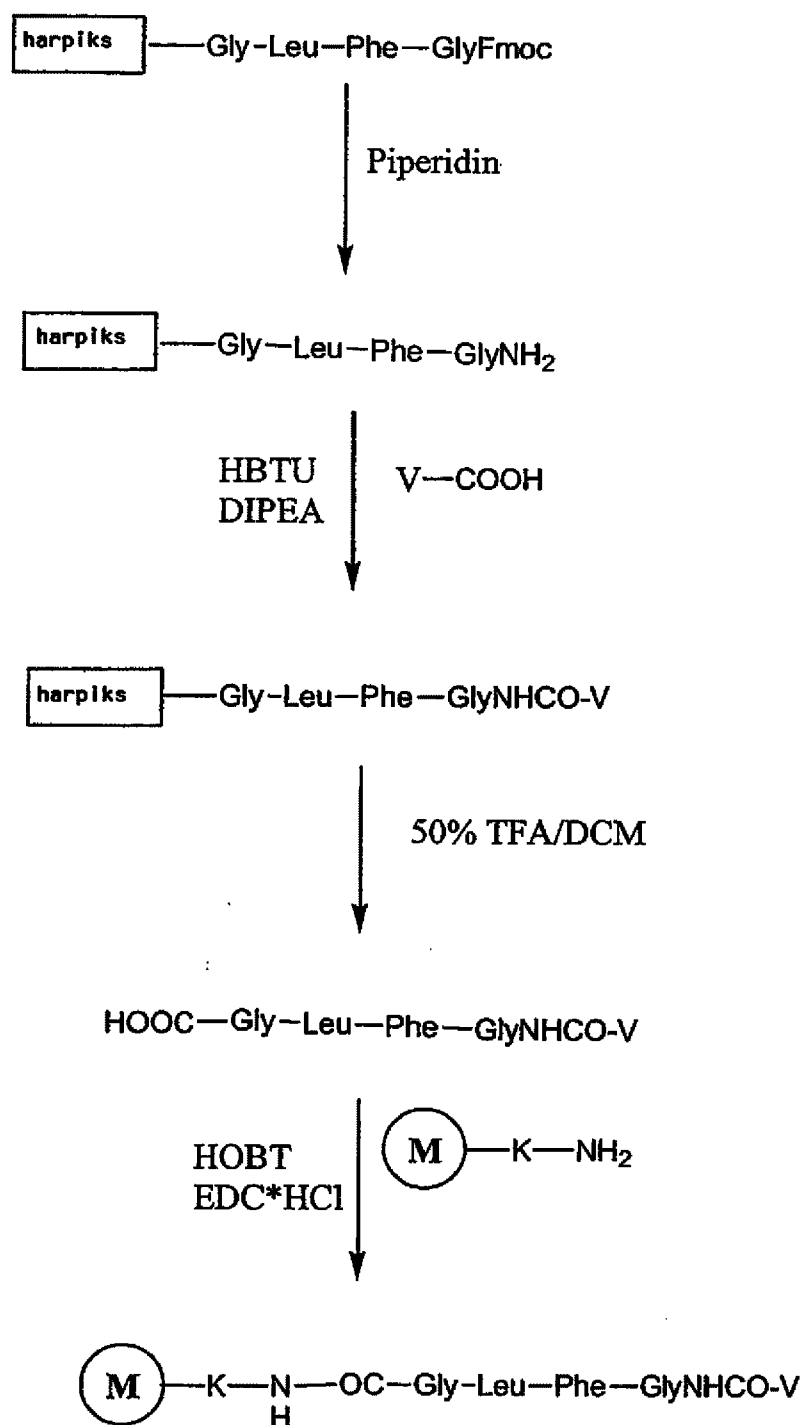
29



En syntesevei for forbindelsen med formel I (V er en steroid eller ikke-steroidal anti-inflammatorisk subenhet med fri karboksylgruppe) når L er peptidlinker er illustrert ved

5 det neste eksempel:

30



Saltene av forbindelsene som representeres ved formel I kan fremstilles ved å anvende generelt kjent prosedyrer som f.eks. omsetning av forbindelsene med formel I med en
 5 tilsvarende base eller syre i et egnet oppløsningsmiddel eller en blanding av slike, f.eks. etere som dietyleter eller alkoholer som etanol, propanol eller isopropanol.

Et ytterligere trekk ved oppfinnelsen angår anvendelsen av forbindelser med formel I for fremstilling av et medikament for behandling av inflammatoriske sykdommer, lidelser eller tilstander som karakteriseres ved eller assosieres med en uønsket, inflammatorisk immunrespons, særlig alle sykdommer og tilstander som induseres av eller assosieres med en eksessiv sekresjon av TNF- α eller IL-1.

En terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen kan bestemmes på i og for seg kjent måte. Fordi forbindelsen ifølge oppfinnelsen mer effektivt avgis til det ønskede setet enn det tilsvarende medikament alene, kan en mindre mengde av forbindelsen administreres på molar basis enn av det anti-inflammatoriske medikamentet, mens man samtidig oppnår den samme terapeutiske effekt. Fordi den aktive bestanddel ifølge oppfinnelsen etter internalisering av målet ikke lenger vil være i kontakt med annet vev, vil administreringen resultere i færre bivirkninger, noe som vil tillate at den maksimalt tolererbare, anti-inflammatoriske mengde kan økes. Således er tabellen nedenfor kun en rettesnor. En terapeutisk effektiv terskelmengde av forbindelsen, et farmasøytisk akseptabelt salt derav, et solvat derav, er generelt lik eller mindre enn en terapeutisk effektiv mengde av det anti-inflammatoriske medikamentet på molar basis. Generelle og foretrukne effektive mengder av forbindelsen, et farmasøytisk salt derav, et solvat derav eller et prodrug derav, er vist i tabellen:

20

	Mengde forbindelse, farmasøytisk salt derav solvat derav	
	mg/kg kroppsvekt/dag av medikament (ved administrering alene)	μ mol/kg kroppsvekt/dag for hybridet eller medikamentet
Bred	fra rundt 0,001 til rundt 1000	fra rundt 0,004 til rundt 4000
Foretrukket	fra rundt 0,01 til rundt 100	fra rundt 0,04 til rundt 400
Mer foretrukket	fra rundt 1 til rundt 100	fra rundt 4 til rundt 400
Mest foretrukket	fra rundt 3 til rundt 30	fra rundt 12 til rundt 120

Således ligger f.eks. det foretrukne doseringsområdet for indometacin ved 50 til 200 mg/dag, og med noe som tilsvarer området 140 til 560 μ mol/dag. Det samme mol-baserte området, 140 til 560 μ mol av en hybridforbindelse ifølge oppfinnelsen, vil være utgangspunktet for å bestemme det foretrukne doseringsområdet. En tilpasning av denne tilnærmingen ligger godt innenfor fagmannens kunnskapsområde.

25

Videre angår foreliggende oppfinnelse farmasøytiske preparater som inneholder en effektiv dose av forbindelser ifølge oppfinnelsen så vel som farmasøytisk akseptable eksipienter som bærere eller fortynningsmidler.

- 5 Fremstillingen av de farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan inkludere blanding, granulering, tabletering og oppløsning av bestanddelene. Kjemiske bærere kan foreligge i fast eller flytende form. Faste bærere kan være laktose, sucrose, talkum, gelatin, agar, pektin, magnesiumstearat, fettsyrer, osv.. Flytende bærere kan være siruper, oljer som oliven-, solsikkefrø- eller soyabønneolje, vann eller fysiologisk
- 10 saltoppløsning. På samme måte kan bærere også inneholde en komponent for opprettholdt frigivning av den aktive bestanddel som glycerylmonostearat eller glyceryldistearat. Flere former for farmasøytiske preparater kan fremstilles. Hvis det benyttes en fast bærer, kan disse former inkludere tabletter, kapletter, faste gelatinøse kapsler, pulvere eller granuler, alt for oral administrering. Mengden av den faste bærer
- 15 kan variere, men vil hovedsakelig ligge i området 25 mg til 1 g. Hvis det benyttes en flytende bærer, kan formuleringen foreligge i form av en sirup, emulsjon, mykgelatinkapsler eller sterile, injiserbare væsker eller ikke-vandige, flytende suspensjoner.
- 20 Forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan administreres topisk eller systemisk, f.eks. oralt, parenteralt, perkutant, mucosalt som bucalt, intranasalt, intrarektalt og intravaginalt. "Parenteralt" betyr intravenøst, intramuskulært eller subkutant. De tilsvarende preparater av forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan benyttes profylaktisk så vel som terapeutisk (forebyggelse, forsinkelse, inhibering eller lindring) i forbindelse med diverse
- 25 lidelser (sykdommer eller andre patologiske, inflammatoriske tilstander) forårsaket av eller assosiert med en anormal eller uønsket (eksessiv, ikke-regulert eller dysregulert) inflammatorisk immunrespons som involverer produksjon av inflammatoriske cytokiner eller andre inflammasjonsmediatorer inkludert TNF- α og IL-1 β . De inkluderer autoimmune sykdommer som reumatoid artritt, insulinavhengig diabetes mellitus,
- 30 autoimmun thyroiditt, multippel sklerose, uveoretinitt, lupus erytematose, skleoderma, andre artrittiske tilstander med en inflammatorisk komponent som reumatoid spondylitt, osteoartritt, septisk artritt og polyartritt; andre inflammatoriske hjernelidelser som meningitt, Alzheimers sykdom, AIDS dementia encefalitt, andre inflammatoriske øye-inflammasjoner som retinitt; inflammatoriske hudlidelser som eksem, andre derma-
- 35 titter (f.eks. atopisk eller kontaktdermatitt), psoriasis, brannsåar induisert av UV-stråling (solstråler eller tilsvarende UV-kilder); inflammatorisk tarmsykdom som Crohns sykdom, ulcerativ colitt, astma; andre allergilidelser som allergisk rhinitt; tilstander

assosiert med akutt trauma som cerebralskade etter slag, hjertevevskade på grunn av myokardial ischemi, lungeskade som den som inntreffer ved adult respiratorisk distress-syndrom, inflammasjon i forbindelse med infeksjon som sepsis, septisk sjokk, toksisk sjokksyndrom, andre inflammatoriske tilstander assosiert med spesielle organer eller vev som nefritt (f.eks. glomerulonefritt), betent blindtarm, podagra, betent galleblære, kronisk obstruktiv pulmonær sykdom, kongestiv hjertesvikt, type-II-diabetes, lungefibrose, vaskulær sykdom som aterosklerose og restenose; og alloimmunitet som fører til transplantatavvisning.

