



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator
dokumenta:

HR P20040801 A2

HR P20040801 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: C 07 D 211/58
C 07 D 401/04
C 07 D 207/14
C 07 D 403/04
A 61 K 31/4545
A 61 P 35/00

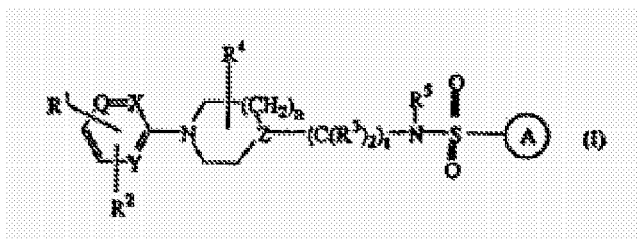
(21) Broj prijave u HR: P20040801A
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 03.09.2004.
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.04.2005.
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP03/02517
Datum podnošenja međunarodne prijave 11.03.2003.
(87) Broj međunarodne objave: WO 03/076401
Datum međunarodne objave 18.09.2003.

(31) Broj prve prijave: 60/363,799 (32) Datum podnošenja prve prijave: 13.03.2002. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US
PCT/EP02/14481 18.12.2002. EP

(71) Podnositelj prijave:
(72) Izumitelji:

Janssen Pharmaceutica N.V., Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
Kristof Van Emelen, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
Leo, Jacobus, Jozef Backx, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
Sven, Franciscus, Anna Van Brandt, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
Patrick, Rene Angibaud, 1, rue Camille Desmoulins, TSA 91003, 92787
Issy-les-Moulineaux Cedex 9, FR
Isabelle, Noelle, Constance Pilatte, 1, rue Camille Desmoulins, TSA
91003, 92787 Issy-les-Moulineaux Cedex 9, FR
Marc, Gustaaf, Celine Verdonck, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
Hans, Louis, Jos De Winter, Turnhoutseweg 30, 2340 Beerse, BE
(74) Punomoćnik: CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: SULFONILAMINO DERIVATI KAO NOVI INHIBITORI HISTON DEACETILAZE
(57) Sažetak:



Ovaj izum obuhvaća nove spojeve formule (I) u kojoj n, m, t, R¹, R², R³, R⁴, L, Q, X, Y, Z imaju definirana značenja, s djelovanjem inhibiranja enzima histon deacetilaze; njihovo pripravljanje, pripravke koji ih sadrže i njihovu uporabu kao lijeka.

HR P20040801 A2

OPIS IZUMA

Ovaj izum razmatra spojeve koji djeluju kao inhibitori enzima histon deacetilaze (HDAC). Dalje se odnosi na procese njihova pripravljanja, na pripravke koji ih sadrže, kao i na njihovu uporabu, i *in vitro* i *in vivo*, za inhibiranje HDAC i kao lijeka, primjerice kao lijeka za inhibiranje proliferacijskih stanja, kao što je karcinom i psorijaza.

U svim eukaritoskim stanicama, genomska DNA u kromatinu udružuje se s histonima i oblikuje nukleosome. Svaki nukleosom sastoji se od proteinskog oktamera načinjenog od dvije kopije svakog histona H2A, H2B, H3 i H4. DNA se obavija oko te proteinske jezgre, a bazične aminokiseline histona djeluju s negativno nabijenim fosfatnim skupinama DNA. Najuočividnija posttranslacijska modifikacija tih histona iz jezgre je reverzibilno acetiliranje ϵ -amino skupina zatvorenih, visoko bazičnih N-terminalnih lizinskih skupina. Stabilno stanje acetiliranja histona uspostavljeno je dinamičkom ravnotežom između međusobno konkurirajuće histon acetiltransferaze(a) i histon deacetilaze(a) koja je ovdje označena kao "HDAC". Acetiliranje i deacetiliranje histona dugo je povezivano s kontrolom transkripcije. Današnje kloniranje gena koji kodiraju različite histon acetiltransferaze i histon deacetilaze dalo je moguće obješnjenje odnosa između acetiliranja histona i kontrole transkripcije. Reverzibilno acetiliranje histona može rezultirati ponovnim modeliranjem kromatina i kao takvo djelovati kao kontrolni mehanizam transkripcije gena. Općenito, hiperacetiliranje histona omogućava ekspresiju gena, dok je deacetiliranje histona povezano s potiskivanjem transkripcije. Histone acetiltransferaze pokazale su se da djeluju kao koaktivatori transkripcije, dok je za histon deacetilaze pronađeno da potiskuju transkripciju.

