



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



HR P20050174 A2

(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20050174 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 31/28
C 07 C 211/00
C 07 C 213/00
C 07 C 215/00
C 07 C 217/00
C 07 C 229/00
C 07 D 207/06
C 07 D 211/92
C 07 D 213/18
C 07 D 213/20

(21) Broj prijave u HR: P20050174A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 22.02.2005.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.10.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US03/023031
Datum podnošenja međunarodne prijave: 22.07.2003.
(87) Broj međunarodne objave: WO 04/009034
Datum međunarodne objave: 29.01.2004.

(31) Broj prve prijave: 10/202,346
60/434,742
10/436,958
10/447,585

(32) Datum podnošenja prve prijave: 23.07.2002.
18.12.2002.
12.05.2003.
28.05.2003.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
US
US
US

(71) Podnositelji prijave:

Attenuon, LLC, 10130 Sorrento Valley Road, Suite B, San Diego, 92121 CA, US
The Regents of the University of Michigan, Wolverine Tower Room 2071, 3003 South
State Street, Ann Arbor, 48109-1280 MI, US

(72) Izumitelji:

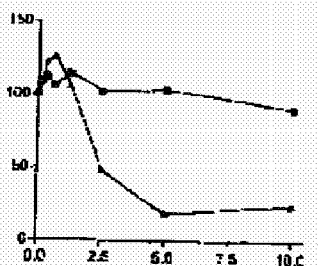
Robert, J. Ternansky, 4125 Shorepoint Way, San Diego, 92130 CA, US
Andrew Mazar, 10816 Vereda Sol Del Dios, San Diego, 92130 CA, US
Patricia, L. Gladstone, 9242 Pebbelstone Lane, San Diego, 92126 CA, US
Dimitri Coucouvanis, 3750 Lamplighter, Ann Arbor, 48103 MI, US
Amy, L. Allan, 542 San Deguito Drive, Encinitas, 92024 CA, US
Sean, M. O'Hare, 812 Tourmaline Street #8, San Diego, 92109 CA, US
Mellissa, L.P. Price, 908 Nalbey Street, Cardiff, 92007 CA, US
Steven, Robert Pirie-Shepperd, 1543 Kings Cross Drive, Cardiff, 92007 CA, US
Fernando Donate, 10744 Portobelo Drive, San Diego, 92124 CA, US
Dragutin Sikirić, Zagreb, HR

(74) Punomoćnik:

(54) Naziv izuma: ANALOZI TIOMOLIBDATA I NJIHOVO KORIŠTENJE

(57) Sažetak: Ovaj izum donosi novitetne derivate tiomolibdata, metode njihove proizvodnje, farmaceutske spojeve koji ih sadržavaju, metode korištenja novitetnih derivata tiomolibdata u tretmanu bolesti koje su povezane s aberantom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, s pretilošću ili poremećenom regulacijom NF- κ B, kao i metode korištenja farmaceutskih kompozicija koje podrazumijevaju derivate tiomolibdata u tretiranju bolesti koje su povezane s aberantom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, s pretilošću ili poremećenom regulacijom NF- κ B.

Učinak bis(holin)tetratiomolibdata na
proliferaciju endotelnih stanica



Y = % proliferacije (iniciran sa 1 ng/mL bFGF)
X = Supstanca (μM)
--- Kontrola
-▲- Bis(holin)tetratiomolibdat

HR P20050174 A2

OPIS IZUMA**Područje razmatranja izuma**

- 5 Ovaj se izum odnosi na novitetne derivate tiomolibdata, metode njihovog dobivanja, farmaceutske kompozicije novitetnih derivata tiomolibdata i metode korištenja novitetnih derivata tiomolibdata u tretmanu ili prevenciji bolesti koje su povezane s pojavom aberantne vaskularizacije, poremećaja metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću i poremećenom regulacijom NF- κ B sustava.

Pozadina izuma

- 10 Većina oblika raka proizlazi iz čvrstih tumorskih tvorbi (Shockley et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. **1991**, 617:367-382), koji su obično klinički rezistentni na terapije kao što je primjerice korištenje monoklonalnih antitijela i imunotoksina. Anti-angiogena terapija za tretman raka razvijena je iz pretpostavke da čvrsti tumori zahtijevaju angiogenezu (npr. novo stvaranje krvnih žila) za održivi rast (Folkman, Ann. Surg. **1972**, 175:409-416; Folkman, Mol. Med. **1995**, 1(2):120-122; Folkman, Breast Cancer Res. Treat. **1995**, 36(2):109-118; Hanahan et al., Cell **1996**, 86(3):353-364). Pokazana je učinkovitost anti-angiogene terapije kod životinjskih modela (Millauer et al., Cancer Res. **1996**, 56:1615-1620; Borgstrom et al., Prostate **1998**, 35:1-10; Benjamin et al., J.Clin.Invest. **1999**, 103:159-165; Marajver et al., Proceedings of Special AACR Conference on Angiogenesis and Cancer **1998**, Abstract #B-11, January 22-24). U nedostatku angiogeneze, unutarnji slojevi stanica bivaju nedovoljno opskrbljeni hranom i kisikom. Nadalje, angiogeneza (npr. aberantna vaskularizacija) je povezana s brojnim drugim vrstama oboljenja (primjerice, okularna neovaskularna bolest, makularna degeneracija, reumatoidni artritis, itd.). U posljednje je vrijeme inhibicija angiogeneze dovedena u neposredna vezu sa gubitkom adipoznog tkiva i tjelesne težine kod životinjskih modela, što navodi na pomisao da anti-angiogena terapija može biti korisna kod prevencije gojaznosti (Rupnick et al., Proc.Natl.Acad. Sci 2002, 99:10730-10735).

- Nasuprot tome, normalno tkivo ne zahtjeva angiogenezu osim u posebnim okolnostima kao što su primjerice zacjeljivanje rane, poliferacija internih veza uterusa tijekom menstrualnog ciklusa, itd.). U skladu s rečenim, pretpostavka angiogeneze je značajna razlika između tumorske i normalne stanice. Važno je za naglasiti da je ovisnost tumorske stanice o angiogenezi u usporedbi s normalnom stanicom, kvantitativno veća od razlike koja se pojavljuje kod stanične replikacije i stanične smrti između normalne i tumorske stanice, što se često koristi kod terapije raka.

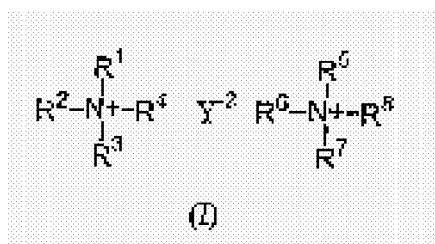
- Angiogeneza zahtjeva bakar, kao što je već i pokazano u nizu studija (Parke et al., Am.J.Pathol. **1988**, 69:475-482; Gullino, Anticancer Res. **1986**, 6(2):153-158). Poznati su slučajevi pokušaja da se prevenira angiogeneza, te time i rast samog tumora kod životinjskih modela putem reduciranja *in vivo* količina bakra (Brem et al., Neurosurgery **1990**, 26:391-396; Brem et al., Am.J.Pathol. **1990**, 137(5):1121-1142; Yoshida et al., Neurosurgery **1995**, 37(2):287-295). Ovi su slučajevi podrazumijevali inkorporiranje helatora bakra, kao i dijete sa smanjenim unosom bakra. U posljednje vrijeme, u Brewer et al., Međunarodna prijava br. PCT/US99/20374 pokazano je da helatori bakra (npr. tetramolibdat) mogu biti učinkoviti u tretiranju bolesti (primjerice čvrstih tumora) koje podrazumijevaju angiogenezu. Pored indukcije angiogeneze, bakar može također imati neposrednu ulogu u rastu i opstanku tumorskih stanica. Visoke razine bakra postoje kako u plazmi, tako i u tumorskom tkivu pacijenata s mnogim vrstama čvrstih tumora (Chakravarty et al., J.Cancer.Res.Clin.Oncol. **1984**, 108:312-315). U posljednje je vrijeme pokazano da tetramolibdat regulira ekspresiju NF- κ B kao što i inhibira translokaciju u jezgru kod inflamatorne stanične linije raka dojke SUM 149 (Pan et al. m Cancer Res. 2002, 62:4854-4859). NF- κ B sustav može biti uključen u u medijaciju opstanka stanica tumora, te se zaključuje da regulacija ekspresije tumorskih stanica s tetramolibdom navodi na neposredni učinak helacije bakra na opstanak tumora.

- Shodno tome, novitetne tiomolibdat supstance koje su helatori bakra, potrebne su za cjelovito istraživanje potencijala helatora bakra u tretmanu i/ili prevenciji angiogeneze i reduciranju vijabilnosti tumorskih stanica. Rečene novitetne tiomolibdat supstance mogu biti učinkovite u tretmanu različitih bolesti koje su povezane s angiogenezom kao što su primjerice rak, poremećaji metabolizma bakra, neurodegenerativni poremećaji ili pretilost, kao i u tretiranju bolesti kao što su inflamatorni poremećaji kada je poremećena regulacija puta NF- κ B.

Sažetak izuma

- 55 Ovaj izum zadovoljava različite terapijske potrebe putem omogućavanja novitetnih derivata tiomolibdata, metoda dobivanja novitetnih derivata tiomolibdata; farmaceustkih kompozicija novitetnih derivata tiomolibdata, metoda korištenja novitetnih derivata tiomolibdata i njihovih farmaceutskih kompozicija u tretmanu bolesti koje su povezane s aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću i poremećajem u regulaciji NF- κ B sustava.

U svom prvom aspektu, ovaj izum omogućava supstancu strukturne formule (I):



ili njezin solvat ili hidrat ili N-oksid, koji je naznačen slijedećim parametrima:

5 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6$ i R^7 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil;

10 R^4 i R^8 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil ili pak nedostaju kada je N dio aromatskog prstena;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

15 opcionalno, R^5 i R^6 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno, R^2 i R^3 zajedno, i R^2 i R^4 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

20 opcionalno, R^5 i R^6 zajedno, R^6 i R^7 zajedno, i R^6 i R^8 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^3 i R^7 zajedno zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil; i

25 Y^{-2} predstavlja $(MoS_4)^{-2}$, $(Mo_2S_{12})^{-2}$, $(Mo_2S_9)^{-2}$, $(Mo_2S_7)^{-2}$, $(Mo_2S_8)^{-2}$, $(Mo_2S_{11})^{-2}$, $(Mo_2S_6)^{-2}$ ili $(Mo_2S_{13})^{-2}$;

uz uvjet da ako je Y $(MoS_4)^{-2}$ i $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ i R^8 su jednaki, tada svaki od $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7$ i R^8 ne predstavlja vodik, metil, etil ili n-propil.

30 U svom drugom aspektu, ovaj izum omogućava farmaceutske kompozicije novitetnih derivata tiomolibdata. Farmaceutske kompozicije uobičajeno podrazumijevaju jedan ili više derivata tiomolibdata, njihovih hidrata, solvata ili N-okside, kao i farmaceutski prihvatljivi diluent, nosač, ekscipijent i adjuvant. Njihov će izbor ovisiti između ostalog o željenom načinu aplikacije.

35 U svom trećem aspektu, ovaj izum omogućava metode tretiranja ili preveniranja bolesti koje su karakterizirane aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću ili poremećajem u regulaciji NF-kB. Metode općenito podrazumijevaju apliciranje terapijski učinkovite količine novitetnih derivata tiomolibdata i/ili njihovih farmaceutskih kompozicija.

40 **Kratak opis ilustracija**

Ilustracija 1 pokazuje efekt bis(holin)tetratiomolibdata na produkciju endotelnih stanica;

Ilustracija 2 pokazuje da bis(holin)tetratiomolibdat ne inducira apoptozu u endotelnim stanicama;

Ilustracija 3 pokazuje da je bis(holin)tetramolibdat anti-angiogen u matrigel eseju

45 Ilustracija 4 pokazuje da bis(holin)tetramolibdat regulira sekreciju IL-8 iz konfluentnih endotelnih stanica;

Ilustracija 5 pokazuje da bis(holin)tetramolibdat regulira ekspresiju IL-8 iz aktiviranim monocita; i

Ilustracija 6 pokazuje da bis(holin)tetramolibdat uzrokuje smanjenje razine mišjeg KC u plazmi.

Detaljan opis izuma**Definicije**

5 „Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma“ je izraz koji se odnosi na supstance obuhvaćene strukturnom formulom (I) koja se ovdje navodi i podrazumijeva sve specifične supstance koje su obuhvaćene generičkom formulom čija je struktura ovdje navedena. Supstance mogu biti određene ili svojom kemijskom strukturom i/ili svojim imenom. Kada su kemijska struktura i kemijsko ime u konfliktu, kemijska struktura određuje identitet supstance. Supstance koje se razmatraju u ovom izumu mogu podrazumijevati jedan ili više kiralnih središta i/ili dvostrukih veza, te stoga mogu postojati kao stereizomeri, kao što su izomeri s dvostrukim vezama (npr. geometrijski izomeri), enantiomeri ili diastereomeri. S skladu s rečenim, kemijske strukture koje se ovdje navode podrazumijevaju sve moguće enantiomere i stereoisomere prikazanih supstanci uključujući također i stereoisomerno čiste forme (npr. geometrijski čiste, enantiomerno čiste ili diastereoisomerno čiste) i enantiomerne i stereoisomerne smjese. Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu također postojati u nekoliko tautomernih formi. A skladu s rečenim, kemijske strukture koje su ovdje prikazane podrazumijevaju također izotopički označene supstance gdje jedan ili više atoma ima atomsku masu koja je različita od atomske mase koja je uobičajeno prisutna u prirodi. Primjeri izotopa koji mogu biti inkorporirani u supstance koje se razmatraju u ovom izumu podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničeni na, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , itd. Supstance koje se razmatraju u ovom izumu mogu postojati kako u solvatiziranom, tako i u nesolvatiziranom obliku, podrazumijevajući također hidratirane forme i N-okside. Općenito uzevši, hidrati, solvati i N-oksidu su u kontekstu razmatranja ovog izuma. Pojedine supstance koje se razmatraju u ovom izumu mogu postojati u multiplim kristaliničnim ili amorfnim oblicima. Općenito uzevši, svi fizički oblici su ekvivalentni za korištenje u kontekstu ovog izuma. Nadalje, treba razumjeti da kada su prikazane djelomične strukture supstanci koje se razmatraju u ovom izumu, zagrade ukazuju na mjesto dodira djelomične strukture na ostatak molekule.

25 „Alkil“ sam po sebi ili kao dio drugog supstituenta, odnosi se na zasićeni ili nezasićeni, razgranati, ravnolančani ili ciklički monovalentni ugljikovodični radikal koji je dobiven uklanjanjem jednog atoma vodika od jednog atoma ugljika u izvornom alkanu, alkenu ili alkinu. Uobičajena alkil grupa podrazumijeva, no istovremeno nije ograničena na, metil; etile kao što su etanil, etenil, etinil; propile kao što su propan-1-il, propan-2-il, ciklopropan-1-il, prop-1-en-1-il, prop-1-en-2-il, prop-2-en-1-il (alil), cikloprop-1-en-1-il; cikloprop-2-en-1-il, prop-1-in-1-il, prop-2-in-1-il, itd.; butile kao što su butan-1-il, butan-2-il, 2-metil-propan-1-il, 2-metil-propan-2-il, ciklobutan-1-il, but-1-en-1-il, but-1-en-2-il, 2-metil-prop-1-en-1-il, but-2-en-1-il, but-2-en-2-il, buta-1,3-dien-1-il, buta-1,3-dien-2-il, ciklobut-1-en-1-il, ciklobut-1-en-3-il, ciklobuta-1,3-dien-1-il, but-1-in-1-il, but-1-in-3-il, but-3-in-1-il, itd. i slično.

Izraz „alkil“ je specifično usmjeren na grupe koje imaju bilo koji stupanj zasićenosti, primjerice grupe koje posjeduju samo jednostruke C-C veze, grupe koje posjeduju jednu ili više dvostrukih C-C veza, grupe koje posjeduju jednu ili više trostrukih C-C veza, kao i grupe koje posjeduju smjese jednostrukih, dvostrukih i trostrukih C-C veza. Tamo gdje se navodi specifična razina zasićenosti, koriste se izrazi „alkanil“, „alkenil“ i „alkinil“. Preferabilno, alkilna grupa podrazumijeva od 1 do 20 atoma ugljika. U boljem slučaju, podrazumijeva od 1 do 0 atoma ugljika, dok u najboljem slučaju podrazumijeva od 1 do 6 atoma ugljika.

40 „Alkanil“ samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta, odnosi se na zasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal koji je dobiven uklanjanjem jednog atoma vodika od jednog atoma ugljika u izvornom alkanu. Uobičajene alkanilne grupe podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničene na, metanil; etanil; propanile kao što su propan-1-il, propan-2-il (izopropil), ciklopropan-1-il, itd.; butanile kao što su butan-1-il, butan-2-il (sek-butil), 2-metil-propan-1-il (izobutil), 2-metil-propan-2-il (t-butil), ciklobutan-1-il itd. i slično.

50 „Alkenil“ samostalno ili pak dio nekog drugog supstituenta, odnosi se na nezasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal koji posjeduje barem jednu C-C dvostruku vezu koja je dobivena uklanjanjem jednog atoma vodika od jednog atoma ugljika u izvornom alkanu. Grupa može biti ili u cis ili u trans konformaciji u odnosi na dvostruku(e) vezu(e). Uobičajene alkenilne grupe podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničene na, etenil; propenile kao što su prop-1-en-1-il, prop-1-en-2-il, prop-2-en-1-il (alil), prop-2-en-2-il, cikloprop-1-en-1-il, cikloprop-2-en-1-il; butenile kao što su but-1-en-1-il, but-1-en-2-il, 2-metil-prop-1-en-1-il, but-2-en-1-il, but-2-en-2-il, buta-1,3-dien-1-il, buta-1,3-dien-2-il, ciklobut-1-en-1-il, ciklobut-1-en-3-il, ciklobuta-1,3-dien-1-il, itd. i slično.

55 „Alkinil“ samostalno ili pak dio nekog drugog supstituenta, odnosi se na nezasićeni razgranati, ravnolančani ili ciklički alkil radikal koji posjeduje barem jednu C-C trostruku vezu koja je dobivena uklanjanjem jednog atoma vodika od jednog atoma ugljika u izvornom alkinu. Uobičajene alkinilne grupe podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničene na, etinil; propinile kao što su prop-1-in-1-il, prop-2-in-1-il, itd.; butinile kao što su but-1-in-1-il, but-1-in-3-il, but-3-in-1-il, itd. i slično.

60

„Alkildiil“ samostalno ili pak dio nekog drugog supstituenta, odnosi se na zasićenu ili nezasićenu razgranatu, ravnolančanu ili cikličku divalentnu ugljikovodičnu grupu koja je dobivena uklanjanjem jednog atoma vodika od svakog od dva različita atoma ugljika u izvornom alkanu, alkenu ili alkinu.

Dva monovalentna radikalna centra ili svaka valencija divalentnog radikalnog centra mogu tvoriti veze s istim ili različitim atomima. Uobičajene alkildiil grupe podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničene na metandiil; etildiile kao što su etan-1,1-diil, etan-1,2-diil, eten-1,1-diil, eten-1,2-diil; propildiile kao što su propan-1,1-diil, propan-1,2-diil, propan-2,2-diil, propan-1,3-diil, ciklopropan-1,1-diil, ciklopropan-1,2-diil, propan-1-en-1,1-diil, propen-1-en-1,2-diil, propan-2-en-1,2-diil, propan-1-en-1,3-diil, ciklopropan-1-en-1,2-diil, ciklopropan-2-en-1,2-diil, ciklopropan-2-en-1,1-diil, propan-1-in-1,3-diil, itd.; butildiile kao što su butan-1,1-diil, butan-1,2-diil, butan-1,3-diil, butan-1,4-diil, butan-2,2-diil, 2-metil-propan-1,1-diil, 2-metil-propan-1,2-diil, ciklobutan-1,1-diil; ciklobutan-1,2-diil, ciklobutan-1,3-diil, but-1-en-1,1-diil, but-1-en-1,2-diil, but-1-en-1,3-diil, but-1-en-1,4-diil, 2-metil-prop-1-en-1,1-diil, 2-metaniliden-propan-1,1-diil, buta-1,3-dien-1,1-diil, buta-1,3-dien-1,2-diil, buta-1,3-dien-1,3-diil, buta-1,3-dien-1,4-diil, ciklobut-1-en-1,2-diil, ciklobut-1-en-1,3-diil, ciklobut-2-en-1,2-diil, ciklobuta-1,3-dien-1,2-diil, ciklobuta-1,3-dien-1,3-diil, but-1-in-1,3-diil, but-1-in-1,4-diil, buta-1,3-diin-1,4-diil, itd. i slično. Tamo gdje se navode specifične razine zasićenosti, koristi se nomenklatura alkanildiil, alkenildiil i/ili alkinildiil. Preferabilno, alkildiil grupa je (C₁-C₂₀)alkildiil. U boljem slučaju ista predstavlja (C₁-C₁₀)alkildiil, dok u najboljem slučaju predstavlja (C₁-C₆)alkildiil. Preferiraju se zasićene acikličke alkanildiil grupe u kojima su radikalni centri na terminalnim atomima ugljika, primjerice metandiil(metano); etan-1,2-diil(etano); propan-1,3-diil(propano); butan-1,4-diil(butano); i slično (također se odnosi na alkileno, definirano *infra*).

„Alkileno“ samostalno ili pak dio nekog drugog supstituenta, ravnolančanu alkildiil grupu koja posjeduje dva terminalna monovalentna radikalna centra koji su dobiveni uklanjanjem jednog atoma vodika od svakog od dva terminalna atoma ugljika u ravnolančanom u izvornom alkanu, alkenu ili alkinu. Uobičajene elkileno grupe podrazumijevaju, no istovremeno nisu ograničene na metano; etilene kao što su etano, eteno i etino; propilene kao što su propano, prop[1]eno, propa[1,2]dieno, prop[1]ino, itd.; butilene kao što su butano, but[1]eno, but[2]eno, buta[1,3]dieno, but[1]ino, but[2]ino, but[1,3]diino, itd. i slično. Tamo gdje se navode specifične razine zasićenosti, koristi se nomenklatura alkaneno, alkeno i/ili alkino. Preferabilno, alkileno grupa je (C₁-C₂₀)alkileno. U boljem slučaju ista predstavlja (C₁-C₁₀)alkileno, dok u najboljem slučaju predstavlja (C₁-C₆)alkileno. Preferiraju se ravnolančane zasićene alkaneno grupe, kao što su primjerice metano, etano, propano, butano i slično.

„Acil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na radikal -C(O)R³⁰, u kojem R³⁰ predstavlja vodik, alkil, cikloalkil, cikloheteroalkil, aril, arilalkil, heteroalkil, heteroaril, heteroarilalkil kao što su ovdje definirani. Reprezentativni primjeri podrazumijevaju, bez da su istovremeni ograničeni na iste, formil, acetil, cikloheksilkarbonil, cikloheksilmetilkarbonil, benzoil, benzilkarbonil i slično.

„Acilamino“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na radikal -NR³¹-C(O)R³², u kojem R³¹ i R³² svaki zasebno i međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, cikloalkil, cikloheteroalkil, aril, arilalkil, heteroalkil, heteroaril, heteroarilalkil kao što su ovdje definirani. Reprezentativni primjeri podrazumijevaju, bez da su istovremeni ograničeni na iste, formilamino, acetilamino, cikloheksilkarbonilamino, cikloheksilmetilkarbonilamino, benzoilamino, benzilkarbonilamino i slično.

„Alkoksi“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na radikal -OR³³, u kojem R³³ predstavlja alkil ili cikloalkil grupu kao što su ovdje definirane. Reprezentativni primjeri podrazumijevaju, bez da su istovremeni ograničeni na iste, metoksi, etoksi, propoksi, butoksi, cikloheksiloksi i slično.

„Alkoksikarbonil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na radikal -C(O)OR³⁴, u kojem R³⁴ predstavlja alkil ili cikloalkil grupu kao što su ovdje definirane.

„Aril“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na monovalentni aromatski ugljikovodični radikal koji je dobiven uklanjanjem jednog atoma vodika od jednog atoma ugljika iz izvornog aromatskog prstenastog sustava. Uobičajene aril grupe podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, grupe koje su izvedene iz aceantrilena, acenaftilena, acefenantrilenam antracena, azulena, benzena, krizena, koronena, fluorantena, fluorena, heksacena, heksafena, heskalena, as-indacena, s-indacena, indana, indena, naftalena, oktacena, oktafena, oktalena, ovalena, penta-2,4-diena, pentacena, pentalena, pentafena, perilena, fenalena, fenantrena, picena, pleadena, pirena, pirantrena, rubicena, trifenilena, trinaftalena i slično. U preferiranom slučaju, aril grupa podrazumijeva 6 do 20 atoma ugljika, dok u najboljem slučaju podrazumijeva 6 do 12 atoma ugljika.