- 10 Den biologiske aktivitet for forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble bestemt ved de følgende in vitro- og in vivo-forsøk:

1. Analyse av binding til human glukokortikoidreseptor

- Genet for [redacted]soformen av human glukokortikoidreseptor (EMBL Acc. Nr. M10901) kloneres ved revers polymerase-kjedereaksjon. Det totale RNA isoleres fra humane perifere blodlymfocytter i henhold til produsentens instruksjoner (Qiagen), transkriberes inn i cDNA med AMV revers transkriptase (Roche) ved 50°C i 45 minutter og genet multipliseres med spesifikke primere:

- 20 1) 5'ATATGGATCCCTGATGGACTCCAAAGAATCATTAAGTCC3'
og
2) 5'ATATCTCGAGGGCAGTCACTTTTGATGAAACAGAAG3'

- og pfx-polymerase (Invitrogen). PCR-betingelsene er: 94°C denaturering i 30 sekunder, 55°C annealing i 30 sekunder, 68°C i 3 minutter, med til sammen 36 cykler; sluttforlengelsestrinn ved 68°C i 7 minutter. Det oppnådde reaksjonsprodukt kloneres inn i XhoI/BamHI-setet av Bluescript KS-plasmid (Stratagene), underkastes sekvensering ved dideoksyfluorescensmetoden med M13- og M13rev-primere (Micosynth) og kloneres så inn i XhoI/BamHI-setet av pCDNA3.1 hygro(+)plasmid (Invitrogen Life Technologies). 1 x 10⁵ COS-1-celler såes på en 12 brønners plate (Falcon) i DMEM-medium (Invitrogen Life Technologies) med 10% FBS (Biowhitaker) og dyrkes til 70% konfluens ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂. Mediet fjernes og 1 µg DNA, 7 µl PLUS-reagens og 2 µl Lipofectamin (Life Technologies) i 500 µl DMEM tilsettes pr. brønn. Cellene inkuberes ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂ og etter 5 timer tilsettes det samme volum 20% FBS/DMEM. Etter 24 timer skiftes mediet fullstendig. 48 timer etter transfeksjon tilsettes testforbindelsene i forskjellige konsentrasjoner og 24 nM [³H]deksametason (Pharmacia) i DMEM-medium tilsettes. Cellene inkuberes i 90

minutter ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂, vaskes tre ganger med PBS-buffer (Sigma), avkjøles til 4°C (pH=7,4) og lyseres deretter i Tris-buffer (pH=8,0) (Sigma) med 0,2% SDS (Sigma). Etter tilsetning av UltimaGold XR (Packard) scintillasjonsvæske, avleses gjenværende radioaktivitet i en Tricarb (Packard) ■■■
 5 scintillasjonsteller.

2. Analyse av inhibering av muse-T-cellehybridoma-13-proliferering som et resultat av apoptoseinduksjon

I en 96-brønners plate gjennomføres triplikater av teststeroidfortynning i RPMI-medium (Instituted of Immunology, Zagreb) med 10% FBS. Til oppløsningene av forbindelsene
 10 settes 20 000 celler pr. brønn og det hele inkuberes over natten ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂, hvorefter 1 µCi [³H]thymidin (Pharmacia) tilsettes og blandingen inkuberes i ytterligere 3 timer. Cellene høstes ved å legge på et vakuum over GF/C-filter (Packard). Til hver brønn settes 30 µl Microscynt O-scintillasjonsvæske (Packard) og
 15 den innarbeidede radioaktivitet måles på en ■■■ scintillasjonsteller (Packard). Spesifisiteten for apoptose-induksjon på grunn av glukokortikoider bevises ved antagonisering av prolifereringsinhiberingen med mifepriston (Sigma).

3. Modell av lunge eosinofilia i mus

Balb/C-hannmus med en kroppsvekt på 20-25 g deles vilkårlig i grupper og sensitiseres med en i.p.-injeksjon av ovalbumin (OVA, Sigma) på dag 0 og dag 14. Den 20. dag underkastes musene en utfordringstest ved i.n. (intranasal) applikering av OVA (positiv kontroll eller testgruppe) eller PBS (negativ kontroll). 48 timer etter i.n.-applikering av OVA anestetiseres dyrene og lungene skylles med 1 ml PBS. Cellene separeres på en
 25 Cytospin 3-cytosentrifuge (Shandon). Cellene farges i Diff-Quick (Dade) og prosentandelen eosinofiler bestemmes ved differensialtelling av minst 100 celler.

Flutikason og beklometason benyttes som anti-inflammatoriske standardsubstanser.

30 Forbindelsene administreres daglig i.n. eller i.p. i forskjellige doser 2 dager før den provokative test og opptil testen er ferdig. Forbindelsene admininstreres som suspensjon enten i karboksymetylcellulose eller i laktoseoppløsning.

4. Modell av korticosteronsuppresjon og thymus-størrelsesreduksjon i rotter

35 Wistar-hannrotter med en kroppsvekt mellom 200 og 250 g fordeles vilkårlig. Testede forbindelser og standard glukokortikoider tilføres ved s.c.-administrering en gang daglig i 3 dager. På dag 3 underkastes rottene kald belastning (4°C i 1 time), anestetiseres med

Tiopenetal (Pliva Inc.) og blod hentes ut på heparin. Den komplette thymus fjernes fra hvert dyr og veies umiddelbart. Plasma lagres ved -70°C til analyse. Kortikosteron ekstraheres med 5 ml kloroform fra 1 ml plasma eller fra standard kortikosteronfortynninger i PBS, intereferente forbindelser vaskes med 0,1M NaOH og
 5 svovelsyre:H₂O:C₂H₅OH=8:2:1 tilsettes. Fluorescens måles 60 minutter senere og eksiterings/emisjonsbølglengden er 470/530.

5) Bestemmelse av TNF- α og IL-1 β sekresjon i mononukleære celler av human perifer blod in vitro

10 Mononukleære perifere blodceller (PMBC) prepareres fra heparinisert fullblod etter separering av PMBC på Ficoll-Hypaque (Amersham-Pharmacia). For bestemmelse av TNF- α nivået dyrkes 3,5-5 x 10⁴ celler i et totalvolum på 200 μ l i et tidsrom på 18 til 24 timer på flatbunn-mikrotiterplater (96 brønner, Falcon) i RPMI 1640-medium supplert med 10% varme-inaktivert humant AB-serum (Croatian Centre For Transfusion
 15 Medicine, Zagreb), 100 enheter/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin og 20 mM HEPES (Invitrogen Life Technologies). Cellene inkuberes ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂ og 90% fuktighet. Cellene i en negativ kontroll dyrkes kun i medium (NC), mens sekresjonen av TNF- α en positiv kontroll ble stimulert ved tilsetning av 1 μ g/ml lipopolysakkarid (LPS, E. coli serotype 0111:B4, Sigma) (PC) og effekten av de testede
 20 substanser på TNF- α sekresjonen testes etter deres tilsetning til cellekulturer stimulert med LPS (TS). TND- α nivået i cellesupernatanten bestemmes ved ELISA i henhold til produsentens (R&D Systems) forslag. Testsensitiviteten var < 3 pg/ml TNF- α . Bestemmelsen av IL-1 β nivået gjennomføres som beskrevet for TNF- α bestemmelsen bortsett fra at 1 x 10⁵ celler/brønn og 0,1 ng/ml LPS benyttes. IL-1 β nivået bestemmes ved
 25 ELISA (R&D Systems). Prosent inhibering av TNF- α eller IL-1 β produksjonen beregnes ved følgende ligning:

$$\% \text{ inhibering} = [1 - (\text{TS} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC})] \times 100$$

30 IC₅₀-verdien bestemmes som den konsentrasjon av substansen ved hvilken 50% TNF- α produksjon inhiberes. Forbindelser som viser IC₅₀ i konsentrasjoner på 20 μ M eller lavere anses som aktive. IC₅₀ beregnes ved bruk av Graph Pad Prism Software.

6) Bestemmelse av TNF- α sekresjon med RAW 264,7 celler

35 Cellene dyrkes i 10% føtalboviumserum (FBS) i DMEM-medium (Invitrogen Life Technologies) ved 37°C i en atmosfære med 5% CO₂ og 90% fuktighet. 20 000 celler/brønn bringes på plate i 96-brønnersplater (Falcon). Cellene i en negativ kontroll

dyrkes kun i medium (NC), mens sekresjon av TNF- α en positiv kontroll stimuleres ved tilsetning av 500 pg/ml lipopolysakkarid (LPS, E. coli serotype 0111:B4, Sigma) (PC) og effekten av de testede stoffer på TNF- α sekresjonen testes etter deres tilsetning til cellekulturer stimulert med LPS (TS). TNF- α nivået i celledsupernatanten bestemmes ved ELISA i henhold til produsentens (R&D Systems, Biosource) antydninger. Prosent inhibering av TNF- α produksjonen beregnes ved den følgende ligning:

$$\% \text{ inhibering} = [1 - (\text{TS} - \text{NC}) / (\text{PC} - \text{NC})] \times 100$$

IC₅₀-verdien defineres som den konsentrasjon av substansen ved hvilken 50% av TNF- α produksjonen inhiberes. Forbindelser som viser IC₅₀ i konsentrasjoner på 10 μ M eller lavere anses som aktive.

7. Human prostaglandin-H-syntase-1 (hPGH-1)- og human prostaglandin-H-syntase-2 (hPGH-2)-inhiberingsanalyse

Genet som koder hPGH-1 og hPGH-2 forsterkes ved PCR ved bruk av platinum pfx DNA-polymerase (Invitrogen Life Technologies) fra human placenta cDNA-bibliotek (Stratagene). Primersekvensene som benyttes for hPGH-1 er:

5'-ATATAAGCTTGCGCCATGAGCCGGAGTCTTC-3' og

5'-ATATGGATCCTCAGAGCTCTGTGGATGGTCGC-3';

for hPGH-2

5'-ATATAAGCTTGCTGCGATGCTCGCCCGC-3' og

5'-ATATGGATCCCTACAGTTCAGTTCAGTCGAACGTTC-3'.

PCR-produktene klones inn i HindIII- og BamHI-restriksjons seter av pCDNA3.1

Hygro(+)-plasmid (Invitrogen Life Technologies), sekvenser bekrefte ved sekvensering.

Transfeksjon gjennomføres på COS-7-celler (ATCC), celler dyrkes i 10% fetalbovin-serum (FBS) i DMEM-medium (Invitrogen Life Technologies) 37°C, i en atmosfære med 5% CO₂ og 90% fuktighet, til full konfluens i 24-brønners plater (Falcon). 1 μ g plasmid-DNA (pcDNA Hygro 3.1 (+) inneholdende PGH-1- eller PGH-2-genet, eller pcDNA hygro 3.1 (+) for negative kontrollprøver) kombineres med 1,5 μ l lipofektamin 2000 (Invitrogen Life Technologies) ved å følge produsentens anbefalinger. 24 til 48 timer etter transfeksjon settes testforbindelsene i DMEM til cellene uten å fjerne medium og etter 40 minutter settes arachidonsyre (Sigma) til en sluttkonsentrasjon på 20 μ M. Etter 30 minutter fjernes supernatantene og PGE-2 måles med PGE-2-analyse-

sett (Cayman) ved å følge produsentens instruksjoner. Ingen produksjon av PGE-2 detekteres i den negative kontroll.

