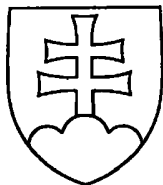


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 27. 10. 2000
 (31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/164 700
 (32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 10. 11. 1999
 (33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
 (40) Dátum zverejnenia prihlášky: 4. 4. 2002
 Vestník ÚPV SR č.: 4/2002
 (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
 (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/US00/29875
 (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO01/34605

(11), (21) Číslo dokumentu:

989-2001

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

C07D487/04,
A61K 31/505,
A61P 19/02,
A61P 19/10,
A61P 25/28

(71) Prihlasovateľ: ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC., Raritan, NJ, US;

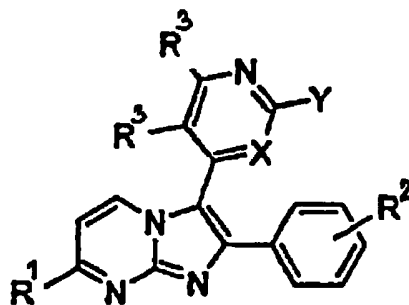
(72) Pôvodca: Dodd John H., Pittstown, NJ, US;
 Henry James R., Indianapolis, IN, US;
 Rupert Kenneth C., South Orange, NJ, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov Substituované 2-aryl-3-(heteroaryl)imidazo[1,2-a]pyrimidíny, spôsob prípravy týchto zlúčenín a farmaceutické preparáty obsahujúce tieto zlúčeniny

(57) Anotácia:

Sú opísané substituované imidazopyrimidíny všeobecného vzorca (I) a ich farmaceuticky prijateľné soli, kde X je N alebo CH, R³ je H alebo tvorí dohromady aromatický kruh, R² je jeden z piatich členov nezávisle vybraných zo súboru zahŕňajúceho halogén, trifluórmetyl, -NCH₂PH, C₁₋₅-alkyl a C₁₋₅-alkoxy, Y je vybraný zo súboru zahŕňajúceho H, halogén, heterocyklus, OR⁴, SR⁴, NR⁴ a NR⁴R⁵, kde význam substituentov R⁴ a R⁵ je uvedený v opise, R¹ je vybraný zo súboru zahŕňajúceho NH₂, C₁₋₅-alkylamino, diC₁₋₅-alkylamino, hydroxy, C₁₋₅-alkoxy, fenylmetylamino, heterocyklylmetyl, C₁₋₅-alkylkarbonylamino a substituovanú fenylkarbonylamino skupinu, pričom fenylmetylamino a heterocyklylmetyl skupina môže byť substituovaná na svojej fenylovej časti jedným alebo viacerými substituentmi, ktorých význam je uvedený v opise. Ďalej je opísaný spôsob ich prípravy, farmaceutický preparát s ich obsahom a ich použitie ako inhibítorov tvorby celého radu zápalových cytokínov. Sú užitočné pri liečbe a prevencii ochorení združených s nadprodukciou týchto cytokínov.



(I)

Substituované 2-aryl-3-(heteroaryl)imidazo[1,2-a]pyrimidíny,
spôsob prípravy týchto zlúčenín a farmaceutické preparáty
obsahujúce tieto zlúčeniny

Oblasť techniky

Vynález sa týka série substituovaných imidazopyrimidínov a farmaceutických preparátov obsahujúcich tieto zlúčeniny. Zlúčeniny, ktoré sú predmetom vynálezu, inhibujú celý rad zápalových cytokínov, najmä TNF- α a IL-1 β . Zlúčeniny podľa tohto vynálezu sú užitočné pri liečbe ochorení sprostredkovaných proteínom p38, ako je napríklad reumatická artritída, nešpecifické črevné zápal, septický šok, osteoporóza, osteoartróza, neurodegeneratívne ochorenia a ochorenia spojené s AIDS.

Doterajší stav techniky

Zápalové cytokíny TNF- α a IL-1 β hrajú dôležitú úlohu v celom rade zápalových ochorení, ako je napríklad reumatická artritída (Dinarello et al., Curr Opin Immunol 1991, 3, 941-8). Artritída je zápalové ochorenie, ktoré postihuje milióny ľudí a môže napadnúť akýkoľvek kĺb v ľudskom tele. Jej príznaky sa pohybujú od miernej bolesti a zápalu postihnutých kĺbov až k ťažkým a vysilujúcim bolestiam a zápalu. Aj keď sa toto ochorenie vyskytuje hlavne u starších dospelých, nie je obmedzené len na dospelých.

Najbežnejšia liečba artritídy zahŕňa použitie nesteroidných protizápalových liekov (NSAID), aby došlo k úľave od príznakov. Avšak napriek širokému použitiu NSAID nemôže mnoho jedincov dlhší čas tolerovať dávky nevyhnutné na liečbu

ochorenia. Okrem toho NSAID liečia len príznaky ochorenia bez ovplyvnenia základnej príčiny. Ak u pacientov zlyhá liečba pomocou NSAID, často sa používajú ďalšie lieky, ako je napríklad metotrexát, D-penicilamín, soli zlata a prednizón. Tieto lieky majú často významné toxické účinky a mechanizmus ich účinku zostáva neznámy. V malých klinických štúdiách na človeku bolo dokázané, že antagonisty receptora pre IL-1 β a monoklonové protilátky k TNF- α znižujú príznaky reumatickej artritídy. Navyše k tejto bielkovinovej liečbe existujú látky s malou molekulou, ktoré inhibujú produkciu týchto cytokínov a ktoré prejavili aktivitu na zvieracích modeloch artritídy (Boehm et al., J Med Chem 1996, 39: 3929-37). Z týchto malých bolo dokázané, že SB 203580 účinne znižuje tvorbu TNF- α a IL-1 v bunkových líniiach ľudských monocytov stimulovaných pomocou LPS s hodnotami IC₅₀ od 50 do 100 nM (Adams et al., WO 93/14081, 23. júl, 1993). Navyše k tomuto *in vitro* testu inhibuje SB 203580 tvorbu zápalových cytokínov u potkanov a myší pri hodnotách IC₅₀ od 15 do 25 mg/kg (Badger et al., J Pharm Exp Therap 1996, 279: 1453-61). Aj keď ľudské údaje nie sú pre SB 203580 v súčasnosti k dispozícii, bolo pre monoklonové protilátky proti TNF- α dokázané, že sú účinné v liečbe reumatickej artritídy (Elliot et al., Arthritis Rheum. 1993, 36: 1681-90). V dôsledku perorálnej aktivity a účinnosti SB 203580 na zvieracích modeloch naznačili výskumní pracovníci, že zlúčenina s týmto profilom má potenciál ako životaschopná liečebná možnosť pre reumatickú artritídu (Badger et al., J Pharm Exp Therap 1996, 279: 1453-61).

SB 203580 a ďalšie látky s malou molekulou znižujú tvorbu zápalových cytokínov inhibíciou aktivity serín/treonínovej kinázy p38, ktorá je označovaná ako CSBP v koncentrácii IC₅₀ 200 nM (Griswold et al., Pharm Commun

1996, 7: 232-9). Aj keď presná úloha tejto kinázy nie je známa, hrá úlohu ako pri tvorbe TNF- α , tak aj v signálnych odpovediach združených s receptorom pre TNF- α .

WO 91/00092 uvádza spôsob inhibície tvorby interleukínu-1 monocytmi a/alebo makrofágmi u človeka prostredníctvom podania diaryl-substituovaného imidazolu fuzionovaného s druhým heterocyklickým kruhom obsahujúcim dusíkový premostujúci atóm, kde druhý kruh môže obsahovať aj atóm síry, kyslíka alebo ďalší atóm dusíka a môže obsahovať ďalšie nenasýtené väzby.

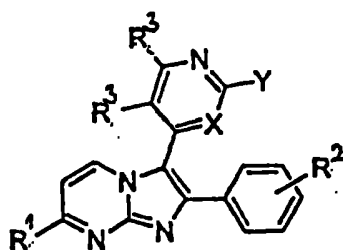
Vo WO 90/15534 a EP 0403251 sú uvedené liečebné spôsoby pre človeka postihnutého T-bunkovou vírusovou infekciou (TIV), ktorá zahŕňa podanie účinného množstva látky znižujúcej aktivitu monokínov.

Vo WO 91/19497 je uvedená diarylom substituovaná imidazolová zlúčenina užitočná na duálnu inhibíciu ochorení spôsobených 5-lipooxygenázovou dráhou a ochorení spôsobených cyklooxygenázovou dráhou. Táto zlúčenina je fuzionovaná k druhému nenasýtenému 5- alebo 6-člennému heterocyklickému kruhu obsahujúcemu dusíkový premostujúci atóm, kde druhý 5-členný kruh obsahuje aj atóm síry alebo kyslíka a 6-členný kruh môže obsahovať aj ďalší atóm dusíka.

Napriek týmto známym zlúčeninám a spôsobom zostáva v odbore potreba zlepšiť spôsoby zníženia produkcie zápalových cytokínov pomocou inhibície aktivity serín/treonínovej kinázy p38 a príbuzné spôsoby liečby a prevencie artritídy a ďalších zápalových chorôb.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje nové zlúčeniny, ktoré inhibujú *in vitro* aktivitu p38 v nanomolovom rozsahu, ako aj spôsoby majúce rovnaký účinok. Zlúčeniny, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, okrem toho inhibujú *in vitro* sekreciu TNF- α a IL-1 β v nanomolovom rozsahu. Na zvieracích modeloch bola dokázaná inhibícia produkcie TNF- α indukovaná pomocou LPS. Tieto biologické aktivity boli dokázané v *in vitro* a *in vivo* testoch pre zlúčeniny, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, definované vzorcom I:



Vzorec I

Tento vynález poskytuje aj farmaceutický preparát obsahujúci predkladanú zlúčeninu a farmaceuticky prijateľný nosič a taktiež poskytuje príslušné syntetické metódy.

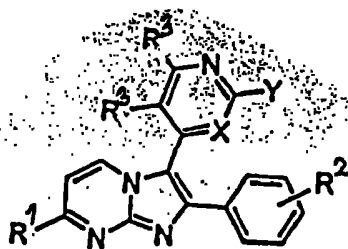
Tento vynález ďalej poskytuje spôsob liečby jedinca trpiaceho stavom, ktorého zmiernenie je sprostredkované znížením zápalových cytokínov, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob zahŕňa podanie terapeuticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi.

Tento vynález ďalej ešte poskytuje u jedinca spôsob inhibície vzplanutia stavu, ktorého zmiernenie je sprostred-

kované znížením zápalových cytokínov, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob zahŕňa podanie profylakticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi.

Detailný opis vynálezu

Vynález poskytuje zlúčeninu definovanú vzorcom I.



Vzorec I

alebo jej farmaceuticky prijateľné soli, kde

a) R^1 je vybraný zo súboru zahŕňajúceho NH_2 , C_{1-65} -alkyl-amino, diC_{1-5} -alkylamino, hydroxy, C_{1-5} -alkoxy, fenylmetylamino, heterocyklylmetyl, C_{1-5} -alkylkarbonylamino a substituovanú fenylkarbonylamínoskupinu, kde

uvedená skupina fenylmetylamino a heterocyklylmetyl môže byť substituovaná na svojej fenylovej časti jedným alebo viacerými členmi vybranými zo súboru zahŕňajúceho halogén, C_{1-5} -alkyl, C_{1-5} -alkoxy, $arylC_{1-3}$ -alkylamino, $R'R''NCH=N-$ a OR''' , kde R' , R'' a R''' sú nezávisle vybrané zo súboru zahŕňajúceho H, C_{1-5} -alkyl, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, α -alkylfenylmetyl, substituovaný α -alkylfenylmetyl, heterocyklylmetyl a substituovaný heterocyklylmetyl;

- b) Y je vybraný zo súboru zahŕňajúceho H, halogén, heterocyklus, OR^4 , SR^4 , NR^4 a NR^4R^5 , kde R^4 a R^5 sú nezávisle vybrané zo súboru zahŕňajúceho H, heterocyklyl, C_{3-5} -karbocyklofenyl, α -alkylfenyl- C_{1-5} -alkyl, nerozvetvený alebo rozvetvený alkyl voliteľne substituovaný pomocou R, NR, $N(R)_2$, C_{3-5} -karbocyklu, fenylu alebo substituovaného fenylu, kde (i) R je H, halogén, C_{1-5} -alkyl, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, SO_2Ph , pyridyl alebo pyridylmetyl a (ii) uvedený fenyl, heterocyklyl a α -alkylfenyl- C_{1-5} -alkyl môžu byť substituované jedným alebo viacerými členmi vybranými zo súboru zahŕňajúceho halogén, C_{1-5} -alkyl, C_{1-5} -alkoxy, aryl, C_{1-3} -alkylamino, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, $R'R''NCH=N-$ a OR''' , ako je tu definované v (a);
- c) R^2 je jeden z piatich členov nezávisle vybraných zo súboru zahŕňajúceho halogén, trifluórmetyl, $-NCH_2PH$, C_{1-5} -alkyl a C_{1-5} -alkoxy;
- d) R^3 je H alebo tvorí dohromady aromatický kruh; a
- e) X je N alebo CH.