„Arilalkil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na aciklički alkil radikal u kojem je jedan atom vodika koji je vezan na atom ugljika, uobičajeno na terminalni ili sp³ atom ugljika, zamijenjen arilnom grupom. Uobičajene arilalkil grupe podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, benzil, 2-feniletan-1-il, 2-feniletan-1-il, naftilmetil, 2-naftiletan-1-il, 2-naftiletan-1-il, naftobenzil, 2-naftofeniletan-1-il i alično. U slučajevima kada su potrebne specifične alkil građevne jedinice, koriste se izrazi arilalkanil, arilalkenil i arilalkinil. U preferiranom slučaju,

arilalkil grupa je (C₆-C₃₀)arilalkil, primjerice alkanil, alkenil ili alkinil jedinica arilalkil grupe je (C₁-C₁₀) i aril jedinica je (C₆-C₂₀). U više preferiranom slučaju arilalkil grupa je (C₆-C₂₀)arilalkil, primjerice alkanil, alkenil ili alkinil jedinica arilalkil grupe je (C₁-C₈) i aril jedinica je (C₆-C₁₂).

„Cikloalkil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na zasićeni ili nezasićeni ciklički alkil radikal. U slučajevima kada je potrebna specifična razina zasićenosti, koristi se nomenklatura „cikloalkanil“ ili „cikloalkenil“. Uobičajene cikloalkil grupe podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, grupe koje su dobivene iz ciklopropana, ciklobutana, ciklopentana, cikloheksana i slično. U preferiranom slučaju cikloalkil grupa je (C₃-C₁₀)cikloalkil, a u još boljem slučaju (C₃-C₇)cikloalkil.

„Cikloheteroalkil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na zasićeni ili nezasićeni ciklički alkil radikal u kojem su jedan ili više atoma ugljika (kao i svi obližnji atomi vodika) neovisno zamijenjeni jednakim ili različitim heteroatomom. Uobičajeni heteroatom koji zamjenjuju atom(e) ugljika podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, N, P, O, S, Si itd. U slučajevima kada je potrebna specifična razina zasićenosti, koristi se nomenklatura „cikloheteroalkanil“ ili „cikloheteroalkenil“. Uobičajene cikloheteroalkil grupe podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, grupe koje su dobivene iz epoksida, azirina, tiorana, imidazolidina, morfolina, piperazina, piperidina, pirazolidina, pirolidina, kvinuklidina i slično.

„Heteroalkil, Heteroalkanil, Heteroalkenil, Heteroalkanil, Heteroalkildiil i Heteroalkileno“ se samostalno ili pak kao dijelovi nekog drugog supstituenta odnose na alkil, alkanil, alkenil, alkinil, alkildiil i alkileno grupe, u kojima su jedan ili više atoma ugljika (kao i svi pridruženi atomi vodika) neovisno zamijenjeni jednakim ili različitim heteroatomskim grupama. Heteroatomske grupe koje se mogu ubrajati u rečene grupe podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, -O-, -S-, -O-O-, -S-S-, -O-S-, -NR³⁵R³⁶-, =N-N=, -N=N-, -N=N-NR³⁷R³⁸-, -PR³⁹-, -P(O)₂-, -POR⁴⁰-, -O-P(O)₂-, -OS-, -SO₂-, -SnR⁴¹R⁴²- i slično, gdje R³⁵, R³⁶, R³⁷, R³⁸, R³⁹, R⁴⁰, NR⁴¹ i R⁴² međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroalkil, supstituirani heteroalkil, heteroarilalkil ili supstituirani heteroarilalkil.

„Heteroaril“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na monovalentni heteroatomski radikal koji je dobiven uklanjanjem jednog atoma iz jednog atoma ugljika izvornog heteroaromatskog prstenastog sustava. Uobičajene heteroaril grupe podrazumijevaju, no s tim da nisu istovremeno i ograničene na, grupe koje su dobivene iz akridina, arindola, karbazola, β-karbolina, kromana, kromena, cinolina, furana, imidazola, indazola, indola, indolina, indolizina, izobenzofurana, izokromena, izoindola, izoindolina, izokvinolina, izotiazola, izoksazola, naftiridina, oksadiazola, oksazola, perimidina, fenantridina, fenantrolina, fenazina, ftalazina, pteridina, purina, pirana, pirazina, pirazola, piridazina, piridina, pirimidina, pirola, pirolizina, kvinazolina, kvinolina, kvinolizina, kvinoksalina, tetrazola, tiadiazola, tiazola, tiofena, triazola, ksantena i slično. U preferiranom slučaju, heteroaril grupa je 5-20 članski heteroaril. Heteroaril grupe koje se preferiraju su one dobivene iz tiofena, pirola, benzotiofena, benzofurana, indola, piridina, kvinolina, imidazola, oksazola i pirazina.

„Heteroarilalkil“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na aciklički alkil radikal u kojem je jedan od vodikovih atoma koji je vezan na atom ugljika, uobičajeno terminalni ili sp³ atom ugljika, zamijenjen s heteroaril grupom. U slučajevima kada su potrebne specifične alkil građevne jedinice, koriste se izrazi heteroarilalkanil, heteroarilalkenil i/ili heteroarilalkinil. U preferiranom slučaju, heteroarilalkil grupa je 6-30 članski heteroarilalkil, primjerice alkanil, alkenil ili alkinil jedinica heteroarilalkila koji je 1-8 članski i heteroaril jedinica je 5-12 članski heteroaril.

„Izvorni aromatski prstenasti sustav“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na nezasićeni ciklički ili policiklički prstenasti sustav koji podrazumijeva konjugirani π elektronski sustav. Specifično se pod rečenim izrazom podrazumijevaju fuzionirani prstenasti sustavi i kojima je jedan ili više prstenova aromatsko i u kojima je jedan ili više prstenova zasićeno ili nezasićeno, kao što su primjerice fluoren, indan, inden, fenalen itd. Uobičajeni izvorni aromatski prstenasti sustavi podrazumijevaju, no s tim da nisu istovremeno i ograničeni na, aceantrilen, acenaftalen, acfenantrilen, antracen, azulen, benzen, krizen, korenen, fluoranten, fluoren, heksacen, heksafen, heksalen, as-indacen, s-indacen, indan, inden, naftalen, oktafen, oktalen, ovalen, penta-2,4-dien, pntacen, pentalen, pentafen, perilen, fenalen, fenantren, picen, plejaden, piren, pirantren, rubicen, trifenilen, trinaftalen i slično.

„Izvorni heteroaromatski prstenasti sustav“ se samostalno ili pak kao dio nekog drugog supstituenta odnosi na izvorni aromatski prstenasti sustav u kojem je jedan ili više atoma ugljika (podrazumijevajući također i pridružene atome vodika) zamijenjeno sa jednakim ili različitim heteroatomima. Uobičajeni heteroatom koji zamjenjuju atome ugljika podrazumijevaju, no s tim da nisu istovremeno i ograničeni na, N, P, S, O, Si itd. Specifično su definicijom „izvorni heteroaromatski prstenasti sustav“ obuhvaćeni također i fuzionirani prstenasti sustavi u kojima je jedan ili više prstenova aromatsko, i jedan ili više prstenova je zasićeno ili nezasićeno kao što su primjerice arindol, benzodioksan, benzofuran, kroman, kromen, indol, indolin, ksanten itd. Uobičajeni izvorni heteroaromatski prstenasti sustavi podrazumijevaju, s tim da nisu istovremeno i ograničeni na, arindol, karbazol, β-karbolin, kroman, kromen, cinolin,

furan, imidazol, indazol, indol, indolin, indolizin, izobenzofuran, izokromen, izoindol, izoindolin, izokvinolin, izotiazol, izoksazol, naftiridin, oksadiazol, oksazol, perimidin, fenantridin, fenantrolin, fenazin, ftalazin, pteridin, purin, piran, pirazin, pirazol, piridazin, piridin, pirimidin, pirol, pirolizin, kvinazolin, kvinolin, kvinolizin, kvinoksalin, tetrazol, tiadiazol, tiazol, tiofen, triazol, ksanten i slično.

„Farmaceutski prihvatljiva sol“ se odnosi na sol supstance koja se razmatra u kontekstu ovog izuma, koja pokazuje željenu farmakološku aktivnost izvorne supstance. Takve soli podrazumijevaju: (1) kiselinske adicijske soli, koje su formirane s anorganskim kiselinama kao što su klorovodična kiselina, bromovodična kiselina, sumporna kiselina, dušična kiselina, fosforna kiselina i slično; ili su formirane s organskim kiselinama kao što su octena kiselina, propionska kiselina, heksanoična kiselina, ciklopentanpropionska kiselina, glikolna kiselina, piruvična kiselina, mliječna kiselina, malonska kiselina, sukcijska kiselina, maleinska kiselina, malinska kiselina, fumarna kiselina, tartarna kiselina, limunska kiselina, benzoična kiselina, 3-(4-hidroksibenzoil)benzoična kiselina, cimetna kiselina, bademska kiselina, metansulfonska kiselina, etansulfonska kiselina, 1,2-etan-disulfonska kiselina, 2-hidroksietansulfonska kiselina, benzensulfonska kiselina, 4-klorbenzensulfonska kiselina, 2-naftalensulfonska kiselina, 4-toluensulfonska kiselina, kamforsulfonska kiselina, 4-metilbiciklo[2.2.2]-okt-2-en-1-karboksilična kiselina, glukheptonska kiselina, 3-fenilpropionska kiselina, trimetiloktenu kiselina, tercijarna butiloktenu kiselina, lauril sumporna kiselina, glukonska kiselina, glutaminska kiselina, hidroksinaftoična kiselina, salicilna kiselina, stearinska kiselina, mukonska kiselina i slično; ili (2) soli koje bivaju formirane kada kiselinski proton koji je prisutan u izvornoj supstanci biva zamjenjen s metalnim ionom, primjerice alkalni metalni ion, alkalni zemni ion ili aluminij ion; ili koordinati s organskom bazom kao što je etanolamin, dietanolamin, trietanolamin, N-metilglukamin i slično.

„Farmaceutski prihvatljivi nosač“ se odnosi na diluent, adjuvant, ekscipijent ili nosač uz pomoć kojeg supstanca koja se razmatra u kontekstu ovog izuma biva aplicirana.

„Pacijent“ podrazumijeva ljudsko biće. Izraz „humani“ i „pacijent“ se ovdje koriste u jednakom značenju.

„Prevenција“ ili „preveniranje“ se odnosi na redukciju rizika dobivanja bolesti ili poremećaja (npr. uzrokuje da se barem jedan od kliničkih simptoma bolesti ne razvije kod pacijenta koji može biti izložen ili predisponiran za rečenu bolest, no do sada još nije pokazao ili razvio simptome rečene bolesti).

„Profarmaceutik“ se odnosi na derivat molekule lijeka koji podrazumijeva transformaciju u tijelu u svrhu dobivanja aktivnog lijeka. Profarmaceutici su često, iako ne nužno, farmakološki inaktivni sve do trenutka konvertiranja u izvorni oblik aktivnog lijeka. Lijek koji sadržava skupinu hidroksil može primjerice biti konvertiran u sulfonat, ester ili karbonat koji može biti hidroliziran *in vivo* u svrhu omogućavanja hidroksilne supstance. Lijek koji podrazumijeva amino skupinu može primjerice biti konvertiran u karbamat, amid, enamin, imin, N-fosfonil, N-fosforil ili N-sulfenil profarmaceutik, koji može biti hidroliziran *in vivo* u svrhu omogućavanja amino supstance. Lijek koji podrazumijeva karboksiličnu kiselinu može biti konvertiran u ester (podrazumijevajući također i silil estere i tioestere), amid ili hidrazid profarmaceutik, koji može biti hidroliziran *in vivo* u svrhu omogućavanja rečene supstance. Profarmaceutici lijekova čije se funkcionalne skupine razlikuju od naprijed navedenih su dobro poznate stručnjacima iz ovog područja znanosti.

„Proelement“ se odnosi na oblik protektivne skupine koja kada se koristi da maskira funkcionalnu grupu unutar molekule lijeka, konvertira lijek u profarmaceutik. Uobičajeno će proelement biti vezan uz lijek *via* veze(a) koje bivaju cijepane *in vivo* enzimatskim ili ne-enzimatskim putem.

„Protektivna skupina“ se odnosi na grupirane atome koji kada su pridruženi reaktivnoj funkcionalnoj grupi u molekuli, maskiraju, reduciraju ili preveniraju reaktivnost funkcionalne grupe. Primjeri protektivnih skupina mogu se pronaći u Green et al., „Protective Groups in Organic Chemistry“ (Protektivne skupine u organskoj kemiji), (Wiley, 2nd ed. 1991) i Harrison et al., „Compendium of Synthetic Organic Methods“ (Priručni pregled sintetskih organskih metoda), Vol 1-8 (John Wiley i sinovi, 1971-1996). Reprezentativne amino protektivne skupine podrazumijevaju, no nisu istovremeno i ograničene na, formil, acetyl, trifluoroacetyl, benzil, benziloksikarbonil („CBZ“), terc-butoksikarbonil („Boc“), trimetilsilil („TMS“), 2-trimetilsilil-etansulfonil („SES“), tritil i supstituirane tritil skupine, aliloksikarbonil, 9-fluorenilmetiloksikarbonil („FMOC“), nitro-veratriloksikarbonil („NVOC“) i slično. Reprezentativne hidroksi protektivne skupine podrazumijevaju, no nisu istovremeno i ograničene na, one grupe u kojima je hidroksi grupa ili acilirana ili alkilirana, kao što su primjerice benzil, te tritil eteri i alkil eteri, tetrahidropiranil eteri, trialkilsilil eteri i alil eteri.

„Supstituirani“ se odnosi na skupinu u kojoj je jedan ili više atoma vodika neovisno zamijenjen jednakim ili različitim supstituentima. Uobičajeni supstituenti podrazumijevaju, no nisu istovremeno i ograničeni na, -M, -R⁶⁰, -O⁻, =O, -OR⁶⁰, -S⁻, =S, -NR⁶⁰R⁶¹, =NR⁶⁰, -CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -(O)₂O⁻, -S(O)₂OH, -S(O)₂R⁶⁰, -OS(O₂)O⁻, -OS(O)₂R⁶⁰, -P(O)(O)₂, -P(O)(OR⁶⁰)(O⁻), -OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹), -C(O)OR⁶⁰, -C(S)OR⁶⁰, -C(O)OR⁶⁰, -C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -C(O)O⁻, -C(S)OR⁶⁰, -NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(S)OR⁶⁰R⁶¹, -NR⁶²C(NR⁶³)NR⁶⁰R⁶¹ i -C(NR⁶²)OR⁶⁰R⁶¹ s tim da vrijedi

da je M neovisno halogen; OR^{60} , R^{61} , R^{62} i R^{63} , međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, alkoksi, supstituirani alkoksi, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, aril, supstituirani aril, heteroaril ili supstituirani heteroaril, ili opcionalno P^{60} i R^{61} zajedno s atomom dušika za kojeg su vezani čine cikloheteroalkil ili supstituirani cikloheteroalkil prsten; i R^{64} i R^{65} međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, aril, supstituirani aril, heteroaril ili supstituirani heteroaril, ili opcionalno P^{64} i R^{65} zajedno s atomom dušika za kojeg su vezani čine cikloheteroalkil ili supstituirani cikloheteroalkil prsten. U preferiranom slučaju, supstituenti podrazumijevaju -M, - R^{60} , =O, - OR^{60} , - SR^{60} , -S-, =S, - $NR^{60}R^{61}$, = NR^{60} , - CF_3 , -CN, -OCN, -SCN, -NO, - NO_2 , = N_2 , - N_3 , - $S(O)_2R^{60}$, - $OS(O)_2O^-$, - $OS(O)_2R^{60}$, - $P(O)(O^-)_2$, - $P(O)(OR^{60})(O^-)$, - $OP(O)(OR^{60})(OR^{61})$, - $C(O)OR^{60}$, - $C(S)OR^{60}$, - $C(O)OR^{60}$, - $C(O)NR^{60}R^{61}$, - $C(O)O^-$, - $NR^{62}C(O)NR^{60}R^{61}$, u boljem slučaju -M, - R^{60} , =O, - OR^{60} , - SR^{60} , - $NR^{60}R^{61}$, - CF_3 , -CN, - NO_2 , - $S(O)_2R^{60}$, - $P(O)(OR^{60})(O^-)$, - $OP(O)(OR^{60})(OR^{61})$, - $C(O)OR^{60}$, - $C(O)R^{60}$, - $C(O)NR^{60}R^{61}$, - $C(O)O^-$, dok u najboljem slučaju podrazumijevaju -M, - R^{60} , =O, - OR^{60} , - SR^{60} , - $NR^{60}R^{61}$, - CF_3 , -CN, - NO_2 , - $S(O)_2R^{60}$, - $OP(O)(OR^{60})(OR^{61})$, - $C(O)OR^{60}$, - $C(O)R^{60}$, - $C(O)O^-$, s tim da vrijedi da su R^{60} , R^{61} i R^{62} naznačeni kao što je to naprijed definirano.

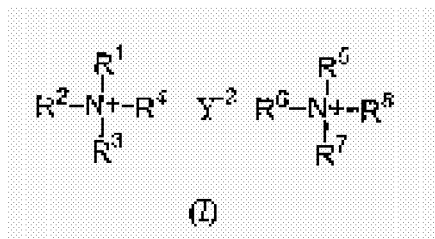
„Tretiranje“ ili „tretman“ bilo koje bolesti ili poremećaja odnosi se u jednom aspektu na amelioriranje bolesti ili poremećaja (npr. arrest ili redukcija razvoja bolesti ili barem jednog njezinog kliničkog simptoma). U drugom aspektu, „tretiranje“ ili „tretman“ odnosi se na amelioriranje barem jednog fizičkog parametra, koji ne mora nužno biti naglašen od strane pacijenta. U još jednom slijedećem aspektu, „tretiranje“ ili „tretman“ odnosi se na inhibiranje bolesti ili poremećaja, i to ili fizički (npr. stabilizacija simptoma), fiziološki (npr. stabilizacija fizičkog parametra) ili oboje. U slijedećem aspektu, „tretiranje“ ili „tretman“ odnosi se na odgađanje iskaza bolesti ili poremećaja.

„Terapeutske učinkovite količine“ je izraz koji se odnosi na količinu supstance koja kada je aplicirana pacijentu u svrhu tretiranja bolesti, je dovoljna da utječe na pozitivni razvoj kliničke slike. „Terapeutske učinkovite količine“ će varirati u ovisnosti o supstanci koja se aplicira, o bolesti i pridajućem stupnju ozbiljnosti stanja koje se tretira, o starosnoj dobi pacijenta, tjelesnoj težini itd. pacijenta koji se izlaže tretmanu.

U nastavku se daje detaljan opis preferiranih aspekata ovog izuma, što ne treba razumjeti kao pokušaj limitiranja konteksta razmatranja ovog izuma. Nasuprot tome, namjera nam je prikazati alternative, modifikacije i ekvivalente koji ulaze u kontekst razmatranja ovog izuma, kao što je to definirano u patentnim zahtjevima.

Supstance strukturne formule (I)

U prvom aspektu, supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma podrazumijevaju supstancu strukturne formule (I):



ili njezin solvat ili hidrat ili N-oksidi, koji je naznačen slijedećim parametrima:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 i R^7 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil;

R^4 i R^8 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil ili pak nedostaju kada je N dio aromatskog prstena;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^5 i R^6 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno, R^2 i R^3 zajedno, i R^2 i R^4 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^5 i R^6 zajedno, R^6 i R^7 zajedno, i R^6 i R^8 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

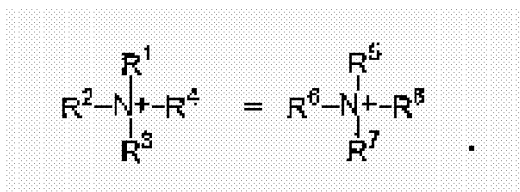
opcionalno, R^3 i R^7 zajedno zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil; i

Y^{2-} predstavlja $(MoS_4)^{2-}$, $(Mo_2S_{12})^{2-}$, $(Mo_2S_9)^{2-}$, $(Mo_2S_7)^{2-}$, $(Mo_2S_8)^{2-}$, $(Mo_2S_{11})^{2-}$, $(Mo_2S_6)^{2-}$ ili $(Mo_2S_{13})^{2-}$;

uz uvjet da ako je Y $(MoS_4)^{2-}$ i R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 su jednaki, tada svaki od R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 ne predstavlja vodik, metil, etil ili n-propil.

U drugom aspektu, Y predstavlja $(MoS_4)^{2-}$. U slijedećem aspektu R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 ne predstavljaju alkil.

U još jednom slijedećem aspektu,



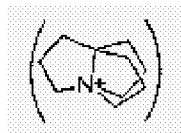
U preferiranom slučaju, Y predstavlja $(MoS_4)^{-2}$.

- 5 U jednom aspektu izuma, barem jedan od R^1 , R^2 , R^3 i R^4 ne predstavlja alkil. U slijedećem aspektu R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, alkanil ili supstituirani alkanil. U preferiranom slučaju R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, metil ili etil.

U još jednom slijedećem aspektu, R^1 i R^2 predstavljaju alkanil. U preferiranom slučaju, R^1 i R^2 predstavljaju metil ili etil.

- 10 U još jednom slijedećem aspektu, R^1 predstavlja alkanil, supstituirani alkanil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil ili supstituirani cikloalkil. U preferiranom slučaju, R^1 i R^2 predstavljaju zajedno alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno, supstituirani heteroalkileno. U još boljem slučaju, R^1 i R^2 predstavljaju zajedno alkileno ili heteroalkileno.

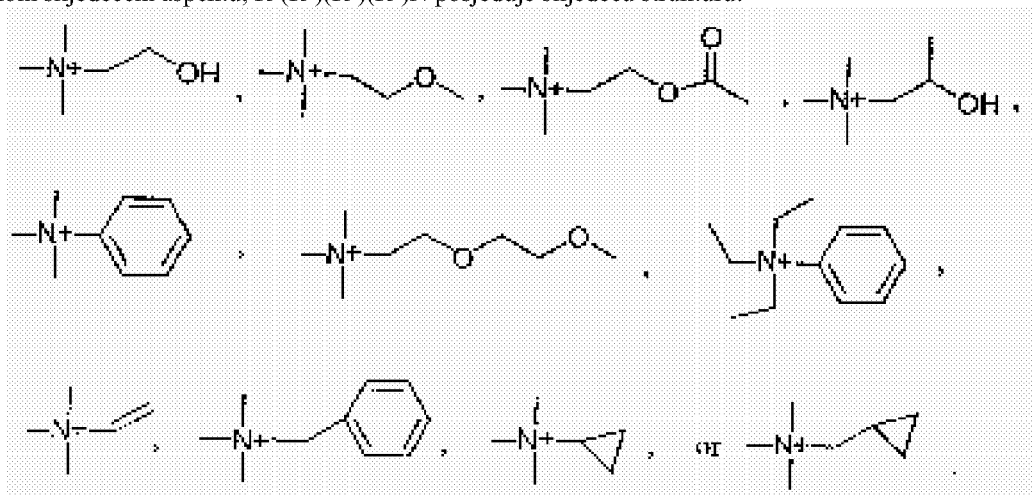
- 15 U još jednom slijedećem aspektu, R^1 i R^2 zajedno predstavljaju, R^2 i R^3 zajedno predstavljaju i R^2 i R^4 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno. U preferiranom slučaju, R^1 i R^2 zajedno predstavljaju, R^2 i R^3 zajedno predstavljaju i R^2 i R^4 zajedno predstavljaju alkileno. U preferiranom slučaju, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ posjeduje slijedeću strukturu:



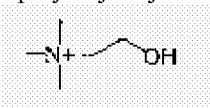
- 20 U još jednom slijedećem aspektu, R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno. U preferiranom slučaju, R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno.

- 25 U još jednom slijedećem aspektu, R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, alkanil ili supstituirani alkanil i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkanil, aril, arilalkil, cikloalkil ili R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno. U preferiranom slučaju, R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkenil, aril, arilalkil, cikloalkil ili R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno. U preferiranom slučaju, R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkenil, aril, arilalkil ili cikloalkil.