Dinamička ravnoteža između acetiliranja i deacetiliranja histona je bitna za normalan rast stanice. Inhibicija histon deacetilaze rezultira sprječavanjem staničnog ciklusa, stanične diferencijacije, apoptozom i vraćanjem transformiranog fenotipa u prvobitno stanje. Prema tome inhibitori HDAC imaju veliki terapijski potencijal u liječenju staničnih proliferacijskih bolesti ili stanja (Marks et al., Nature Reviews, Cancer 1: 194-202, 2001).

Proučavanje inhibitora histon deacetilaza (HDAC) ukazuje da ti enzimi zaista imaju važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica. Inhibitor Trihostatin A (TSA) uzrokuje prekid staničnog ciklusa i u fazi G1 i G2, vraća transformirani fenotip različitih staničnih linija u prvobitno stanje, i započinje diferencijaciju stanica Friendove leukemije i ostalih. Za TSA (i suberoilanolid hidroksaminska kiselina SAHA) objavljeno je da inhibiraju rast stanice, induciraju terminalnu diferencijaciju, i sprječavaju nastanak tumora u miševa (Finnin et al., Nature, 401: 188-193, 1999).

Za Trihostatin A također je objavljeno da je koristan u liječenju, npr. fibroze jetre i ciroza jetre. (Geerts et al., Europska patentna prijava EP 0 827 742, objavljena 11. ožujka, 1998).

Patentna prijava WO01/38322 objavljena 31. svibnja, 2001. medu ostalim iznosi inhibitore histon deacetilaze opće formule Cy-Z, dajući pripravke i postupke liječenja staničnih proliferacijskih bolesti i stanja.

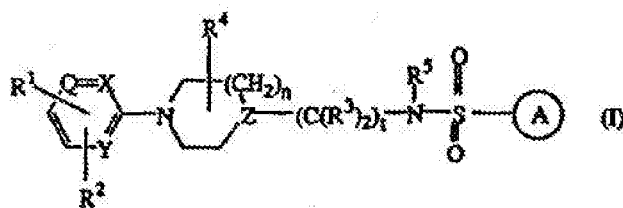
Patentna prijava WO01/70675 objavljena 27. rujna, 2001. iznosi inhibitore histon deacetilaze formule $\text{Cy-S(O)}_2\text{-NH-Y}^3\text{-W}$ i i dalje daje pripravke i postupke liječenja staničnih proliferacijskih bolesti i stanja.

Problem kojeg treba riješiti je pribaviti inhibitore histon deacetilaze s jakom enzimatskom aktivnošću i koji također imaju povoljna svojstva kao što je stanična aktivnost i povećana biodostupnost, poželjno oralna biodostupnost, i imaju malo ili nemaju nuspojava.

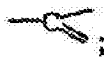
Novi spojevi iz predloženog izuma rješavaju gore opisan problem. Spojevi se razlikuju od prethodnih saznanja u struci u strukturi.

Spojevi iz predloženog izuma imaju izvrsnu aktivnost *in-vitro* kao inhibitori enzima histon deacetilaze. Predloženi spojevi imaju povoljna svojstva s obzirom na staničnu aktivnost i specifična svojstva s obzirom na inhibiciju napredovanja staničnog ciklusa i na G1 i G2 kontrolnim točkama (p21 induksijski kapacitet). Spojevi iz predloženog izuma pokazuju dobru metaboličku stabilnost i visoku biodostupnost, a posebno pokazuju oralnu biodostupnost. Povrh toga, spojevi iz predloženog izuma imaju mali afinitet prema P450 enzimima, što smanjuje rizik od štetnog međudjelovanja lijek-lijek omogućujući također veći sigurnosni prostor.