V jednej forme predkladanej zlúčeniny R^1 je NH_2 . V ďalšej forme R^2 je prvok vybraný zo súboru zahŕňajúceho halogén, trifluórmetyl, $-NCH_2PH$ a C_{1-5} -alkoxy. V ešte ďalšej forme Y je NR^4 a R^4 je fenylmetyl. V ešte ďalšej forme X je CH.

Ak nie je inak špecifikované, týka sa termín „alkyl“ nerozvetvených, rozvetvených alebo cyklických substituentov tvorených výlučne uhlíkom a H bez nenasýtených väzieb. Termín

„alkoxy“ sa týka O-alkylu, kde alkyl je rovnaký, ako je definované vyššie. Termín „aromatický kruh“ sa týka 5- až 6-členného kruhu obsahujúceho 6-elektrónový delokalizovaný konjugovaný π väzbový systém, ako je napríklad fenyl, furanyl a pyrolyl. Termín „aryl“ zahŕňa mono a fuzionované aromatické kruhy, ako je napríklad fenyl, naftyl, difenyl, fluórfenyl, difluórfenyl, benzyl, benzoyloxyfenyl, hydroxyfenyl, karboxyfenyl, trifluórmetylfenyl, metoxyetylfenyl, acetamidofenyl, tolyl, xylyl, dimetylkarbamylfenyl a podobne. Termín „halogén“ znamená fluór, chlór, bróm alebo jód. Symbol „Ph“ sa týka fenylu. Termín „heterocyklyl“, „heterocyklus“ alebo „heterocyklický zvyšok“ predstavuje jeden alebo fuzionovaný kruh majúci aspoň jeden atóm kruhu iný ako uhlíkový, napríklad pyridínový, pyrimidínový, oxazolínový, pyrolový, imidazolový, morfolínový, furánový, indolový, benzofuránový, pyrazolový, pyrrolidínový, piperidínový a benzimidazolový.

Substituovaný heterocyklylmetyl a substituovaný fenylmetyl majú substituenty, ako je napríklad halogén, C_{1-5} -alkyl, C_{1-5} -alkoxy, aryl- C_{1-3} -alkylamino, $R'R''NCH=N-$, a OR''' , kde R' , R'' a R''' sú nezávisle vybrané zo súboru zahŕňajúceho H, C_{1-5} -alkyl, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, α -alkylfenylmetyl, heterocyklylmetyl a substituovaný heterocyklylmetyl.

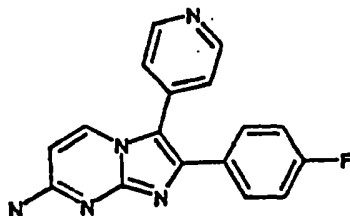
Termín „FCS“ predstavuje fetálne teľacie sérum, „TCA“ predstavuje kyselinu trifluóroctovú a „RPMI“ predstavuje médium z Roswell Park Memorial Inst. (Sigma, kat. č. R0833). „Nezávisle“ znamená, že ak existuje viac ako jeden substituent, môžu byť substituenty odlišné. „DME“ sa týka etylénglykoldimetylu. Termín „NaHMDS“ sa týka hexametyl-disilazidu sodného.

Termín „farmaceuticky prijateľná soľ“ označuje soli voľnej zásady, ktorá má požadovanú farmakologickú aktivitu voľnej zásady a ktorá nie je ani biologicky ani inak nežiaduca. Tieto soli môžu byť odvodené od anorganických alebo organických kyselín. Príkladmi anorganických kyselín sú kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina jodovodíková, kyselina chloristá, kyselina dusičná, kyselina fosforečná a kyselina sírová. Príkladmi organických kyselín sú kyselina octová, kyselina propiónová, kyselina glykolová, kyselina mliečna, kyselina pyrohroznová, kyselina malónová, kyselina jantárová, kyselina jablčná, kyselina maleínová, kyselina fumarová, kyselina vínna, kyselina citrónová, kyselina benzoová, kyselina škoricová, kyselina mandľová, kyselina šťaveľová, kyselina pamoová, kyselina sacharová, kyselina metánsulfónová, kyselina etánsulfónová, kyselina p-toluénsulfónová, kyselina metylsulfónová, kyselina salicylová, kyselina hydroetánsulfónová, kyselina benzén-sulfónová, kyselina 2-naftalénsulfónová, kyselina p-toluén-sulfónová, kyselina cyklohexánsulfónová a podobne.

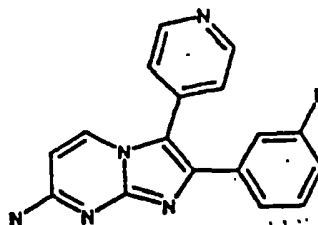
Ak zlúčeniny podľa vynálezu majú jedno alebo viac stereogénnych centier, malo by sa rozumieť, že súčasťou tohto vynálezu sú aj všetky možné optické izoméry, antipódy, enantioméry a diastereoméry vzniknuté z ďalších stereogénnych centier, ktoré môžu existovať vo svojich optických antipódoch, racemátoch a racemických zmesiach. Antipódy sa môžu oddeľovať spôsobmi známymi osobám vyznajúcim sa v odbore, ako je napríklad frakčná rekryštalizácia diastereomérnych solí enantiomérne čistých kyselín. Alternatívne sa môžu antipódy separovať chromatografiou na kolóne Pirklovho typu.

Nasledovné zlúčeniny sú príkladom predloženého vynálezu:

Zlúčenina 1: 2-(4-fluórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;



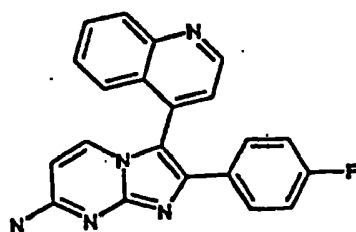
Zlúčenina 1



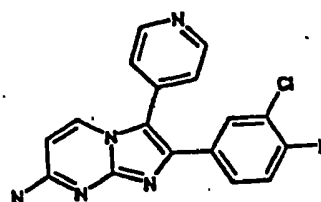
Zlúčenina 2

Zlúčenina 2: 2-(3-fluórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 3: 2-(4-fluórfenyl)-3-(4-chinolínlyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;



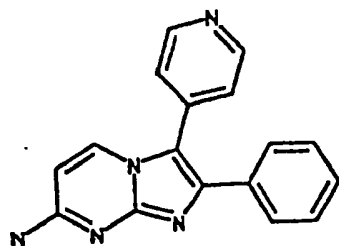
Zlúčenina 3



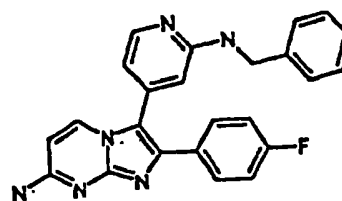
Zlúčenina 4

Zlúčenina 4: 2-(3-chlór-4-fluórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 5: 2-(fenyl-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;



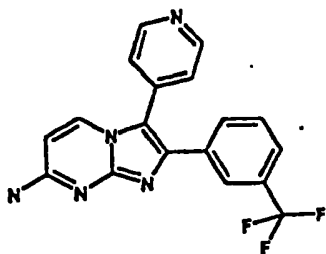
Zlúčenina 5



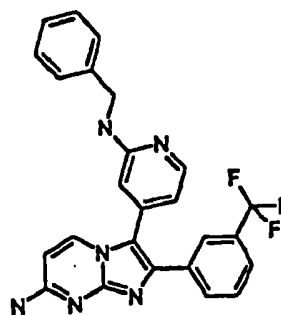
Zlúčenina 6

Zlúčenina 6: 2-(4-fluórfenyl)-3-(2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 7: 3-(4-pyridinyl)-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



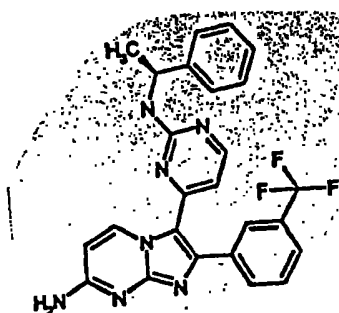
Zlúčenina 7



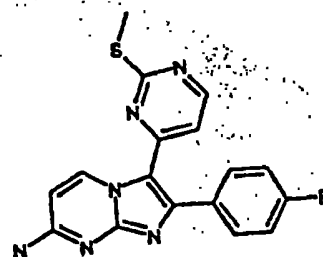
Zlúčenina 8

Zlúčenina 8: 3-[2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 9: 3-[2-[[1-(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



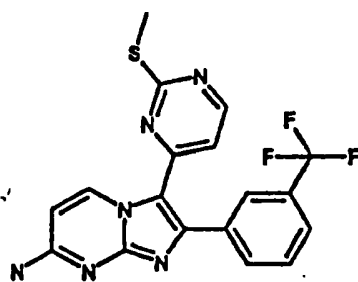
Zlúčenina 9



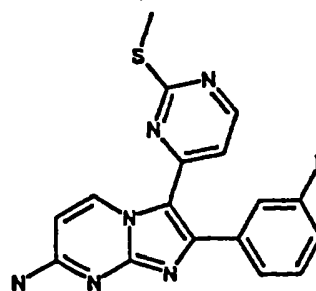
Zlúčenina 10

Zlúčenina 10: 2-(4-fluórfenyl)-3-[2-(metyltio)-4-pyrimidinyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 11: 3-[2-metyltio)-4-pyrimidinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



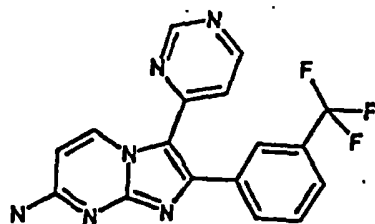
Zlúčenina 11



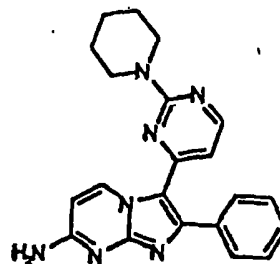
Zlúčenina 12

Zlúčenina 12: 2-(3-fluórfenyl)-3-[2-(metyltio)-4-pyrimidinyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 13: 3-(4-pyrimidinyl)-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



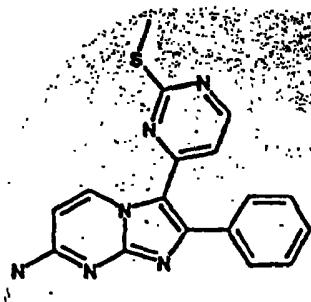
Zlúčenina 13



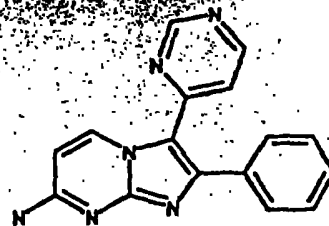
Zlúčenina 14

Zlúčenina 14: 2-fenyl-3-[2-(1-piperidiny)l]-4-pyrimidiny]l-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 15: 3-[2-(metyltio)-4-pyrimidiny]l]-2-fenyl-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



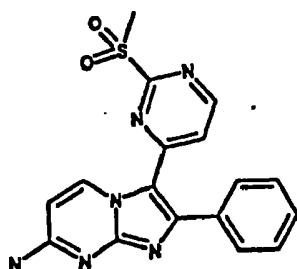
Zlúčenina 15



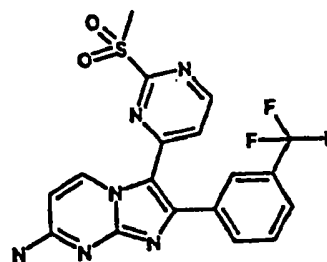
Zlúčenina 16

Zlúčenina 16: 2-fenyl-3-(4-pyrimidiny]imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 17: 3-[2-(metylsulfonyl)-4-pyrimidiny]l]-2-fenyl-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