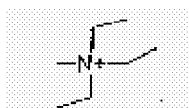
- 30 U još jednom slijedećem aspektu, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ posjeduje slijedeću strukturu:



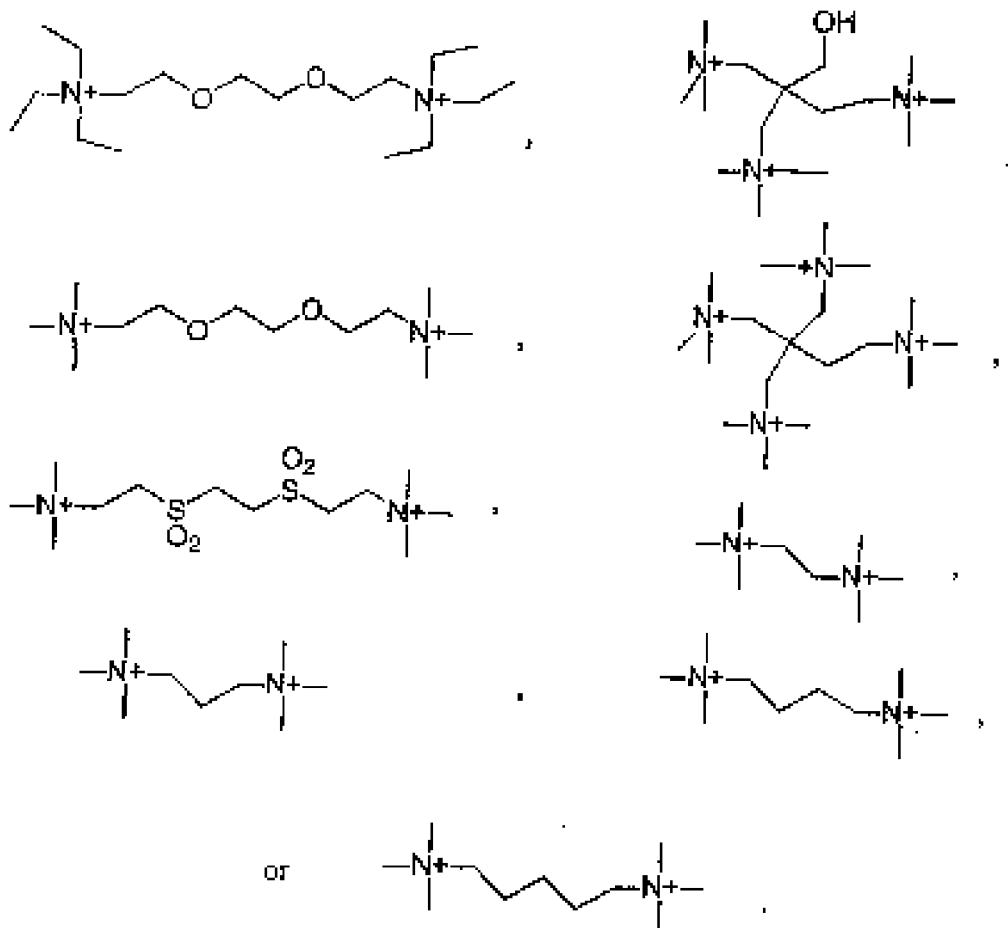
U još jednom slijedećem aspektu, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ posjeduje slijedeću strukturu:



U još jednom slijedećem aspektu, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ posjeduje slijedeću strukturu:



U još jednom slijedećem aspektu, R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkeno i heteroalkleno. U preferiranom slučaju, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ posjeduje slijedeću strukturu:

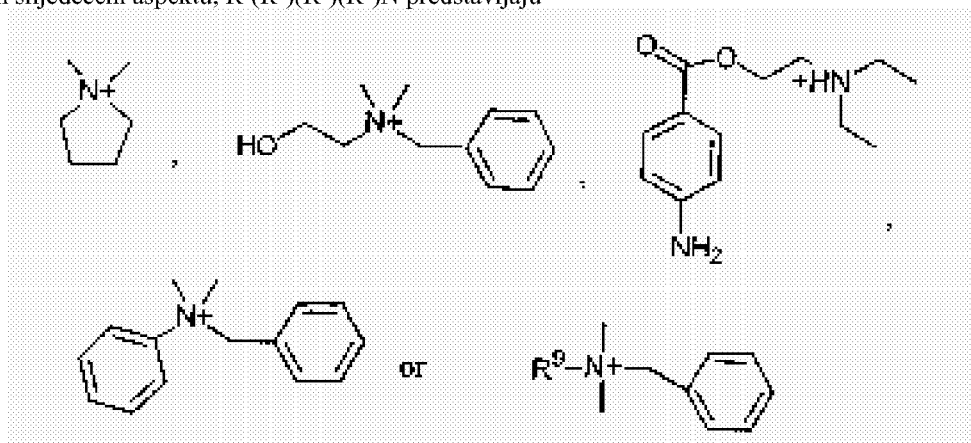


5

U još jednom slijedećem akpektu, R¹, R² i R⁴ predstavljaju vodik i R³ predstavlja supstituirani alkil, cikloalkil ili supstituirani heteroaril ili R³ i R⁷ zajedno predstavljaju alkileno. U još jednom slijedećem akpektu, R¹ i R² predstavljaju alkanil i R³ i R⁴ predstavljaju alkil, aril, arilalkil ili alkileno. U preferiranom slučaju, R¹ i R² predstavljaju metil ili etil i R³ i R⁴ predstavljaju alkil, supstituirani alkil, aril, arilalkil ili alkileno.

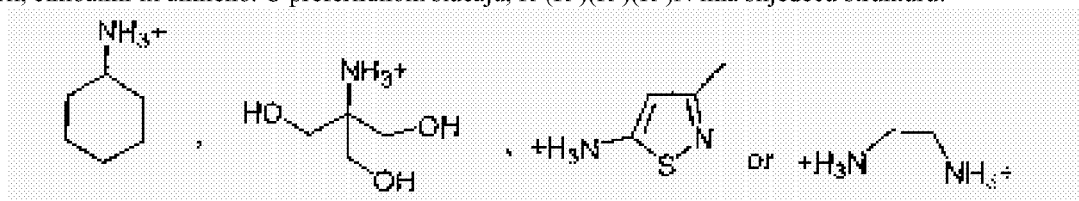
10

U još jednom slijedećem aspektu, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ predstavljaju

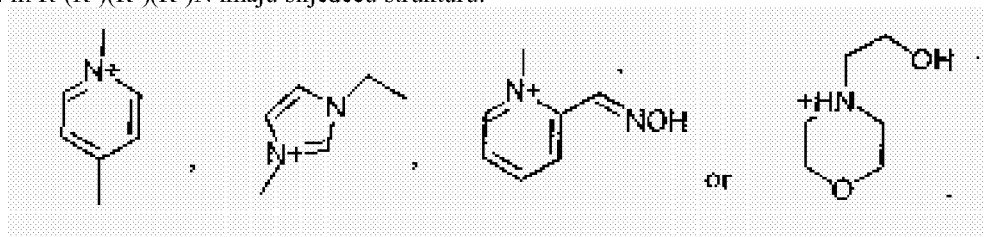


s tim da je R^9 naznačen time da predstavlja smjesu ravnolančanih alkanil grupa koje posjeduju barem 8 atoma ugljika i ne više od 18 atoma ugljika.

U još jednom slijedećem aspektu, R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik i R^3 predstavlja supstituirani alkil, supstituirani heteroaril, cikloalkil ili alkileno. U preferiranom slučaju, $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ ima slijedeću strukturu:



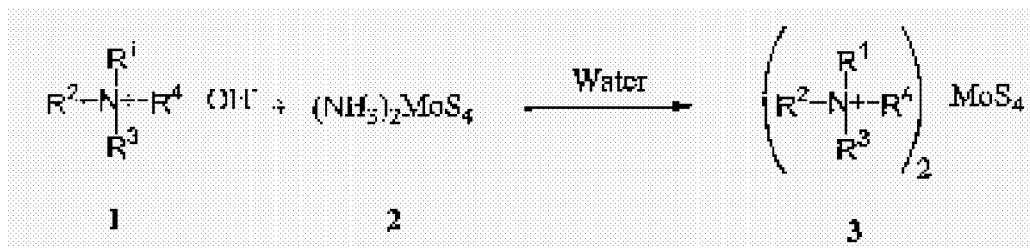
- 5 U još jednom slijedećem aspektu, R^1 i R^2 zajedno predstavljaju alkeno, supstituirani alkeno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno, dok R^3 predstavlja alkil i R^4 predstavlja vodik ili isti nedostaje. U preferiranom slučaju, $R^1(R^2)(R^3)N$ ili $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju slijedeću strukturu:



10 Sinteza supstanci koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma

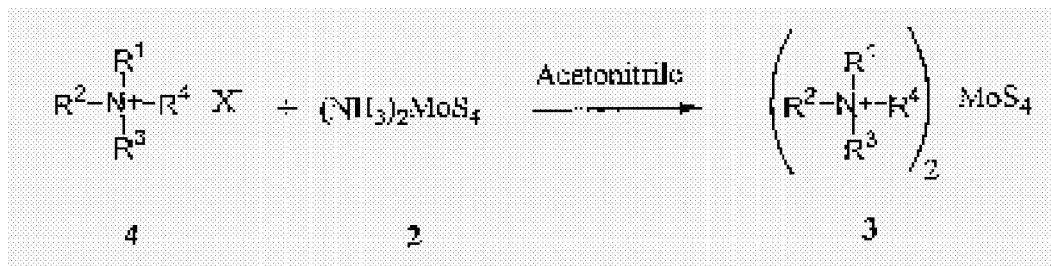
Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu biti dobivene konvencionalnim sintetskim metodama koje su prikazane na shematskim prikazima 1 i 2. Startni materijali i odgovarajući intermedijeri koji se koriste za pripravljanje rečenih supstanci su komercijalno dostupni ili pak mogu biti pripremljeni dobro poznatim sintetskim postupcima. Tako primjerice, amonij tiomolibdat može biti nabavljen od poznatih dobavljača kemijskih supstanci, kao što je npr. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI. Supstituirane amonijeve soli (npr. amonij hidroksid ili amonij halidi) mogu također biti nabavljene iz komercijalnih izvora ili pak mogu biti sintetizirane korištenjem dobro poznatih sintetskih postupaka (Harrison et al., „Compendium of Synthetic Organic Methods“ (Priručni pregled sintetskih organskih metoda), Vol 1-8 (John Wiley i sinovi, 1971-1996); „Beilstein Handbook of Organic Chemistry“ (Beilstein-ov priručnik organske kemije), Beilstein Institut za organsku kemiju, Frankfurt, Njemačka; Feiser et al., „Reagents for Organic Synthesis“ (Reagensi u organskoj sintezi), Vol. 1-17, Wiley Interscience; Trost et al., „Comprehensive Organic Chemistry“ (Pregled organske kemije), Pergamon Press, 1991; „Theilheimer's Synthetic Methods of Organic Chemistry“ (Theilheimer-ove sintetske metode u organskoj kemiji), vol. 1-45, karger, 1991; March, „Advanced Organic Chemistry“ (Napredna organska kemija), Wiley Interscience, 1991; Larock „Comprehensive Organic Transformations“ (Pregled organskih transformacija), VCH Publishers, 1989; Paquette, „Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis“ (Enciklopedija reagensa za organsku sintezu), John Wiley & sinovi, 1995). Ostale metode sinteze supstanci koje se ovdje razmatraju i/ili odgovarajućih startnih materijala su ili već dobro opisane ili su dobro poznate stručnjacima iz ovog područja znanosti. U skladu s rečenim, metode koje su prikazane na Shemama 1 i 2 treba smatrati više ilustrativnima nego opisnima.

Shema 1



Kao što je naprijed pokazano u Shemi 1, dodavanje kvaternarnog amonijevog hidroksida u tiomolibdat u prisustvu vode, dovodi do razmjene kationa (ekvilibrij do produkta je postignut uklanjanjem hlapivog amonijaka) u svrhu dobivanja željenog derivata tiomolibdata.

Shema 2



Kao što je naprijed pokazano u Shemi 2, dodavanje kvaternarnog amonijevog halida u tiomolibdat u prisustvu acetonitrila, dovodi do razmjene kationa (ekvilibrirajući do produkta je postignut formiranjem amonij halida) u svrhu dobivanja željenog derivata tiomolibdata.

Derivati tiomolibdata gdje su prisutne različite amonij jedinice mogu biti pripravljene iz supstanci 3 putem tretiranja s jednim ekvivalentom drugog amonij elementa. Iz takve reakcije se može očekivati da nastane statistička smjesa produkata.

Eseji za supstance koje se razmatraju u izumu

Za stručnjake će biti pogodna činjenica da su *in vivo* i *in vitro* eseji korisni za mjerenje aktivnosti supstanci koje se razmatraju u ovom izumu, i rečeni eseji su stoga više ilustrativni nego opisni.

Esej za migraciju endotelih stanica

Za migraciju endotelih stanica, bunari se prevlače s kolagenom tip I (50 µg/mL) dodavanjem 200 µL otopine kolagena po bunaru, nakon čega slijedi inkubacija tijekom noći na 37°C. Potom se dodaje kemoatraktant (npr. FGF-2) u ukupnom volumenu od 0.8 mL medija. Endotelne stanice kao što su primjerice humane endotelne stanice umbilikalne vene („HUVEC“) koje su prethodno bile tretirane tripsinom u svrhu odvajanja od monoslojne kulture, bivaju razrijeđivane do finalne koncentracije od oko 106 stanica/mL i to sa medijem koji je oslobođen seruma, nakon čega se 0.2 mL ove stanične suspenzije dodaje u gornji prostor svakog bunara. Dodaju se inhibitori u gornje i donje dijelove bunara, nakon čega se dopušta migracija tijekom slijedećih 5 sati u vlažnoj atmosferi na 37°C. Bunari se uklanjaju uz pomoć DiffQuick®. Stanice koje nisu migrirale bivaju uklonjene iz gornjih prostora struganjem uz pomoć pamučne lopatice, nakon čega se membrane odvajaju, postavljaju na podlogu za pretraživanje, te mjere u visikonaponskom polju (400x) u svrhu određivanja broja stanica koje su migrirale.

Biološki esej za određivanje anti-invazivne aktivnosti

Supstance i/ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma bivaju testirane na anti-invazivni kapacitet. Sposobnost stanica kao što su endotelne ili tumorske stanice (npr. PC-3 humane stanice karcinoma prostate) da invadiraju kroz rekonstituiranu baznu membranu (Matrigel®) u eseju koji je poznat pod imenom Matrigel® invazijski esej (Kleinman et al., *Biochemistry* **1986**, 25:312-318; Parish et al., *Int. J. Cancer* **1992**, 52:378-383). Matrigel® predstavlja rekonstituiranu baznu membranu koja sadržava kolagen tip IV, laminin, heparan sulfat proteoglikane kao što je perlekan koji se veže na i lokalizira bFGF, vitronektin, kao i transformirajući faktor-β rasta (TGFβ, urokinaza-tip plazminogen aktivator (uPA), tkivni plazminogen aktivator (tPA) i serpin koji je poznat kao plazminogen aktivator inhibitor tip 1 (PAI-1) (Chambers et al., *Canc. Res.* **1995**, 55:1578-1585). Rezultati koji su dobiveni ovom esejom za supstance koje su usmjerene na ekstracelularne receptore ili enzime se mogu očekivano predvidjeti u odnosu na učinkovitost istih supstanci *in vivo* (Rabbani et al., **1995**, *Int. J. Cancer* 63:840-845).

Takvi eseji koriste insertate tkivnih kultura. Invazivne stanice su definirane kao stanice koje imaju sposobnost prolaska kroz Matrigel® i kroz gornji dio polikarbonatne membrane, te da adheziraju na dno membrane. Bunari (Costar) koji sadržavaju polikarbonatne membrane (8.0 µm veličina pore) bivaju prevučeni s Matrigel® (Collaborative Research) koji je prethodno razrijeđen sa sterilnim PBS do finalne koncentracije od 75 µg/mL (60 µL razrijeđenog Matrigel® po insertu) i potom smješten u bunare na plati od njih 24. Membrane se izlažu sušenju tijekom noći u biološki sigurnom prostoru, potom rehidriraju dodavanjem 100 µL DMEM koji sadržava antibiotike tijekom 1 sat na stolu za trešnju. DMEM se uklanja iz svakog inserta aspiriranjem i nakon toga se dodaje po 0.8 mL DMEM/10% FBS/antibiotik u svaki pojedini bunar na način da je popunjen donji prostor bunara. Na vrh se dodaje svježi DMEM/antibiotik (100 µL), humani Glu-plazminogen (5 µg/mL) kao i svaki inhibitor koji je namijenjen za testiranje. Stanice koje su namijenjene za testiranje bivaju tripsinizirane i resuspendirane u DMEM/antibiotik, potom se dodaju na vrh bunara u finalnoj koncentraciji od 800,000 stanica/mL. Finalni volumen gornjih prostora je prilagođen na količinu od 200 µL. Ploča se potom inkubira na u vlažnoj 5% CO₂ atmosferi tijekom 72 sata. Nakon inkubacije, stanice se fiksiraju i bojaju uz

korištenje DikkQuick® (Giemsa boja) nakon čega se gornji prostor ostruže uz pomoć pamučne lopatice u svrhu uklanjanja Matrigel® i svake stanice koja nije invadirala kroz membranu. Membrane se odvaaju od podloge uz pomoć X-acto® koja se nanosi na prereze uz korištenje Permount®, nakon čega slijedi pretraživanje u visokonaponskom polju (400x). Prosječna vrijednost invadiranih stanica izvedena je iz vrijednosti za 5-10 polja koja je izražena kao funkcija koncentracije inhibitora.

Eseji formiranja tunela za mjerenje anti-angiogene aktivnosti

Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu biti testirane na anti-angiogenu aktivnost i jednom od dva različita esej *in vitro*. Endotelne stanice, kao što su primjerice humane endotelne stanice iz umbilikalne vene („HUVEC“) ili humane mikrovaskularne endotelne stanice („HMVEC“) koje mogu biti pripravljene ili su komercijalno dostupne, miješaju se pri koncentraciji od 2×10^5 stanica/mL s fibrinogenom (5 mg/mL u otopini fosfatnog pufera („PBS“) u 1:1 (v/v) omjeru. Dodaje se trombin (5 jedinica/mL finalne koncentracije) nakon čega se smjesa odmah prenosi na sustav od 24 bunara (0.5 mL po bunaru). Potom se dopušta formiranje fibrinskog gela, nakon čega se u bunare dodaju VEGF i bFGF (svaki u 5 ng/mL finalne koncentracije) zajedno sa test supstancom. Stanice se inkubiraju na 37°C u 5% CO₂ tijekom 4 dana pri čemu se stanice u svakom pojedinačnom bunaru prebrojavaju i klasificiraju u grupe: okrugle, produljene bez ogranka, produljene s ograncima ili produljene s 2 ili više ogranka. Rezultati se izražavaju kao prosječna vrijednost rezultata dobivenih iz 5 različitih bunara za svaku od koncentracija supstance. Uobičajeno je da u prisustvu angiogenih inhibitora, stanice zadržavaju ili okrugli oblik, ili formiraju nediferencirane tunele (npr. 0 ili 1 ogranak). Ovaj esej se u okvirima struke prepoznaje kao metoda za određivanje angiogene (ili anti-angiogene) učinkovitosti *in vivo* (Min et al., Cancer Res. 1996 56:2428-2433).

U alternativnom eseju, tuneli endotelnih stanica se uočavaju u slučaju kada su endotelne stanice kultivirane na Matrigel® (Schapner et al., J. Cell. Physiol. 1995 165:107-118). Endotelne stanice (1×10^4 stanica/bunar) bivaju transferirane na Matrigel® obložene ploče koje sadržavaju po 24 bunara, a formiranje tunela se dešava nakon oko 48 sati. Inhibitori se testiraju dodavanjem ili u isto vrijeme s endotelnim stanicama ili u različito vrijeme. Formiranje tunela se također može i stimulirati dodavanjem angiogenog faktora rasta kao što je primjerice bFGF ili VEGF, reagensa koji stimuliraju diferencijaciju (npr. PMA) ili njihove kombinacije.

Ovaj esej modelira angiogenezu na način da predstavlja određeni tip bazne membrane endotelnih stanica, kao što je sloj matriksa čije se endotelne stanice koje migriraju i diferenciraju se, mogu prvo očekivati da budu zabilježene brojačem. Pored vezanih faktora rasta, komponente matriksa koje su uočene u Matrigel® (te u baznim membranama *in situ*) ili njihovi proteolitički produkti mogu također djelovati stimulativno na formiranje tunela endotelnih stanica, što ovaj model čini komplementarnim modelu fibrin gel angiogeneze koji je naprijed opisan (Blood et al., Biochim.Biophys.Acta 1990, 1032:89-118; Odedra et al., Pharmac. Ther. 1991, 49:111-124). Supstance koje se razmatraju u ovom izumu inhibiraju formiranje tunela endotelnih stanica u oba esej, što navodi na činjenicu da će rečene supstance imati također i anti-angiogeno djelovanje.

Eseji za inhibiciju proliferacije

Sposobnost supstanci koje se razmatraju u ovom izumu da inhibiraju proliferaciju endotelnih stanica može biti određena u formatu ploče od 96 bunara. Koristi se kolagen tip I (želatina) za prevlačenje bunara (0.1-1 mg/mL u PBS, 0.1 mL po bunaru tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi). Nakon ispiranja ploče (3 x voda/PBS), 3-6,000 stanica se nasaduje po bunaru, nakon čega se dopušta združivanje tijekom 4 sata (37°C/5% CO₂) u mediju endotelnog rasta (EGM; Clonetics) ili mediju M199 koji sadržava 0.1-2% FBS. Medij i netaknute stanice se uklanjaju nakon 4 sata nakon čega se u bunare dodaje svježi medij koji sadržava bFGF (1-10 ng/mL) ili VEGF (1-10 ng/mL). Supstance koje se podvrgavaju testiranju se dodaju posljednje, nakon čega se ploča inkubira (37°C/5% CO₂) tijekom 24-48 sati. MTS (Promega) se dodaje u svaki od bunara nakon čega slijedi inkubacija tijekom 1-4 sata. Potom se mjeri apsorbancija na 490 nm koja je proporcionalna broju stanica, u svrhu određivanja razlika u razini proliferacije između kontrolnih bunara i onih koji sadržavaju test supstance. Sličan se esej može koristiti sa kultiviranim adherentnim tumorskim stanicama. Međutim, kolagen može nedostajati u tom slučaju. Tumorske stanice (npr. 3000-10000(bunar) se nasaduju i puštaju odstajati tijekom noći. Potom se u bunare dodaje medij oslobođen od seruma i stanice se sinhroniziraju tijekom 24 sata. Potom se u svaki bunar dodaje medij koji sadržava 10% FBS u svrhu stimuliranja proliferacije. Supstance koje se testiraju stavljaju se u neke od bunara. Nakon 24 sata, dodaje se MTS i esej se razvija i očitava na način koji je naprijed opisan. Slična metodologija može također biti korištena u svrhu evaluiranja učinaka supstanci koje se razmatraju u ovom izumu na proliferaciju drugih stabičnih tipova, podrazumijevajući također tumorske stanice, s tim da se neće koristiti VEGF i bFGF za stimulaciju rasta stanica. Ukoliko postoji dokaz anti-proliferativne aktivnosti, indukcija apoptoze može biti mjerena korištenjem TumorTACS (Genzime).

Eseji za mjerenje citoksičnosti

Citotoksični efekti supstanci koje se razmatraju u ovom izumu mogu biti određeni za različite stanične tipove podrazumijevajući također i tumorske stanice, endotelne stanice, fibroblaste i makrofage.

- 5 Tipičan esej će podrazumijevati nasadivanje stanica u gustoći od 5-10000 stanica po bunaru u 96-bunarskoj ploči. Supstance koje se testiraju dodaju se u različitim koncentracijama i potom se inkubiraju sa stanicama tijekom 24 sata. Potom se stanice ispiru 3x s medijem. U svrhu provedbe eseja citotoksičnosti (mjerenje lize stanica), koristi se Promega 96-bunarski komplet opreme.

Model kornealne angiogeneze

Protok koji se u ovom slučaju koristi je u osnovi identičan sa onim koji se opisuje u Volpert et al., J.Clin.Invest. **1996**, 98:671-679. Ukratko, ženke Fischer štakora (120-140 g) se anestetiziraju, te jedinice (5 μ l) koje se sastoje od Hydron®, bFGF (150 nM) i supstance koja se testira bivaju implantirane putem sićušnih incizija u korneu 1.0-1.5 mm od limbusa.

- 15 Neovaskularizacija se mjeri na 5. i na 7. dan nakon implantacije. Na 7. dan, životinje bivaju anestetizirane i infuzijom im se unosi boja kao što je koloidalni ugljik u svrhu bojanja krvnih žila. Životinje potom bivaju eutanazirane, njihove rožnice bivaju fiksirane s formalinom, izravunate i fotografirane u svrhu procjene stupnja neovaskularizacije. Novonastale krvne žile se kvantificiraju prikazom ukupnog područja neovaskularizacije ili njegove duljine ili pak jednostavno brojanjem novonastalih krvnih sudova.