% inhibering beregnes ved følgende ligning:

5

$$\% \text{ inhibering} = (1 - \text{prøve PGE-2-konsentrasjon} / \text{positiv kontroll PGE-2-konsentrasjon}) \times 100$$

8. In vivo-modell av LPS-indusert eksessiv sekresjon av TNF- α mus

TNF- α sekresjonen i mus induseres i henhold til den tidligere beskrevne metode (Badger A. M. et al., *J. of Pharmac. and Env. Therap.* 279 1996 1453-1461). I denne test benyttes BALB/C-hannmus med en alder på 8 til 12 uker i grupper på 6 til 10 dyr. Dyrene behandles p.o. enten kun med oppløsningsmiddel (i en negativ og en positiv kontroll) eller med oppløsninger av substansen 30 minutter før i.p.-behandling med LPS (E. Coli serotype 0111:B4, Sigma) i en dose på 25 μ g/dyr. 2 timer senere eutaniseres dyrene ved hjelp av i.p.-injeksjon av Roumpun (Bayer) og Ketanest (Park-Davis). En blodprøve fra hvert dyr samles i et "vacutaner"-rør (Becton Dickinson) og plasma separeres i henhold til produsentens forslag. TNF- α nivået i plasma bestemmes ved ELISA (Biosource, R&D Systems) i henhold til den prosess som er beskrevet av produsenten. Testsensitiviteten er < 3 pg/ml TNF- α . Prosent inhibering av TNF- α produksjonen kalkuleres ved følgende ligning:

$$\% \text{ inhibering} = [1 - (\text{TS-NC}) / (\text{PC-NC})] \times 100$$

Forbindelser som viser 30% eller høyere inhibering av TNF- α produksjonen i en dose på 10 mg/kg anses som aktive.

25

9. Vridningstest for analgetisk aktivitet

I denne test induseres smerte ved en injeksjon av et irritasjonsmiddel, vanligvis eddiksyre, i musenes peritonealkavitet. Dyrene responderer ved de karakteristiske vridninger som har gitt testen sitt navn (Collier H.O.J. et al., *Pharmac. Chemother.* 1968, 32, 295-310; Fukawa K. et al., *J. Pharmacol. Meth.*, 1980, 4, 251-259; Schweizer A. et al., *Agents Actions*, 1988, 23, 29-31). Denne test er egnet for bestemmelse av analgetisk aktivitet av forbindelsene. Prosess: BALB/c-hannmus (Charles River, Italia) med en alder på 8 til 12 uker benyttes. Metylcellulose administreres p.o. til en kontrollgruppe 30 minutter før i.p.-administrering av eddiksyre i en konsentrasjon på 0,6%, mens det til testgruppene administreres en standard (acetylsalicylsyre) eller testsubstansene i metylcellulose, p.o. 30 minutter før i.p.-administrering av 0,6% eddiksyre (volum 0,1 ml/10

35

g). Musene anbringes individuelt under glass og antallet vridninger for hvert dyr noteres i en periode på 20 minutter. Prosent inhibering av vridninger beregnes i henhold til ligningen:

$$\% \text{ inhibering} = (\text{midlere verdi av antall vridninger i kontrollgruppen} - \text{antallet vridninger i testgruppen}) / \text{antall vridninger i kontrollgruppen} \times 100$$

Forbindelser som viser den samme eller bedre analgetisk aktivitet enn acetylsalicylsyre anses som aktive.

10

10. In vivo-modell av LPS-indusert sjokk i mus

BALB/c-hannmus med en alder på 8 til 12 uker (Charles River, Italia) benyttes i testen. LPS som er isolert fra *Serratia marcescens* (Sigma, L-6136) fortynnes i steril saltoppløsning. Den første LPS-injeksjon administreres intradermalt i en dose på 4 µg/mus. 18 til 24 timer senere administreres LPS i.v. i en dose på 200 µg/mus. Til en kontrollgruppe administreres to LPS-injeksjoner på den ovenfor beskrevne måte. Testgruppene administrerer substansen p.o. en ½ time før hver LPS-administrering. Overlevelsen etter 24 timer observeres.

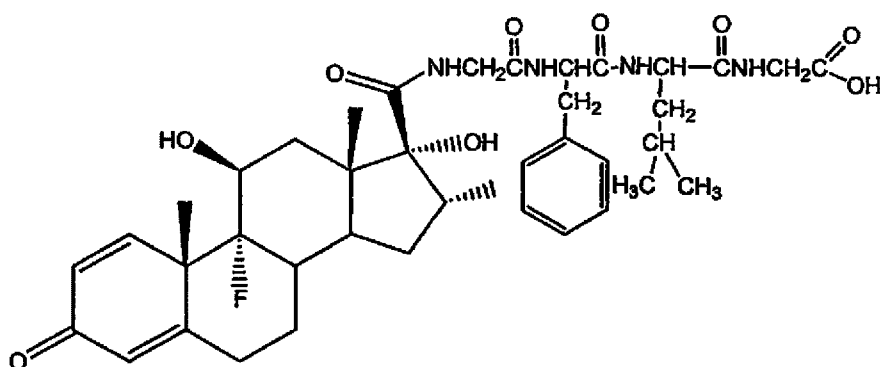
Forbindelser som resulterer i 40% eller bedre overlevelse ved en dose på 30 mg/kg anses som aktive.

Forbindelser anses aktive hvis de viser en statistisk signifikant (ved Student's t-test, $p < 0,05$) resultat i minst av de ovenfor angitte tester. De molare mengder av forbindelse som benyttes ligger under terskelmengden av makrolid (over 30 µm) for å utøve en mild anti-inflammatorisk effekt som rapportert i litteraturen.

SYNTETISKE METODER OG EKSEMPLER

Fremstilling av mellomprodukter

5 Mellomprodukt A



2-klortritylkloridharpiks (1 ekv. = 0,5 mmol, 600 mg) ble anbragt i en glasskolonne utstyrt med et grovt glassfrittefilter og svellet i DCM i 10 minutter. Deretter ble harpiksen filtrert og vasket tre ganger med DCM. Etter vasking med DMF ble harpiksen beladet med N-R-Fmoc-glycin ved tilsetning av 2,0 ml av en 0,6M oppløsning av aminosyre i DMF og 0,630 ml N,N-diisopropyletylamin (DIPEA), og blandes. Etter 5 minutter tilsettes 0,315 ml DIPEA. Etter blanding i 50 minutter ble det tilsatt en mengde på 0,5 metanol. Etter 10 minutter ble harpiksen filtrert og vasket ti ganger med DCM, DMF og metanol.

Debeskyttelse

Forskjellige oppløsninger av piperidin i DMF ble preparert og helt over kulene som følger:

5% piperidin/DMF	10 min. (~ 10 ml)
30% piperidin/DMF	15 min. (~ 10 ml)
50% piperidin/DMF	30 min. (~ 10 ml)

Etter debeskyttelse ble harpiksen vasket med DMF.

Den andre aminosyre, Fmoc-leucin (1060 mg, 3 mmol) og 2-(1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HBTU) ble oppløst i 3 ml DMF og ble med 0,216 ml (5 mmol) DIPEA hurtig og samtidig satt til monomer/harpiksblandingen i reaksjonsrøret.

Endedekking:

En oppløsning av 10 ekv. (2,04 ml) eddiksyreanhydrid og 10 ekv. (3,48 ml) DIPEA i 5 ml DMF ble preparert. 2,5 ml av denne oppløsning ble satt til reaksjonsblandingen i 5 minutter.

5

Den andre aminosyre ble debeskyttet med en oppløsning av piperidin i DMF som følger:

	30% piperidin/DMF	2 min. (~ 10 ml)
10	30% piperidin/DMF	2 min. (~ 10 ml)
	30% piperidin/DMF	5 min. (~ 10 ml)
	30% piperidin/DMF	5 min. (~ 10 ml)

og vasket med stor mengde DMF.

15

Den samme prosedyre for kobling og debeskyttelse ble gjentatt for den tredje aminosyre Fmoc-fenylalanin, 1162 mg, 3 mmol, HBTU, 1081 mg/3 ml DMF, DIPEA (0,87 ml)

20

og den fjerde aminosyre Fmoc-glycin, 892 mg, 3mmol, HBTU, 1081 mg/3 ml DMF, DIPEA 87 ml,

25 fulgt av filtrering og vasking med DMF.

Til tetrapeptid/harpiksblandingen i reaksjonsrøret satte man blandingen av deksametasonsyre (567 mg, 3 ekv.), HBTU (540, 3,8 ekv.) og 0,435 ml DIPEA i 3 ml DMF, hvor-etter det hele ble blandet og satt hen over natten.

30

Endedekking:

En oppløsning av 0,5 ml eddiksyreanhydrid og 0,5 ml DIPEA i 3 ml DMF ble satt til reaksjonsblandingen i 5 min., fulgt av vasking med DCM, DMF og MeOH og tørking under vakuum.

35

SPALTING FRA HARPIKSEN

10 ml av en oppløsning av 50% trifluoreddiksyre i DCM ble helt over kulene og blandet

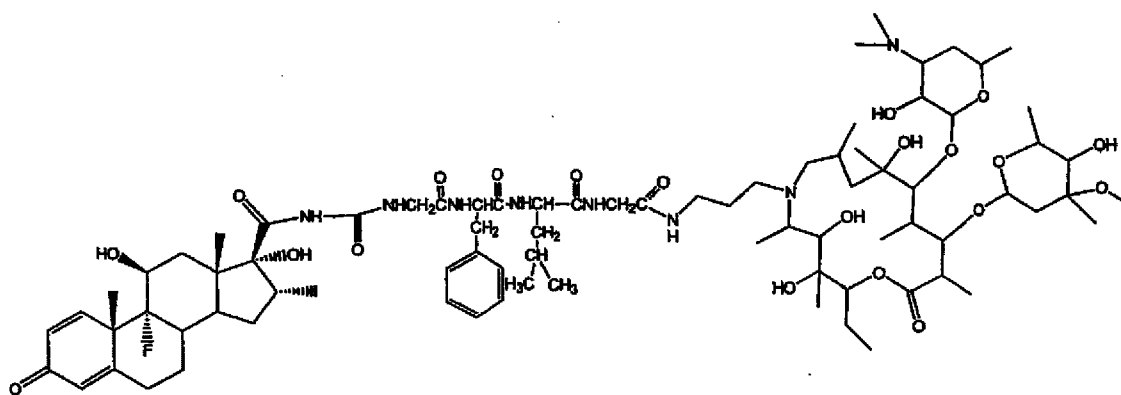
i 15 min. Reagensene ble fjernet ved filtrering og kulene vasket to ganger med DCM. Den samme prosedyre ble gjentatt med de neste 10 ml syre.

Samlet oppløsningsmiddel ble fordampet for å fjerne overskudd av TFA under tilsetning
 5 av en mengde dietyleter. Det ble isolert 60,1 mg mellomprodukt A.
 MS(m/z): 753,3 [MH]⁺.