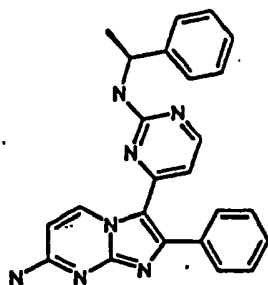
Zlúčenina 17



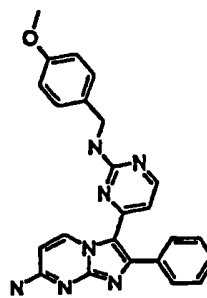
Zlúčenina 18

Zlúčenina 18: 3-[2-(methylsulfonyl)-4-pyrimidinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 19: 2-fenyl-3-[2-[[[(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



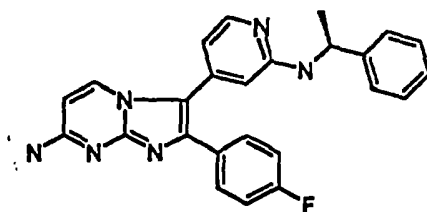
Zlúčenina 19



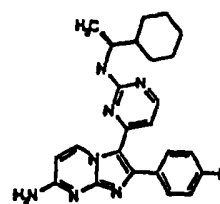
Zlúčenina 20

Zlúčenina 20: 3-[[[(4-metoxifyfenyl)metyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-fenylimidazo-[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 21: 2-(4-fluórfenyl)-3-[3-[[[(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyridinyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



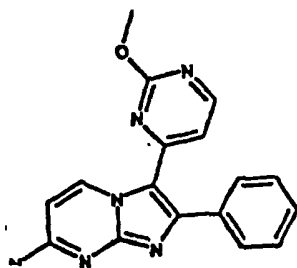
Zlúčenina 21



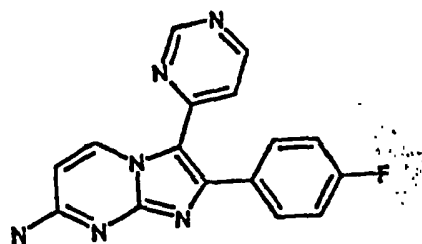
Zlúčenina 22

Zlúčenina 22: 3-[2-[[[(1S)-1-cyklohexyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-(4-fluórfenyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 23: 3-(2-metoxy-4-pyrimidinyl)-2-fenylimidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



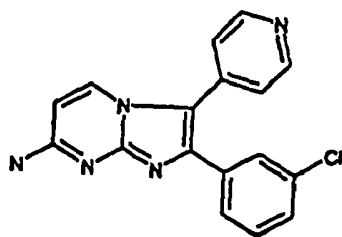
Zlúčenina 23



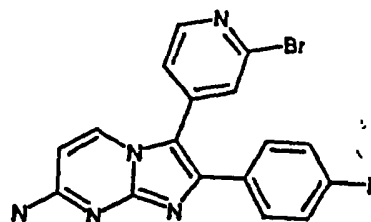
Zlúčenina 24

Zlúčenina 24: 2-(4-fluórfenyl)-3-(4-pyrimidinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;

Zlúčenina 25: 2-(3-chlórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



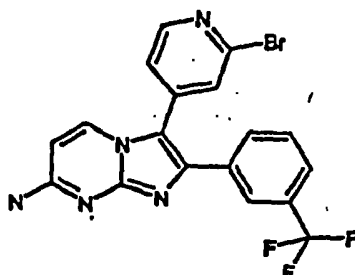
Zlúčenina 25



Zlúčenina 26

Zlúčenina 26: 3-(2-bróm-4-pyridinyl)-2-(4-fluórfenyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín; a

Zlúčenina 27: 3-(2-bróm-4-pyridinyl)-2-[3-trifluórmetyl)-fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín;



Zlúčenina 27

Tento vynález poskytuje aj farmaceutický preparát obsahujúci predkladanú zlúčeninu a farmaceuticky prijateľný nosič.

Farmaceutické preparáty obsahujúce zlúčeninu, ktorá je predmetom predloženého vynálezu, ako aktívnu zložku v premiešanej zmesi s farmaceutickým nosičom sa môžu pripraviť podľa konvenčných farmaceutických techník. Nosič môže mať celý rad foriem v závislosti od preparátu požadovaného na podanie, ako napríklad na topické a systémové podanie zahŕňajúce, ale

neobmedzujúce sa len na intravenóznú infúziu, perorálne, nazálne alebo parenterálne podanie. Pri príprave preparátov v perorálnej dávkovej forme sa môžu použiť akékoľvek z obvyklých farmaceutických nosičov, ako je napríklad voda, glycerol, glykoly, alkoholy, chuťové látky, konzervačné látky, dofarbujúce látky a sirup a podobne, na perorálne kvapalné preparáty (napríklad suspenzie, elixíry a roztoky); alebo nosiče, ako sú napríklad škroby, cukry, metylcelulóza, magnéziumstearát, dikalciumfosfát, manitol a podobne, v prípade perorálnych tuhých preparátov (napríklad prášky, kapsuly a tablety). Všetky excipientné látky sa môžu zmiešať podľa potreby s dezintegračnými látkami, riediacimi látkami, granulačnými látkami, lubrikačnými látkami, väzbovými látkami a podobne, použitím konvenčných techník známych osobám vyznajúcim sa v odbore prípravy dávkových foriem.

Prednostným spôsobom podania je perorálne podanie. Pre jednoduchosť podania predstavujú tablety a kapsuly výhodnú perorálnu dávkovú formu, v ktorej sú samozrejme použité tuhé farmaceutické nosiče. Ak je to potrebné, môžu byť tablety potiahnuté cukrom alebo môžu byť entericky potiahnuté pomocou štandardných techník. Nosič pre parenterálne preparáty zahŕňa obvykle sterilnú vodu, avšak môžu byť obsiahnuté aj iné zložky, napríklad na zlepšenie rozpustnosti alebo na konzervačné účely. Môžu sa pripraviť aj injekčné suspenzie, v ktorých sa môžu použiť príslušné kvapalné nosiče, suspendujúce látky a podobne.

Ak sa používa v tomto vynáleze termín „cytokín“, týka sa proteínov TNF- α a IL-1 β . Cytokínmi spôsobené poruchy sú ochorenia človeka a iných cicavcov, u ktorých nadprodukcia cytokínov spôsobuje príznaky ochorenia. Nadprodukcia cytokínov TNF- α a IL-1 β je spojená s celým radom ochorení.

Zlúčeniny, ktoré sú predmetom predloženého vynálezu, inhibujú tvorbu TNF- α a IL-1 β . Tento vynález teda ďalej poskytuje spôsob liečby jedinca trpiaceho stavom, ktorého zmiernenie je spôsobené znížením zápalových cytokínov, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob zahŕňa podanie terapeuticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi. Ako sa tu používa, zahŕňa termín „jediniec“ bez obmedzenia akéhokoľvek živočícha alebo umelo modifikovaného živočícha. V prednostnej forme vynálezu je jedincom človek.

Tento vynález ďalej ešte poskytuje u jedinca spôsob inhibície vzplanutia stavu, ktorého zmiernenie je spôsobené znížením zápalových cytokínov, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob zahŕňa podanie profylakticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi.

V jednej forme uskutočnenia je stav vybraný zo súboru zahŕňajúceho artritídu, nešpecifické zápaly čreva, septický šok, osteoporózu, osteoartrózu, neuropatickú bolesť, replikáciu HIV, HIV demenciu, vírusovú myokarditídu, inzulín-dependentný diabetes, non-inzulín-dependentný diabetes, periodontálne ochorenie, restenózu, alopecia areata, depléciu T-lymfocytov pri infekcii HIV alebo AIDS, psoriázu, akútnu pankreatitídu, rejekciu alotransplantátu, alergický zápal pľúc, aterosklerózu, roztrúsenú sklerózu, kachexiu, Alzheimerovu chorobu, mozgovú príhodu, Crohnovu chorobu, ischemiu, zlyhanie srdca spôsobujúce upchatie, pľúcnu fibrózu, hepatitídu, glioblastóm, Guillainov-Barrov syndróm a systémový lupus erytematosus. V prednostnej forme vynálezu je stavom reumatická artritída.

Ako sa používa tu, znamená „liečenie“ poruchy elimináciu alebo inak zmiernenie príčiny a/alebo jej účinkov. „Inhibíciou“ vzplanutia poruchy sa rozumie prevencia, oddialenie a zníženie pravdepodobnosti takého vzplanutia. Podobne „terapeuticky účinné“ a „profylakticky účinné“ dávky sú dávky, ktoré umožňujú liečbu a respektíve inhibíciu poruchy. Spôsoby na určenie terapeuticky a profylakticky účinných dávok pre predkladaný farmaceutický preparát sú známe v odbore. Účinná dávka na podanie farmaceutického preparátu človeku sa môže určiť napríklad matematicky z výsledkov štúdií na zvieratách.

V jednej forme vynálezu sú perorálne dávky predkladaných zlúčenín v rozpätí od približne 0,05 do približne 10 mg/kg denne. V ďalšej forme vynálezu sú perorálne dávky predkladaných zlúčenín v rozpätí od približne 0,05 do približne 50 mg/kg denne a v ďalšej forme vynálezu od približne 0,05 do približne 20 mg/kg denne. Infúzne dávky môžu byť v rozpätí napríklad od približne 1,0 do $1,0 \times 10^4$ ug/kg/min predkladanej zlúčeniny zmiešanej s farmaceutickým nosičom, podávanej v intervale od niekoľkých minút do niekoľkých dní. Na topické podanie sa môže prednostná zlúčenina zmiešať s farmaceutickým nosičom v koncentrácii napríklad približne 0,1 až približne 10 % lieku k vehikulu.

Napokon tento vynález poskytuje postupy prípravy predkladaných zlúčenín. Tieto zlúčeniny sa môžu pripraviť, ako je uvedené nižšie, z ľahko dostupných východiskových látok a/alebo medziproduktov pomocou postupov dobre známych v odbore.

Tomuto postupu sa lepšie porozumie pomocou odkazu na experimentálne detaily, ktoré nasledujú, ale osoby vyznajúce sa v odbore, ľahko ocenia, že tieto detaily sú len

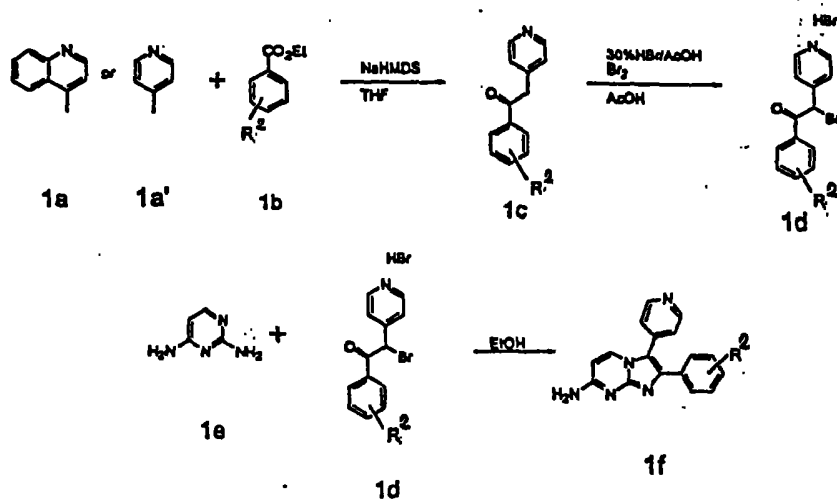
ilustráciou vynálezu, ako sa opisuje detailnejšie v patentových nárokoch, ktoré potom nasledujú. Okrem toho sú v tejto prihláške citované rôzne publikácie. Uvedenie týchto publikácií je týmto začlenené ako referencia k tejto prihláške, aby bol detailnejšie opísaný doterajší stav techniky, ktorého sa vynález týka.

Experimentálne detaily

A. Schémy a syntézy

Zlúčeniny definované vzorcom I, v ktorých R je NH_2 a R^3 a Y sú H, sa môžu pripraviť podľa schémy I. Východisková zlúčenina typu 1a, ako je napríklad 4-metylpyridín alebo 4-metylchinolín, sa môže premiešavať pri izbovej teplote s esterom typu 1b a dvoma ekvivalentmi alebo s vhodnou brániacou zásadou, ako je napríklad hexametyldisilazid, vo vhodnom rozpúšťadle, ako je napríklad THF, za vzniku enolátu 1c, ktorý sa potom brómuje na typ 1d. Medziprodukt typu 1d sa môže ďalej podrobiť reakcii s 2,6-diaminopyridínom za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom I, v ktorom R je NH_2 a Y je H.