Matrigel® ključni esej

- 25 Ova se vrsta eseja izvodi u skladu s procedurom koja je opisana u Passaniti et al., Lab Invest. 1992, 67:519-528. Ledeni Matrigel® (npr. 500 μ L) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) se miješa sa heparinom (npr. 50 μ g/ml), FGF-2 (npr. 400 ng/ml) i supstancom koja se testira. U nekim oblicima izvedbe eseja, bFGF može biti supstituiran s tumorskim stanicama u svrhu dobivanja angiogenog stimulusa. Matrigel® smjesa se injektira subkutano u 4-8 tjedana stare atimičke gole miševе na mjestu abdominalne srednje linije, preferabilno 3 injekcije po mišu. Injektirani Matrigel® formira čvrsti gel. Mjesta za injektiranje se odabiru na način da svaka životinja prima pozitivnu kontrolnu 30 injekciju (kao što je FGF-2 + heparin), negativnu kontrolnu injekciju (kao što je npr. pufer + heparin) i injekciju koja podrazumijeva supstancu koja se testira za učinak na angiogenezu (npr. FGF-2 + heparin + supstanca). Svi se tretmani provode u triplicatu. Životinje bivaju žrtvovane cervikalnom dislokacijom oko 7 dana nakon injekcije ili pak u neko drugo optimalno vrijeme za uočavanje i praćenje angiogeneze. Koža miša se odvaja duž abdominalne srednje linije i Matrigel® elementi se obnavljaju i skeniraju na visokoj rezoluciji. Elementi se potom dispergiraju u vodi i inkubiraju n 35 a37°C tijekom noći. Razine Hb hemoglobina se određuju uz pomoć Drabkin otopine (npr. dobavljač Sigma) u skladu s uputama proizvođača. Količina Hb je indirektan pokazatelj angiogeneze, stoga što odražava količinu krvi u uzorku. Nadalje ili alternativno, životinje mogu primiti injekciju neposredno prije žrtvovanja sa 0.1 ml pufera (preferabilno PBS) koji sadržava visoko molekularni dekstran na kojeg je konjugiran fluorofor. Količina fluorescencije u disperzatu biva određivana fluorimetrijski i također služi za određivanje razine angiogeneze. Bojanje sa mAb anti-CD31 (CD31 je 40 endotelna adhezijska molekula ili „PECAM“) može također biti korišteno za potvrđivanje formiranja novih krvnih sudova i mikrovaskularne gustoće.

CAM - pileći korioalantoinski membranski esej angiogeneze

- 45 Ovaj esej biva izveden u osnovi na jednak način kao što je to opisano u Nguyen et al., Microvascular Res. **1994**, 47:31-40. Smjesa koja sadržava angiogene faktore (bFGF) ili tumorske stanice s inhibitorima biva smještena na CAM 8 dana starog pilećeg embrija i potom se CAM prati tijekom 3-9 dana nakon implantacije uzorka. Angiogeneza se kvantificira određivanjem postotka uzorka koji sadržava krvne sudove.

In vivo procjena inhibicije angiogeneze i anti-tumorskog učinka uz korištenje Matrigel® ključnog eseja sa tumorskim stanicama

- 55 U ovoj vrsti eseja, tumorske stanice kao što su primjerice 1-5 x 10⁶ stanica 3LL Lewis karcinom pluća ili prostate štakora stanične linije MatLyLu, se miješa sa Matrigel® i potom injektira u miša u skladu s protokolom koji je naprijed opisan u sekciji 5.4.7. Masa tumorskih stanica i snažni angiogeni odgovor se uočava nakon oko 5-7 dana. Anti-tumorsko i anti-angiogeno djelovanje supstance u aktualnom tumorskom okolišu može biti procijenjeno uključivanjem u ključni element eseja. Mjerenje biva izvedeno na masi tumorskog tkiva, na razinama Hb ili razinama fluorescencije (dekstran-fluorofor konjugat koji je injektiran prije žrtvovanja). U svrhu mjerenja vrijednosti Hb ili fluorescencije, uzorci se prethodno homogeniziraju s tkivnim homogenizatorom.

60

Ksenograft model subkutanog tumorskog rasta

Goli miševi bivaju inokulirani sa MDA-MB-231 stanicama (humani karcinom dojke) i Matrigel® (1 x 10⁶ stanica u 0.2 mL) subkutano u desnu stranu životinje. Tumori se razvijaju do 200 mm³ i potom se tretiraju sa test supstancom. Volemeni tumora se prate svaki dan i životinje se žrtvuju nakon 2 tjedna tretmana. Tumori bivaju izvađeni, vagani i ulagani u parafin. Histološki prerezi tumora se analiziraju sa H i E, anti-CD31, Ki-67, TUNEL i CD68 bojanjem.

Također se na sličan način mogu koristiti i druge stanične tumorske linije koje podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na njih, PC-3, CWR22R, SK-OV-3, A2780, A549, HCT116, HT29, u svrhu testiranja anti-tumorske aktivnosti supstanci koje se razmatraju ovom izumu.

Ksenograft model metastaze

Supstance koje se razmatraju ovom izumu mogu također biti testirane na inhibiranje kasne metastaze uz korištenje eksperimentalnog modela metastaze (Crowley et al., Proc. Natl.Acad.Sci USA **1993**, 90:5091-5025). Kasna metastaza podrazumijeva korake pridruživanja i ekstravazacije tumorskih stanica, lokalne invazije, usadivanja, proliferacije i angiogeneze. Stanice humanog karcinoma prostate (PC-3) bivaju transfektirane uz pomoć reporterskog gena, preferabilno genom za zeleni fluorescentni protein (GFP), dok se kao alternativa može koristiti gen koji kodira enzime kloramfenikol acetiltransferazu (CAT), luciferazu ili LacZi, i bivaju inokulirane u gole miševe. Ovakav pristup podrazumijeva također korištenje rečenih markera (fluorescencijska detekcija GFP ili histokemijska kolorimetrijska detekcija enzimatske aktivnosti) u svrhu praćena sudbine rečenih stanica. Stanice bivaju injektirane, preferabilno intravenski i metastaze se identificiraju nakon oko 14 dana, posebice u plućima, no također i u regionalnim limfnim čvorovima, femuru i mozgu. To prikrija tropizam organa u prirodno nastalim metastazama u raku humane prostate. Primjerice, GFP-ekspresirajuće PC-3 stanice (1 x 10⁶ stanica po jednom mišu) bivaju injektirane intravenski u repne vene golih (nu/nu) miševa. Životinje bivaju tretirane sa test kompozicijom od 100 µg/životinja/dan. Individualne metastatske stanice i fokusi bivaju vizualizirani i kvantificirani uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa ili histokemijski uz pomoć svjetlosnog mikroskopa, ili pak nanošenjem tkiva na mrežicu i primjenom kvantitativnog kolorimetrijskog esaja detektabilne oznake.

Inhibicija spontane metastaze *In vivo* uz pomoć HPRG u funkcionalnih derivata

Singenetski sustav raka dojke kod štakora (Xing et al., Int.J.Cancer 67:423-429 (1996) koristi Mat BIII stanice raka dojke štakora. Tumorske stanice, primjerice oko 10⁶ suspendiranih u 0.1 mL PBS, bivaju inokulirane u masne naslage na prsima ženke Fisher štakora. U vrijeme inokulacije, 14-dnevna Alza osmotska mini-pumpa biva implantirana intraperitonealno u svrhu pravilne jednolike disperzije test supstance. Supstanca biva otopljena u PBS (npr. 200 mM stok), sterilno filtrirana i smještena u mini-pumpu u svrhu dobivanja razine otpuštanja od oko 4 gm/kg/dan. Kontrolne životinje primaju nosač (PBS) ili nosač kontrolni peptid u mini-pumpi. Životinje bivaju žrtvovane na 14. dan tretmana.

Drugi modeli eksperimanetalne metastaze mogu također biti korišteni u svrhu evaluacije supstanci koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma. Ovi će modeli koristiti naprijed navedene humane tumorske stanične linije, koje bivaju supra injektirane IV kroz repnu venu golih miševa. Uobičajeno, ti miševi bivaju žrtvovani 28. dan nakon što su tumorske stanice inokulirane i njihova pluća se ispituju na prisustvo metastaza.

3LL Lewis karcinom pluća: Primarni tumorski rast

Ova je tumorska linija nastala spontano 1951. godine kao karcinom pluća u C57BL/6 mišu (Cancer Res. 1955, 15:39. Pogledati također Malave et al., J.Natl.Canc.Inst. 1979, 62:83-88). Propagira prolaskom u C57BL/6 mišu subkutanom inokulacijom i biva testiran u semialogenim C57BL/6 x DBA/2 F₁ miševima ili u alogenim C3H miševima. Uobičajeno se koristi 6 životinja po grupi za subkutani imlantata ili 10 za intramuskularni implantat. Tumor može biti implantiran subkutanom inokulacijom kao fragment veličine 2-4 mm ili pak implantiran intramuskularno ili subkutano kao inokulum suspendiranih stanica od oko 0.5-2 x 10⁶ stanica. Tretman započinje 24 sata nakon implantiranja ili je odgođen dok se tumor ne razvije do određene veličine (obično approx. Do 400 mg). Test supstanca biva aplicirana ip dnevno tijekom 11 dana.

Životinje se prate vaganjem, palpacijom i mjerenjem veličine tumora. Uobičajena težina tumora u netretiranim kontrolnim primateljima na dan 12. nakon intramuskularne inokulacije je 500-2500 mg. Uobičajeno srednje vrijeme preživljenja je 18-28 dana. Koristi se također i pozitivna kontrolna supstanca, primjerice ciklofosamid na 20 mg/kg/injekcija dnevno na dane 1-11. Rezultati podrazumijevaju težinu životinja, veličinu tumora, težinu tumora, vrijeme preživljenja. Za potvrđeno terapijsko djelovanje, test kompozicija bi trebala biti testirana u dva multi-dozna esaja.

3II Lewis karcinom pluća: Model primarnog rasta i spontane metastaze

Ovaj je model korišten od strane nekoliko istraživača (Gorelik et al., 1980, J. Natl. Canc. Inst. 65:1257-1264; Gorelik et al., 1980, Rec. Results Canc. Res. 75:20-28; Isakov et al., Invasion Mets. 1982, 2:12-32; Talmadge et al., J. Natl. Canc. Inst. 1982, 69:975-980; Hilgard et al., Br. J. Cancer 1977, 35:78-86). Test miševi su mužjaci C57BL/6 miševi, stari 2-3 mjeseca. Nakon subkutane, intramuskularne ili intrastopalne implantacije, ova vrsta tumora uzrokuje metastaze, prvenstveno u plućima. S nekim linijama tumora, primarni tumor pokazuje anti-metastaski učinak i treba najprije biti ekscidiran prije izvedbe studije metastatske faze (US Patent br. 5,639,725).

Suspenzije pojedinačnih stanica bivaju pripravljene iz čvrstih tumora uz pomoć tretiranja tumorskog tkiva otopinom 0.3% tripsina. Stanice se ispiru 3 x sa PBS (pH 7.4) u suspendiraju u PBS. Viabilnost 3LL stanica koje su pripravljene na ovaj način je općenito oko 95-99% (s ekscizijom trypan plave boje). Viabilne tumorske stanice ($3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$) suspendirane u 0.05 ml PBS bivaju injektirane subkutano ili u dorzalnu regiju ili u jedan nožni jastučić C57BL/6 miša. Vidljivi tumori se pojavljuju nakon 3-4 dana nakon dorzalne se injekcije 10^6 stanica. Dan pojavljivanja tumora i dijometri nastalih tumora mjere se svaka dva dana uz pomoć kalipera.

Tretman je doziran kao jedna ili dvije doze peptida ili derivata tjedno. U drugom aspektu, peptid se aplicira uz pomoć osmotske mini-pumpe.

U eksperimentima gdje se primjenjuje ekscizija dorzalnih tumora, kada tumori dosegnu veličinu od oko 1500 mm³, miševi se dijele u dvije grupe: (1) primarni tumor je u cijelosti ekscidiran; ili (2) kirurški zahvat je izveden i tumor je ostavljen netaknut. Iako tumori veličine 500-3000 mm³ inhibiraju rast metastaza, 1500 mm³ je najveća veličina primarnog tumora koji može biti sigurno podvrgnut resekciji s visokim postotkom mogućnosti preživljenja i bez pojave lokalnog pratećeg rasta. Nakon 21 dana, svi miševi bivaju žrtvovani i autopsirani.

Pluća se uklanjaju i mjere. Tkivo biva fiksirano u Bouin otopini i bilježi se broj vidljivih metastaza. Vrijednosti dijametara metastaza se također bilježe uz korištenje binokularnog steroskopa koji je opremljen mikrometarskom skalom i povećanjem od 8x. Na osnovu zabilježenih vrijednosti dijametara, moguće je izračunati volumen svake pojedine metastaze. Da bi se odredio ukupan volumen metastaza u plućima, srednj avrijednost vidljivih metastaza biva multipliciran sa srednjom vrijednošću volumena svih metastaza. U svrhu daljnjeg određivanja metastatskog rasta, moguće je izmjeriti inkorporiranje ¹²⁵IdUrd u stanice pluća (Thakur et al., J. Lab. Clin Med. 1977, 89:217-228). Deset dana poslije amputacije tumora, u peritoneum se inokulira 25 µg fluorodeoksiuridina. Nakon 30 minuta, miševima se unosi 1 µCi ¹²⁵IdUrd (jododeoksiuridin). Jedan dan kasnije, uklanjaju se pluća i slezena i važu, a stupanj inkorporacije ¹²⁵IdUrd se mjeri u gama-brojaču.

Kod miševa kojima se razvio rak na nožnim jastučićima, kada veličin atumora dosegne 8-10 mmm u dijametru, miševi se dijele u dvije grupe: (1) noge s tumorima se amputiraju nakon ligacije iznad kolenskog zgloba; ili (2) miševi se ostalaju intaktni kao kontrolne jedinice koje nose tumor. (Amputacija noge bez tumora u miševima koji nose tumor nema poznati učinak na pojavu metastaza, dok su moguće posljedice anestezije, stresa ili operativnog zahvata). Miševi bivaju žrtvovani 10-14 dana nakon amputacije. Metastaze bivaju evaluirane na naprijed opisani način.

Terapeutski načini korištenja

U skladu s kontekstom razmatranja ovog izuma, supstanca strukturalne formule (I) i/ili farmaceutska kompozicija koja sadržava rečenu supstancu biva aplicirana pacijentu, koji je preferabilno čovjek, a koji pati od bolesti koje su karakterizirane aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću ili poremećajem regulacije NF-kB. Aberantna vaskularizacija podrazumijeva abnormalnu neovaskularizaciju kao što je formiranje novih krvnih žila, većih krvnih žila, više razgranatih krvnih žila i svih drugih mehanizama koji dovode do povećanja kapaciteta prijenosa krvi u oboljelo tkivo.

Bolesti koje su karakterizirane aberantnom vaskularizacijom podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na, rak (npr. svaki vaskularizirani tumor, prvenstveno čvrsti tumor, podrazumijevajući, a bez da je istovremeno ograničen na, karcinome pluća, dojke, jajnika, želuca, pankreasa, dušnika, ezofagusa, testisa, jetre, parotide, žučnih kanala, kolona, rektuma, cerviksa, uterusa, endometrija, bubrega, žući, prostate, tiroidee, karcinome skvamoznih stanica, adenokarcinome, karcinome malih stanica, melanome, gliome, neuroblastome, sarkome (npr. angiosarkome, hondrosarkome)), artritis, sijabetes, arterioskleroza, arteriovenoza, malformacije, kornealne graft neovaskularizacije, odgođeno zaraštanje rana, dijabetička retinopatija, makularna degeneracija uslijed starenja, granulacija, opeklina, hemofilik azarašćivanja, reumatoidni artritis, hipertrofički ožiljci, neovaskularni glaukom, nesrašćene frakture; Osier Weber sindrom, psorijaza, granulom, retrolentalna fibroplazija, pterigium, skleroderma, trahom, vaskularna adhezija, okularna neovaskularizacija, parazitske bolesti, hipertrofija nakon kirurškog zahvata, inhibicija rasta kose, makularna degeneracija (podrazumijevajući vlažni i suhi tip), reumatoidni artritis i osteoartritis. u jednom aspektu, bolesti koje se karakterizirane aberantnom vaskularizacijom su rak, makularna degeneracija i reumatoidni artritis.

Nadalje u skladu s razmatranjem ovog izuma, supstanca strukturne formule (I) i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečenu supstancu mogu biti aplicirane pacijentu, koji je prvenstveno čovjek, a koji boluje od bolesti koje su povezane s poremećajima metabolizma bakra (npr. Wilsonova bolest) u svrhu tretiranja rečene bolesti.

- 5 Nadalje u skladu s razmatranjem ovog izuma, supstanca strukturne formule (I) i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečenu supstancu mogu biti aplicirane pacijentu, koji je prvenstveno čovjek, a koji boluje od pretilosti. Supstance strukturne formule (I) se mogu nadalje koristiti za reduciranje razina inflamatornih citokina (npr. TNF- α , TNF- β , IL-8, itd.) i plazminogen aktivator inhibitor koji može biti povezan s angiogenezom i pretilošću. (Loskutoff et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. **2000**, 902:272-281; Pan et al., Cancer Res. **2002**, 62:4854-4859; Hanada et al., Cytokine Growth Factor Rev. **2002**, 13:413-421; Chen et al., Science **2002**, 296:1634-5; Miyake et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol. **1998**, 159:18-28; Koch et al., Science **1992**, 258:1798-801; Osawa et al., Infect. Immun. **2002**, 70:6294-6301; Bajou et al., Nat. Med. **1998**, 4:923-8).

- 15 Nadalje u skladu s ovim izumom, supstanca strukturne formule (I) i/ili farmaceutska kompozicija koja podrazumijeva rečenu supstancu može biti aplicirana u pacijenta koji je prvenstveno čovjek, koji pati od neurodegenerativnog poremećaja, a u svrhu tretmana rečenog neurodegenerativnog poremećaja. U okvirima struke uočeno je da povišene razine bakra ukazuju na različite neurodegenerativne poremećaje, podrazumijevajući također i Alzheimerovu bolest, amiotrofnu lateralnu sklerozu (ALS) i prion bolest (Llanos et al., DNA Cell Biol. **2002**, 21:259-270; Carri et al., Funct. Neurol. **2001**, 16:181-188; Perry et al., CNS Drugs **2002**, 5:869-870; Maynard et al., J. Biol. Chem. **2002**, September 4; Gnjec et al., Front Biosci. **2002**, 16-23; Strausak et al., Brain Res. Bull. **2001**, 55:175-185; Brown, Brain Res. Bull. **2001**, 55:165-173; Brown, Biochem Soc. Trans **2002**, 30:742-745).

- 25 Nadalje u skladu s ovim izumom, supstanca strukturne formule (I) i/ili farmaceutska kompozicija koja podrazumijeva rečenu supstancu može biti aplicirana u pacijenta koji je prvenstveno čovjek, u svrhu tretmana poremećaja regulacije aktivnosti NF-kB ili poremećaja regulacije inflamacije ili inflamatornog odgovora.

- 30 Nadalje u pojedinim aspektima, supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečene supstance mogu biti aplicirane u pacijenta, s tim da se prvenstveno misli na čovjeka, kao preventivna mjera protiv različitih bolesti ili poremećaja koji su karakterizirani aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću i poremećajem u regulaciji NF-kB sustava. U skladu s tim, supstance strukturne formule (I) i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečene supstance mogu biti korištene u prevenciji jedne bolesti ili poremećaja, s tim da se istovremeno konkurentno tretira druga bolest ili poremećaj (npr. Wilson-ova bolest ili Alzheimer-ova bolest uz tretman raka).

- 35 Činjenica da li supstance strukturne formule (I) i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečene supstance odgovaraju u tretiranju ili prevenciji različitih bolesti ili poremećaja koji su karakterizirani aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću i poremećajem u regulaciji NF-kB sustava, može biti određena primjenom metoda koje su općenito poznate u okvirima struke. U skladu s tim očekuje se od stručnjaka da s lakoćom procjenjuju i koriste supstance strukturne formule (I) i/ili farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju rečene supstance u svrhu tretiranja ili preveniranja aberantne vaskularizacije, poremećaja metabolizma bakra, neurodegenerativnih poremećaja, pretilosti i poremećaja u regulaciji NF-kB sustava.

Terapeutska/profilaktička aplikacija

- 45 Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma i/ili farmaceutske kompozicije koje ih podrazumijevaju mogu se pogodno koristiti u humanoj medicini. Kao što je prethodno opisano u Odjeljku 5.5, supstance strukturalne formule (I) i/ili njihove farmaceutske kompozicije su korisne za tretman ili prevenciju različitih bolesti koje su karakterizirane aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, pretilošću ili poremećajem u regulaciji NF-kB.

- 50 Kada se koriste za tretiranje ili preveniranje naprijed rečenih bolesti ili poremećaja, supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma i/ili farmaceutske kompozicije koje ih podrazumijevaju mogu biti aplicirane ili primijenjene samostalno ili pak u kombinaciji sa drugim agensima. Supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma i/ili farmaceutske kompozicije koje ih podrazumijevaju mogu također biti aplicirane pojedinačno i u kombinaciji s drugim farmaceutski aktivnim reagensima (npr. drugim ant-karcinogenim reagensima, drugim anti-angiogenim reagensima, drugim helatorima kao što je primjerice cink, penicilamin, itd. kao i drugim agensima koji su aktivni protiv pretilosti), podrazumijevajući i ostale supstance koje se razmatraju u ovom izumu.

- 60 Ovaj izum omogućava metode provedbe tretmana i profilakse putem apliciranja terapijski aktivne količine farmaceutske kompozicije i/ili supstance koja se razmatra u ovom izumu. Pacijent može biti životinja, no u preferiranom slučaju se radi o sisavcu, preferabilno o čovjeku.

Supstance i/ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma, koje podrazumijevaju jednu ili više supstanci koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma, se prvenstveno apliciraju oralnim putem. Supstance i/ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu također biti aplicirane na bilo koji od poznatih konvencionalnih načina, primjerice infuzijom ili bolusnom injekcijom, apsorpcijom kroz epitel ili mukokutalne slojeve (npr. oralna mukoza, rektalna i intestinalna mukoza itd.). Aplikacija može biti sistemska ili lokalna. Poznati su različiti sustavi dostavljanja lijeka (npr. enkapsulacija u liposome, mikropartikule, mikrokapsule, kapsule itd.) koji mogu biti korišteni za aplikaciju supstance i/ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma. Metode aplikacije podrazumijevaju, bez da su istovremeno ograničene na njih, intradermalna, intramuskularna, intraperitonealna, intravenska, subkutana, intranazalan, epiduralna, oralna, sublingualna, intranazalna, intracerebralna, intravaginalna, transdermalna, rektalna, putem inhalacije, topički, posebice u uši, nos, oči ili kroz kožu. Preferirani način aplikacije se ostavlja pojedinom liječniku na odabir i ovisit će o zdravstvenom stanju pacijenta. U većini će slučajeva, aplikacija rezultirati otpuštanje supstanci i/ili farmaceutskih kompozicija koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma u krvotok.

U specifičnim aspektima ovog izuma, može se pojaviti primjerice potreba da se aplicira jedna ili više supstanci i/ili farmaceutskih kompozicija koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma, lokalno u ciljno oboljelo područje. To se može postići primjerice lokalnom infuzijom tijekom kirurškog zahvata, topičkom aplikacijom, npr. u konjukciji sa smjesom za cijeljenje rana nakon operacije, injekcijom, putem katetera, putem supozitorija, putem implantata, s tim da je rečeni implantat porozan, neporozan ili želatinozni materijal, podrazumijevaju također i membrane kao što su sialastične membrane ili vlakna. U jednom aspektu aplikacija može biti izvedena neposrednim injektiranjem na mjesto razvoja raka ili artritisa.

U pojedinim aspektima ovog izuma, može biti pogodno uvođenje jedne ili više supstanci i/ili farmaceutskih kompozicija koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma, u središnji nervni sustav i to na bilo koji od dostupnih primjerenih načina, što podrazumijeva intraventrikularnu, intratekalnu i epiduralnu injekciju. Intraventrikularna injekcija može biti provedena uz pomoć intraventrikularnog katetera, primjerice s rezervoarom kao što je npr. Ommaya rezervoar.