Ovaj izum razmatra spojeve formule (I)



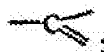
njihove N-oksidsne oblike, farmaceutski prihvatljive adicijske soli i stereokemijski izomerne oblike, u kojima
 n je 0, 1, 2 ili 3 i kada je n jednak 0 tada to znači direktnu vezu;
 t je 0, 1, 2, 3 ili 4 i kada je t jednak 0 tada to znači direktnu vezu;
 5 svaki Q je dušik ili



svaki X je dušik ili



svaki Y je dušik ili



10 svaki Z je dušik ili



R¹ je -C(O)NR⁸R⁹, -N(H)C(O)R¹⁰, -C(O)-C₁₋₆alkandil SR¹⁰,
 -NR¹¹C(O)C₁₋₆alkandilSR¹⁰, -NR¹¹C(O)ON(OH) R¹⁰ ili druga Zn-helirajuća-skupina
 15 u kojoj R⁸ i R⁹ je svaki nezavisno izabran između vodika, hidroksil C₁₋₆alkila, hidroksiC₁₋₆alkila, aminoC₁₋₆alkila ili aminoarila;

R¹⁰ je nezavisno izabran između vodika, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkilkarbonila, arilC₁₋₆alkila, C₁₋₆alkilpirazinila, piridinona, pirolidinona ili metilimidazolila;

R¹¹ je nezavisno izabran između vodika ili C₁₋₆alkila;

R² je vodik, halo, hidroksi, amino, nitro, C₁₋₆alkil, C₁₋₆alkiloksi, trifluormetil, di (C₁₋₆alkil) amino, hidroksiaamino ili naftalenilsulfonilpirazinil;

svaki R³ nezavisno predstavlja vodikov atom i jedan vodikov atom može biti zamijenjen supstituentom izabranim između arila;

R⁴ je vodik, hidroksi, amino, hidroksiC₁₋₆alkil, C₁₋₆alkil, C₁₋₆alkiloksi, arilC₁₋₆alkil, aminokarbonil, hidroksikarbonil, aminoC₁₋₆alkil, aminokarbonilC₁₋₆alkil, hidroksikarbonilC₁₋₆alkil, hidroksiaminokarbonil, C₁₋₆alkiloksikarbonil, C₁₋₆alkilaminoC₁₋₆alkil ili di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil;

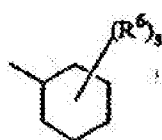
R⁵ je vodik, C₁₋₆alkil, C₃₋₁₀cikloalkil, hidroksiC₁₋₆alkil, C₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkil, di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil ili aril;



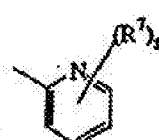
je radikal izabran između



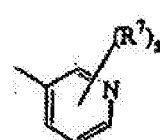
(a-1)



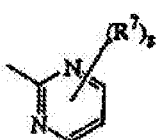
(a-2)



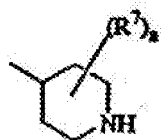
(a-3)



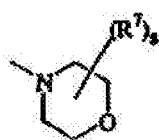
(a-4)



(a-5)



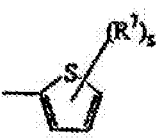
(a-6)



(a-7)



(a-8)



(a-9)



(a-10)



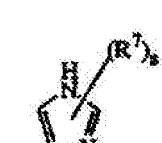
(a-11)



(a-12)



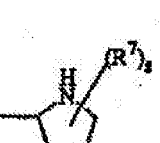
(a-13)



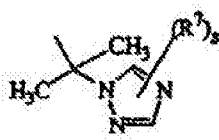
(a-14)



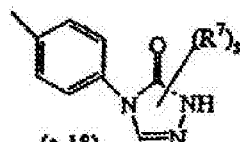
(a-15)



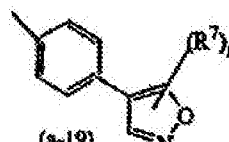
(a-16)



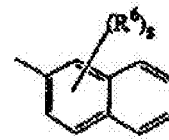
(a-17)



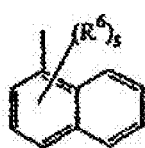
(a-18)



(a-19)



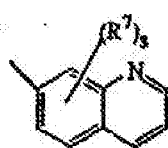
(a-20)



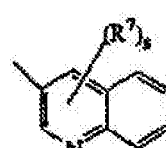
(a-21)



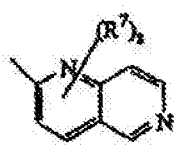
(a-22)



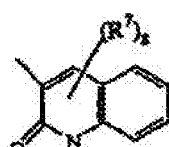
(a-23)