Schéma I



Aj keď ilustrovaný spôsob vedie k tvorbe zlúčeniny definovanej vzorcom I, kde R^1 je NH_2 , X je CH a Y je H, môže byť táto schéma použitá aj na tvorbu iných zlúčenín podľa vynálezu.

Schéma II znázorňuje, ako pripraviť zlúčeniny definované vzorcom I, kde X je N a Y, R^2 a R^3 sú rovnaké, ako je definované H.

Schéma II

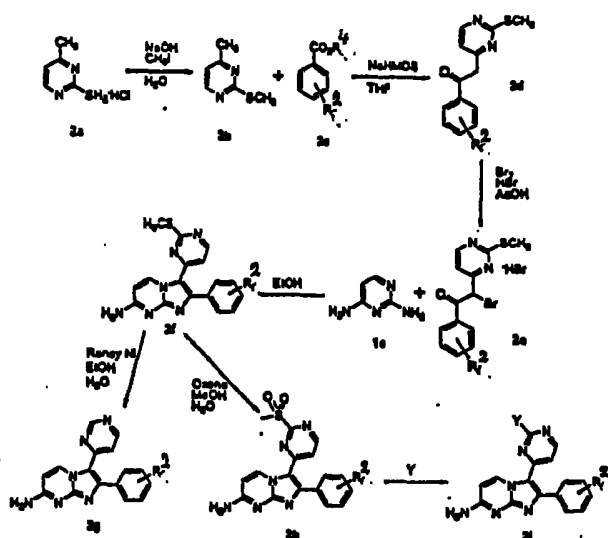


Schéma III ukazuje, ako pripraviť zlúčeniny definované vzorcom I, kde X je CH, Z' je F, Cl alebo Br a Y, R^2 a R^3 sú rovnaké, ako je definované vyššie.

Schéma III

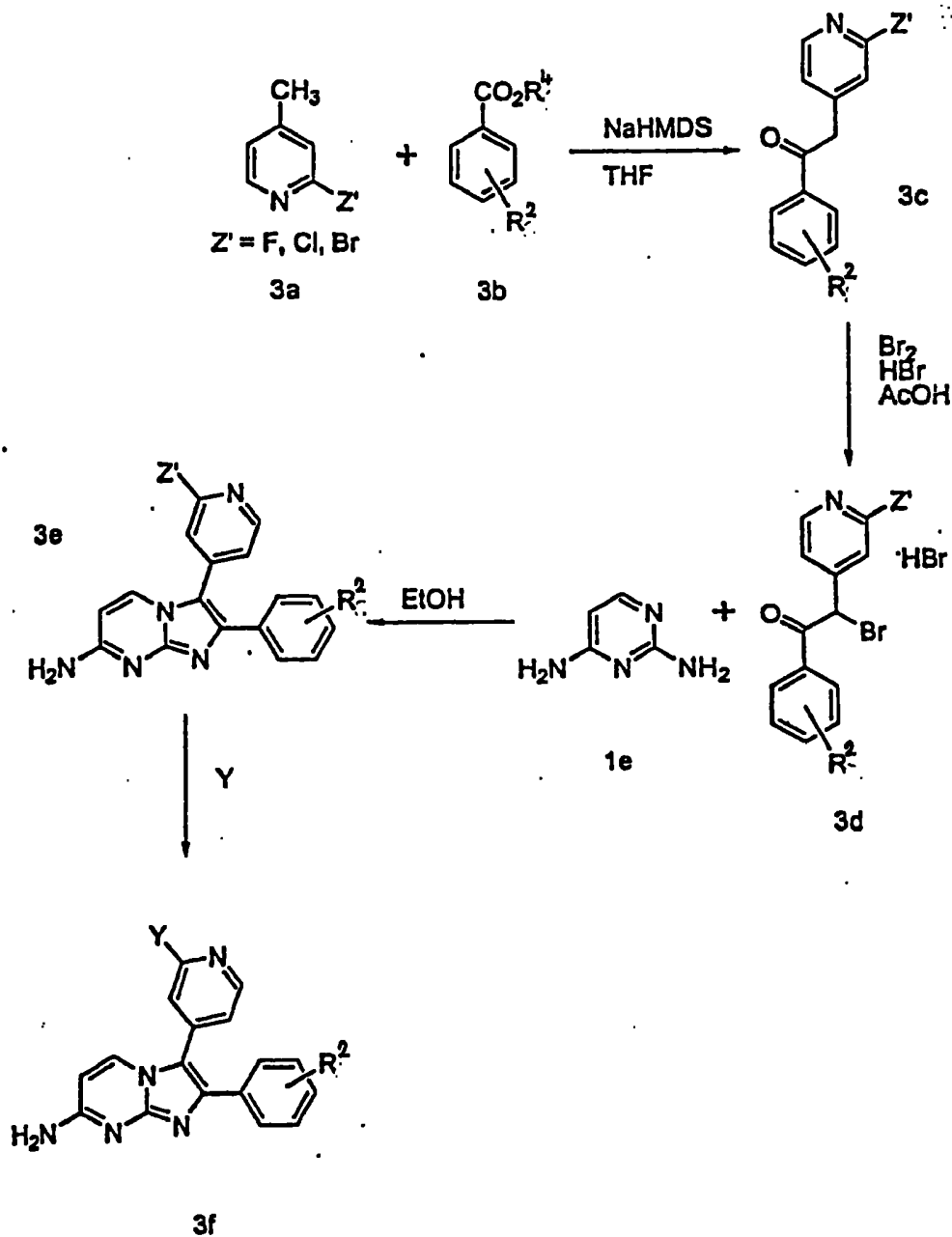
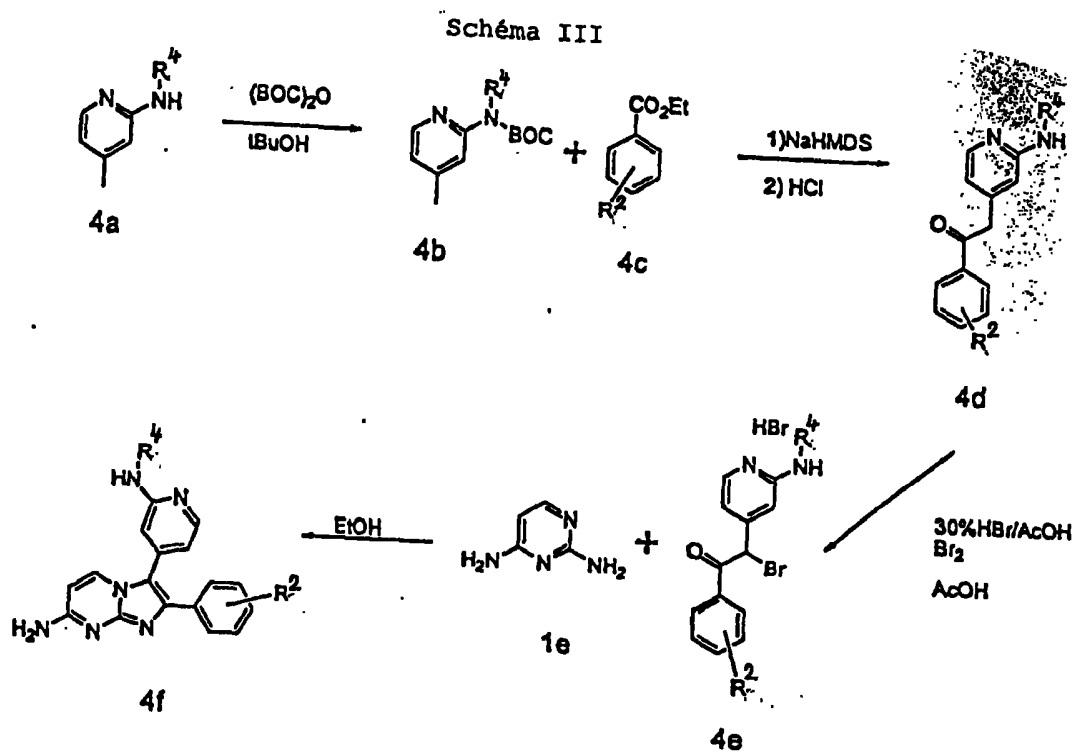


Schéma IV ukazuje, ako pripraviť zlúčeniny definované vzorcom I, kde X je CH, Y je NR^4 a R^4 je rovnaké, ako je definované vyššie.

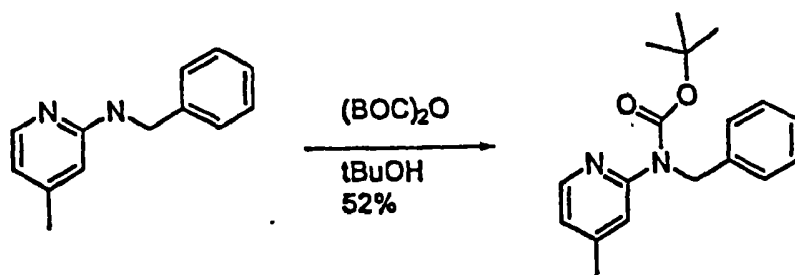


Príklady uvedené nižšie opisujú konkrétnejšie chemickú syntézu typických zlúčenín podľa predloženého vynálezu. Ostávajúce zlúčeniny tu uvedené sa môžu pripraviť podobne v zhode s jedným alebo viacerými z týchto spôsobov. Neuskutočnil sa žiadny pokus na optimalizovanie výťažkov v týchto reakciách a osobe vyznajúcej sa v odbore by malo byť zrejmé, že odchýlky reakčných časov, teplôt, rozpúšťadiel a/alebo činidiel by mohli zvýšiť tieto výťažky.

Príklady uskutočnenia vynálezu

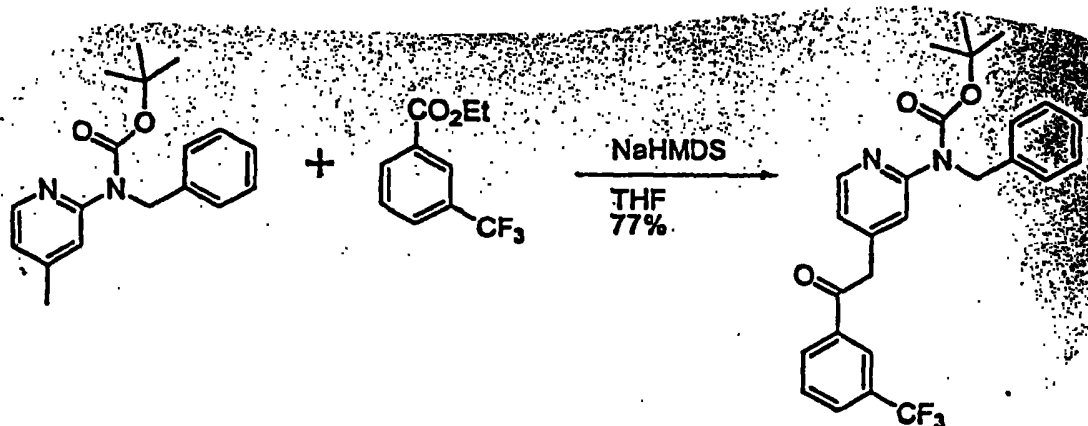
Príklad 1

Imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín, 3-[2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]



6,59 g (31,18 mmol) diterc-butyldikarbonátu sa pridalo k 5,44 g (27,44 mmol) 2-benzylamino-4-metylpyridínu v 40 ml terc-butanolu. Po 18 hodinách sa rozpúšťadlo odstránilo vo vákuu. Zvyšok sa rozotrel s hexánom a prefiltroval. Filtrát sa skoncentroval vo vákuu za vzniku 4,25 g chráneného amínu.

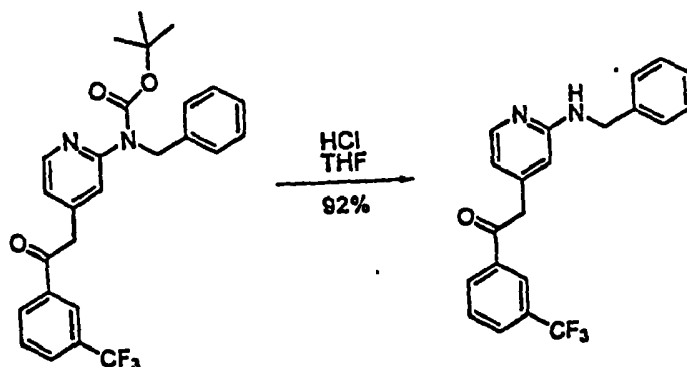
^1H NMR (300 Mhz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8,22 (1H, d, $J=5,1$ Hz), 6,99 (1H, d, $J=5,1$ Hz), 5,10 (2H, s), 2,31 (3H, s), 1,38 (9H, s).