Supstanca i/ili farmaceutska kompozicija koja se razmatra u kontekstu ovog izuma, može također biti aplicirana neposredno u pluća inhalacijom. Za apliciranje inhalacijom, supstanca i/ili farmaceutska kompozicija koja se razmatra u ovom izumu može biti na odgovarajući način dostavljena u pluća uz pomoć brojnih različitih uređaja. Primjerice, može se koristiti tzv. Metered Dose Inhaler ("MDI") koji koristi kanistere koji sadržavaju odgovarajući propelant niskog vrelišta (npr. diklorodifluorometan, triklorofluorometan, diklorotetrafluorometan, ugljik dioksid ili svaki drugi odgovarajući plin) u svrhu dopremanja supstance koja se razmatra u ovom izumu neposredno u pluća.

Alternativno, može se koristiti tzv. Dry Powder Inhaler ("DPI") u svrhu apliciranja supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u kontekstu ovog izuma u pluća. DPI uređaj uobičajeno koristi mehanizam izgaranja plina u svrhu stvaranja oblaka suhog praška unutar kontejnera, koji potom može biti inhaliran u pluća pacijenta. DPI uređaji su također poznati u okvirima struke. Popularna varijacija DPI uređaja koji podrazumijeva višestruke doze je multidozni DPI ("MDDPI") sustav koji dopušta apliciranje više terapijskih doza. MDDPI uređaji su dostupni kod dobavljača Astra Zeneca, GlaxoWellcome, IVAX, Schering Plough, SkyePharma i Vectura. Primjerice, kapsule i punjenja želatina za korištenje u inhaleru ili insuflatoru mogu biti formulirane na način da sadržavaju smjesu praška supstance koja se razmatra u kontekstu ovog izuma, i odgovarajući bazni prašak kao što je laktoza ili škrob.

Drugi oblik uređaja koji može biti korišten u svrhu dostavljanja supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu u pluća je uređaj koji dostavlja tekući sprej a može se nabaviti od Aradign Corporation. Sustavi tekućih sprejeva koriste izrazito male pukotine za raspršivanje u pluća.

U jednom aspektu izuma, koristi se magličasti raspršivač u svrhu dostavljanja supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu u pluća. Takve vrste raspršivača stvaraju aerosole iz tekućih formulacija lijekova, i to primjerice korištenjem ultrazvučne energije u svrhu kreiranja finih čestica koje mogu biti neposredno inhalirane. (pogledati primjerice Verschoyle et al., British J. Cancer, **1999**, 80, Suppl. 2, 96, koji je u ovaj dokument inkorporiran u obliku reference). Primjeri takvih raspršivača podrazumijevaju uređaje koji se mogu nabaviti kod Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd. (pogledati, Arner et al., US Patent br. 5,954,047; van der Linden et al., US Patent br. 5,950,619; van der Linden et al., US Patent br. 5,970,974), Aventis and Batelle Pulmonary Therapeutics.

U slijedećem aspektu izuma, koristi se elektrohidrodinamski ("EHD") aerosol uređaj u svrhu dostavljanja supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu u pluća. EHD aerosol uređaji koriste električnu energiju za akrolizaciju tekućih otopina lijekova ili suspenzija (pogledati primjerice Nokes et al., US Patent br. 4,765,539). Elektrokemijska svojstva formulacije mogu biti važni parametri u optimizaciji prilikom dostavljanja supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu u pluća uz pomoć EHD aerosol uređaja i takva optimizacija se izvodi rutinski od strane stručnjaka. EHD aerosol uređaji mogu dostavljati lijekove mnogo učinkovitije u pluća u usporedbi sa postojećim tradicionalnim tehnologijama dostavljanja supstanci u pluća.

U slijedećem aspektu ovog izuma, supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu mogu biti dostavljene u vezikule, posebice liposome (pogledati Langer, **1990**, Science, 249:1527-1533; Treat et al., u "Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer" (Liposomi u terapiji infekcijskih bolesti i raka), Lopez-Berestein and Fiedler (urednici), Liss, New York, str. 353-365 (1989)).

U slijedećem aspektu ovog izuma, supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu mogu biti dostavljene putem sustava odgođenog otpuštanja, prvenstveno putem oralnih sustava odgođenog otpuštanja. U jednom aspektu može se koristiti pumpa (pogledati "Medical Applications of Controlled Release" (Medicinske aplikacije za kontrolirano otpuštanje lijeka), Langer and Wise (urednici), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974); "Controlled Drug Bioavailability" (Kontrolirana biodostupnost lijekova), "Drug Product Design and Performance" (Oblikovanje lijekova i njihovog djelovanja), Smolen and Ball (urednici, Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, **1983**, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; pogledati također Levy et al., **1985**, Science, 228:190; During et al., **1989**, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., **1989**, J. Neurosurg. 71:105). U slijedećem aspektu izuma, koriste se polimerni materijali za oralno odgođeno otpuštanje. Polimeri koji se u ovom slučaju preferiraju podrazumijevaju natrij karboksimetilcelulozu, hidroksipropilcelulozu, hidroksipropilmetilcelulozu hidroksietilcelulozu (preferira se hidroksipropilmetilceluloza). Opisani su i drugi odgovarajući oblici celuloza etera (Alderman et al., Int. J. Pharm, tech & Prod. Mfr., 1984, 5(3)1-9. Faktori koji utječu na otpuštanje lijekova su dobro opisani i poznati stručnjacima (Bamba et al., Int. JH. Pharm., **1979**, 2, 307).

U slijedećem aspektu ovog izuma, mogu se koristiti enterički preparati za aplikaciju oralnog odgođenog otpuštanja. Materijali koji se preferiraju za enteričko zaštitno oblaganje podrazumijevaju polimere čija je topivost ovisna o vrijednosti pH (npr. pH kontrolirano otpuštanje), polimere s polaganim pH-ovisnim bubrenjem, disolucijom ili erozijom (npr. vremenski kontrolirano otpuštanje), polimeri koji bivaju degradirani enzimima (npr. enzimima kontrolirano otpuštanje) i polimeri koji tvore čvrste slojeve koji bivaju uništeni povećanjem tlaka (npr. otpuštanje kontrolirano tlakom).

U slijedećem aspektu izuma, koriste se sustavi za osmotsko dostavljanje kod oralnih izvedbi aplikacije s kontroliranim otpuštanjem. (Verna et al., Drug Dev. Ind. Pharm., **2000**, 26:695-907. U još jednom slijedećem aspektu ovog izuma, koriste se OROSTM osmotski uređaji za uređaje koji su namijenjeni za oralnu aplikaciju kontrolirano otpuštanja supstanci (Theuwees et al., US Patent br. 3,845,770; Theuwees et al., US Patent br. 3,916,899).

U slijedećem aspektu ovog izuma, sustav s kontroliranim otpuštanjem može biti smješten u blizinu cilnog tkiva supstance i/ili farmaceutske kompozicije koja se razmatra u ovom izumu, s tim da je pri tom potreban samo jedan dio sustava (pogledati primjerice Goodson, u "Medical Applications of Controlled Release" (Medicinske aplikacije za kontrolirano otpuštanje), supra, vol. 2, str. 115-138 (1984)). Mogu se koristiti i drugi sustavi za kontrolirano otpuštanje, primjerice oni koji su opisani u Langer, **1990**, Science 249:1527-1533.

Farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u ovom izumu

Ove farmaceutske kompozicije sadržavaju terapijski učinkovitu količinu jedne ili više supstanci koje se razmatraju u ovom izumu, prvenstveno u čistom obliku, zajedno s odgovarajućom količinom farmaceutske prihvatljivog nosača, a sve u svrhu omogućavanja forme koja je odgovarajuća za aplikaciju u pacijenta. Kada biva aplicirana u pacijenta, supstance koje se razmatraju u ovom izumu kao i farmaceutske prihvatljivi nosači su prvenstveno u sterilnom obliku. Kao nosač se preferira voda, posebice u slučaju kada se supstanca koja se razmatra u ovom izumu unosi intravenski. Kao tekući nosači mogu se koristiti fiziološke otopine i vodene otopine dektroze i glicerola, posebice u slučajevima otopina za injektiranje. Odgovarajući farmaceutske nosači također podrazumijevaju ekscipijente kao što su škrob, glukoza, laktoza, sukroza, želatina, slad, riža, brašno, kreda, silika gel, natrij stearat, glicerol monostearat, talk, natrij klorid, sušeno obrano mlijeko, glicerol, propilen, glikol, voda, etanol i slično. Farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu u pojedinim slučajevima sadržavati i manje količine reagensa za vlaženje ili emulzificiranje, ako i pH puferirajuće reagentse. Nadalje, mogu se također koristiti i reagensi za stabiliziranje, zgušnjavanje, lubriciranje i bojanje.

Farmaceutske kompozicije koje podrazumijevaju supstance koje se razmatraju u ovom izumu mogu biti proizvedene na način konvencionalnog miješanja, otapanja, granuliranja, oblikovanja dražea, levigiranja, emulzificiranja, enkapsuliranja, uklapanja i liofilizacije. Farmaceutske kompozicije mogu biti formulirane na konvencionalan način uz korištenje jednog ili više fiziološki prihvatljivih nosača, razrjeđivača, ekscipijenata ili dodataka, koji omogućavaju procesiranje supstanci koje se razmatraju u ovom izumu u pripravke koji se potom mogu farmaceutske koristiti. Odgovarajuće formulacije će pri tom ovisiti o odabranom načinu aplikacije.

Farmaceutske kompozicije koje se ovdje razmatraju mogu dobiti oblik otopina, suspenzija, emulzija, tableta, pilula, peleta, kapsula, kapsula koje sadržavaju tekućine, prašaka, formulacija sa odgođenim otpuštanjem, supozitorija, emulzija, aerosola, sprejeva, suspenzija ili bilo koje druge odgovarajuće forme. U jednom aspektu, farmaceutske

prihvatljivi nosač je kapsula (pogledati primjerice Grosswald et al., US Patent br. 5,698,155). Drugi primjeri odgovarajućih farmaceutskih nosača opisani su u stručnoj literaturi (pogledati Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Znanost i praksa u farmaciji), Philadelphia College of Pharmacy and Science, 20th Edition, 2000).

- 5 Za topičku aplikaciju supstance koja se razmatra u ovom izumu, pripravak može biti oblikovan u obliku otopina, gelova, masti, krema, suspenzija itd. što je dobro poznato u okvirima struke.

Sustavne formulacije podrazumijevaju one oblike koji su namijenjeni za aplikaciju injekcijskim putem, npr. subkutano, intravenski, intramuskularno, intratekalno ili intraperitonealno, kao i one oblike koji su namijenjeni i oblikovani za 10 transdermalnu, transmukozalnu, oralnu ili pulmonarnu administraciju. Sustavne formulacije mogu biti izvedene u kombinaciji s daljnjim aktivnim reagensima koji poboljšavaju mukocilijarnu bistrinu zračnog mukusa ili pak reduciraju viskozitet mukoze. Ovi aktivni reagensi podrazumijevaju, no nisu istovremeno ograničeni na, blokatore natrijevih kanala, antibiotike, N-acetil cistein, hemocistein i fosfolipide.

15 U jednom aspektu ovog izuma, supstance koje se ovdje razmatraju bivaju formulirane u skladu s rutinskim postupcima kao farmaceutske kompozicije koje su prilagođene za intravensku aplikaciju kod ljudi. Uobičajeno, supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma koje su namijenjene za intravensku aplikaciju su otopine u sterilnom izotoničnom vodenom puferu. U svrhu injektiranja, supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu biti formulirane u vodene otopine, prvenstveno u fiziološki kompatibilnim puferima kao što je Hank otopina, Ringer otopina ili pufer 20 izveden od fiziološke otopine. Takva otopina može sadržavati formulatorne reagense kao što su reagensi za suspendiranje, stabiliziranje i/ili dispergiranje. Kada je to potrebno, farmaceutske kompozicije mogu također podrazumijevati solubulizirajući reagens. Farmaceutske kompozicije za intravensku aplikaciju mogu opcionalno podrazumijevati lokalni anestetik kao što je primjerice lignokain u svrhu smanjivanja boli na mjestu injekcije. Općenito uzevši, rečeni sastojci se unose ili odvojeno ili zajedno u smjesi u jediničnoj formi doziranja. primjerice kao liofilizirani 25 prašak ili dehidrirani koncentrat u hermetički zatvorenom kontejneru kao što je primjerice ampula na kojoj je navedena količina aktivne supstance. Kada je supstanca koja se ovdje razmatra aplicirana putem infuzije, može biti dispencirana, primjerice uz pomoć infuzijske boce koja sadržava sterilni farmaceutski gradijent vode ili fiziološke otopine. Kada je supstanca koja se ovdje razmatra aplicirana putem injekcije, može se omogućiti ampula sterilne vode za injektiranje ili fiziološka otopina, tako da se sastojci mogu pomiješati prije same aplikacije.

30 Za potrebe izvedbe transmukozalne aplikacije, u formulacijama se koriste odgovarajući penetranti koji prolaze kroz barijeru. Takvi su penetranti dobro poznati u okvirima struke.

Farmaceutske kompozicije namijenjene za oralnu aplikaciju mogu biti primjerice u formi tableta, vodenih ili uljnih 35 suspenzija, granula, prašaka, emulzija, kapsula, sirupa ili eliksira. Farmaceutske kompozicije koje se apliciraju oralno mogu sadržavati jedan ili više opcionalnih reagensa, kao što su primjerice zaslađivači poput fruktoze, aspartama ili saharina; supstance koje poboljšavaju okus poput peperminta, ulja crnogorice, ili kolorirajuće reagense i konzervative u svrhu pripremanja farmaceutskog pripravka koji je podnošljiv za nepce. Nadalje, kada je pripravak u formi tablete ili 40 pilule, kompozicije mogu biti prevučene slojem koji omogućava njihovo odgođeno otpuštanje i apsorpciju u gastrointestinalnom traktu, omogućavajući na taj način produženo djelovanje. Selektivno propusne membrane koje okružuju osmotski aktivnu vodeću supstancu, su također pogodne za oralnu aplikaciju supstanci koje se ovdje razmatraju. U rečenim slučajevima, fluid iz okoliša okružuje kapsulu koja postepeno bubri i otpušta reagens ili kompoziciju reagensa kroz otvore. Ovakav način dovođenja supstance ima znatne prednosti u odnosu na konvencionalni način jednostrukog otpuštanja cjelokupne količine aktivne supstance. Može se također koristiti materijal kao što je 45 primjerice glicerol monostearat ili glicerol stearat. Oralne kompozicije mogu podrazumijevati standardne nosače kao što su manitol, laktoza, škrob, magnezij stearat, natrij saharin, celulozu, magnezij karbonat itd. rečeni nosači su preferabilno farmaceutski primjenjivi.

50 Tekući preparati koji se apliciraju oralno kao što su primjerice suspenzije, eliksiri i otopine, odgovarajući nosači, ekscipijenti ili diluenti, podrazumijevaju vodu, fiziološku otopinu, alkilenglikole (npr. propilen glikol), polialkilen glikole (npr. polietilen glikol) ulja, alkohole, lagano kisele pufere sa vrijednosti pH između 4 i 6 (npr. acetat, citrat, askorbat u koncentracijama od oko 5.0 do 50.0 mM) itd. Nadalje se mogu dodati agensi za poboljšavanje okusa, konzervativi, boje, soli, acilkarnitini i slično.

55 Za bukalnu aplikaciju, farmaceutske kompozicije mogu biti oblikovane na tradicionalni način kao tablete i pastile.

Tekuće formulacije lijekova koje su pogodne za korištenje s raspršivačima i EHD aerosol uređajima će uobičajeno podrazumijevati supstancu koja se razmatra u ovom izumu s farmaceutski prihvatljivim nosačem. U preferiranom slučaju, farmaceutski prihvatljiv nosač je tekućina kao što je primjerice alkohol, voda, polietilen glikol ili 60 perfluorokarbon. Opcionalno se može dodati i neki drugi materijal u svrhu mijenjanja svojstava aerosola otopine ili suspenzije supstance koja se razmatra u ovom izumu. U preferiranom slučaju, rečeni materijal može biti tekućina kao npr. alkohol, glikol, poliglikol ili masna kiselina. Stručnjacima su također poznate i druge metode formuliranja tekućih

otopina lijeka ili suspenzija koje su odgovarajuće za korištenje u aerosol uredajima (pogledati npr. Biesalski, US Patent br. 5,112,598; Biesalski, US Patent br. 5,556,611.

Supstanca koja se ovdje razmatra može također biti oblikovana u rektalne ili vaginalne farmaceutske kompozicije kao što su primjerice supozitoriji ili retencijski enemi, npr. sadržavaju konvencionalne baze supozitorija kao što su kakao maslac ili drugi gliceridi.

Pored formulacija koje su naprijed opisane, supstanca koja se ovdje razmatra može također biti formulirana kao depo preparat. Takve formulacije produženog djelovanja mogu biti aplicirane implantiranjem (primjerice, subkutano ili intramuskularno) ili intramuskularnom injekcijom. Tako primjerice, supstanca koja se ovdje razmatra može biti formulirana sa odgovarajućim polimernim ili hidrofobnim materijalima (primjerice kao emulzija u odgovarajućem ulju) ili izmjenjivačkim smolama, ili pak sa blago topivim derivatima, primjerice blago topivim solima.

U slučajevima kada je supstanca koja se ovdje razmatra kisela, može biti uključena u bilo koju od naprijed spomenutih formulacija u obliku slobodne kiseline, farmaceutski prihvatljive soli, solvata ili hidrata. Farmaceutski prihvatljive soli dosljedno zadržavaju aktivnost slobodne kiseline, mogu biti pripravljene reakcijom s bazama, i b+više su topive u vodenim nego u drugim protičkim otapalima, u usporedbi s odgovarajućom slobodnom kiselinom.

Terapeutske doze

Supstanca koja se ovdje razmatra ili njezina odgovarajuća farmaceutska kompozicija, općenito uzevši će biti korištena u količini koja je učinkovita u smislu postizanja namjeravanog planiranog cilja. Za korištenje u svrhu tretiranja ili preveniranja bolesti ili poremećaja koje su karakterizirane aberantnom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima i pretilošću, supstance strukturalne formule (I) i/ili njihove farmaceutske kompozicije bivaju aplicirane u terapeutski učinkovitoj količini.

Količina supstance koja se ovdje razmatra koja će biti učinkovita u tretmanu određenog poremećaja ili stanja koje se ovdje navodi, ovisit će o prirodi poremećaja ili stanja, i može biti određena standardnim kliničkim tehnikama koje su poznate u okvirima struke, kao što je to naprijed opisano. Nadalje, *in vitro* ili *in vivo* eseji se mogu opcionalno koristiti u svrhu određivanja optimalnih raspona doza. Količina aplicirane supstance koja se ovdje razmatra će svakako ovisiti i o drugim faktorima, te o stanju pacijenta, njegovoj tjelesnoj težini, ozbiljnosti poremećaja, načinu aplikacije i procjeni liječnika.

Primjerice, doza može biti dostavljena u farmaceutskoj kompoziciji putem jedne aplikacije, putem višestrukih aplikacija ili putem sustava kontroliranog otpuštanja. U jednom aspektu ovog izuma, supstance koje se ovdje razmatraju se dostavljaju putem oralnog sustava aplikacije s odgođenim otpuštanjem. Preferira se u ovom aspektu izuma da su supstance koje se ovdje razmatraju aplicirane dva puta na dan (u još boljem slučaju, jedan put dnevno). Doziranje može biti ponavljano, može biti omogućeno jedan put ili pak u kombinaciji sa drugim lijekovima i može potrajati koliko je potrebno za učinkovit tretman stanja bolesti ili poremećaja.

Odgovarajući rasponi doziranja za oralnu aplikaciju ovisit će o potencijalu lijeka, no općenito uzevši oni se kreću od oko 0.001 mg do oko 200 mg supstance koja se ovdje razmatra, po kilogramu tjelesne težine pacijenta. Rasponi doziranja mogu jednostavno biti određeni uz pomoć metoda koje su dobro poznate u okvirima struke.

Odgovarajući rasponi doza za intravensku (i.v.) aplikaciju se kreću od oko 0.01 mg do oko 100 mg po kilogramu tjelesne težine pacijenta. Odgovarajući rasponi doza za intranazalnu aplikaciju se kreću od oko 0.01 mg do oko 1 mg po kilogramu tjelesne težine pacijenta. Supozitorije općenito uzevši sadržavaju oko 0.01 mg do oko 50 mg supstance koja se razmatra u ovom izumu, po kilogramu tjelesne težine pacijenta i podrazumijevaju aktivni sastojak u rasponu od oko 0.5% do oko 10% po kilogramu tjelesne težine pacijenta. Doze koje se preporučuju za intradermalnu, intramuskularnu, intraperitonealnu, subkutanu, epiduralnu, sublingualnu ili intracerebralnu aplikaciju kreću se od oko 0.001 mg do oko 200 mg po kilogramu tjelesne težine pacijenta. Učinkovite doze mogu biti ekstrapolirane od krivulja odgovora koje su izvedene iz *in vitro* testa sustava životinjskih modela. Takvi životinjski modeli su dobro poznati u okvirima struke.

Supstance koje se razmatraju u ovom izumu se prvenstveno ispituju u *in vitro* i *in vivo* esejima, u svrhu procjene željene terapeutske ili profilaktičke aktivnosti, prije no što se počnu ispitivati i primjenjivati na ljudima. Primjerice, *in vitro* eseji mogu biti korišteni za određivanje činjenice da li aplikacija specifične supstance koja se razmatra u kontekstu ovog izuma ili kombinacije rečenih supstanci može djelovati pozitivno na reduciranje konvulzija i do koje mjere. Za supstance koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma može se također odrediti učinkovitost i sigurnost korištenjem sustava životinjskih modela.

U preferiranom slučaju, terapeutski učinkovita doza supstance koja se razmatra u kontekstu ovog izuma polučit će terapeutsku dobrobit, a bez da uzrokuje toksičnost. Toksičnost supstanci koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma može

biti brzo i učinkoviti određena korištenjem farmaceutskih postupaka od strane stručnjaka. Omjer doza između toksičnog i terapijskog učinka predstavlja terapijski indeks. Supstanca koja se razmatra u kontekstu ovog izuma će prvenstveno pokazivati posebice visoke terapijske indekse u tretiranju bolesti i poremećaja. Doziranje supstance koja se razmatra u kontekstu ovog izuma, a koje je ovdje opisano, prvenstveno će se kretati unutar raspona cirkulirajućih koncentracija koje podrazumijevaju učinkovitu dozu s malo ili nimalo toksičnosti.

Kombinirana terapija

U pojedinim aspektima ovog izuma, supstance i/ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu biti korištene u kombiniranoj terapiji s barem jednim terapijskim reagensom. Supstanca i/ili farmaceutska kompozicija koja se razmatra u kontekstu ovog izuma i rečeni terapijski reagens mogu djelovati aditivno, ili u boljem slučaju sinergijski. U preferiranom aspektu, supstanca i/ili pripadajuća farmaceutska kompozicija koja se razmatra u kontekstu ovog izuma biva aplicirana konkurentno uz aplikaciju drugog terapijskog reagensa, koji zapravo može predstavljati dio iste farmaceutske kompozicije kao i rečena razmatrana supstanca ili dio neke druge farmaceutske kompozicije. U drugom aspektu ovog izuma, farmaceutska kompozicija supstance koja se razmatra u ovom izumu biva aplicirana prije aplikacije drugog terapijskog reagensa.

Posebice u jednom drugom preferiranom aspektu ovog izuma, supstance i/ili pripadajuće farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma mogu biti korištene u kombiniranoj terapiji s drugim kemoterapeutskim reagensima (npr. alkilirajući reagensi (kao što su primjerice dušikove muštarde (npr. ciklofosfamidi, ifosfamidi, mekloretamini, melfaleni, klorambucili, heksametilmelamini, tiotepa), alkil sulfonati (npr. busulfan), nitrozouree, triazini), antimetaboliti (npr. analozi folne kiseline, analozi pirimidina (npr. fluoroacil, floksuridin, citozin arabinosid, itd.), analozi purina (npr. merkaptopurin, tioguanin, pentostatin, itd.), prirodni produkti (npr. vinblastin, vinkristin, etoposid, terciposid, daktinomycin, daunorubicin, doksorubicin, bleomicin, mitrimicin, mitomicin C, L-asparaginaza, interferon α), platinski kompleksi (npr. cis-platina, karboplastin, itd.), mitoksantron, hidroksiurea, prokarbazin, hormoni i antagonisti (npr. prednizon, hidroksiprogesteron kaproat, medroksiprogesteron acetat, megestrol acetat, dietilstilbestrol, etinil estradiol, tamoksifen, testosteron propionat, fluoksimesteron, flutamid, leuprolid, itd.), anti-angiogeni agensi ili inhibitori (npr. angiostatin, retinolna kiselina i paklitaksel, derivati estradiola, derivati tiazolpirimidina, itd.), agensi koji induciraju apoptozu (npr. antisens nukleotidi koji blokiraju onkogene koji inhibiraju apoptozu, tumor supresori, TRAIL, TRAIL polipeptidi, Fas-asocirani faktor 1, interleukin- 1β -konvertirajući enzim, fosfotirozin inhibitori, RXR retinoid receptor agonisti, derivati karbostirila itd.), helatori (penicilamin, cink, trientin, itd.) i drugi reagensi koji su aktivni protiv pretilosti.