Eksempel I

Forbindelse 1 (deksametason-Gly-Phe-Leu-Gly-Azitromycin)

10

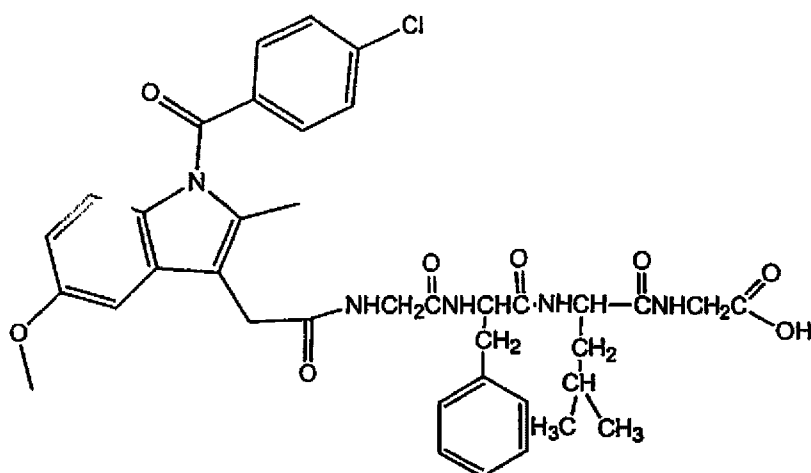


Mellomprodukt A (57 mg, 0,076 mmol) ble oppløst i 5 ml tørr CH₂Cl₂ under en inert atmosfære og avkjølt til 0°C. 0,115 ml N,N-diisopropyletylamin og 20,5 mg
 1-hydroksybenzotriazol ble tilsatt, fulgt av tilsetning av forbindelsen 9-deokso-9a-aza-
 15 9a-(aminopropyl)-9a-homoerytromycin A (60 mg, 0,076 mmol) og 1-(3-dimetyl-aminopropyl)-3-etyl-karbodiimidhydroklorid (57,6 mg, 0,30 mmol). Reaksjonsblanding
 en ble omrørt i en strøm av argon ved romtemperatur i 24 timer og så fordampet til et mindre volum under redusert trykk og renses på en silikagelkolonne med
 CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH = 6:1:0,1). Man oppnådde 14 mg forbindelse 1.

20

MS (m/z): 1527,3 [MH]⁺.

IR(cm⁻¹)/KBr: 3415, 2969, 2939, 2874, 1664, 1528, 1458, 1378, 1262, 1168, 1107,
 1054, 1013, 959, 894, 803, 702.

Mellomprodukt B

2-klortritylkloridharpiks (1 ekv. = 0,5 mmol, 600 mg) ble anbragt i en glasskolonne
 5 utstyrt med et grovt glassfrittefilter og svellet i DCM i 10 min. Deretter ble harpiksen
 filtrert og vasket tre ganger med DCM. Etter vasking med DMF ble harpiksen fylt med
 N-R-Fmoc-glycin ved tilsetning av 2,0 ml av en 0,6M oppløsning av aminosyren i DMF
 og 0,630 ml N,N-diisopropyletylamin (DIPEA) og blandet. Etter 5 min. ble 0,315 ml
 DIPEA tilsatt. Etter blanding i 50 min. ble 0,5 ml metanol tilsatt. Etter 10 min. ble
 10 harpiksen filtrert og vasket 10 ganger med DCM, DMF og metanol.

Debeskyttelse

Forskjellige oppløsninger av piperidin i DMF ble fremstilt og hellt over kulene som
 følger:

15	5% piperidin/DMF	10 min. (~ 10 ml)
	30% piperidin/DMF	15 min. (~ 10 ml)
	50% piperidin/DMF	30 min. (~ 10 ml)

Etter debeskyttelse ble harpiksen vasket med DMF.

20

Den andre aminosyre, Fmoc-leucin (1060 mg, 3 mmol) og 2-(1H-benzotriazolyl)-
 1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HBTU) ble oppløst i 3 ml DMF og ble
 sammen med 0,216 ml (5 mmol) DIPEA tilsatt hurtig og samtidig til monomer/harpiks-
 blandingen i reaksjonsrøret.

25

Endedekking:

En oppløsning av 10 ekv. (2,04 ml) eddiksyreanhydrid og 10 ekv. (3,48 ml) DIPEA i 5 ml DMF ble fremstilt. 2,5 ml av denne oppløsning ble satt til reaksjonsblandingen i løpet av 5 min.

5

Den andre aminosyre ble debeskyttet med en oppløsning av piperidin i DMF som følger:

30% piperidin/DMF 2 min. (~ 10 ml)

30% piperidin/DMF 2 min. (~ 10 ml)

10 30% piperidin/DMF 5 min. (~ 10 ml)

30% piperidin/DMF 5 min. (~ 10 ml)

og vasket med en stor mengde DMF.

Den samme prosedyre for kobling og debeskyttelse ble gjentatt for den tredje aminosyre:

15

Fmoc-fenylalanin, 1162 mg, 3 mmol

HBTU, 1081 mg/3 ml DMF

DIPEA, 0,87 ml

20 og den fjerde aminosyre:

Fmoc-glycin, 892 mg, 3 mmol

HBTU, 1081 mg/3 ml DMF

DIPEA, 0,87 ml

kun etter kobling av den fjerde aminosyre ble den Fmoc-beskyttende gruppe ikke fjernet.

25

Etter filtrering og vasking med DMF ble produktet fjernet fra harpiksen:

10 ml av en oppløsning av 50% trifluoreddiksyre i DCM ble helt over kulene og blandet i 15 min. Reagensene ble fjernet ved filtrering og kulene vasket to ganger med DCM.

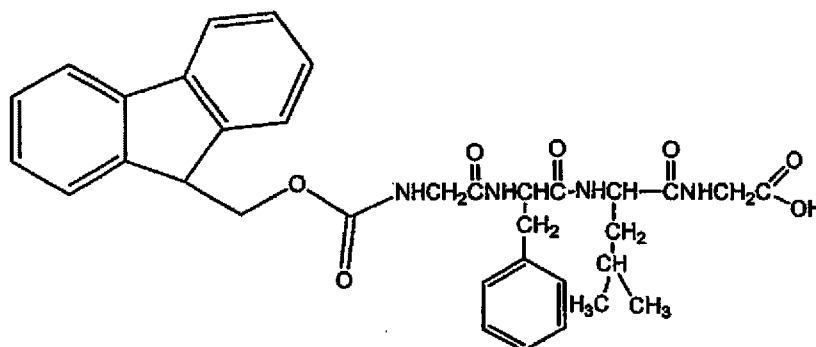
30

Den samme prosedyre ble gjentatt med de neste 10 ml syre.

Oppsamlet oppløsningsmiddel ble fordampet for å fjerne overskudd av TFA med tilsetning av en mengde dietyleter. Man isolerte 109,1 mg mellomprodukt B1.

35

MS (m/z): 715,6 $[M+H]^+$.



Mellomprodukt B1

2-klortritylkloridharpiks (1 ekv. = 0,352 mmol, 326 mg) ble anbragt i en glasskolonne
 5 utstyrt med et grovt glassfrittefilter og svellet i DCM i 10 minutter. Deretter ble har-
 piksen filtrert og vasket tre ganger med DCM. Etter vasking med DMF ble harpiksen
 lastet med mellomprodukt B1 ved tilsetning av 259 mg (0,422 mmol) oppløst i 2 ml
 DMF og 0,150 ml N,N-diisopropyletylamin (DIPEA), og blandet. Etter 5 min. ble 0,230
 ml DIPEA tilsatt. Etter blanding i 50 min. ble 0,355 ml metanol tilsatt. Etter 10 min. ble
 10 harpiksen filtrert og vasket 10 ganger med DCM, DMF og metanol.

Debeskyttelse

Forskjellige oppløsninger av piperidin i DMF ble preparert og helt over kulene som
 følger:

- | | | |
|----|-------------------|------------------|
| 15 | 5% piperidin/DMF | 10 min (~ 10 ml) |
| | 30% piperidin/DMF | 15 min (~ 10 ml) |
| | 50% piperidin/DMF | 30 min (~ 10 ml) |

Etter debeskyttelsen ble harpiksen vasket med DMF.

- 20 377 mg (1,055 mmol) indometacin og 533 mg (1,41 mmol) 2-(1H-benzotriazolyl)-
 1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorofosfat (HBTU) ble oppløst i 3 ml DMF og sammen
 med 0,602 ml (3,52 mmol) DIPEA satt hurtig og samtidig til polymer/harpiks-
 blandingen i reaksjonsrøret.

25 Endedekking:

En oppløsning av 0,5 ml eddiksyreanhydrid og 0,5 ml DIPEA i 3 ml DMF ble satt til
 reaksjonsblanding i 5 min., filtrert og vasket med DCM, DMF og MeOH.

Spalting fra harpiksen

10 ml av en oppløsning av 50% trifluoreddiksyre i DCM ble helt over kulene og det hele blandet i 15 min. Reagensene ble fjernet ved filtrering og kulene vasket to ganger med DCM. Den samme prosedyre ble gjentatt med de neste 10 ml syre.

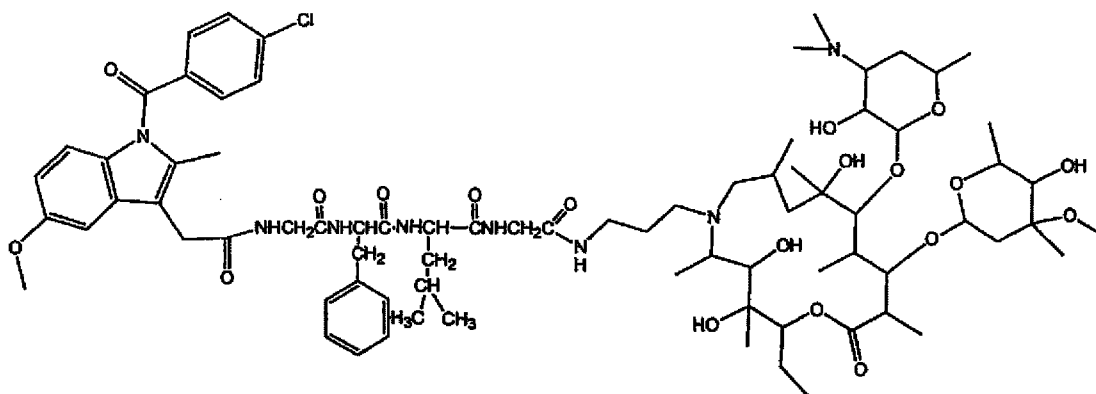
5

Samlet oppløsningsmiddel ble fordampet for å fjerne overskytende TFA under tilsetning av en mengde dietyler. Det ble isolert 210,8 mg mellomprodukt B.

MS (m/z): 732,66 $[\text{MH}]^+$.

Eksempel II

Forbindelse 2 (indometacin-Gly-Phe-Leu-Gly-azitromycin)



Mellomprodukt B (200 mg, 0,27 mmol) ble oppløst i 5 ml tørr CH_2Cl_2 under en inert atmosfære. 0,416 ml (2,14 mmol) N,N -diisopropyletylamin og 74 mg (0,55 mmol)

15 1-hydroksybenzotriazol ble tilsatt, fulgt av tilsetning av forbindelsen 9-deokso-9a-aza-9a-(aminopropyl)-9a-homoerytromycin A (21,6 mg, 0,27 mmol) og 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etyl-karbodiimidhydroklorid (188 mg, 1,09 mmol). Reaksjonsblanding ble omrørt under en argonstrøm ved romtemperatur i 24 timer og så fordampet til et mindre volum under redusert trykk og renses på en silikagelkolonne med elueringsmiddel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 6:1:0,1. Man oppnådde 70 mg forbindelse 2.