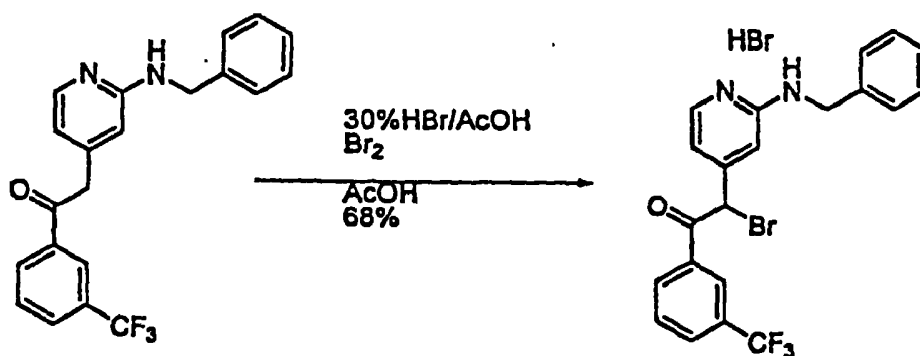
61 ml (61 mmol) 1,0M bis(trimetylsilyl)amidu sodného v tetrahydrofuráne sa pridalo po kvapkách pomocou lievika v dusíkovej atmosfére k roztoku 8,97 g (30,07 mmol) N-Boc-2-benzylamino-4-metylpyridínu a 6,58 (30,07 mmol) etyl-3-trifluórmetylbenzoátu v 60 ml tetrahydrofuránu. Po 18 hodinách sa reakcia ukončila nasýteným roztokom chloridu amónneho a rozpúšťadlo sa odstránilo vo vákuu. Zvyšok sa extrahoval do 300 ml etylacetátu a premyl 2 x 200 ml vody, 1 x 100 ml soľného roztoku, vysušil síranom sodným, prefiltroval a skoncentroval vo vákuu za vzniku hnedého oleja. Kolónová chromatografia použitím 5:1 hexánu/etylacetátu

umožnila získať 10,92 g produktu vo forme hustého žltého oleja.

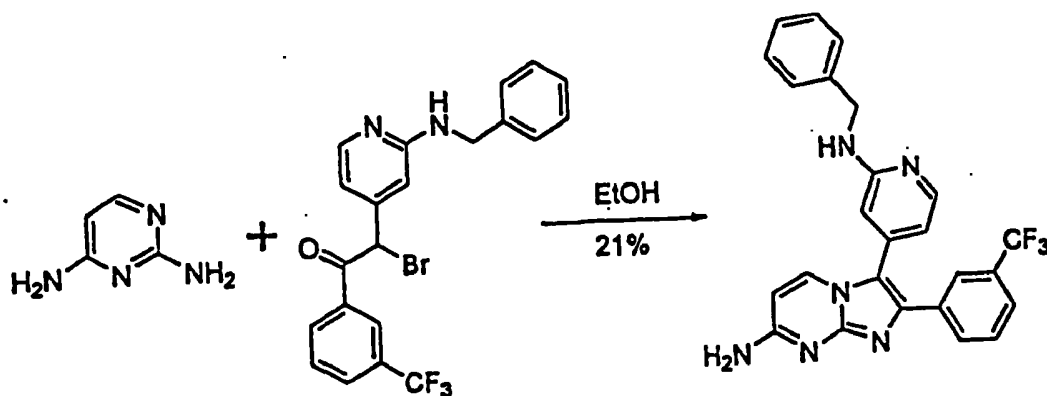
^1H NMR (300 Mhz, DMSO- d_6) δ 7,59 (1H, s) 5,11 (2H, s), 1,33 (9H, s).



10,92 g (23,21 mmol) chráneného amínu sa zohrievalo 1 hodinu pod spätným chladičom v 100 ml tetrahydrofuránu obsahujúceho 20 ml 6M roztoku HCl, potom sa ochladilo, zriedilo 220 ml vody a extrahovalo 2 x 250 ml etylacetátu. Organické vrstvy sa oddelili, skombinovali, premyli 200 ml vody, 2 x 100 ml soľného roztoku, vysušili síranom horečnatým, prefiltrovali a skoncentrovali vo vákuu za vzniku 7,91 g viskózneho červeného oleja. $MH^+ = 371$.



1,30 ml (6,61 mmol) 30% hydrogenbromidu v kyseline octovej sa pridalo k 2,33 g (6,29 mmol) ketónu v 10 ml ľadovej kyseliny octovej. Po kvapkách sa pridala roztok 0,35 ml (6,79 mmol) brómu v 1,65 ml ľadovej kyseliny octovej a reakčná zmes sa zahrievala pri teplote 60 °C 1 hodinu, ochladila na izbovú teplotu a zriedila éterom. Vytvorený olejový zvyšok sa premyl éterom za vzniku 2,27 g (4,28 mmol) hrubého bromidu. $MH^1 = 450$.



Zlúčenina 8

Roztok 1,89 g (17,13 mmol) 2,4-diaminopyrimidínu v 20 ml etanolu sa zohriala na teplotu 80 °C. Pridal sa roztok 2,27 g (4,28 mmol) hrubého bromidu v 50 ml etanolu po kvapkách pomocou lievika. Reakčná zmes sa miešala pri teplote 80 °C 1 hodinu a potom ochladila na izbovú teplotu. Približne jedna polovica rozpúšťadla sa odstránila vo vákuu. Po ochladení na izbovú teplotu sa reakčná zmes prefiltrovala. Filtrát sa skoncentroval vo vákuu, zriedil 250 ml etylacetátu a premyl 2 x 100 ml 0,5M roztoku hydroxidu sodného, vysušil síranom sodným, prefiltroval a skoncentroval vo vákuu za vzniku červenohnedého oleja. Kolónovou chromatografiou použitím 2%

metanolu v etylacetáte sa získalo 0,4161 g zlúčeniny 8 (imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín, 3-[2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]-) vo forme belavej tuhej látky.

$MH^+ = 461$.

Príklad 2

1-Fenyl-2-(4-pyridinyl)etanón a 1-fenyl-2-bróm-2-(4-pyridinyl)etanón

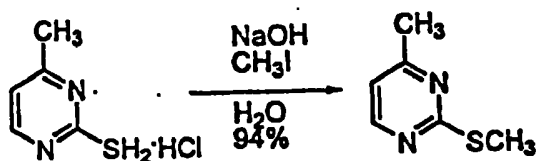
1,0M bis(trimetylsilyl)amid sodný (40 ml, 0,04 mol) v tetrahydrofuráne sa po kvapkách pomocou lievika a pod dusíkovou atmosférou pridal k roztoku 1,8 g (0,02 mmol) 4-pikolínu a 3,0 g (0,02 mmol) etylbenzoátu v 60 ml tetrahydrofuránu. Po 18 hodinách sa reakcia ukončila nasýteným roztokom chloridu amónneho a rozpúšťadlo sa odstránilo vo vákuu. Zvyšok sa extrahoval do 100 ml etylacetátu a premyl 2 x 200 ml vody, 1 x 100 ml soľného roztoku, vysušil síranom sodným, prefiltroval a skoncentroval vo vákuu za vzniku oleja. Rozotrením s éterom sa získalo 1,6 g produktu 1-fenyl-2-(4-pyridinyl)etanónu. $MH^+ = 198$.

1,8 ml (8,9 mmol) 35% hydrogenbromidu v kyseline octovej sa pridalo k 1,6 g (8,1 mmol) ketónu v 10 ml ľadovej kyseliny octovej. Po kvapkách sa pridal roztok 0,46 ml (8,9 mmol) brómu v 1,65 ml ľadovej kyseliny octovej a reakčná zmes sa zahrievala pri teplote 60 °C 1 hodinu, ochladila na izbovú teplotu a zriedila éterom. Vytvorená tuhá látka sa premyla éterom za vzniku 2,5 g bromidu vo forme HBr soli 1-fenyl-2-bróm-2-(4-pyridinyl)etanónu. $MH^+ = 276$.

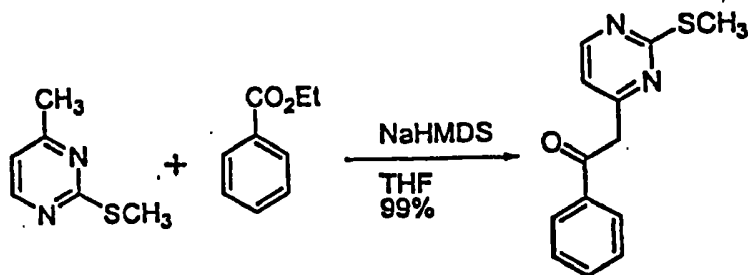
Príklad 3

Imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín, 2-fenyl-3-(4-pyridinyl)

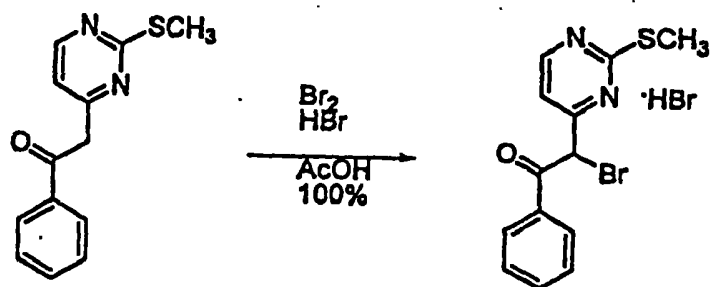
Roztok 1,2 g (11 mmol) 2,4-diaminopyrimidínu v 10 ml etanolu sa zohrial na teplotu 80 °C. Pridal sa roztok 1,0 g (2,8 mmol) bromidu v 20 ml etanolu po kvapkách pomocou lievika. Reakčná zmes sa miešala pri teplote 80 °C 3 hodiny a potom ochladila na izbovú teplotu. Približne jedna polovica rozpúšťadla sa odstránila vo vákuu. Po ochladení na izbovú teplotu sa reakčná zmes prefiltrovala. Filtrát sa skoncentroval vo vákuu, zriedil 250 ml etylacetátu a premyl 2 x 100 ml 0,5M roztoku hydroxidu sodného, vysušil síranom sodným, prefiltroval a skoncentroval vo vákuu za vzniku červeno-hnedého oleja. Rozotrenie zvyšku s EtOAc s následnou filtráciou viedlo k vzniku 0,108 g zlúčeniny 5 vo forme belavej tuhej látky. $MH^+ = 288$.



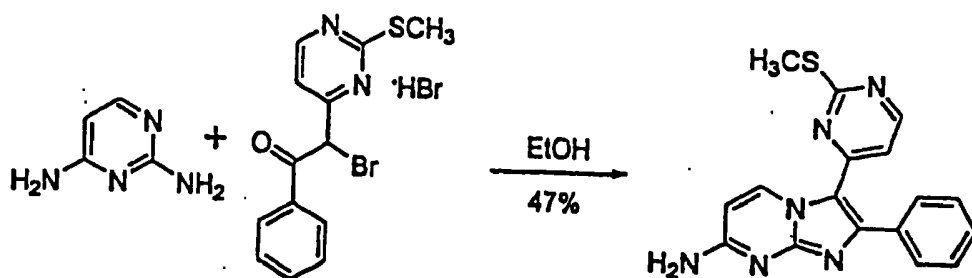
13,23 g (93,2 mmol) jódmetánu sa striekačkou po kvapkách pridalo k roztoku 13,38 g (84,73 mmol) 2-merkaptio-4-metylpyrimidín-hydrochloridu a 7,46 g (186,4 mmol) hydroxidu sodného v 120 ml vody. Po 2 hodinách sa reakčná zmes extrahovala 2 x 125 dichlórmetánu. Organické vrstvy sa oddelili, skombinovali, vysušili síranom sodným, prefiltrovali a skoncentrovali vo vákuu za vzniku 11,14 g (79,45 mmol) 4-metyl-2-metyltio)pyrimidínu vo forme červeného oleja. $MH^+ = 140,9$.