Terapijski pribori

Ovaj izum omogućava terapijske pribore koji sadržavaju supstance koje se ovdje razmatraju i farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma. Terapijski pribori mogu također sadržavati i druge supstance (npr. kemoterapeutske agense, prirodne produkte, hormone ili antagoniste, anti-angiogene agense ili inhibitore, agense koji induciraju apoptozu ili helatore) ili farmaceutske kompozicije naprijed rečenih supstanci.

Terapijski pribori mogu podrazumijevati jedan kontejner koji sadržava supstancu razmatranu u ovom izumu ili pripadajuće farmaceutske kompozicije razmatrane u ovom izumu, sa ili bez komponenti (npr. druge supstance ili pripadajuće farmaceutske kompozicije koje ih sadržavaju) ili mogu podrazumijevati zasebni kontejner za svaku pojedinu komponentu. U preferiranom slučaju terapijski pribori koji se ovdje razmatraju sadržavaju supstancu koja se ovdje razmatra ili farmaceutske kompozicije koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma, koji su pakirani na način da omogućavaju korištenje u kombinaciji sa ko-aplikacijom druge supstance (koja je u preferiranom slučaju kemoterapeutske agense, prirodni produkt, hormon ili antagonist, anti-angiogeni agens ili inhibitor, agens koji inducira apoptozu ili helator) ili odgovarajuće farmaceutske kompozicije koja ih sadržava. Komponente rečenog pribora mogu biti u formi kompleksa, ili pak svaka komponenta može biti sadržana u zasebnom kontejneru prije aplikacije u pacijenta.

Komponente u priboru mogu biti dostupne u obliku jedne ili više tekućih otopina, preferabilno u obliku vodene otopine, a u još boljem slučaju u obliku sterilne vodene otopine. Komponente u priboru mogu također biti dostupne u obliku krutine, koja može biti konvertirana u tekući oblik dodavanjem odgovarajućih otapala, koja su u preferiranom slučaju dostupna u zasebnom kontejneru.

Kontejner terapijskog pribora može biti posudica, flašica, bočica, štrcaljka ili bilo koji drugi oblik u kojeg se može zatvoriti krutina ili tekućina. Obično u slučajevima kada je prisutno više od jedne komponente, pribor će podrazumijevati drugu bočicu ili kontejner, što će omogućiti odvojeno doziranje. Pribor može također podrazumijevati drugi kontejner za farmaceutski prihvatljivu tekućinu.

U preferiranom slučaju, terapijski pribor će sadržavati aparaturu (npr. jednu ili više igala, štrcaljke, kapaljke za oči, pipete itd.) koja će omogućiti aplikaciju pojedinih komponenti pribora.

PRIMJERI

Ovaj je izum nadalje definiran referencama slijedećih primjera koji detaljno opisuju pripremanje supstanci koje se razmatraju u kontekstu ovog izuma i metode za ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Stručnjacima će biti jasno da su u ovom kontekstu primjenjive brojne modifikacije materijala i metoda, koje je moguće primjenjivati bez opasnosti da se izade izvan fokusa razmatranja ovog izuma.

Primjer 1: Opći postupak sinteze derivata tetratiomolibdata

Komercijalno dostupne vodene otopine kvaternarnog amonijevog hidroksida (2 ekv.) dodaje se u amonij tetratiomolibdat (1 ekv.) s deioniziranom vodom sve dok se kruti dio materijala u cijelosti ne otopi. Otopina se stavlja u rotacijski evaporator pod vakuumom (cca 5-10 tora) na 20°C tijekom 2 sata i voda biva primjereno zamijenjena u svrhu održavanja konstantnog volumena. U slučaju da ovaj postupak dovede do nastajanja precipitata, krutina se sakuplja filtracijom, ispire s izopropanolom, etanolom i dietil eterom, te potom suši pod visokim vakuumom tijekom 24 sata u vakuumskom desikatoru u prisustvu P₂O₅. Ukoliko topina ostane bistra, reakcijska se smjesa najprije filtrira u svrhu otklanjanja malih količina krutih nečistoća, i potom se produkt precipitira iz filtrata s izopropanolom. Krutina se sakuplja filtracijom, potom ispire izopropanolom, etanolom i dietil eterom, te potom suši u uvjetima visokog vakuuma tijekom 24 sata u vakuumskom desikatoru u prisustvu P₂O₅.

Primjer 2: Opći postupak sinteze derivata tetratiomolibdata

Krutina kvaternarnog amonijevog halida (2 ekv.) dodaje se u suspenziju amonij tetratiomolibdata (1 ekv.) u suhom acetonitrilu (5 mL po mmol TM) i dobivena smjesa se miješa na sobnoj temperaturi u atmosferi dušika tijekom 18 sati. U slučaju da ovaj postupak dovede do nastajanja precipitata, krutina se sakuplja filtracijom, ispire s vodom, izopropanolom, etanolom i dietil eterom, te potom suši pod visokim vakuumom tijekom 24 sata u vakuumskom desikatoru u prisustvu P₂O₅. Ukoliko topina ostane bistra, reakcijska se smjesa najprije filtrira, a filtrat se potom koncentrira *in vacuo*. Dobivena krutina se suspendira u vodi i filtrira, potom se krutina ispire izopropanolom, etanolom i dietil eterom, te potom suši u uvjetima visokog vakuuma tijekom 24 sata u vakuumskom desikatoru u prisustvu P₂O₅.

Primjer 3: Tetratiomolibdat, bis(trietilmetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (994 mg, 3.82 mmol) i 20% težinskog udjela vodene otopine trietilmetilamonij hidroksida (5.12 g, 7.69 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1 i 1.05 g (60%) naslovne supstance je dostupno u obliku narančasto crvene krutine. IR (KBr, cm⁻¹) 472; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.27 (q, J=7.3 Hz, 12 H), 2.89 (s, 6H), 1.19 (tt, J=7.3, 1.8 Hz, 18H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 55.1 (6C), 46.1 (2C), 7.7 (6C); ES MS m/z (trietilmetil amonijak)⁺ 116.3; UV (H₂O) 468 nm (ε=12000). Analiza: Calcd za C₁₄H₃₆MoN₂S₄: C, 36.82; H, 7.95; N, 6.13. Ustanovljeno: C, 37.07; H, 7.88; N, 6.24.

Primjer 4: Tetratiomolibdat, bis(trietilfenil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (1.00 g, 3.85 mmol) i 10% težinskog udjela vodene otopine trietilmetilamonij hidroksida (15.1 g, 7.71 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1 i 388 mg (17%) naslovne supstance je dostupno u obliku narančaste krutine. IR (KBr, cm⁻¹) 470; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.91 (d, J=8.2 Hz, 4 H), 7.69-7.55 (m, 6H), 3.89 (q, J=6.9 Hz, 12H), 1.04 (t, J=6.9 Hz, 18H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 141.9 (2C), 130.5 (4C), 130.1 (2C), 12-7 (4C), 55.3 (6C), 8.0 (6C); ES MS m/z (trietilfenil amonijak)⁺ 178.2; UV (H₂O) 468 nm (ε=12300). Analiza: Calcd za C₂₄H₄₀MoN₂S₄: C, 49.63; H, 6.94; N, 4.82; S, 22.08. Ustanovljeno: C, 49.39; H, 7.23; N, 5.15; S, 22.41.

Primjer 5: Tetratiomolibdat, bis(holin)

U kontekstu brze aplikacije, bis(holin)tetratiomolibdat ima istu kemijsku strukturu kao bis[2-hidroksietil]trimetil amonijak]tetratiomolibdat. Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (1.08 g, 4.15 mmol) i 50% težinskog udjela vodene otopine holin hidroksida (2.01 g, 8.29 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 1 i 1.30 g (73%) naslovne supstance je dostupno u obliku narančaste krutine. IR (KBr, cm⁻¹) 3389,474; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.21 (t, J=4.6 Hz, 2 H), 3.87-3.79 (m, 4H), 3.43 (t, J=4.6 Hz, 4H), 3.13 (s, 18H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 67.1 (2C), 55.5 (2C), 53.3 (6C); ES MS m/z (holin)⁺ 104.2; UV (H₂O) 468 nm (ε=12900). Analiza: Calcd za C₁₀H₂₈MoN₂O₂S₄: C, 27.77; H, 6.52; N, 6.48; S 29.65; Mo 22.18. Ustanovljeno: C, 27.63; H, 6.84; N, 6.39; S 29.86; Mo 22.23.

Primjer 6: Tetratiomolibdat, bis(acetilholin)

Ova je supstanca pripravljena iz acetilholin klorida (732 mg, 4.03 mmol) i amonij tetratiomolibdata (500 mg, 1.92 mmol) u skladu s postupkom iz Primjera 2 i 390 mg (39%) naslovne supstance je dostupno u obliku narančasto crvene krutine. IR (KBr, cm^{-1}) 1747, 1728, 482, 469, 461; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 4.47-4.41 (m, 4H), 3.72-3.69 (m, 4H), 3.16 (s, 18H), 2.07 (s, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 170.1 (2C), 63.9 (2C), 58.0 (2C), 53.1 (6C), 20.9 (2C); ES MS m/z (acetilholin) $^+$ 146.4; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=13300$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{MoN}_2\text{O}_2\text{S}_4$: C, 32.55; H, 6.24; N, 5.42; S 24.82. Ustanovljeno: C, 32.66; H, 6.23; N, 5.51; S 24.97.

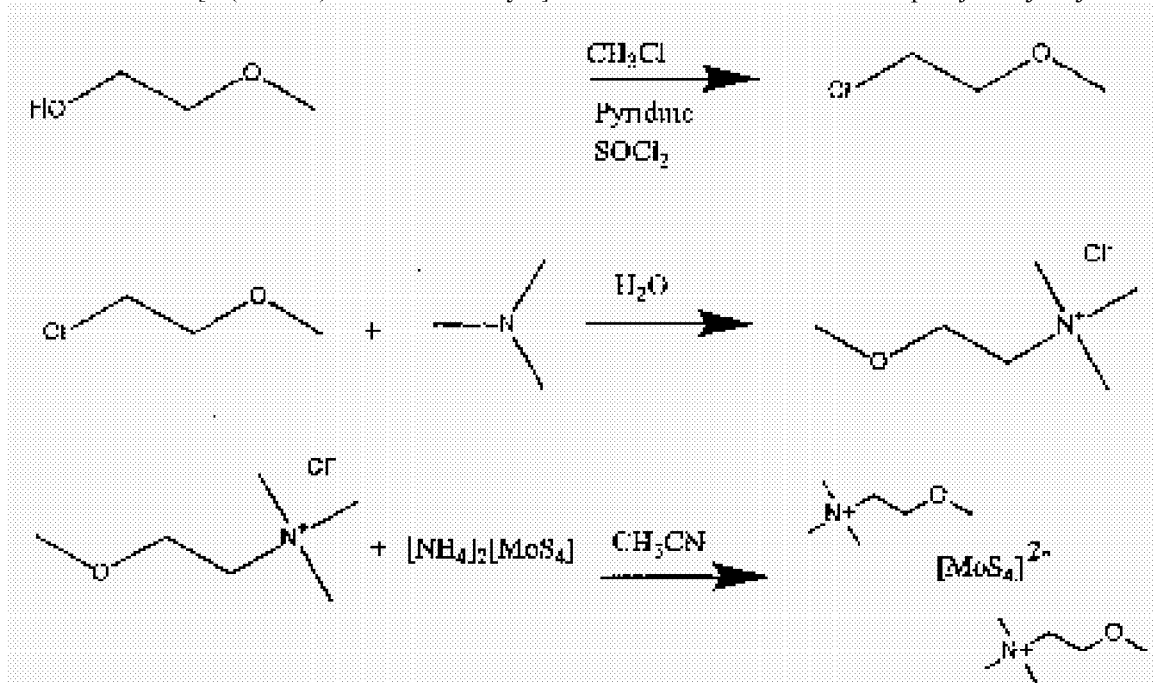
Primjer 7: Tetratiomolibdat, bis[2-(metoksi)etiltrimetil amonijak]

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (5 g, 19.2 mmol) i 2-(metoksi)etiltrimetilamonij klorida (6.199 g, 40.3 mmol, pogledati nadalje u ovom primjeru za postupak sinteze) i miješajućoj suspenziji acetonitrila (125 ml). Suspenzija s miješa tijekom 2 sata, tijekom čega se formira fini svijetlo crveni prašak. Precipitat se filtrira preko staklenog filtra i potom se acetonitril evaporira, nakon čega se dobije 1.76 g (20%) naslovne supstance koja se potom suši u vakuumu. Analiza: Calcd za $\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{MoN}_2\text{O}_4\text{S}_4$: C, 31.293; H, 7.003; N, 6.082. Ustanovljeno: C, 30.85; H, 6.89; N, 6.11.

2-(metoksi)etiltrimetilamonij klorid biva pripremljen združivanjem 1-kloro-2-metoksietana (3.636 g, 38.5 mmol, pogledati nadalje u ovom primjeru za postupak sinteze) u 25 ml bočici s okruglim dnom sa trimetil aminom (40% u vodi, 7.77 ml, 50 mmol). Smjesa se zagrijava do refluksa tijekom 24 sata, potom hladi na sobnoj temperaturi i ispire tri puta sa 15 ml dietil etera. Otapalo se evaporira iz vodenog sloja, nakon čega preostaje bijela krutina koja se ispire s izopropanolom i suši u vakuumu, nakon čega se dobije 4.136 g (70%) supstance.

1-kloro-2-metoksietan biva pripremljen združivanjem 20 ml kloroforma sa 2-metoksietanolom (5.4 ml, 69 mmol) u atmosferi dušika. Tionil klorid (5.0 ml, 69 mmol) i piridin (5.5 ml, 69 mmol) se dodaju postupno putem štrcaljke, sve se potom miješa na sobnoj temperaturi tijekom 1 sat i potom podvrgava uvjetima refluksa tijekom jednog dodatnog sata. Reakcijske komponente se hlade, reakcija se prekida s vodom, slijedi ispiranje dva puta sa 25 ml 1M HCl i otapalo se evaporira. Reakcijski produkti se filtriraju preko silika gela i eluiraju s acetonom, nakon čega se dobije 5.94 g (91%) svijetlo smeđe komponente.

Mehanizam sinteze bis[2-(metoksi)etiltrimetil amonijak] tetratiomolibdata u skladu s ovim primjerom je slijedeći:

**Primjer 8: Tetratiomolibdat, bis[alkildimetil(fenilmetil) amonijak]**

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (1.00 g, 3.84 mmol) i benzalkonij klorida (2.90 g, 8.07 mmol, u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 6, nakon čega se dobije 2.75g (82%) naslovne supstance u formi gustog crvenog ulja. IR (film, cm^{-1}) 471; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.58-7.46 (m, 10H), 4.54 (s, 4H), 3.24-3.20 (m, 4H), 2.95 (s, 12H), 1.83-1.71 (m, 4H), 1.30-1.21 (m, 40H), 0.88-0.81 (m, 6H); ES MS m/z [dodecildimetil(fenilmetil)amonijak] $^+$ 473.5 nm ($\epsilon=10100$).

Primjer 9: Tetratiomolibdat, bis(1-etil-3-metil-1H-imidazolium)

Ova je supstanca pripravljena iz tetratiomolibdat bis(amonijaka) (1.00 g, 3.84 mmol) i 1-eti-3-,etil-1H-imidazolium klorida (1.18 g, 8.06 mmol, u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2 sa slijedećim modifikacijama: smjesa se filtrira i filtrat se koncentrira u vakuumu, nakon čega se dobivene krute čestice filtriraju, ispiru s EtOH i etil eterom, te potom slijedi sušenje u visokom vakuuomskom desikatoru tijekom 24 sata, nakon čega se dobije naslovna supstanca (0.419 g, 24%) u formi crvenkasto-smeđe krutine. IR (KBr paleta, cm^{-1}) 3064, 1566, 1167, 465; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.24 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 4.20 (q, $J=7.3$ Hz), 3.86 (s, 3H), 1.40 (7, $J=7.3$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 136.9, 123.5, 121.8, 44.1, 35.7, 15.3; MS m/z ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_2$) $^+$ 111.2; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=10016$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{MoS}_4$: C, 32.28; H, 4.97; N, 12.55; S, 28.72. Ustanovljeno C, 31.88; H, 4.87; N, 12.56; S, 28.79.

Primjer 10: Tetratiomolibdat, bis(feniltrimetilamonijak)

Ova je supstanca pripravljena iz tetratiomolibdat bis(amonijaka) (1.00 g, 3.84 mmol) i feniltrimetilamonij klorida (1.38 g, 8.06 mmol, u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2, nakon čega se dobije naslovna supstanca (0.859 g, 45%) u formi narančaste krutine. IR (KBr paleta, cm^{-1}) 3032, 3005, 1485, 1458, 473; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.98 (m, 4H), 7.61 (m, 6H), 3.62 (s, 18H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 147.2, 130.0, 129.9, 120.5, 56.3; MS m/z ($\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}$) $^+$ 136.2; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=12900$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 43.53; H, 5.68; N, 5.64; S, 25.83. Ustanovljeno C, 43.66; H, 5.98; N, 5.76; S, 25.73.

Primjer 11: Tetratiomolibdat, bis(benziltrimetilamonijak)

Ova je supstanca pripravljena iz tetratiomolibdat bis(amonijaka) (0.500 g, 1.92 mmol) i benziltrimetilamonij hidroksida (1.60 g 40% vodene otopine, 3.84 mmol), u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 1, nakon čega se dobije naslovna supstanca (0.869 g, 91%) u formi crvene krutine. IR (KBr paleta, cm^{-1}) 2995, 1483, 1454, 474; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7.52 (m, 10H), 4.56 (s, 4H), 3.04 (s, 18H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 132.9, 130.2, 128.9, 128.4, 67.7, 51.7; MS m/z ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}$) $^+$ 150.3; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=12008$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 45.78; H, 6.15; N, 5.34; S, 24.44. Ustanovljeno C, 45.67; H, 6.15; N, 5.62; S, 24.41.

Primjer 12: Tetratiomolibdat, pentan-1,5-bis(trimetilamonijak)

Ova je supstanca pripravljena iz tetratiomolibdat bis(amonijaka) (0.100 g, 0.226 mmol) u CH_3CN (2 mL) koji se dodaju u otopinu pentan-1,5-bis(trimetilamonijak) jodida (0.054 g, 0.205 mmol) koja je otopljena u vodi (2 mL). Nakon miješanja tijekom 5 sati na sobnoj temperaturi, dobivene smeđe-crvene krute čestice se filtriraju, suspendiraju u vodi i potom iznova filtriraju i ispiru s EtOH, $t\text{PrOH}$ i Et_2O . Nakon sušenja u visokom vakuuomskom desikatoru tijekom noći, dobije se crvena krutina koja predstavlja naslovnu supstancu (0.051 g, 60%). IR (KBr paleta, cm^{-1}) 2997, 472; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 3.22 (m, 4H), 2.98 (s, 18H), 1.70 (m, 4H), 1.31 (2H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 79.4, 64.9, 52.2, 21.6; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=12025$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{11}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 32.03; H, 6.84; N, 6.79; S, 31.09. Ustanovljeno C, 32.40; H, 6.74; N, 6.80; S, 30.87.

Primjer 13: Tetratiomolibdat, bis(2-hidroksiiminometil-1-metil-piridinium)

Ova je supstanca pripravljena iz tetratiomolibdat bis(amonijaka) (1.00 g, 3.84 mmol) i 2-hidroksiiminometil-1-metil-piridinium klorida (1.39 g, 8.06 mmol), u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2 sa slijedećim modifikacijama: voda (10 mL) se dodaje u svrhu otapanja amonij halida. Naslovna supstanca (1.20 g, 66%) dobije se u formi crvene krutine. IR (KBr paleta, cm^{-1}) 1002, 477; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9.05 (app d, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.54 (app t, 1H), 8.08 (app d, 1H), 8.04 (app t, 1H), 4.39 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 147.6, 147.1, 145.1, 142.0, 127.4, 124.9, 46.3; MS m/z ($\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$) $^+$ 137.1; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=12092$).

Primjer 14: Tetratiomolibdat, bis(1,1-dimetilpirolidinium)

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (0.644 g, 2.47 mmol) i 1,1-dimetilpirolidinium jodida (1.18 g, 5.19 mmol), u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2, nakon čega se dobije narančasta krutina. IR (KBr, cm^{-1}) 471; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2.09 (m, 4H), 3.10 (s, 6H), 3.47 (7, $J=6\text{Hz}$, 4H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 21.44, 50.86, 64.68; ES MS m/z (1,1-dimetilpirolidinium) $^+$ 100.; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=14130$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{MoS}_4$: C, 33.94; H, 6.64; N, 6.59; S, 30.21. Ustanovljeno C, 33.68; H, 6.97; N, 6.58; S, 30.06.

Primjer 15: Tetratiomolibdat, etilen bis amonijak

Amonij klorid (0.411 g, 7.68 mmol) i etilen diamin (0.230 g, 3.84 mmol) otapa se u 50 mL vode. U ovu se otopinu dodaje amonij tetratiomolibdat (1.0 g, 3.84 mmol) i smjesa se potom miješa tijekom 3 sata. Crvena krutina koja se tom

prilikom formiranja, sakuplja se filtracijom (233 mg), ispire s izopropanolom i Et₂O, te potom suši u visokom vakuumu tijekom 24 sata u vakuumskom desikatoru u prisustvu P₂O₅. Izvorne tekućine se koncentriraju na oko 1/3 njihovog početnog volumena i novoformirani kristali se ponovo sakupljaju filtracijom i ispiru (387 mg). Ukupni prihod naslovne supstance iznosi 620 mg, (56.8%). IR (KBr, cm⁻¹) 474; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 3.08 (s, 4H), 7.79 (br s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 37.08; ES MS m/z (etilen bis amonijak)⁺ 60.5; UV (H₂O) 468 nm (ε=12310). Analiza: Calcd za C₂H₁₀MoN₂S₄: C, 8.39; H, 3.52; N, 9.78; S, 44.80. Ustanovljeno C, 8.75; H, 3.28; N, 10.05; S, 44.99.

Primjer 16: Tetratiomolibdat, bis(1,4-dimetilpiridinium)

Ova je supstanca pripravljena iz amonij tetratiomolibdata (0.50 g, 1.92 mmol) i 1,4-dimetilpiridinium jodida (0.95 g, 4.03 mmol), u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2, nakon čega se dobije 203 mg (24%) naslovne supstance u formi narančaste krutine. IR (KBr, cm⁻¹) 469; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.49 (s, 3H), 4.30 (s, 3H), 7.93 (d, J=6Hz, 2H), 8.85 (d, J=6Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 21.31, 47.03, 127.94 (2C), 144.77, 157.93; ES MS m/z bis(1,4-dimetilpiridinium)⁺ 108.2; UV (H₂O) 468 nm (ε=13480). Analiza: Calcd za C₁₄H₂₀N₂MoS₄: C, 38.17; H, 4.57; N, 6.35; S, 29.11. Ustanovljeno C, 38.27; H, 4.24; N, 6.36; S, 28.89.

Primjer 17: Tetratiomolibdat, bis(feniltrimetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 1. IR (cm⁻¹) 470; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.99-7.97 (d, J=8.4Hz, 4H), 7.66-7.56 (m, 6H), 3.62 (s, 18H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO d₆) δ 21.31, 47.03, 127.94 (2C), 144.77, 157.93; UV (H₂O) 468 nm (ε=13151). Analiza: Calcd za C₁₈H₂₈N₂MoS₄: C, 43.53; H, 5.68; N, 5.64; S, 25.83. Ustanovljeno C, 42.72; H, 5.20; N, 5.27; S, 27.54.

Primjer 18: Tetratiomolibdat, bis(viniltrimetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 1. IR (cm⁻¹) 470; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6.62-6.56 (m, 2H), 5.76 (d, J=15.2 Hz, 2H), 5.54 (m, 2H), 3.24 (s, 18H); UV (H₂O) 468 nm (ε=18012).

Primjer 19: Tetratiomolibdat, bis(velopropilmetiltrimetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2. IR (cm⁻¹) 474; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.24 (d, J=7.2, 4H), 3.11 (s, 18H), 1.16 (m, 2H), 0.72-0.69 (m, 4H), 0.42-0.38 (m, 4H); UV (H₂O) 468 nm (ε=14239).