20

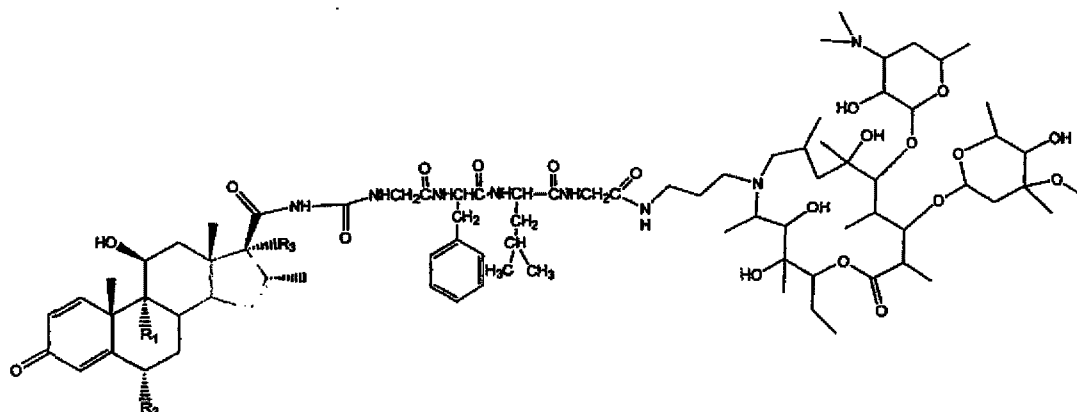
MS (m/z): 1505,8 $[\text{MH}]^+$.

IR(cm^{-1})/KBr: 3654, 3633, 3425, 3084, 2970, 2936, 1720, 1652, 1637, 1545, 1439, 1368, 1309, 1230, 1179, 1111, 1089, 1055, 1013, 867, 803, 739, 700, 643.

25

Eksempel III

Ved å følge den generelle prosedyre fra eksempel I og ved å benytte de egnede reaktanter oppnådde man følgende forbindelser:



Forbindelse 3: $R_1=F$; $R_2=F$; $R_3=OH$

5 Forbindelse 4: $R_1=F$; $R_2=H$; $R_3=H$

Forbindelse 5: $R_1=F$; $R_2=F$; $R_3=H$

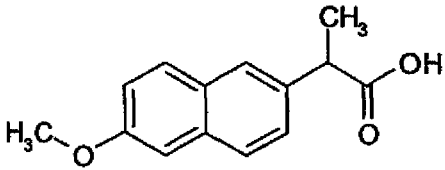
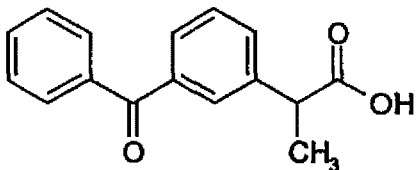
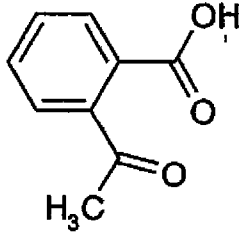
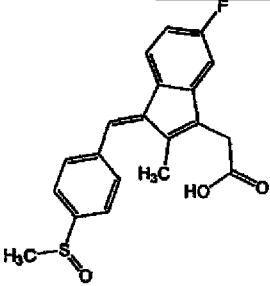
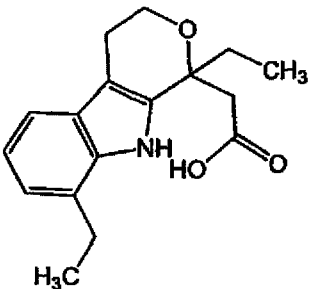
Forbindelse 6: $R_1=H$; $R_2=F$; $R_3=OH$

Eksempel IV

- 10 Ved å følge den generelle prosedyre fra eksempel II og ved å benytte de egnede reaktanter oppnådde man følgende forbindelser:

V-Gly-Phe-Leu-Gly-M

Forbindelse	V
7	
8	

9	
10	
11	
12	
13	

48

14	 <chem>O=C(O)C1=Cc2ccccc2N1C(=O)c3ccccc3</chem>
15	 <chem>CC(C(=O)O)C(c1ccc(cc1)C(=O)C2=CC=CC=S2)c3ccccc3</chem>
16	 <chem>OC(=O)c1ccc2c(c1)c(c3ccncc32)N4C=CC=C(C(F)(F)F)C4C</chem>
17	 <chem>[Na]C(=O)CC1=CC=CC=C1N2C=CC(=CC=C2Cl)Cl</chem>
18	 <chem>[Na]C(=O)CC1=CC=C(C(=O)c2ccc(C)cc2)N1C</chem>

Forkortelser:

Pyr: pyridin

NEt₃: trietylamin

5 4-PP: 4-pyrrolopyridin

DMAP: 2,6-dimetylamino-pyridin

DIPEA: N,N'-diisopropyletylamin

DMF: dimetylformamid

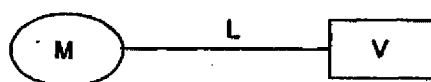
TFA: trifluoreddiksyre

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d formel (I):

5



(I)

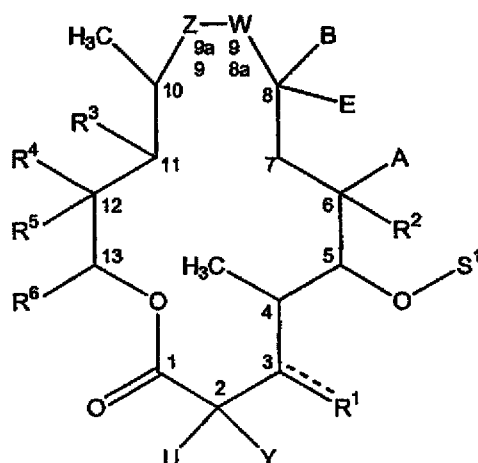
der

M repræsenterer en makrolid-subenhet som har egenskaben å akkumulere i

10

inflammatoriske

celler, hvori M repræsenterer en gruppe med formel (II):



(II)

15

der

(iv) Z og W uafhængig er $>C=O$, $>CH_2$, $>CH-NR_tR_s$, $>N-R_N$, $>C=N-R_M$ eller en binding,

20

der

 R_t og R_s uafhængig er H eller C_{1-10} alkyl; R_M er hydroksy, C_{1-10} alkoksy, substitueret C_{1-10} alkoksy eller OR^P ;

25

 R_N er hydrogen, R^P , C_{1-10} alkyl, C_{2-10} alkenyl, C_{2-10} alkynyl, C_{1-10} alkoksy,

C_{1-10} alkoksyalkyl eller $-CO(=X)-NR_tR_s$; der X er =O eller =S;

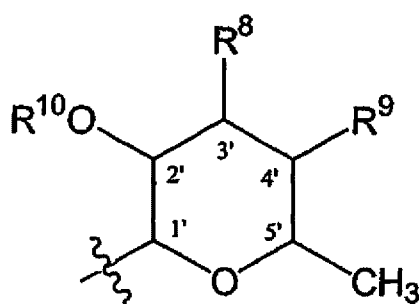
forutsatt at Z og W ikke samtidig kan være $>C=O$, $>CH_2$, $>CH-NR_tR_s$, $>N-R_N$,
 $>C=N-R_M$ eller en binding;

5

(ii) U og Y uavhengig er hydrogen, halogen, C_{1-10} alkyl eller hydroksey- C_{1-10} alkyl;

(iii) R^1 er hydroksey, OR^p , $-O-S^2$ -gruppe eller en =O;

10 (iv) S^1 er en sukkerdel med formelen:



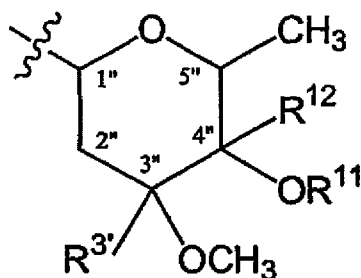
der

15 R^8 og R^9 begge er hydrogen eller sammen danner en binding, eller R^9 er hydrogen
og R^8 er $-N(CH_3)R^y$, der

R^y er R^p , R^z eller $-C(O)R^z$, der R^z er hydrogen eller C_{1-10} alkyl eller
 C_{2-10} alkenyl eller C_{2-10} alkynyl eller C_{3-8} cykloalkyl eller C_{6-14} aryl eller
 C_{2-10} heteroaryl eller C_{1-10} alkyl substituert med C_{2-7} alkyl, C_{2-7} alkenyl,
20 C_{2-7} alkynyl, C_{6-14} aryl eller C_{2-10} heteroaryl

R^{10} er hydrogen eller R^p ;

(v) S^2 er en sukkerdel med formelen:



25

der

$R^{3'}$ er hydrogen eller metyl;

R^{11} er hydrogen, R^p eller $O-R^{11}$ er en gruppe som med R^{12} og med C/4"-

5 karbonatomet danner en $>C=O$ - eller epoksygruppe;

R^{12} er hydrogen eller en gruppe som med $O-R^{11}$ -gruppen og med C/4"-karbonatomet danner en $>C=O$ - eller epoksygruppe;

(vi) R^2 er hydrogen, hydroksy, OR^p eller C_{1-10} alkoksy;

10

(vii) A er hydrogen eller metyl;

(viii) B er metyl eller epoksy;

15 (ix) E er hydrogen eller halogen;

(x) R^3 er hydroksy, OR^p , C_{1-10} alkoksy eller R^3 er en gruppe som med R^5 og med C/11- og C/12-karbonatomene danner et syklisk karbonat eller karbamat; eller, hvis W eller Z er $>N-R_N$, er R^3 en gruppe som med W eller Z danner et syklisk karbamat;

20

(xi) R^4 er C_{1-4} -alkyl;

(xii) R^5 er hydrogen, hydroksy, OR^p , C_{1-4} -alkoksy eller en gruppe som med R^3 og med C/11- og C/12-karbonatomene danner et syklisk karbonat eller karbamat;

25

(xiii) R^6 er hydrogen eller C_{1-4} -alkyl;

der M har et bindingssete gjennom hvilket det er forbundet til V via en linkergruppe L;

30 forutsatt at bindingssetet er ett eller flere av de følgende:

- a. en hvilken som helst reaktiv hydroksy-, nitrogen- eller epoksygruppe lokalisert på S^1 , S^2 eller et aglykon-oksygen hvis S^1 og/eller S^2 er spaltet av;
- b. en reaktiv $>N-R_N$ - eller $-NR_tR_s$ - eller $=O$ -gruppe lokalisert på Z eller W;
- c. en reaktiv hydroksygruppe lokalisert på en hvilken som helst av R^1 , R^2 , R^3 og R^5 ;

35

d. en hvilken som helst annen gruppe som først kan derivatiseres til en hydroksy- eller $-NR_tR_s$ -gruppe, og

R^p er hydroksyl- eller aminobeskyttende gruppe;

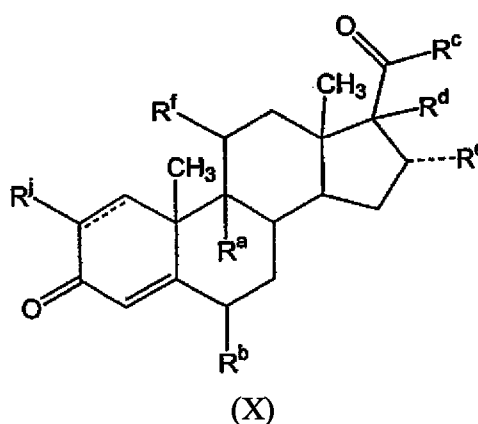
- 5 V representere en anti-inflammatorisk subenhet valgt fra gruppen bestående av steroid-anti-inflammatorisk subenhet og en ikke-steroid-anti-inflammatorisk subenhet, og L er et linker-molekyl hvortil hver av M og V er kovalent bundet, der L representerer et polypeptid valgt fra gruppen bestående av:

10 Gly-Fe-Leu, Gly-Gly-Fe, Gly-Fe-Fe, Gly-Fe-Gly, Gly-Leu-Gly, Gly-Val-Ala, Gly-Fe-Ala, Gly-Leu-Fe, Gly-Leu-Ala, Ala-Val-Ala, Gly-Gly-Fe-Leu, Gly-Fe-Leu-Gly, Gly-Fe-Ala-Leu, Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Fe-Fe-Leu, Gly-Leu-Leu-Gly, Gly-Fe-Tyr-Ala, Gly-Fe-Gly-Fe, Ala-Gly-Val-Fe og Gly-Fe-Fe-Gly;

og farmasøytisk akseptable salter og solvater derav, og individuelle diastereomerer derav.