86 ml (86 mmol) 1,0M bis(trimetylsilyl)amidu sodného v tetrahydrofuráne sa pridalo po kvapkách pomocou lievika v dusíkovej atmosfére k roztoku 6,03 g (43 mmol) 4-metyl-2-(metyltio)pyrimidínu a 6,46 g (43 mmol) etylbenzoátu v 86 ml tetrahydrofuránu. Po 2 hodinách sa reakcia ukončila nasýteným roztokom chloridu amónneho. Väčšina tetrahydrofuránu sa odstránila vo vákuu. Zvyšok sa zriedil 400 ml etylacetátu a 200 ml vody. Organická vrstva sa oddelila a premyla 2 x 100 ml nasýteného roztoku chloridu sodného, oddelila, vysušila síranom sodným, prefiltrovala a skoncentrovala vo vákuu za vzniku 10,45 g (42,77 mmol) 2-[2-(metyltio)pyrimidin-4-yl]-fenyletanónu vo forme viskózneho červenohnedého oleja, ktorý sa státím menil na tuhú formu. $MH^+ = 244,9$.

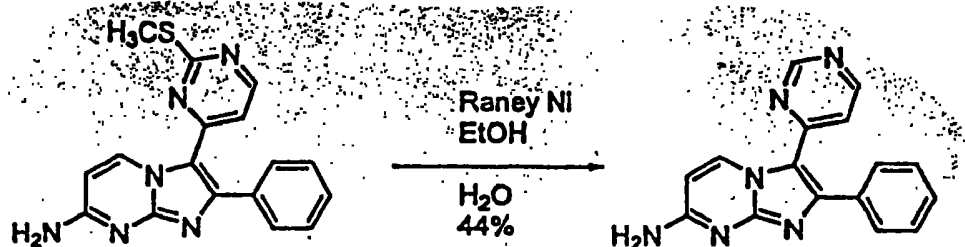


9 ml (44,91 mmol) 30% hydrogenbromidu v kyseline octovej sa pridalo k 10,45 g (42,77 mmol) ketónu v 80 ml ľadovej kyseliny octovej. Po kvapkách sa pridal roztok 2,40 ml (46,19 mmol) brómu v 2,60 ml ľadovej kyseliny octovej a reakčná zmes sa zohrievala pri teplote 60 °C 45 minút, ochladila na izbovú teplotu a zriedila éterom. Výsledný hrubý produkt sa prefiltroval a premyl éterom a vysušil vo vákuu za vzniku 18,06 g (44,69 mmol) hrubého bromidu. $MH^+ = 324,9$.



Zlúčenina 15

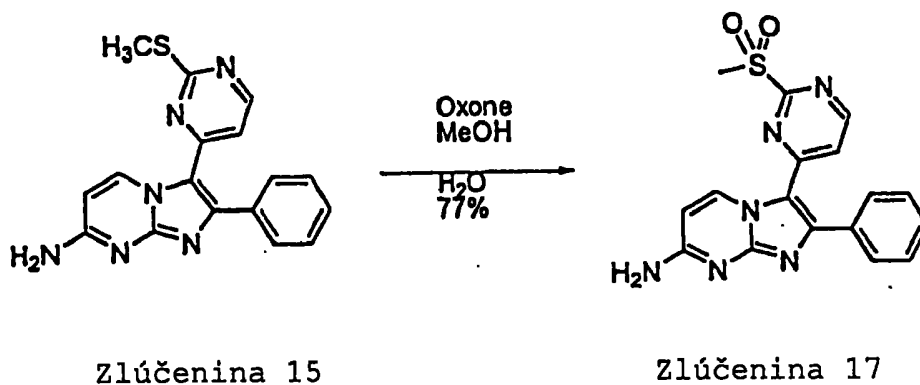
Roztok 18,33 g (171,08 mmol) 2,4-diaminopyrimidínu v 150 ml etanolu sa zohrial na teplotu 80 °C. Pridal sa roztok 18,06 g (42,77 mmol) hrubého bromidu v 350 ml etanolu po kvapkách pomocou lievika. Reakčná zmes sa miešala pod spätným chladičom 2 hodiny. Po ochladení na izbovú teplotu sa reakčná zmes prefiltrovala. Zrazenina sa rozmiešala v 150 ml 0,5M roztoku hydroxidu sodného. Zrazenina sa zhromaždila filtráciou, premyla vodou, éterom a hexánom za vzniku 6,72 g (21,1 mmol) produktu vo forme svetložltej tuhej látky. $MH^+ = 334,9$.



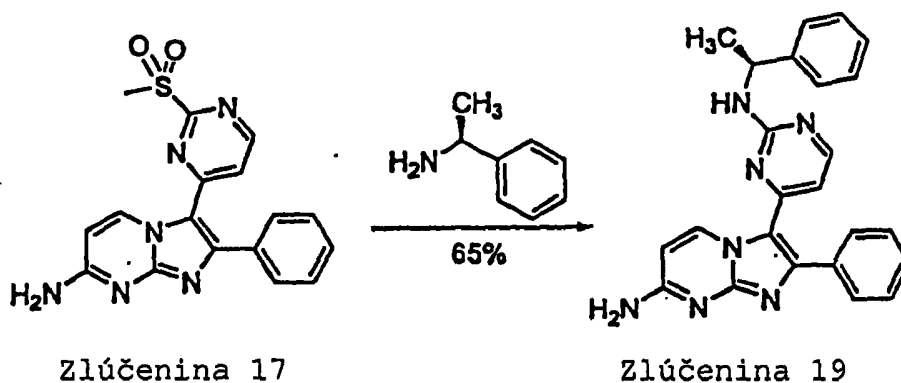
Zlúčenina 15

Zlúčenina 16

Zmes 0,60 g (1,79 mmol) tiometylpyrimidínu, približne 4 ml Raneyho niklu vo vodnom roztoku, 40 ml etanolu a 20 ml vody sa zahrievalo pod spätným chladičom pod dusíkovou atmosférou. Reakčná zmes sa ochladila na izbovú teplotu a prefiltrovala cez celit. Celit sa premyl etanolom. Skombinované filtráty sa skoncentrovali vo vákuu. Zvyšok sa pozbieral rozotrením s etanolom a filtráciou a premyl éterom za vzniku 0,2310 g pyrimidínu vo forme žltej tuhej látky (zlúčenina 16). $MH^+ = 289,0$.



Roztok 8,28 g (13,46 mmol) oxónu v 75 ml vody sa po kvapkách pomocou lievika pridal k 1,50 g (4,49 mmol) tiometylpyrimidínu v 77 ml metanolu. Výsledný hrubý produkt sa miešal pri izbovej teplote 18 hodín, prefiltroval a filtrát sa skoncentroval vo vákuu, aby sa odstránil metanol. Zvyšok sa zriedil 100 ml vody a neutralizoval bikarbonátom sodným v tuhej forme. Výsledný hrubý produkt sa prefiltroval a zrazenina sa premyla vodou a éterom a vysušila, čím sa získalo 1,27 g (3,46 mmol) metylsulfonylpyrimidínu vo forme žltej tuhej látky (zlúčenina 17). $MH^+ = 367,0$.



Zmes 0,55 g (1,5 mmol) metylsulfónpyrimidínu a 1,82 g (15 mmol) (S)-(-)- α -metylbenzénamínu sa zohrievala pri teplote 140 °C 30 minút, ochladila na izbovú teplotu, zriedila 100 ml etylacetátu a premyla 3 x 50 ml vody, 1 x 50 nasýteného roztoku chloridu sodného, vysušila pomocou síranu sodného, prefiltrovala a skoncentrovala vo vákuu, čo viedlo k získaniu žltého oleja. Pomocou kolónovej chromatografie použitím 100% etylacetátu ako eluentu sa získalo 0,3977 g (0,98 mmol) produktu vo forme svetložltej tuhej látky (zlúčenina 19). $\text{MH}^+ = 408,1$.

B. Testy

Príklad 4

Testy na inhibíciu p38

Biologické aktivity určitých zlúčenín, ktoré sú predmetom vynálezu, sa dokázali v testoch in vitro a in vivo. Ako sa diskutovalo vyššie, látky, ktoré inhibujú aktivitu enzýmu p38, inhibujú tvorbu zápalových cytokínov TNF- α a IL-1 β .

Vybrané zlúčeniny, ktoré sú predmetom vynálezu, sú uvedené v tabuľke 1, v ktorej sú poskytnuté údaje hmotnostnej spekrometrie ukazujúce schopnosť každej zo zlúčenín inhibovať p38, ako je ukázané na inhibícii tvorby TNF- α . Testy, z ktorých sú údaje získané, sú opísané nižšie.

Tabuľka 1

Zlúčeniny testované na svoju schopnosť inhibovať p38, ako sa ukazuje na inhibícii tvorby TNF- α

Zlúčenina č.	MS ci (M+1)	LPS/PBMC IC ₅₀ nM (TNF α)	% inhibície tvorby TNF- α 10 mg/kg u myši
1	306	49	100
2	306	55	100
3	356	333	26
4	340	21	100
5	288	55	100
6	411	6	42
7	356	35	99
8	461	4	19
9	476	0,5	97
10	353	37	68
11	403	27	38
12	353	10	51
13	357	278	85
14	372	8	63
15	335	28	23
16	289	304	73
17	367	3414	-
18	435	520	10
19	408	0,40	100
20	424	14	-
21	425	2	97
22	432	1	74
23	319	90	87
24	307	199	91
25	322	162	47

Test na celé bunky PBMC

Reprezentatívne zlúčeniny, ktoré sú predmetom vynálezu, sa testovali v teste in vitro na celé bunky použitím mononukleárnych buniek plnej krvi (PBMC), ktoré sa získali z ľudskej krvi nasledovným spôsobom. Čerstvo odobraná venózna krv sa antikoagulovala heparínom, zriedila rovnakým objemom fosfátového tlmivého roztoku (PBS) a umiestnila do sterilnej skúmavky alebo inej nádoby. Alikvóty (30 ml) tejto zmesi sa preniesli do centrifugačných skúmaviek, kde sa podvrstvlili tekutinou Ficoll-Hypaque (15 ml). Pripravené skúmavky sa centrifugovali pri 400 g bez brzdenia 30 minút pri izbovej teplote. Približne 1/2 až 2/3 vrstvy doštičiek nad pásikom mononukleárnych buniek sa odstránilo pipetou. Väčšina vrstvy mononukleárnych buniek sa opatrne odstránila pipetou a tieto PBMC sa zriedili PBS a stočili pri 600 g počas 15 minút. Výsledné PBMC sa zriedili ďalšou časťou PBS a stočili pri 400 g počas 10 minút pri izbovej teplote. Získané pelety sa zriedili kultivačným médiom s nízkym obsahom endotoxínu RPMI/1% FCS, takže koncentrácia buniek bola $0,5-2,0 \times 10^6$ PMBC/ml. Malý objem suspenzie sa odstránil na spočítanie na hemocytometri a zvyšný preparát sa centrifugoval pri 200 g 15 minút pri izbovej teplote. Získané PBMC v pelete sa resuspendovali v RPMI/1% FCS do koncentrácie $1,67 \times 10^6$ /ml.

Na uskutočnenie testu sa suspenzia PBMC (180 ul) preniesla do dubletových jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej platničky s plochým dnom a inkubovali 1 hodinu pri teplote 37 °C. Roztok testovanej zlúčeniny (10 ul, pripravenej v 20-násobku konečnej koncentrácie) sa pridal do každej jamky a platnička sa inkubovala 1 hodinu pri teplote 37 °C. Pridal sa roztok (10 ul) LPS v RPMI/1% FCS (200 ng/ml) a jamky sa cez noc inkubovali pri teplote 37 °C. Supernatant (100 ul) sa z

každej jamky odstránil a zriedil pomocou RPMI/1% FCS (400 ul). Vzorky sa analyzovali na TNF- α použitím komerčného kitu ELISA (Genzyme). Údaje sú uvedené v tabuľke 1 vyššie.

Test in vivo na hlodavcoch

Schopnosť zlúčenín definovaných vzorcom I inhibovať tvorbu TNF- α indukovanú LPS sa demonštrovala v nasledovných testoch in vivo na hlodavcoch. Myši (samice BALB/cJ, Jackson Laboratories) hladovali 30 minút pred perorálnou dávkou 5-10 ml/kg testovanej zlúčeniny 5-50 mg/kg. Tridsať minút po aplikácii sa zvieratám intraperitoneálne injikoval LPS v dávke 1 mg/kg a zvieratá sa vrátili do svojich kliebok na 1 hodinu. Zvieratá sa anestetizovali pomocou CO₂, exsangvinovali srdcovou punkciou a odobrala sa plná krv (0,1-0,7 ml). Krv sa nechala zraziť a sérum sa prenieslo do centrifugačnej skúmavky. Táto vzorka sa centrifugovala a sérum sa stiahlo, rozdelilo do alikvótov a zmrazilo na -80 °C. Vzorky sa testovali komerčným kitom ELISA na TNF- α (Endogen na myši TNF- α). Percento inhibície testovaných zlúčenín sa vypočítalo podľa nasledovného vzorca:

$$\% \text{ inhibície} = [1 - (\text{vzorka} - \text{pozadie}) / (\text{kontrola} - \text{pozadie})] \times 100.$$

Údaje sú uvedené v tabuľke 1 vyššie.