Primjer 20: Tetratiomolibdat, bis(benzilfenildimetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2. IR (cm⁻¹) 470; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.76-6.60 (m), 5.00 (s), 2.87 (s); UV (H₂O) 468 nm (ε=15606).

Primjer 21 Tetratiomolibdat, heksan-1,6-bis(trimetil amonijak)

Ova je supstanca pripravljena u skladu s postupkom koji je opisan u Primjeru 2. IR (cm⁻¹) 478; UV (DMSO) 468 nm (ε=12666).

Primjer 22: Tetratiomolibdat, bis(2-hidroksietil)trimetil amonijak]

Holin hidroksid (50% težinskog udjela vode, 2.56 mL, 11.3 mmol) se dodaje u otopinu amonij molibdat tetrahidrata (1.0 g, 5.66 mmol Mo) u 2.5 mL deionizirane vode. Plin vodik sulfid se propušta kroz otopinu tijekom 50 minuta na sobnoj temperaturi, tijekom čega se boja otopine pretvara iz smeđe u crvenu. Dušik u obliku plina se također potom propušta kroz otopinu tijekom 10 minuta u svrhu oslobađanja reakcijske smjese od vodik sulfida i otapalo se potom uklanja pod sniženim tlakom. Crvena krutina se potom otapa u deioniziranoj vodi (3 x 25 mL) i otapalo se potom ponovno otklanja pod sniženim tlakom u svrhu uklanjanja otopljenog amonijaka. Sirovi produkt se otapa u 20 mL deionizirane vode i filtrira. Produkt se potom precipitira dodavanjem izopropanola u vodeni sloj. Krute čestice se sakupljaju filtracijom i ispiru s etanolom (3x) i dietil eterom (3x), nakon čega se dobije sirova naslovna supstanca (2.218 g, 90%). Rekristalizacija iz deionizirane vode i izopropanola, i ispiranje s etanolom (3x) i dietil eterom (3x) daje naslovnu supstancu (1.565 g, 62%) u formi plosnatih crvenkastih kristala: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 5.23 (br t, J=4.7 Hz, 2H), 3.85 (br s, 4H), 3.46-3.43 (m, 4H), 3.14 (s, 18H).

Primjer 23: Tetratiomolibdat, bis(2-hidroksietil)trimetil amonijak]

Vodik sulfid se u obliku mjehurića propušta kroz otopinu holin hidroksida (50% težinskog udjela vode, 5.2 mL, 23 mmol) i amonij hidroksida (30% težinskog udjela vode, 8.2 mL, 70 mmol) u posudi pod tlakom tijekom 6 minuta.

Količina vodik sulfida koji se otopio u otopini je 2.5 g. Amonij molibdat tetrahidrat (2.01 g, 11.4 mmol) otopljen u deioniziranoj vodi (2.5 mL) se dodaje u posudu pod tlakom čije su stijenke isprane s deioniziranom vodom (0.5 mL). Reakcijska se smjesa potom začepi i miješa na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata i 45 minuta, tijekom čega se u crvenoj otopini oblikuju kristali. Smjesa se potom prenosi u bočicu s okruglim dnom i dodaje se deionizirana voda do trenutka dok se krutina u cijelosti ne otopi. Otapalo se uklanja pod sniženim tlakom, a preostatak se uvodi u deioniziranu vodu, nakon čega se ponavlja korak koncentriranja. Dobiveni crveni preostatak se rekristalizira iz deionizirane vode i izopropanola, i crvene se pločice potom ispitu još jedan put s izopropanolom, jedan put s etanolom, jedan put s dietil eterom, te potom suše u vakuumskom desikatoru u prisustvu fosforog pentoksida tijekom 23 sata, nakon čega se dobije naslovna supstanca (3.05 g, 62%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.21 (t, $J=4.6$ Hz, 2H), 3.87-3.79 (m, 4H), 3.43 (t, $J=4.6$ Hz, 4H), 3.13 (s, 18H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO d_6) δ 67.1 (2C), 55.5 (2C), 53.3 (6C); MS m/z (holin) $^+$ 104,2; UV (H_2O) 468 nm ($\epsilon=12400$). Analiza: Calcd za $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{MoN}_2\text{O}_2\text{S}_4$: C, 27.77; H, 6.52; N, 6.48; S, 29.65. Ustanovljeno C, 27.76; H, 6.59; N, 6.85; S, 29.52.

Primjer 24: Tetratiomolibdat, bis(2-hidroksietil)trimetil amonijak

Deionizirana voda (200 mL) dodaje se u holin hidroksid (50% težinskog udjela vode, 38.2 mL, 14.7 mmol) i amonij tetratiomolibdat (19.1 g, 7.35 mmol) i bočica se potom trese sve dok se krute čestice u potpunosti ne otope. Potom se otopina premješta u rotacijski evaporator pod vakuumom (cca 5-10 tora) s kupelji na 20°C tijekom 110 minuta, nakon čega se voda zamjenjuje u svrhu održavanja konstantnog volumena. Reakcijska se smjesa filtrira u svrhu otklanjanja malih količina nečistoća, i produkt se precipitira potom iz filtrata uz pomoć izopropanola (1 L). Krutina se sakuplja filtracijom, ispire s izopropanolom, etanolom, dietil eterom, te potom suši u vakuumskom desikatoru u prisustvu fosforog pentoksida tijekom 23 sata, nakon čega se dobije naslovna supstanca (20.76 g, 65%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.23 (t, $J=4.8$ Hz, 2H), 3.89-3.81 (m, 4H), 3.44 (t, $J=4.8$ Hz, 4H), 3.14 (s, 18H). Analiza: Calcd za $\text{C}_{10}\text{H}_{28}\text{MoN}_2\text{O}_2\text{S}_4$: C, 27.77; H, 6.52; N, 6.48; S, 29.65. Ustanovljeno C, 27.91; H, 6.21; N, 6.26; S, 29.70.

Primjer 25: Tetratiomolibdat, bis(2-hidroksietil)trimetil amonijak

U 500 mL Erlenmayer posudu, suspendira se $[\text{NH}_4]_2[\text{MoS}_4]$ (100 g, 0.380 mol) u 200 mL destilirane vode. U rečenu suspenziju se dodaje 45% težinskog udjela holin hidroksida u metanolu (250 mL) koji je komercijalno dostupan. Nakon rečenog dodavanja, oblikuje se velika količina svijetlo crvenog precipitata. U struji dušika, suspenzija se zagrijava do 40°C uz snažno miješanje sve dok se krute čestice u cijelosti ne otope (cca 1 sat). Otopina tamno crvene boje se zadržava u uvjetima sniženog tlaka tijekom 4 sata, tijekom kojeg vremena se precipitira crvena kristalinična krutina. Suspenzija se hladi u ledenoj kupelji tijekom 30 minuta i potom filtrira. Produkt se ispire s izopropil alkoholom, potom s dietil eterom, te na kraju suši u vakuumu, nakon čega se dobije 138 g visoko kristaliničnog produkta (83% stehiometrijske količine).

Primjer 26: Određivanje strukture holin tetratiomolibdata uz pomoć X-zraka

Podaci o difrakciji za crveni kristal (holin) $_2\text{MoS}_4$ sakupljaju se na 158(2)°K uz korištenje Siemens SMART difraktometra (Siemens AG, Wittelsbacherplatz 2, D-80333, München, Njemačka). Dobije se monoklinički P element slijedećih dimenzija: $a=18.6066(1)$, $b=12.7061(1)$, $c=17.7621(2)$ i $\beta=117.540(1)$ (prostorna grupa $P2_1/c$). Kristalna struktura ustanovljena je neposrednim metodama i pokazuje 2 $[\text{MoS}_4]$ i 4 holinska kationa u asimetričnoj jedinici. Nakon posljednjeg namještanja pozicije atoma koji nisu vodici u rečenom jediničnom elementu, konvergencija finalnog R faktora je iznosila 0.06. Koordinate rečenog elementa atoma jedinične stanice su slijedeći:

Atom	x/a	y/b	z/c
Mo1	0.3502	0.7432	0.4307
Mo2	0.1641	0.2579	0.0786
N1	0.4724	0.6022	0.2250
N2	0.3306	0.3142	0.4043
N3	-0.0120	0.0317	-0.3170
N4	0.1920	0.8572	0.1184
S1	0.2450	0.8268	0.4246
S2	0.4354	0.8566	0.4245
S3	0.4096	0.6553	0.5492
S4	0.3114	0.6324	0.3236
S5	0.2769	0.1760	0.1066
S6	0.1167	0.1908	0.1604
S7	0.0768	0.2372	-0.0535
S8	0.1883	0.4248	0.1079
O1	0.6860	0.9215	0.6690
O2	0.6133	0.6075	0.8536
O3	0.8951	0.3408	0.7335
O4	0.9355	0.3376	0.5362
C1	0.7156	0.8812	0.6189
C2	0.6576	0.7959	0.5590
C3	0.6471	0.6801	0.6669
C4	0.7534	0.6488	0.6274
C5	0.6139	0.6151	0.5265
C6	0.6288	0.5111	0.8973
C7	0.6144	0.4157	0.8417
C8	0.5016	0.4766	0.7046
C9	0.5221	0.2904	0.7373
C10	0.4710	0.4023	0.8135
C11	0.9086	0.4169	0.7986
C12	0.9240	0.5165	0.7797
C13	1.0580	0.4580	0.7905
C14	1.0186	0.6375	0.7813
C15	1.0496	0.5430	0.9103
C16	0.9086	0.4815	0.5675
C17	0.8505	0.4262	0.4598
C18	0.7199	0.3849	0.3353
C19	0.8417	0.3763	0.3214
C20	0.8182	0.2446	0.4035

Primjer 27: Kemijska stabilnost podataka za analoge

Sol	MW	% preostatka nakon 10 dana Otvoren za sobne uvjete
propan-1,3-bis(trimetilamonijak)	384.5	52
1-etil-3-metil-1H-imidazolium	446.5	75
Trimetilfenilamonijak	496.6	85
Tetrapropilamonijak	596.92	*82
Amonijak	260.28	*48
Acetilholin	516.6	39
Holin	432.52	62
Trietilfenilamonijak	580.77	76

Metitrietilamonijak	456.63	63
1,1-dimetilpirolidinium	424.57	70
butan-1,4-bis(trimetilamonijak)	398.53	40
1,4-dimetilpiridinium	440.53	32
Trimetilbenzilamonijak	524.69	94
Etilenbis(trimetilamonijak)	370.5	40
Pemntan-1,5-bis(trimetilamonijak)	412.5	86
		* 9 dana; različita studija
		7 dana, 74-77% RH, RT
bis(feniltrimetilamonijak)	496.61	98
bis(viniltrimetilamonijak)	396.49	72
Bis(ciklopropilmetil trimetilamonijak)	452.60	86
bis(benzilfenil dimetilamonijak)	648.81	45
heksan-1,6-bis(trimetilamonijak)	426.56	94

Primjer 28: Biološki usporedni podaci za tetratiomolibdat s holin tetratiomolibdatom kod *in vivo* 3LL Lewis karcinoma pluća: Primarni tumorski rast

- 5 Tumorski model koji je korišten u ovom slučaju je 3LL JF u C57BL/6 miševima. Tumorska se linija razvila spontano 1951. godine kao karcinom pluća u C57BL/6 miševima (cancerw Res. 15:39, 1955. Pogledati također Malave et al., J. Natl. Canc. Inst. 62:83-88 (1979). Propagacija je izvršena prolaskom u C57BL/6 miševima subkutanom inokulacijom i
- 10 testirana je i semialogenim C57BL/6 x DBA/2 F₁ miševima ili u alogenim C3H miševima. Obično se koriste 6 životinja po grupi za subkutani implantat, ili po 10 životinja za intramuskularni implantat. Tumor može biti implantiran subkutano kao 2-4 mm fragment, ili intramuskularno kao inokulum suspenziranih stanica u količini od 0.5-2 x 10⁶ stanica. Tretman započinje 24 sata nakon implantiranja ili je odgođen dok se tumor ne razvije do neke određene veličine (obično approx. 100 mg) kada se može izvršiti palpacija. Test supstanca se aplicira dnevno tijekom 11-25 dana.

- 15 Životinje se prate vaganjem, palpacijom i mjerenjem veličine tumora. Uobičajena težina tumora kod netretiranih kontrolnih primatelja na dan 12. nakon subkutane inokulacije je 500-2500 mg i uobičajena medijan vrijednost za vrijeme preživljenja je 18-28 dana. Pozitivna kontrolna supstanca, primjerice ciklofosfamid u 170 mg/kg/injekciji se daje svakih 6 dana. Izračunati rezultati podrazumijevaju težinu životinje, veličinu tumora, težinu tumora i vrijeme preživljenja. Za potvrđenu terapijsku aktivnost, test kompozicija bi trebala biti testirana u dvije vrste multi-doznih
- 20 eseja. Ženke C57/BL miševa bivaju inokulirane sa 1 x 10⁶ stanica Lewis karcinoma pluća (3LL) subkutano u sredinu leđa. Tretman sa tetratiomolibdatom i holin tiomolibdatom započet je dan nakon inokulacije tumora (50 mg/kg). Ciklofosfamid (170 mg/kg se aplicira svakih 6 dana subkutano počevši od dana 3 nakon inokulacije tumorskih stabica) se koristi kao kontrolna supstanca. 2x tjedno se mjere vrijednosti za volumen razvijenih tumora i tjelesne težine pojedinih životinja, a životinje bivaju eutanazirane kada vrijednost volumena tumora u kontrolnoj grupi dosegne prosječnu vrijednost od 2000 mm³. Određuje se odnos (T/C) vrijednosti volumena tumora u tretiranoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Prate se terminalna kardiacna krvarenja i analiziraju koncentracije crvenih krvnih zrnaca (hematokrit, HTC).
- 25

TRETMAN	N	T/C	TEŽINA MIŠEVA %	HCT**
Voda	19	1	106%	35%
TM	17	0.59	93%*	35%
CHTM	17	0.54	103%	35%
Ciklofosfamid	5	0.74	105%	40%

*značajno; ** normalno je 45%

30 **Primjer 29: Bis(holin)tetratiomolibdat inhibira proliferaciju endotelnih stanica**

Bis(holin)tetratiomolibdat inhibira proliferaciju HUVEC stanica na način kona ovisi o dozi, kao što je to prikazano na Ilustraciji 1, i nije se pokazala njegova toksičnost. Iako se ne dodaje bakar egzogeno, esej biva izveden u prisustvu 10% seruma. Serum sadržava proteine koji vežu bakar i serum u odnosu od approx. 1-2 μM u odnosu na sadržaj bakra. Bakar

igra važnu ulogu u vezivanju bFGF na odgovarajući receptor (Patstone et al., J. Biol. Chem 1996, 271(7):3343-6); te u skladu s tim bis(holin)tetratiomolibdat može također imati neposredna utjecaj na mehanizam indukcije proliferacije. Inkubacija bis(holin)tetratiomolibdata sa HUVEC stanicama (u T-75) tijekom 72 sata i brojanje stanica neposredno na kraju esejja navodi na činjenicu da bis(holin)tetratiomolibdat ima mali ili neznatni učinak na stabilne endotelne stanice, kao što se to može vidjeti u Tablici 1.

Učinci bis(holin)tetratiomolibdata na viabilnost konfluentnih HUVEC stanica nakon 72 sata inkubacije na 37°C.

Tablica 1

Uvjeti	Broj stanica	Broj vijabilnih stanica
1. kontrola	390 000	335 000
2. kontrola + 1μM ATN-22	400 000	460 000
3. kontrola +10μM ATN-224	535 000	555 000
4. kontrola +50μM ATN-224	487 500	475 000

Primjer 30: Bis(holin)tetratiomolibdat ne inducira apoptozu u endotelnim stanicama

Endotelne stanice bivaju inkubirane s različitim dozama bis(holin)tetratiomolibdata tijekom 72 sata (uobičajeno vrijeme trajanja proliferacijskog esejja) i također se mjeri razina aktivirane kaspaze-3. Kao što se može vidjeti na Ilustraciji 2, inkubacija s bis(holin)tetratiomolibdatom ne dovodi do mjerljivih razina aktivirane kaspaze-3 u endotelnim stanicama. Kao kontrola, inkubirali smo istu gustoću HUVEC stanica sa 10 μM kamptotecina koji je poznati induktor apoptoze. U skladu s tim, HUVEC stanice koje bivaju inkubirane sa bis(holin)tetratiomolibdatom, pokazuju slične razine aktiviranih kaspaze-3 stanica koje rastu u normalnim uvjetima proliferacije.

Primjer 31: Bis(holin)tetratiomolibdat je anti-angiogen u matrigel ključnom esejju

Matrigel esej *in vivo* koji je opisan u Primjeru 35 se rutinski koristi za mjerenje angiogeneze. Bis(holin)tetratiomolibdat koji biva apliciran oralno, pokazuje pojavu angiogeneze koja je inducirana od strane bFGF u *in vivo* matrigel esejju, kao što je to prikazano na Ilustraciji 3.

Primjer 32: Bis(holin)tetratiomolibdat regulira IL-8 sekreciju iz konfluentnih endotelnih stanica

Kao što je to prikazano na Ilustraciji 4, bis(holin)tetratiomolibdat smanjuje razinu IL-8 iz konfluentnih endotelnih stanica. IL-8 je kemotaktičan za sve poznate tipove migratornih imuno stanica, pored činjenice da predstavlja proangiogeni citokin.

Primjer 33: Bis(holin)tetratiomolibdat regulira IL-8 ekspresiju iz aktiviranih monocita

Neaktivirani monociti ne ekspresiraju IL-8, no PMA aktivacija Thp-1 stanica inducira kako transkripciju, tako i translaciju IL-8. Ilustracija 5 pokazuje da je bis(holin)tetratiomolibdat sposoban za nizvodnu regulaciju ekspresije/sekrecije mjerljivog IL-8 iz aktiviranih monocita.

Primjer 34: Bis(holin)tetratiomolibdat uzrokuje pad u količinama mišjeg KC u plazmi

Miševi ne ekspresiraju IL-8, no ekspresiraju njegove homologe kao što je primjerice mišji KC. Rečeni element pokazuje viši stupanj homologije sa humanim GRO alfa, no sa humanim IL-8, no ipak njegov receptor ima visoki stupanj homologije na humani IL-8 receptor. Ekspresija mišjeg KC proteina biva inducirana sa TNF alfa. Bis(holin)tetratiomolibdat biva apliciran u C57/B16 mišve (50 mg/kg/dan) koji nose tumor (rečeni miševi imaju mjerljive količine mišjeg KC u plazmi). Uzorci plazme uzimaju se iz životinja na 21. dan terapije i izvođenja esejja za mišji KC. Statističke analize ovih podataka navele su na činjenicu da postoje značajne ($p < 0.1$) razlike između glavnih vrijednosti mišjeg KC između dvije grupe, kao što je prikazano na Ilustraciji 6.

Primjer 35: Matrigel ključni esej

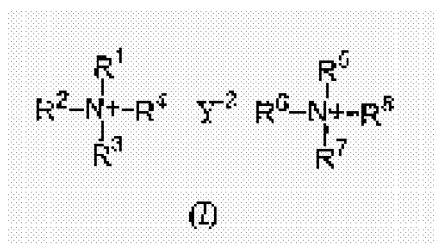
Ovaj se esej izvodi u osnovi na način koji je opisan u Passaniti et al., Lab Invest. 67:519-528 (1992). Ledeno hladni Matrigel® (npr. 500 μL) (Collaborative Biomedical Products, Inc., Bedford, MA) se miješa s heparinom (npr. 50 μg/ml), FGF-2 (npr. 400 ng/ml) te sa susptancom koju treba ovdje testirati. U nekim esejima, bFGF može biti zamijenjen sa tumorskim stanicama kao angiogeni stimulus. Matrigel® smjesa biva injektirana subkuitano u 4-8 tjedana stare atimične mišve, i to na mjestu u blizini abdominalne srednje lniije, u preferabilnoj količini od 3 injekcije po mišu. Injektirani Matrigel® oblikuje čvrsti gel. Mjesta injektiranja se odabiru na način da svaka životinja prima pozitivni kontrolni ubod

(kap što mije FGF-2 + heparin), negativni kontrolni ubod (npr. pufer + heparin), te također injekciju koja sadržava supstancu koja se testira poradi svog eventualnog učinka na angiogenezu, npr. (FGF-2 + heparin + supstanca). Svi se tretmani u najboljem slučaju provode u triplicatu. Životinje bivaju žrtvovane cervikalnom dislokacijom 7 dana poslije injekcije ili u neko drugo vrijeme koje može odgovarati za praćenje procesa angiogeneze. Koža miša se odvaja na mjestu abdominalne srednje linije, a Matrigel® fragmenti se se odmah potom skeniraju visokom rezolucijom. Fragmenti se potom dispergiraju u vodi i inkubiraju na 37°C preko noći. Razine hemoglobina se određuju korištenjem Drabkin otopine (npr. dobavljač Sigma) u skladu s uputama proizvođača. Količina Hb u fragmentu predstavlja indirektnu mjeru angiogeneze stoga što odražava količinu krvi u uzorku. Nadalje, ili u alternativnom slučaju, na životinjama se može izvršiti injektiranje prije žrtvovanja sa 0.1 ml pufera (preferira se PBS) koji sadržava visokomolekularni dekstran na kojega je konjugiran kao fluorofor. Količina fluorescencije u dispergiranom fragmentu, koja je određena fluorometrički, također služi kao pokazatelj angiogeneze u fragmentu. Bojanje sa mAB anti-CD31 (CD31 je adhezijska molekula iz endotelne stanice ili PECAM) može također biti korišteno u svrhu potvrđivanja oblikovanja novih struktura krvnih žila i povećane gustoće u uzorku.

Naposlijetku, treba posebno naglasiti da postoje alternativni putevi implementiranja ovog izuma. Slijedom toga, navedeni aspekti izuma trebaju biti promatrani kao ilustrativni, ne restriktivni. Treba imati na umu da ovaj izum ne treba limitirati na detalje koji su ovdje izneseni, no izum može biti modificiran u okvirima postavljenog okvira razmatranja i u skladu s ekvivalentima koji se navode u patentnim zahtjevima. Sve publikacije i patenti koji se ovdje citiraju, inkorporirani su u izum u obliku reference.

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Supstanca strukturne formule (I)



ili njezin solvat ili hidrat koji su naznačeni slijedećim parametrima:

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 i R^7 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil;

R^4 i R^8 međusobno neovisno predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil, cikloheteroalkil, supstituirani cikloheteroalkil, heteroaril, supstituirani heteroaril, heteroarilalkil, supstituirani heteroarilalkil, heteroalkil ili supstituirani heteroalkil ili pak nedostaju kada je N dio aromatskog prstena;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^5 i R^6 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^1 i R^2 zajedno, R^2 i R^3 zajedno, i R^2 i R^4 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

opcionalno, R^5 i R^6 zajedno, R^6 i R^7 zajedno, i R^6 i R^8 zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil;

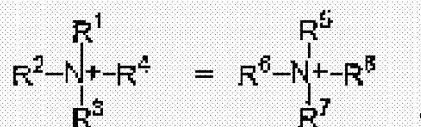
opcionalno, R^3 i R^7 zajedno zajedno čine alkildiil, supstituirani alkildiil, heteroalkildiil ili supstituirani heteroalkildiil; i

Y^{2-} predstavlja $(\text{MoS}_4)^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_{12})^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_9)^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_7)^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_8)^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_{11})^{2-}$, $(\text{Mo}_2\text{S}_6)^{2-}$ ili $(\text{Mo}_2\text{S}_{13})^{2-}$;

uz uvjet da ako je Y $(\text{MoS}_4)^{2-}$ i R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 su jednaki, tada svaki od R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 ne predstavlja vodik, metil, etil ili n-propil.