2.

- 5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den anti-inflammatoriske subenheten V er en steroid-anti-inflammatorisk subenhet representert ved formel (X):



der

R^a og R^b uavhengig betyr hydrogen eller halogen;

R^c er hydroksy, C_{1-10} alkoksy, C_{1-10} alkyl, tiokarbamoyl, karbamoyl eller en
15 valensbinding;

R^d og R^e uavhengig betyr hydrogen, hydroksy, metyl eller C_1 - C_4 -alkoksy eller hver er en gruppe som danner en 1,3-dioksolanring med den andre, eller en valensbinding;

- 20 R^f er hydrogen, hydroksy, klor, eller danner en ketogruppe med karbonatomet den er bundet til; og

R^i er hydrogen eller halogen.

25 3.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at v e d at den anti-inflammatoriske subenheten V er en ikke-steroid-anti-inflammatorisk subenhet avledet fra NSAID'ene valgt blant:

aceklofenac, acemetacin, acetaminofen, acetaminosalol, acetyl-salicylsyre,

- 30 acetyl-salicylsyre-2-amino-4-pikolinsyre, 5-aminoacetylsalicylsyre, alklofenac,

aminoprofen, amfenac, ampyron, ampiroksicam, anileridin, bendazac,
 benoksaprofen, bermoprofen, ■■■isabolol, bromfenac, 5-bromosalicylsyreacetat,
 bromosaligenin, buklokssyre, butibufen, karprofen, celecoksib, kromoglykate,
 kinmetacin, klindanac, klopirac, natriumdiklofenac, diflunisal, ditazol,
 5 droksicam, enfenaminsyre, etodolac, etofenamat, felbinac, fenbufen,
 fenklozinsyre, fendosal, fenoprofen, fentiazac, fepradinol, flufenac, flufen-
 aminsyre, fluniksin, flunoksaprofen, flurbiprofen, glutametacin, glykolsalicyl-
 syre, ibufenac, ibuprofen, ibuproksam, indometacin, indoprofen, isofezolac,
 isoksepac, isoksikam, ketoprofen, ketorolac, lornoksicam, loksoprofen,
 10 meklofenaminsyre, mefenaminsyre, meloksicam, mesalamin, metiazinsyre,
 mofezolac, montelukast, nabumeton, naproksen, nifluminsyre, nimesulid,
 olsalazin, oksaceprol, oksaprozin, oksyfenbutazon, paracetamol, parsalimid,
 perisoksal, fenyl-acetyl-salicylat, fenylbutazon, fenylsalicylat, pyrazolac,
 piroksicam, pirprofen, pranoprofen, protizininsyre, reserveratol, salacetamid,
 15 salicylamid, salicylamid-O-acetylsyre, salicylsvovelsyre, salicin, salicylamid,
 salsalat, sulindac, suprofen, suksibutazon, tamoksifen, tenoksicam,
 tiaprofensyre, tiaramid, tiklopridin, tinoridin, tolfenaminsyre, tolmetin, tropesin,
 xenbucin, ximoprofen, zaltoprofen, zomepirac, tomoksiprol, zafirlukast og
 cyklosporin.

20

4.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 Z og W sammen er:

-NCH₃-CH₂-, -NHCH₂-, -CH₂-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-;

25 A og B er metyl;

E er hydrogen;

R² er hydroksy eller metoksy;

S¹ representerer desosaminsukker der R⁸ er valgt blant hydrogen, metyl, amino, C₁₋₆-
 alkylamino eller C₁₋₆-dialkylamino;

30 R⁹ og R¹⁰ er hydrogen;

R¹ er hydroksy eller O-S²-gruppen, der S² betyr et kladinosesukker der:

R¹¹ er hydrogen, eller O-R¹¹ er en gruppe som med R¹² og med C/4"-
 karbonatomet danner en >C=O- eller epoksygruppe;

35 R¹² er hydrogen eller en gruppe som med O-R¹¹ og med C/4"-karbonatomet
 danner en >C=O- eller epoksygruppe;

R¹³ er metyl;

U er hydrogen;

Y er metyl;

R⁶ er hydroksy, metyl eller etyl;

R⁵ er hydrogen, hydroksy, metoksy eller en gruppe som med R³ og med C/11- og C/12-karbonatomene danner en syklisk karbonat- og karbamatbro;

- 5 R³ er hydroksy eller en gruppe som danner en syklisk karbamatbro med W eller Z, eller R³ er en gruppe som med R⁵ og med C/11- og C/12-karbonatomene danner en syklisk karbonat- eller karbamatbro;

R⁴ er metyl;

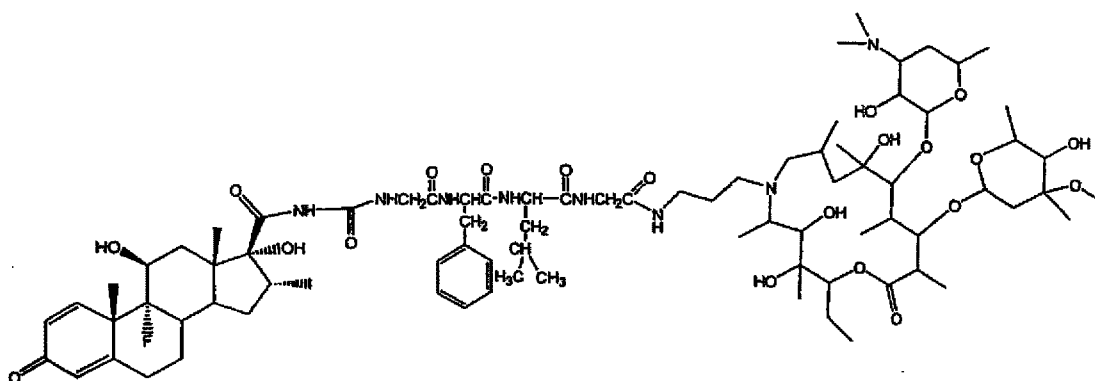
- forutsatt at bindingen skjer gjennom nitrogen av Z ved N/9a-posisjonen eller gjennom
10 karbonet i R¹² eller gjennom oksygenet i R¹¹, begge ved C/4"-posisjonen av S²-sukkeret.

5.

- Forbindelse ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n
15 anti-inflammatoriske subenheten V er en ikke-steroid-anti-inflammatorisk subenhet avledet fra en NSAID valgt blant: S-(+)-ibuprofen, indometacin, flurbiprofen, naproksen, ketoprofen, acetylsalicylsyre, sulindac, etolac, ketorolac, suprofen, fluniksin, deklufenacnatrium og tolmetinnatrium.

20 6.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d f o r m e l e n:



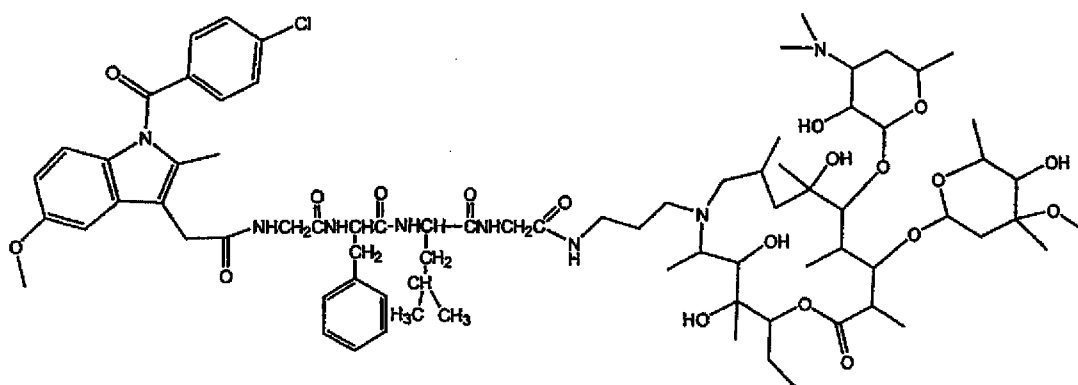
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

25

7.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d f o r m e l e n:

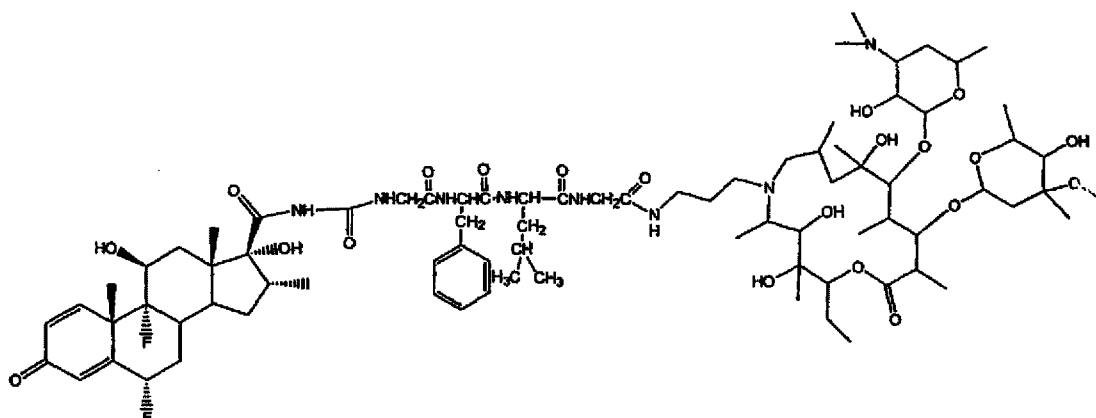
57



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

5 8.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

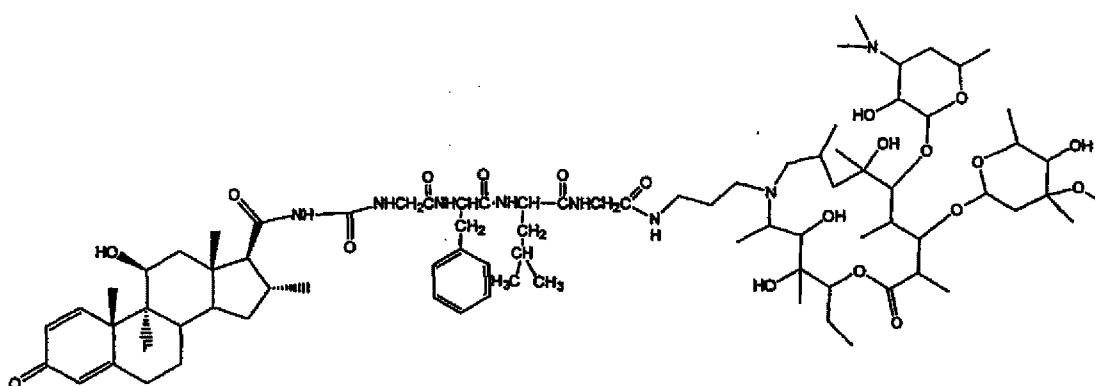


eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10

9.