Test rekombinantného p38

Zlúčeniny, ktoré sú predmetom vynálezu, sa merali na svoju schopnosť inhibovať aktivitu p38 nasledovným testom in vitro. Roztok (38 ul) purifikovaného rekombinantného p38 (kde množstvo enzýmu sa určilo empiricky pri odvážení lineárneho rozmedzia testu a prijateľného pomeru signálu k šumu; 6xHis-p38 exprimovaný v *E. coli*), substrátu myelínového bázického proteínu (taktiež určeného empiricky) a tlmivého roztoku s

pH 7,5 (Hepes: 25 mM; MgCl₂: 10 mM; MnCl₂: 10 mM) sa pridal do 92 jamiek 96-jamkovej polypropylénovej platničky s guľatými dnami. Ostatné jamky sa použili na kontroly a na pozadie. Kontrola sa pripravila s enzýmom, substrátovým tlmivým roztokom a 21% DMSO a pozadie sa pripravilo so substrátovým tlmivým roztokom a 2% DMSO. Roztok (12 ul) testovanej zlúčeniny v DMSO (zlúčeniny sa zriedili na 125 uM v 10% DMSO/H₂O a analyzovali v 25 uM koncentrácii, kde finálna koncentrácia DMSO bola 2 %) sa pridal do testovacích jamiek. Roztok ATP/³³P-ATP (10 ul obsahujúcich 50 uM neoznačeného ATP a 1 uCi ³³P ATP) sa pridal do všetkých jamiek a skompletované platničky sa premiešali a inkubovali pri teplote 30 °C 30 minút. Do každej jamky sa pridala zmes 50% TCA/10 mM fosforečnanu sodného (60 ul) a platničky sa udržiavali na ľade 15 minút. Obsah z každej jamky sa preniesol do jamiek 96-jamkovej filtračnej platničky (Millipore, Multiscreen-DP) a filtračná platnička sa umiestnila na vákuový kolektor vybavený kolektorom odpadu. Jamky sa pod vákuom päťkrát premyli zmesou 50% TCA/10 mM fosforečnanu sodného (200 ul). Pridala sa scintilačná látka MicroScint-20, platničky sa utesnili použitím fólií Topseal-S a vyhodnotili na scintilačnom počítači Packard TopCount použitím ³³P tekutého programu s korekciou farebného potlačenia, kde výstup je v jednotkách cpm korigovaných na pootlačenie farby. Aj keď zlúčeniny sa úvodne testovali v koncentrácii 10 uM, zlúčeniny sa testovali, ak to bolo oprávnené, v štvornásobne vyššej a nižšej koncentrácii. Okrem toho boli pre niektoré zlúčeniny vypočítané hodnoty IC₅₀ použitím programu Delta-graph 4 upravujúceho krivku parametrov. Nie sú uvedené žiadne údaje.

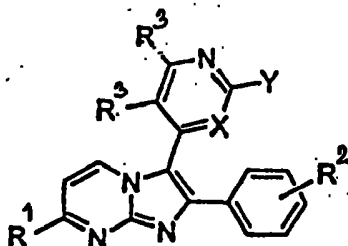
Test in vitro na IL-1β

Schopnosť zlúčenín, ktoré sú predmetom vynálezu, inhibovať tvorbu IL-1 β sa môže určiť nasledovným testom in vitro. K plastu adherujúce bunky sú pripravené z PBMC. Stručne povedané, PBMC sa pridávajú do jamiek 96-jamkovej platničky tak, ako je uvedené vyššie, inkubujú 1 hodinu pri teplote 37 °C a adherujúce bunky sa pripraví jemným resuspendovaním neadherujúcich buniek pipetorom, ich odstránením a znehodnotením a jemným premytím jamiek trikrát 200 μ l kultivačného média. Po finálnom premytí sa do jamiek pridá ďalšie kultivačné médium (180 μ l). Pridanie zlúčeniny, stimulácia pomocou LPS, inkubácia a stiahnutie supernatantu sú rovnaké ako pre TNF- α . Supernatanty sa analyzujú na interleukín 1 β použitím komerčného kitu ELISA (Genzyme). Nie sú uvedené žiadne údaje.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Tento vynález poskytuje zlúčeninu definovanú vzorcom

I



Vzorec I

alebo jej farmaceuticky prijateľné soli, kde

a) R¹ je vybraný zo súboru zahŕňajúceho NH₂, C₁-²₅-alkyl-amino, diC₁-₅-alkylamino, hydroxy, C₁-₅-alkoxy, fenylmetylamo, heterocyklylmetyl, C₁-₅-alkylkarbonylamino a substituovanú fenylkarbonylamínoskupinu, kde

uvedená skupina fenylmetylamo a heterocyklylmetyl môže byť substituovaná na svojej fenylovej časti jedným alebo viacerými členmi vybranými zo súboru zahŕňajúceho halogén, C₁-₅-alkyl, C₁-₅-alkoxy, arylC₁-₃-alkylamino, R'R''NCH=N- a OR''', kde R', R'' a R''' sú nezávisle vybrané zo súboru zahŕňajúceho H, C₁-₅-alkyl, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, α-alkylfenylmetyl, substituovaný α-alkylfenylmetyl, heterocyklylmetyl a substituovaný heterocyklylmetyl;

b) Y je vybraný zo súboru zahŕňajúceho H, halogén, heterocyklus, OR⁴, SR⁴, NR⁴ a NR⁴R⁵, kde

R^4 a R^5 sú nezávisle vybrané zo súboru zahŕňajúceho H, heterocyklyl, C_{3-5} -karbocyklofenyl, α -alkylfenyl- C_{1-5} -alkyl, nerozvetvený alebo rozvetvený alkyl voliteľne substituovaný pomocou R, NR, $N(R)_2$, C_{3-5} -karbocyklu, fenylu alebo substituovaného fenylu, kde (i) R je H, halogén, C_{1-5} -alkyl, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, SO_2Ph , pyridyl alebo pyridylmetyl a (ii) uvedený fenyl, heterocyklyl a α -alkylfenyl- C_{1-5} -alkyl môžu byť substituované jedným alebo viacerými členmi vybranými zo súboru zahŕňajúceho halogén, C_{1-5} -alkyl, C_{1-5} -alkoxy, aryl, C_{1-3} -alkylamino, fenylmetyl, substituovaný fenylmetyl, $R'R''NCH=N-$ a OR''' , ako je tu definované v (a);

- c) R^2 je jeden z piatich členov nezávisle vybraných zo súboru zahŕňajúceho halogén, trifluórmetyl, $-NCH_2PH$, C_{1-5} -alkyl a C_{1-5} -alkoxy;
- d) R^3 je H alebo tvorí dohromady aromatický kruh; a
- e) X je N alebo CH.

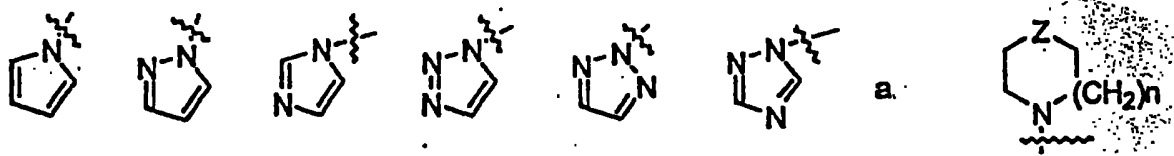
2. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde X je CH.

3. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde R^1 je NH_2 .

4. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde Y je NR^4 a R^4 je fenylmetyl.

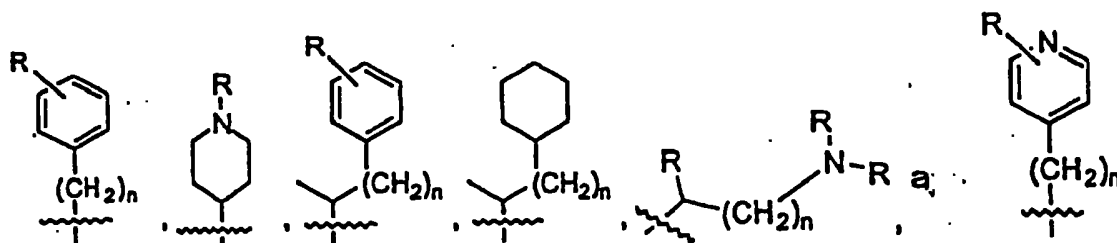
5. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde R^2 je člen vybraný zo súboru zahŕňajúceho halogén, trifluórmetyl, $-NCH_2PH$ a C_{1-5} -alkoxy.

6. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde Y je vybraný zo súboru zahŕňajúceho



kde Z je $-CH_2-$, $-O_2S-$, $-O-$, $-A(R)-$, $-OS-$ alebo S; R je H, halogén, C_{1-5} -alkyl, fenymetyl, substituovaný fenylmetyl, SO_2Ph , pyridyl alebo pyridylmetyl a n je 0-5.

7. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, kde R^4 je vybraný zo súboru zahŕňajúceho



kde každý R môže byť rovnaký alebo odlišný a je nezávisle vybraný zo súboru zahŕňajúceho H, halogén, C_{1-5} -alkyl, fenymetyl, substituovaný fenylmetyl, SO_2Ph , pyridyl a pyridylmetyl a n je 0-5.

8. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(3-chlór-4-fluórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

9. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-fenyl-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

10. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(4-fluórfenyl)-3-(2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl)-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

11. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je

3-(4-pyridinyl)-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

12. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-[(fenylmetyl)amino]-4-pyridinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

13. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(4-fluórfenyl)-3-(4-chinolinyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

14. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(3-chlórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo-[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

15. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(4-fluórfenyl)-3-[2-(metyltio)-4-pyrimidinyl]imidazo-[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

16. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-metyltio)-4-pyrimidinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

17. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(3-fluórfenyl)-3-[2-(metyltio)-4-pyrimidinyl]imidazo-[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

18. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-(4-pyrimidinyl)-2-[3-(trifluórmetyl)fenyl]imidazo-[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

19. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-(metyltio)-4-pyrimidinyl]-2-fenylimidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

20. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-fenyl-3-(4-pyrimidinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

21. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-(metylsulfonyl)-4-pyrimidinyl]-2-fenylimidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

22. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-(metylsulfonyl)-4-pyrimidinyl]-2-[3-(trifluórmetyl)-fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

23. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-fenyl-3-[2-[[(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

24. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[[[(4-metoxyfenyl)metyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-fenylimidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

25. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-(2-metoxy-4-pyrimidinyl)-2-fenylimidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

26. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(4-fluórfenyl)-3-(4-pyrimidinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

27. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(3-fluórfenyl)-3-(4-pyrimidinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

28. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je

2-(4-fluórfenyl)-3-(4-pyridinyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

29. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-[[(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-[3-(tri-fluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

30. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-fenyl-3-[2-(1-piperidinyl)-4-pyrimidinyl]imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

31. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-[2-[[(1S)-1-cyklohexyletyl]amino]-4-pyrimidinyl]-2-(4-fluórfenyl)imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

32. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 2-(4-fluórfenyl)-3-[3-[[(1S)-1-fenyletyl]amino]-4-pyridinyl]-imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

33. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-(2-bróm-4-pyridinyl)-2-(4-fluórfenyl)imidazo[1,2-a]-pyrimidín-7-amín.

34. Zlúčenina podľa patentového nároku 1, ktorou je 3-(2-bróm-4-pyridinyl)-2-[3-trifluórmetyl)fenyl]imidazo[1,2-a]pyrimidín-7-amín.

35. Farmaceutický preparát obsahujúci zlúčeninu podľa patentového nároku 1 a farmaceuticky prijateľný nosič.

36. Spôsob liečby jedinca trpiaceho stavom, ktorého zmiernenie je sprostredkované zápalovými cytokínmi, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob

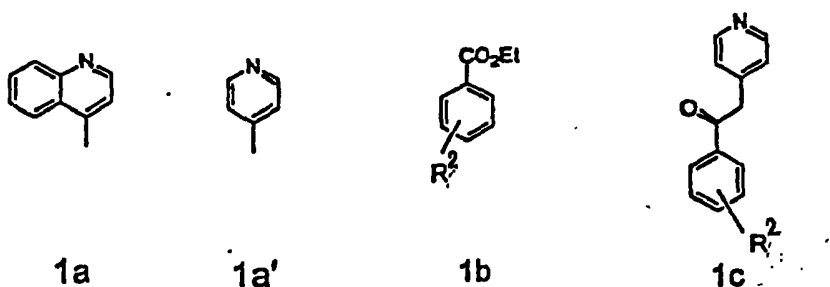
zahŕňa podanie terapeuticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi.