2. Supstanca u skladu s patentnim zahtjevom 1, koja je naznačena time da Y predstavlja $(\text{MoSO}_4)^{2-}$.

3. Supstanca u skladu s patentnim zahtjevom 1, koja je naznačena:

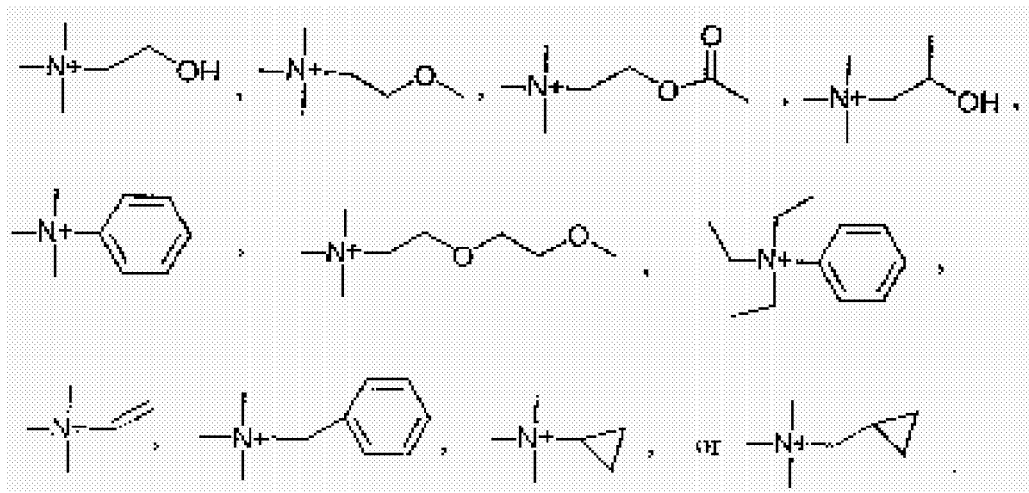


4. Supstanca u skladu s patentnim zahtjevom 3, koja je naznačena time da Y predstavlja $(\text{MoSO}_4)^{2-}$.

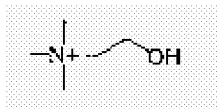
5. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da barem jedan element od R^1 , R^2 , R^3 i R^4 ne predstavlja alkil.
6. Supstance u skladu sa patentnim zahtjevima 1 ili 2, koje su **naznačene time** da barem jedan element od R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 i R^8 ne predstavlja alkil.
7. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, alkanil ili supstituirani alkanil.
8. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, metil ili etil.
9. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 predstavljaju alkanil.
10. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 predstavljaju metil ili etil.
11. Supstanca u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koja je **naznačena time** da R^1 predstavlja alkanil, supstituirani alkanil, alkenil, supstituirani alkenil, aril, supstituirani aril, arilalkil, supstituirani arilalkil, cikloalkil, supstituirani cikloalkil.
12. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno.
13. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno.
14. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 zajedno predstavljaju, te R^2 i R^3 zajedno predstavljaju, te R^2 i R^4 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno.
15. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 zajedno predstavljaju, te R^2 i R^3 zajedno predstavljaju, te R^2 i R^4 zajedno predstavljaju alkileno.
16. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



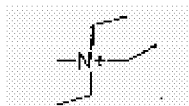
17. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno.
18. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno.
19. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, alkanil, supstituirani alkanil, i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkenil, aril, arilalkil, cikloalkil ili R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno ili supstituirani heteroalkileno.
20. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkenil, aril, arilalkil, cikloalkil ili R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno.
21. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 predstavlja alkil, supstituirani alkil, alkenil, aril, arilalkil ili cikloalkil.
22. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



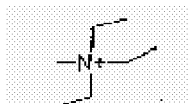
23. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



24. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:

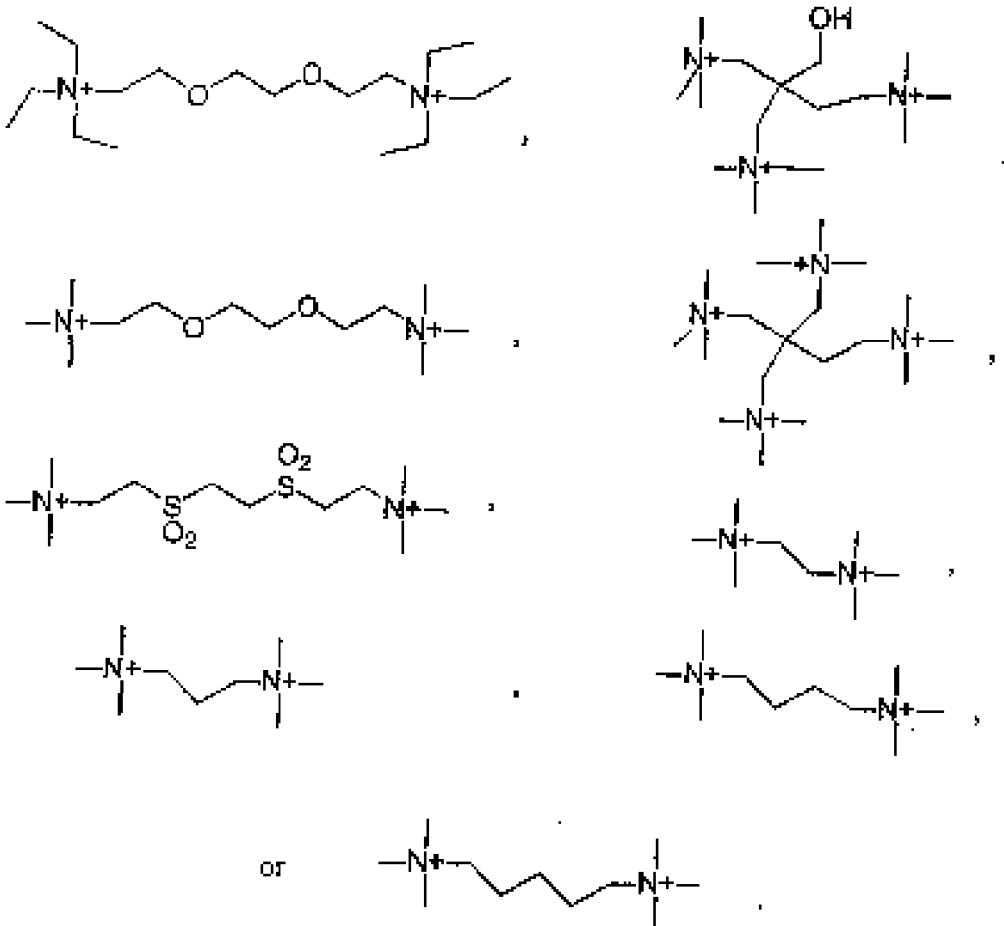


25. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



26. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju metil ili etil i R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkileno ili heteroalkileno.

27. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:

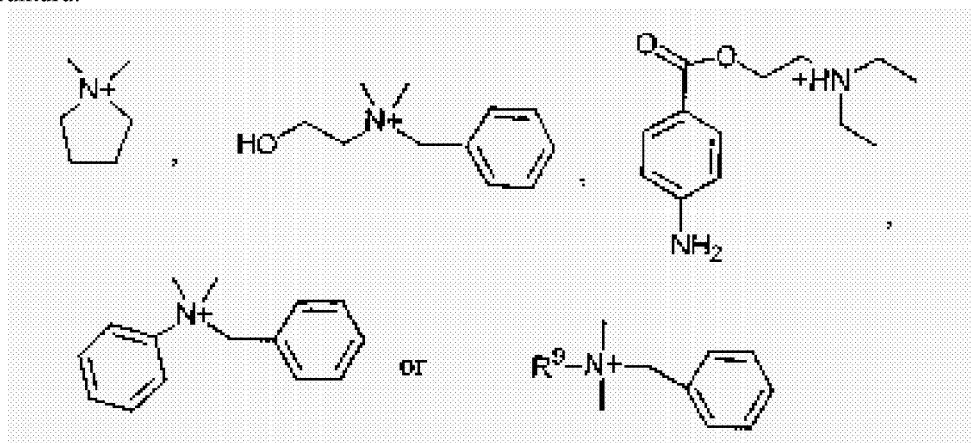


28. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik i R^3 predstavlja alkil, cikloalkil ili supstituirani heteroaril ili R^3 i R^7 zajedno predstavljaju alkilcno.

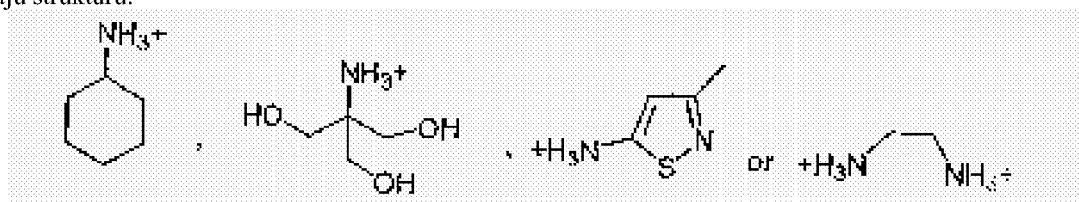
29. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 predstavljaju alkanil i R^3 i R^4 predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, arilalkil ili alkileno.

30. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 predstavljaju metil ili etil, i R^3 i R^4 predstavljaju vodik, alkil, supstituirani alkil, aril, arilalkil ili alkeno.

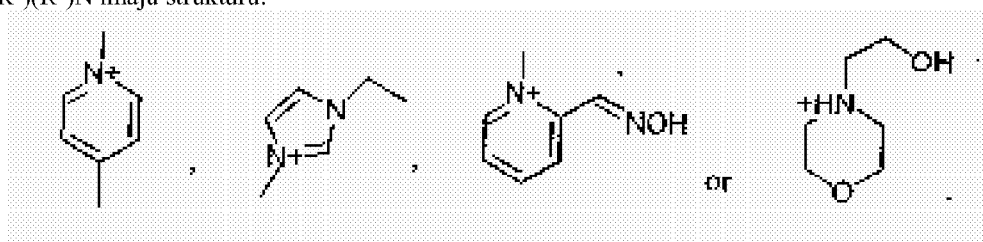
31. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



- s tim da R^9 predstavlja smjesu ravnančanih alkanilnih grupa koje imaju barem 8 atoma ugljika i ne više od 18 atoma ugljika.
32. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 , R^2 i R^4 predstavljaju vodik, i R^3 predstavlja supstituirani alkil, supstituirani heteroaril, cikloalkil ili alkileno.
33. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



34. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi R^1 i R^2 zajedno predstavljaju alkileno, supstituirani alkileno, heteroalkileno, supstituirani heteroalkileno, dok R^3 predstavlja alkil ili supstituirani alkil i R^4 predstavlja vodik ili pak nedostaje.
35. Supstance u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, koje su **naznačene time** da elementi $R^1(R^2)(R^3)N$ ili $R^1(R^2)(R^3)(R^4)N$ imaju strukturu:



36. Farmaceutska kompozicija **naznačena time** da podrazumijeva supstancu u skladu s bilo kojim od patentnih zahtjeva 1-4, kao i farmaceutski prihvatljivi diluent, ekscipijent ili adjuvant.
37. Metoda za tretiranje ili prevenciju raka kod pacijenta, koja je **naznačena time** da podrazumijeva apliciranje rečenog tretmana na pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, s tim da se aplicira učinkovita količina supstance u skladu s kontekstom razmatranja bilo kojeg od patentnih zahtjeva 1-4.
38. Metoda za tretiranje ili prevenciju raka kod pacijenta, koja je **naznačena time** da podrazumijeva apliciranje rečenog tretmana na pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, s tim da se aplicira učinkovita količina farmaceutske kompozicije u skladu s patentnim zahtjevom 36.
39. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 37, koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva apliciranje u pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, učinkovite količine drugog reagensa s anti-kancerogenim djelovanjem ili farmaceutske kompozicije koja sadržava drugi anti-kancerogeni reagens i farmaceutski prihvatljiv diluent, ekscipijent ili adjuvant.
40. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 38, koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva apliciranje u pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, učinkovite količine drugog reagensa s anti-kancerogenim djelovanjem ili farmaceutske kompozicije koja sadržava drugi anti-kancerogeni reagens i farmaceutski prihvatljiv diluent, ekscipijent ili adjuvant.

41. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 37, koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva apliciranje u pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, terapijski učinkovite količine cinka ili farmaceutske kompozicije koja sadržava cink.
- 5 42. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 38, koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva apliciranje u pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenim tretmanom, terapijski učinkovite količine cinka ili farmaceutske kompozicije koja sadržava cink i farmaceutski prihvaljiv diluent, ekscipijent ili adjuvant.
43. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 37, koja je **naznačena time** da izraz rak predstavlja rak dojke, rak bubrega, rak mozga, rak debelog crijeva, rak prostate, hondrosarkom ili angiosarkom.
- 10 44. Metoda tretiranja ili preveniranja makularne degeneracije vlažnog tipa ili reumatoidnog artritisa kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine supstance koja je navedena u patentnim zahtjevima 1-4.
45. Metoda tretiranja ili preveniranja makularne degeneracije vlažnog tipa ili reumatoidnog artritisa kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine farmaceutske kompozicije koja je definirana u patentnom zahtjevu 36.
- 15 46. Metoda tretiranja ili preveniranja aberantne vaskularizacije kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine supstance koja je navedena u patentnim zahtjevima 1-4.
47. Metoda tretiranja ili preveniranja aberantne vaskularizacije kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine farmaceutske kompozicije koja je definirana u patentnom zahtjevu 36.
- 20 48. Metoda tretiranja ili preveniranja stanja suviška bakra kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine supstance koja je navedena u patentnim zahtjevima 1-4.
49. Metoda tretiranja ili preveniranja stanja suviška bakra kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine farmaceutske kompozicije koja je definirana u patentnom zahtjevu 36.
- 25 50. Metoda tretiranja ili preveniranja stanja pretilosti kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine supstance koja je navedena u patentnim zahtjevima 1-4.
- 30 51. Metoda tretiranja ili preveniranja stanja pretilosti kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine farmaceutske kompozicije koja je definirana u patentnom zahtjevu 36.
52. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 50 koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva aplikaciju kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, terapijski učinkovite količine drugog reagensa ili farmaceutske kompozicije koja je učinkovita protiv pretilosti, a koja nadalje podrazumijeva drugi reagens protiv pretilosti, kao i farmaceutski prihvaljiv diluent, ekscipijent ili adjuvant.
- 35 53. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 51 koja je **naznačena time** da nadalje podrazumijeva aplikaciju kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, terapijski učinkovite količine drugog reagensa ili farmaceutske kompozicije koja je učinkovita protiv pretilosti, kao i farmaceutski prihvaljiv diluent, ekscipijent ili adjuvant.
- 40 54. Metoda tretiranja ili preveniranja neurodegenerativne bolesti kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine supstance koja je navedena u patentnim zahtjevima 1-4.
55. Metoda tretiranja ili preveniranja stanja neurodegenerativne bolesti kod pacijenta koji pokazuje potrebu za rečenom vrstom tretmana, **koja je naznačena** apliciranjem terapijski učinkovite količine farmaceutske kompozicije koja je definirana u patentnom zahtjevu 36.
- 45 56. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 55 koja je **naznačena time** da neurodegenerativna bolest podrazumijeva Alzheimerovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu ili prion bolest.
57. Metoda u skladu s patentnim zahtjevom 56 koja je **naznačena time** da neurodegenerativna bolest podrazumijeva Alzheimerovu bolest, amiotrofičnu lateralnu sklerozu ili prion bolest.
- 50

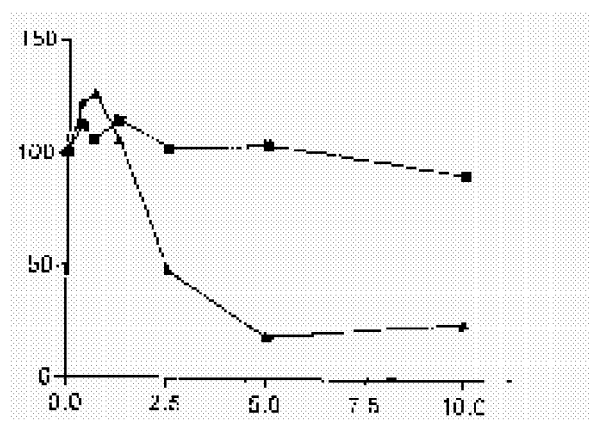
SAŽETAK

55

Ovaj izum donosi novitetne derivate tiomolibdata, metode njihove proizvodnje, farmaceutske spojeve koji ih sadržavaju, metode korištenja novitetnih derivata tiomolibdata u tretmanu bolesti koje su povezane s aberantom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, s pretilošću ili poremećenom regulacijom NF- κ B, kao i metode korištenja farmaceutskih kompozicija koje podrazumijevaju derivate tiomolibdata u tretiranju bolesti koje su povezane s aberantom vaskularizacijom, poremećajima metabolizma bakra, neurodegenerativnim poremećajima, s pretilošću ili poremećenom regulacijom NF- κ B.

60

Učinak bis(holin)tetratiomolibdata na proliferaciju endotelnih stanica



Y = % proliferacije (iniciran sa 1 ng/mL bFGF)

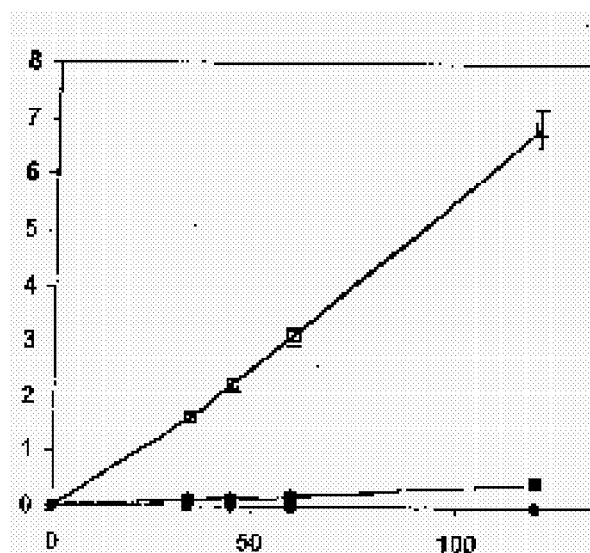
X - Supstanca (μM)

-■- Kontrola

-▲- Bis(holin)tetratiomolibdat

Ilustracija 1

Aktivnost kaspaze 3 u huvec stanicama inkubiranim sa bis(holin) tetratiomolibdatom tijekom 2 sata u mediju koji je oslobođen seruma sa 1 ng/mL bFGF



Y = μ M oslobođeni rodamin

X = vrijeme eseja (min)

-■- kontrola 72 sata in vitro kulture

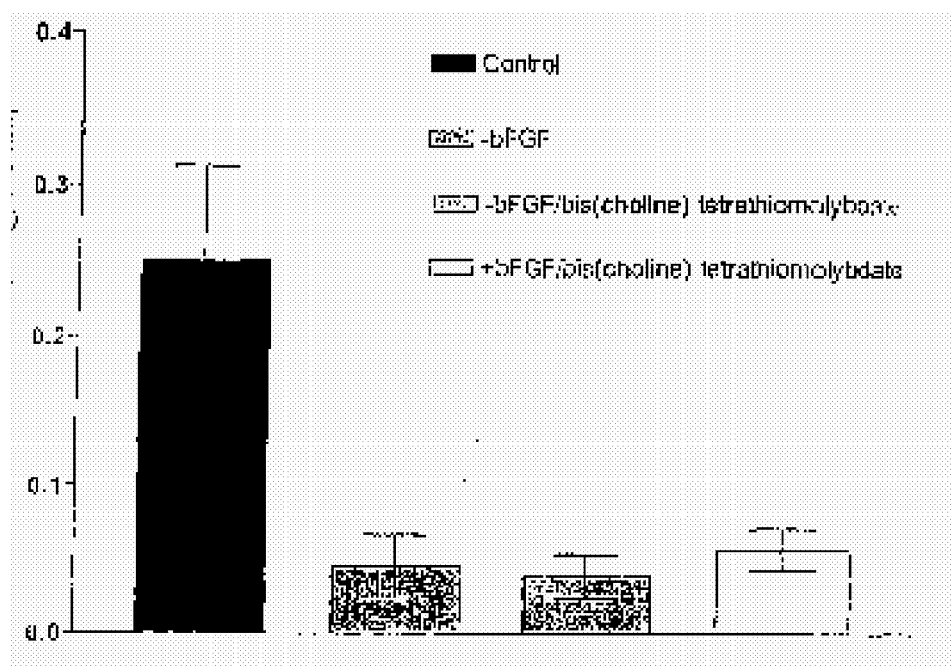
-◆- 1 μ M bis(holin)tetratiomolibdat

-▲- 10 μ M bis(holin)tetratiomolibdat

-●- kontrolne huvec stanice u M200/1sgs

-○- apoptotičke huvec stanice (kamptotecin)

Ilustracija 2



Y = Sadržaj hemoglobina (OD @ 540 nm)

X =

Kontrola

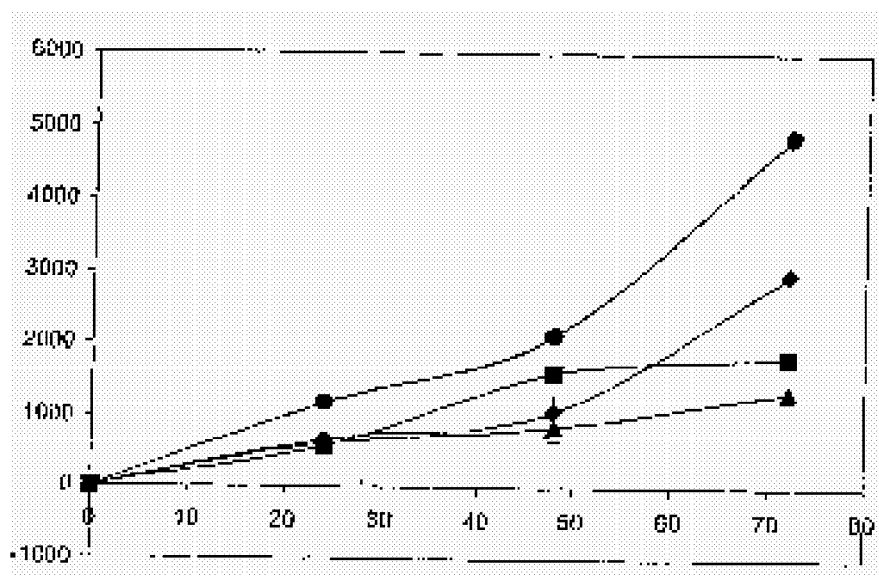
-bFGF

-bFGF/bis(holin)tetratiomolibdat

+bFGF/ bis(holin)tetratiomolibdat

Ilustracija 3

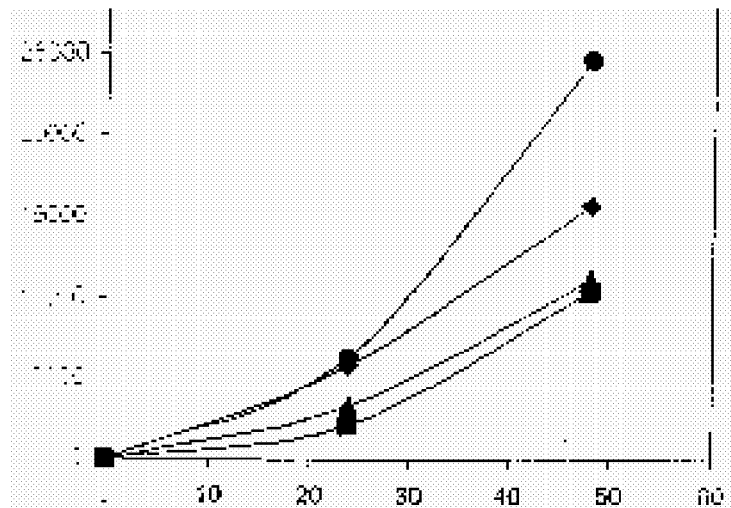
Učinak bakra ili bis(holin)tetratiomolibdata na ekspresiju IL-8 kaskade HUVEC stanica u ultrakulturi



Y = IL-8 pg/mL
 X = vrijeme (hr)
 -♦- Kontrola
 -●- 10 mM bakra
 -▲- 10 μM bis(holin)tetratiomolibdata
 -■- 10 μM kombo

Ilustracija 4

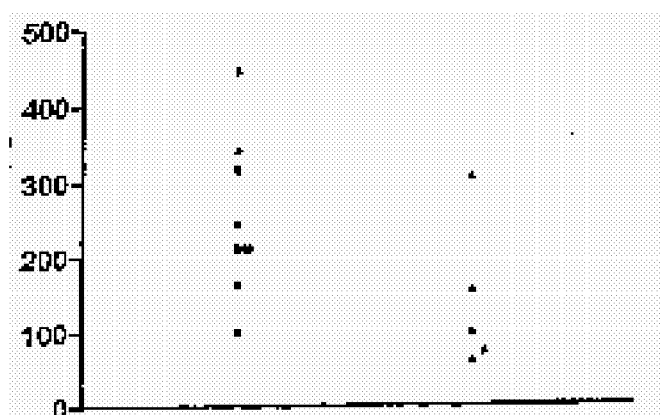
Učinak bis(holin)tetratiomolibdata na ekspresiju IL-8 uz pomoć aktiviranih Thp-1 stanica



Y = IL-8 pg/mL
X = vrijeme (hr)
-♦- Kontrola
-●- 10 mM bakra
-▲- 10 μM bis(holin)tetratiomolibdata
-■- 10 μM kombo

Ilustracija 5

Učinak oralno apliciranog bis(holin)tetratiomolibdata
na razine mišjeg KC u plazmi



Y = mišji KC pg/mL

X = terapija: kontrola, bis(holin)TM

-■- Kontrola

-▲- bis(holin)TM

Ilustracija 6