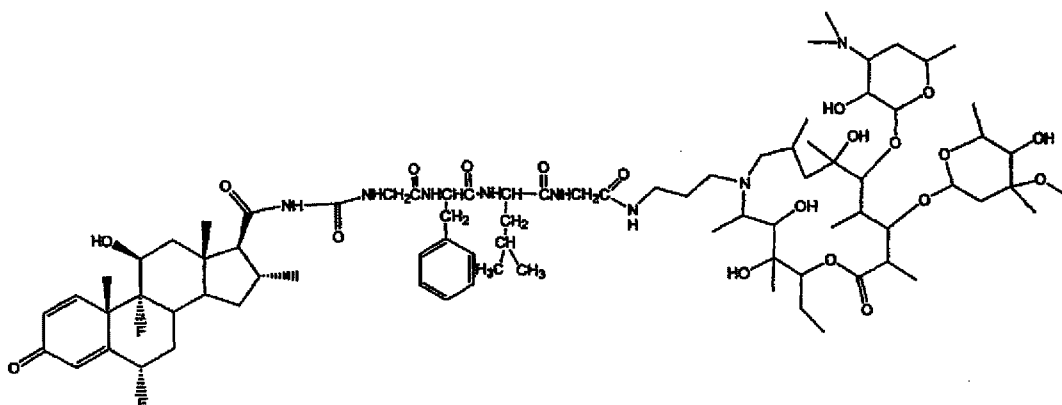
Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10.

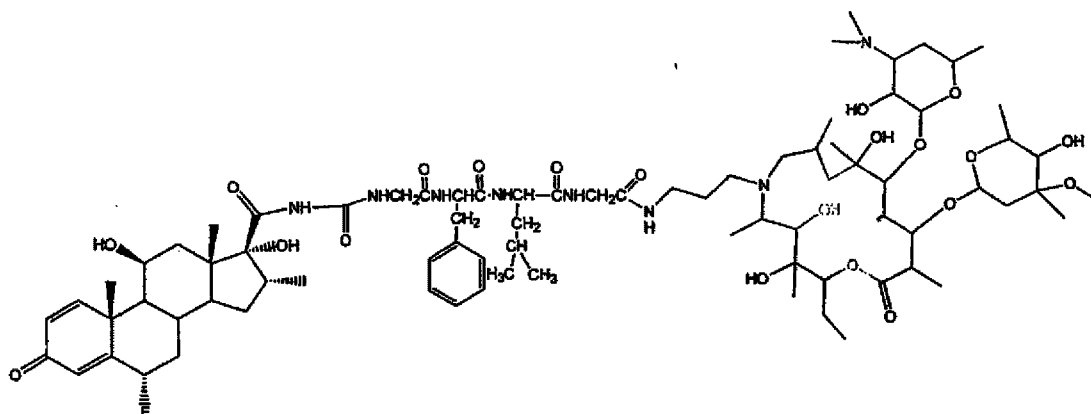
5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10 11.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



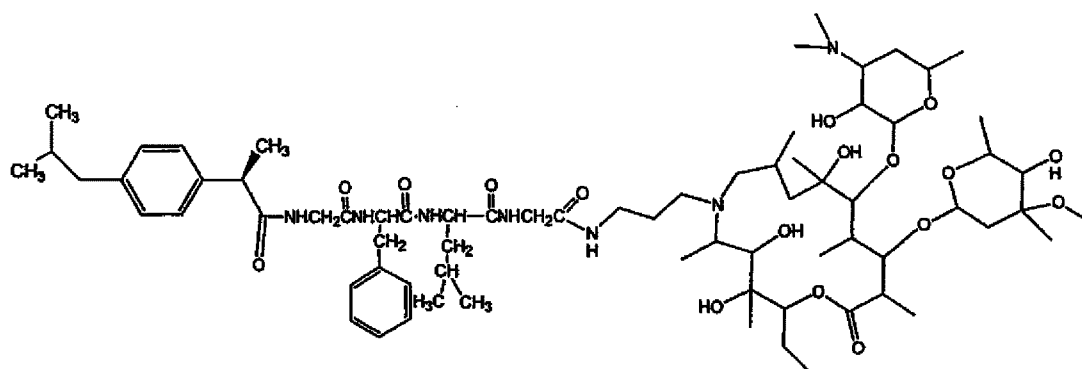
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

15

12.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

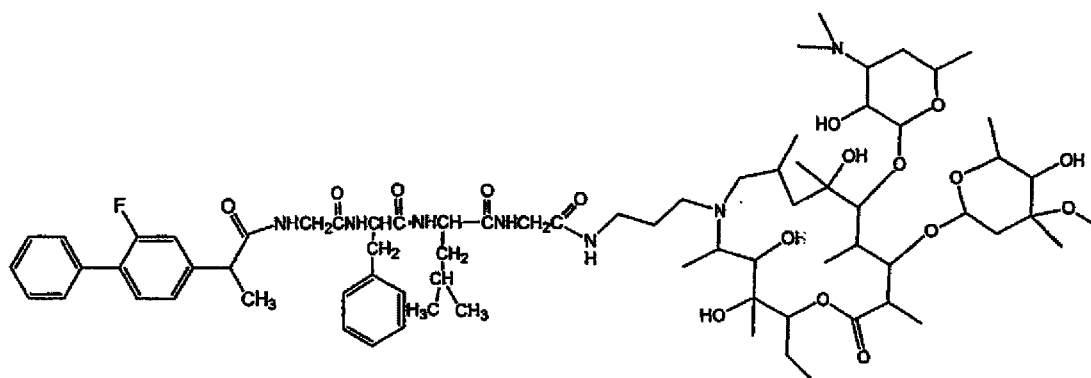
59



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

13.

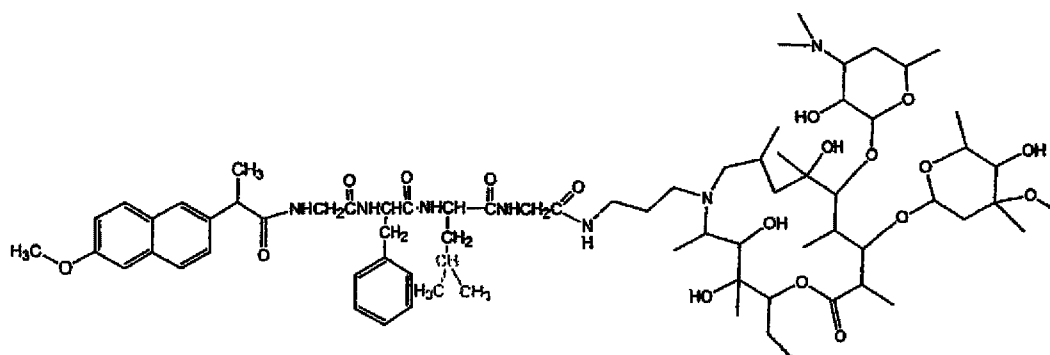
- 5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10 14.

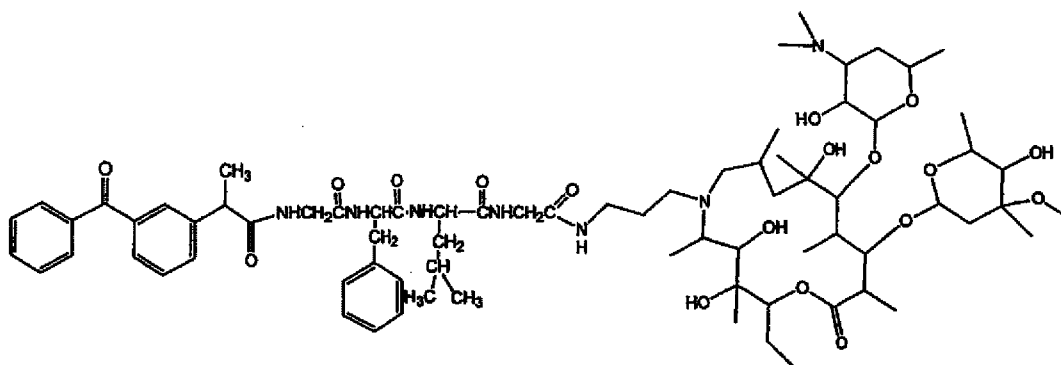
- Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

15.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



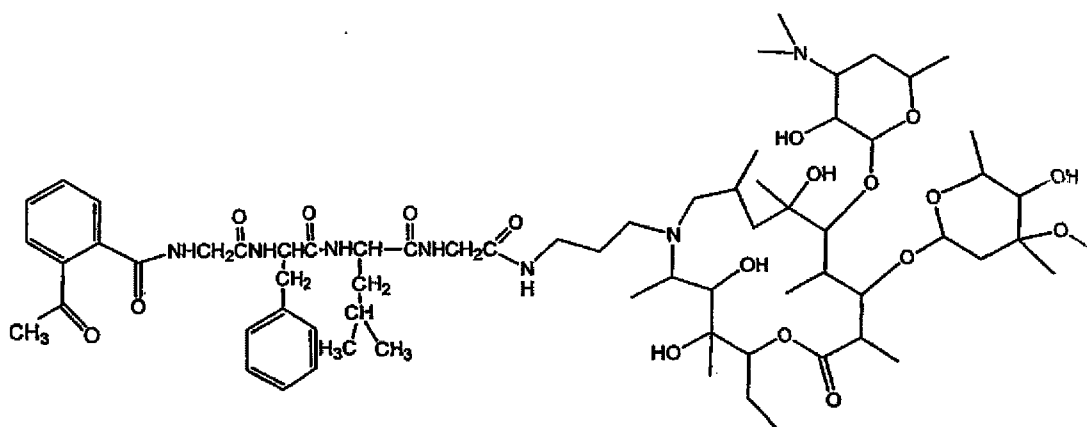
5

eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

16.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

10

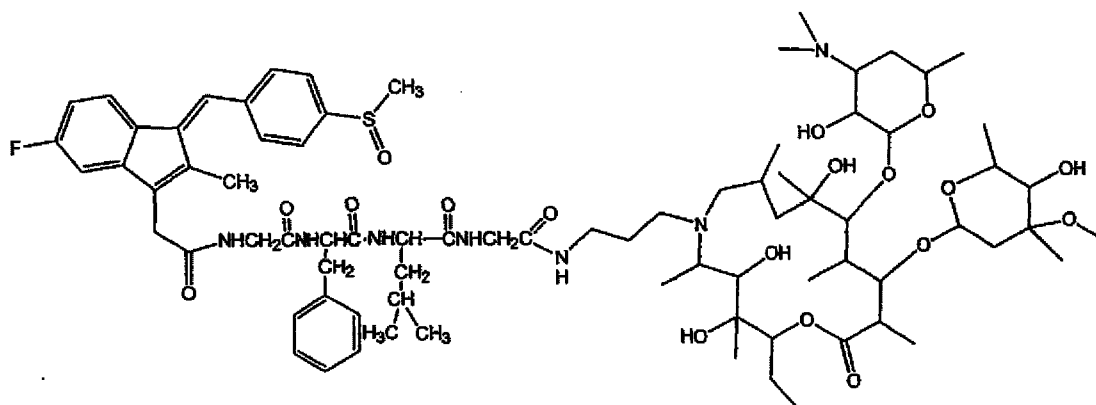


eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

17.