37. Spôsob inhibície vzplanutia stavu jedinca, ktorého zmiernenie je sprostredkované znížením zápalových cytokínov, ktorých účinky sa podieľajú na tomto stave, pričom tento spôsob zahŕňa podanie profylakticky účinnej dávky predkladaného farmaceutického preparátu jedincovi.

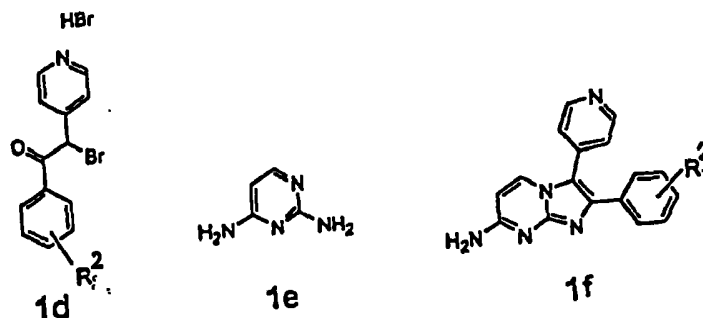
38. Spôsob podľa patentových nárokov 36 alebo 37, kde stav je vybraný zo súboru zahŕňajúceho reumatickú artritídu, nešpecifické zápaly čreva, septický šok, osteoporózu, osteoartrózu, neuropatickú bolesť, replikáciu HIV, HIV demenciu, vírusovú myokarditídu, inzulín-dependentný diabetes, non-inzulín-dependentný diabetes, periodontálne ochorenie, restenózu, alopecia areata, depléciu T-lymfocytov pri infekcii HIV alebo AIDS, psoriázu, akútnu pankreatitídu, rejekciu alotransplantátu, alergický zápal pľúc, aterosklerózu, roztrúsenú sklerózu, kachexiu, Alzheimerovu chorobu, mozgovú príhodu, Crohnovu chorobu, ischemiu, zlyhanie srdca spôsobujúce upchatie, pľúcnu fibrózu, hepatitídu, glioblastóm, Guillainov-Barrov syndróm a systémový lupus erythematosus.

39. Spôsob podľa patentového nároku 38, kde stavom je reumatická artritída.

40. Postup prípravy zlúčeniny podľa patentového nároku 1, kde R^1 je NH_2 , X je CH a R^5 a Y sú H, pričom tento postup zahŕňa:

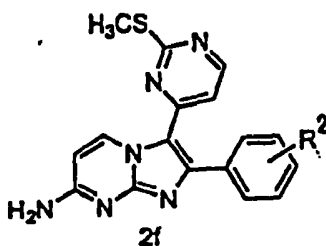


- a) reakciu zlúčeniny 1a alebo 1a' so zlúčeninou 1b v prítomnosti NaHMDS a THF za vzniku zlúčeniny 1c;
 b) konverziu zlúčeniny 1c na zlúčeninu 1d v prítomnosti 30% HBr/AcOH, Br₂ a AcOH; a



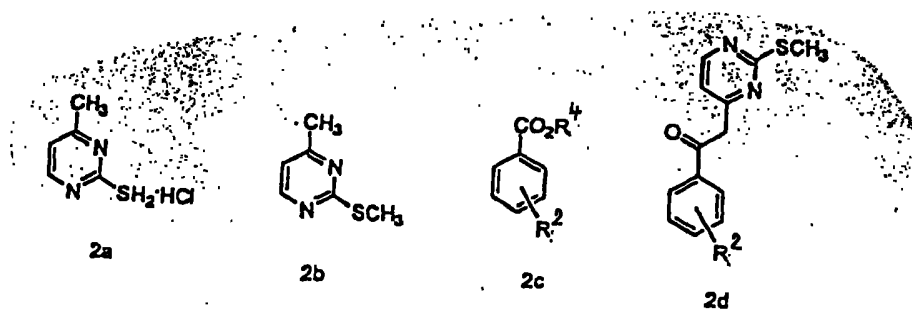
- c) reakciu zlúčeniny 1d so zlúčeninou 1e v prítomnosti EtOH za vzniku zlúčeniny 1f.

41. Postup prípravy zlúčeniny podľa patentového nároku 1 majúcej štruktúru 2f

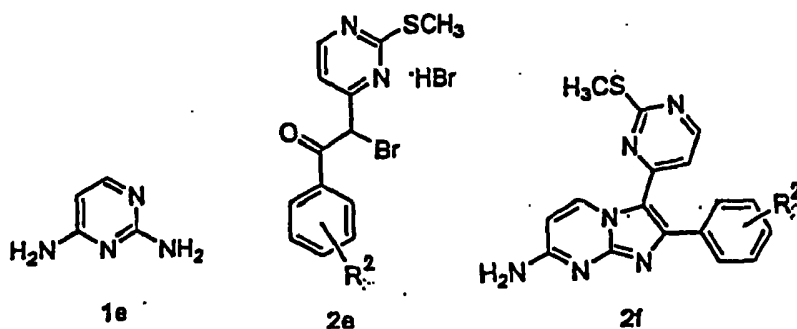


pričom tento postup zahŕňa:

- a) konverziu zlúčeniny 2a v prítomnosti NaOH a CH₃I za vzniku zlúčeniny 2b;

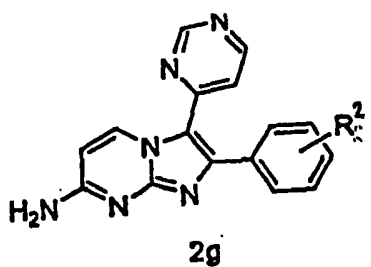


- b) reakciu zlúčeniny 2b so zlúčeninou 2c v prítomnosti NaHMDS a THF za vzniku zlúčeniny 2d;
 c) konverziu zlúčeniny 2d v prítomnosti Hbr, Br₂ a AcOH za vzniku zlúčeniny 2e; a

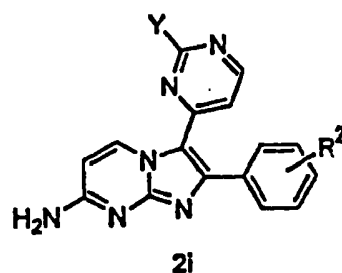
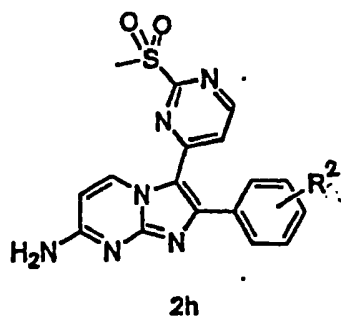


- c) reakciu zlúčeniny 2e so zlúčeninou 1e v prítomnosti EtOH za vzniku zlúčeniny 2f.

42. Postup podľa patentového nároku 41, ktorý ďalej zahŕňa premenu zlúčeniny 2f v prítomnosti Raneyho niklu a EtOH na zlúčeninu 2g.



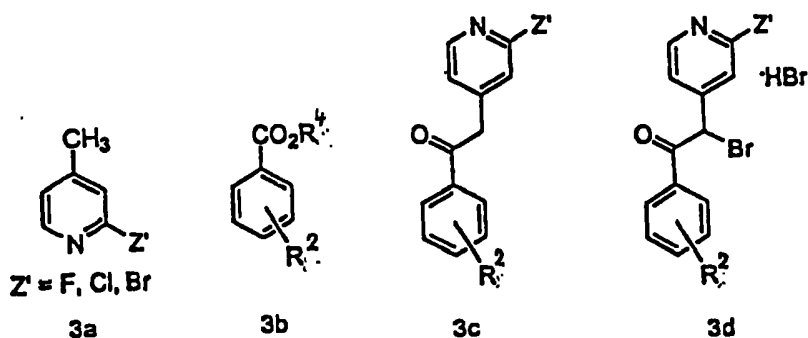
43. Postup podľa patentového nároku 41, ktorý ďalej zahŕňa:
 a) konverziu zlúčeniny 2f na zlúčeninu 2h v prítomnosti oxónu a MeOH; a



c) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 2h so zlúčeninou Y, kde Y je halogén, heterocyklus, OR^4 , SR^4 , NR^4 alebo NR^4R^5 , za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom 2i.

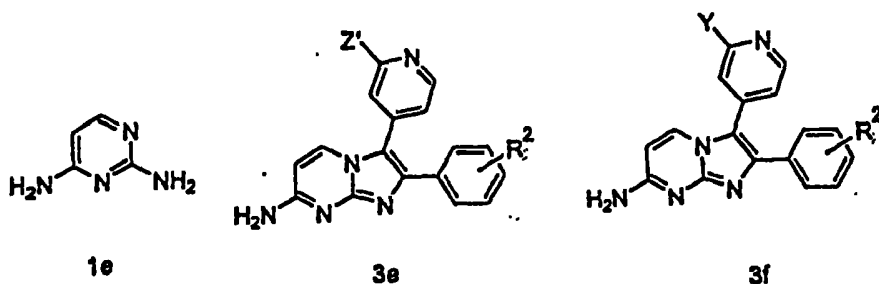
44. Postup prípravy zlúčeniny podľa patentového nároku 1, kde X je H a Y je halogén, heterocyklus, OR^4 , SR^4 , NR^4 alebo NR^4R^5 , pričom tento postup zahŕňa:

a) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 3a so zlúčeninou definovanou vzorcom 3b za vzniku zlúčeniny 3c v prítomnosti NaHMDS a THF;



b) konverziu zlúčeniny ddefinovanej vzorcom 3c so zlúčeninou definovanou vzorcom 3d v prítomnosti Hbr, Br_2 a AcOH;

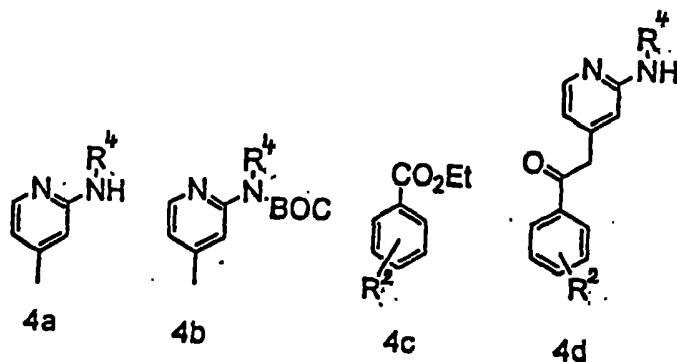
c) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 3d so zlúčeninou 1e za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom 3e v prítomnosti EtOH; a



d) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 3e s Y za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom 3f.

45. Postup prípravy zlúčeniny podľa patentového nároku 1, kde X je CH a Y je NR^4 , pričom tento postup zahŕňa:

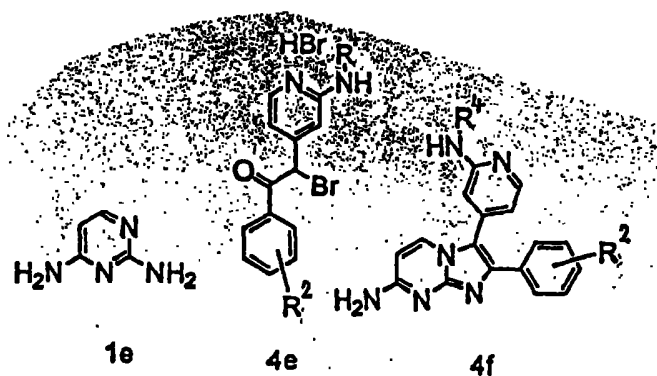
a) konverziu zlúčeniny definovanej vzorcom 4a v prítomnosti $(\text{BOC})_2\text{O}$ a tBuOH na zlúčeninu definovanú vzorcom 4b;



b) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 4b so zlúčeninou definovanou vzorcom 4c v prítomnosti NaHMDS a HCl za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom 4d;

c) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 4d v prítomnosti 30% HBr/AcOH , Br_2 a AcOH na zlúčeninu definovanú vzorcom 4e;

a



d) reakciu zlúčeniny definovanej vzorcom 4e so zlúčeninou 1e v prítomnosti EtOH za vzniku zlúčeniny definovanej vzorcom 4f.