15 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

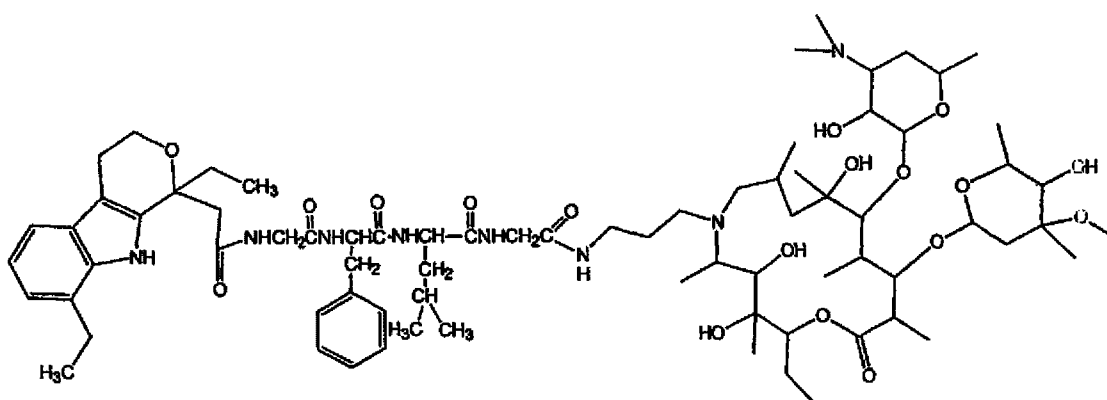
61



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

18.

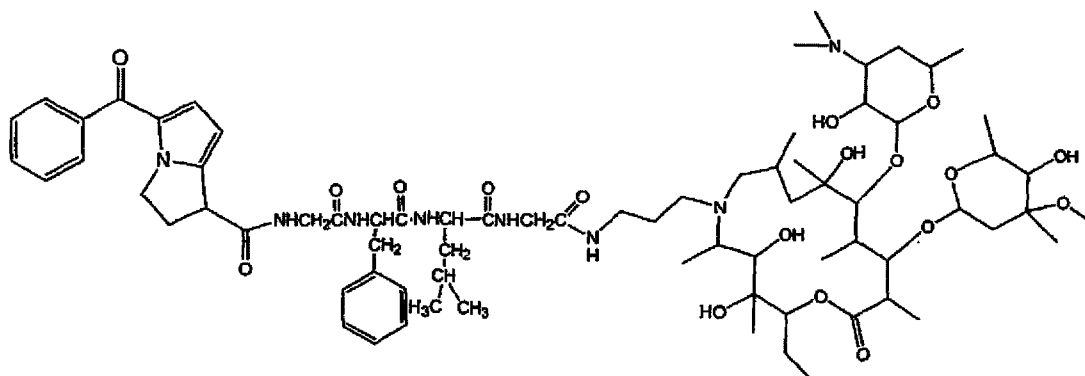
- 5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10 19.

- Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

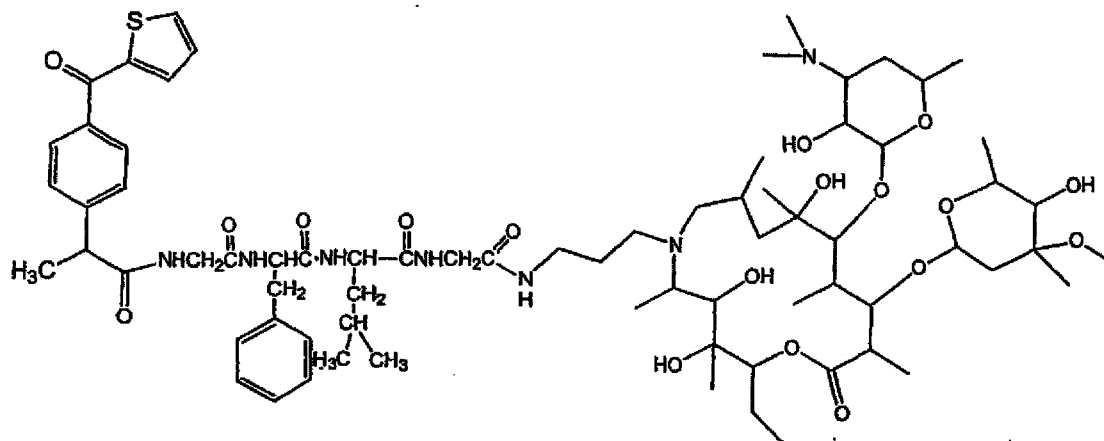


eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

62

20.

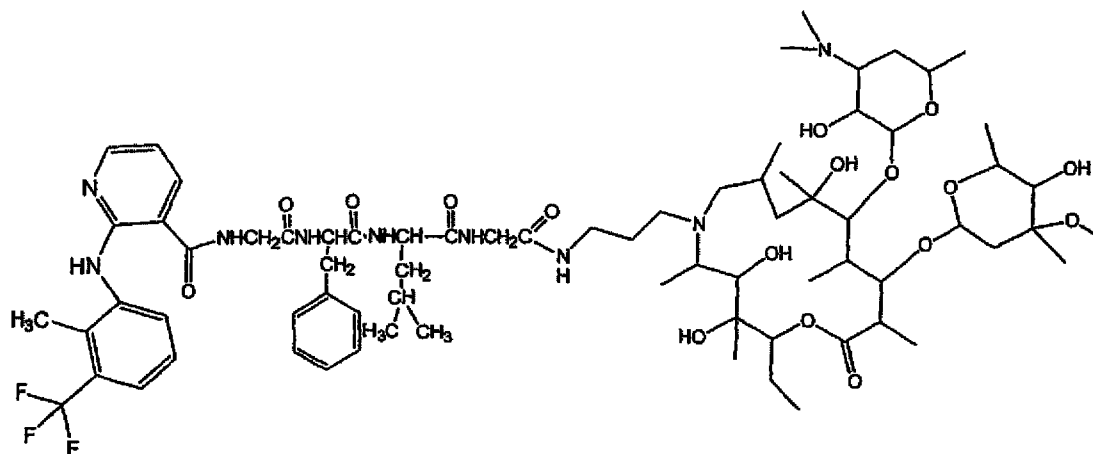
Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



5 eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

21.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



10

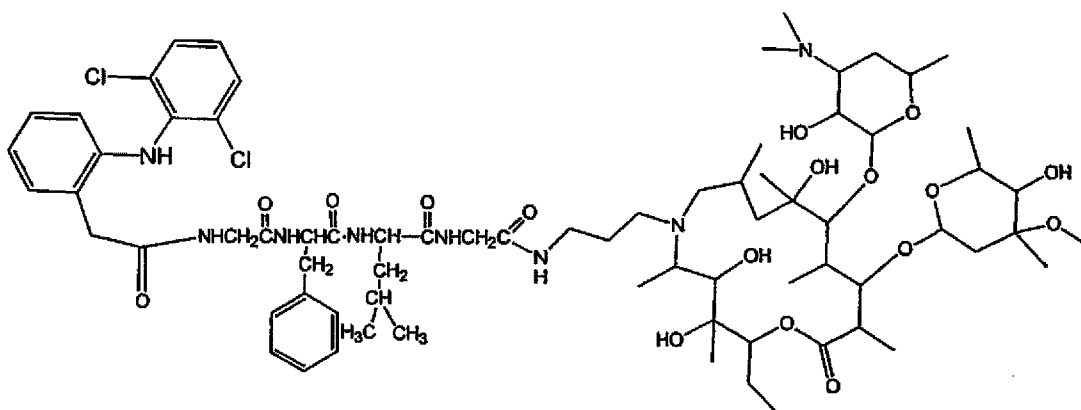
eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

22.

Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:

15

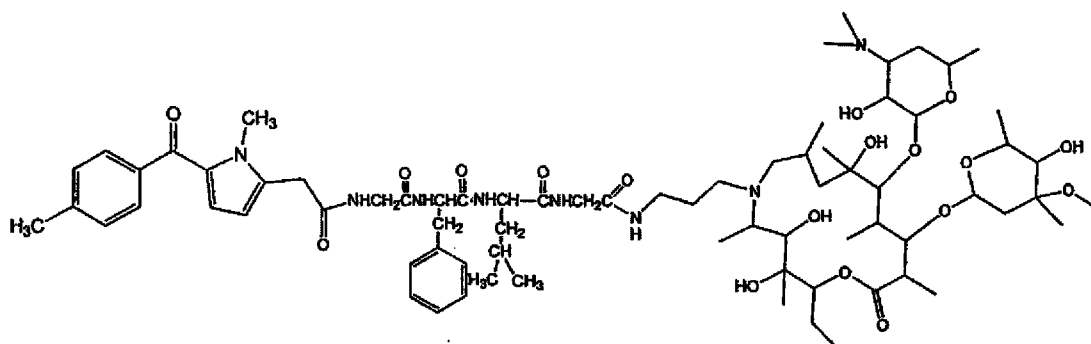
63



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

23.

- 5 Forbindelse ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d formelen:



eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat derav.

10 24.

Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en forbindelse eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller solvat av forbindelsen i henhold til et hvilket som helst av kravene 1-23 samt et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel eller bærer.

15

25.

- Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av inflammatoriske sykdommer, forstyrrelser eller tilstander som induseres av eller assosieres med en uønsket inflammatorisk immunrespons, spesielt sykdommer eller tilstander som induseres eller assosieres med en eksessiv sekresjon av TNF- eller IL-1.
- 20

26.

Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av inflammatorisk tilstand eller en immun- eller anafylaktisk forstyrrelse med infiltrering av leukocytter i betent vev.

5

27.

Anvendelse ifølge krav 26, der nevnte tilstand eller forstyrrelse er valgt fra gruppen bestående av astma, adult respiratorisk distress-syndrom, bronkitt og cystisk fibrose.

10

28.

Anvendelse ifølge krav 26, der nevnte inflammatoriske tilstand eller forstyrrelse er valgt fra gruppen bestående av inflammatoriske tilstander eller immunforstyrrelser i lungene, leddene, øynene, tarmen, huden og hjertet.

15

29.

Anvendelse ifølge krav 26, der nevnte inflammatoriske tilstand eller forstyrrelse er valgt fra gruppen bestående av astma, adult respiratorisk distress-syndrom, bronkitt og cystisk fibrose, reumatoid artritt, reumatoid spondylitt, osteoartritt, gikt, uvetitt, konjunktivitt, inflammatoriske tarmforstyrrelser, Crohns sykdom, ulcerativ colitt, distal procitt, psoriasis, eksem, dermatitt, koronar infarktskade, kronisk inflammasjon, endotoksinsjokk, og glatt muskel proliferasjonsforstyrrelser.

20

30.

Anvendelse av en forbindelse ifølge krav 1, for fremstilling av et medikament for å redusere inflammasjon i et angrepet organ eller vev.

25