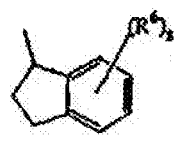
(a-24)



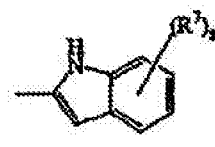
(a-25)



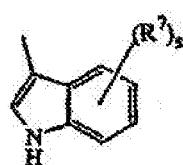
(a-26)



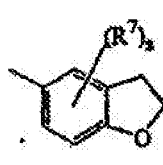
(a-27)



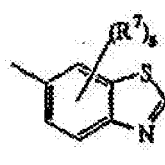
(a-28)



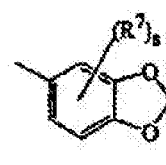
(a-29)



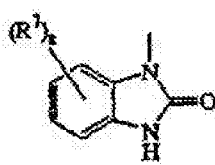
(a-30)



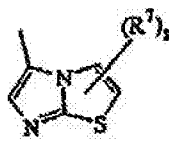
(a-31)



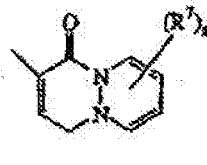
(a-32)



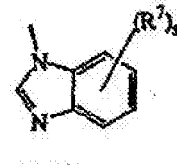
(a-33)



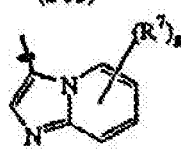
(a-34)



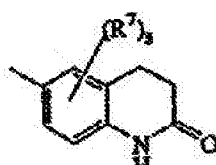
(a-35)



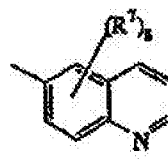
(a-36)



(a-37)



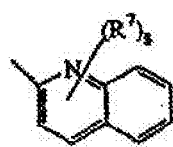
(a-38)



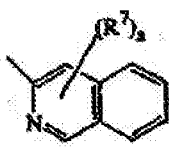
(a-39)



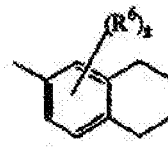
(a-40)



(a-41)



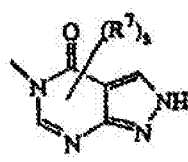
(a-42)



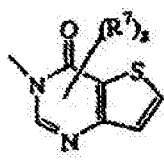
(a-43)



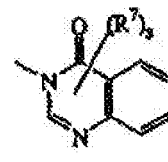
(a-44)



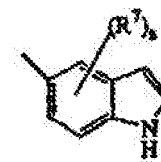
(a-45)



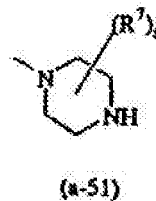
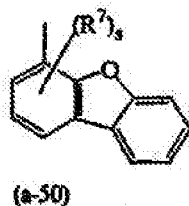
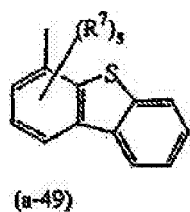
(a-46)



(a-47)



(a-48)



pri čemu je svaki s nezavisno 0, 1, 2, 3, 4 ili 5;

svaki R^6 i R^7 su nezavisno izabrani između vodika; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkila; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkila supstituiranog s arilom i C_{3-10} cikloalkilom; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkilkarboni
 5 1 a; C_{1-6} alkiloksikarbonila; C_{1-6} alkilsulfonila; cijano C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi; hidroksi C_{1-6} alkilamino; amino C_{1-6} alkiloksi; di (C_{1-6} alkil) aminokarbonila; di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino; (aril) (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkiloksi; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino; di(C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila;
 10 arilsulfonila; arilsulfonilamino; ariloksi; ariloksi C_{1-6} alkila; aril C_{1-6} alkendiila; di (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) amino (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino;
 15 aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; cijano; tiofenila; tiofenila supstituiranog s di(C_{1-6} alkil)amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom, hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom,
 20 hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom, di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkilom, C_{1-6} alkiloksipiperidinilom, C_{1-6} alkiloksipiperidinil C_{1-6} alkilom, morfolinil C_{1-6} alkilom, hidroksi C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, ili di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom; furanila; furanila supstituiranog s hidroksi C_{1-6} alkilom; benzofuranila; imidazolila; oksazolila; oksazolila supstituiranog s arilom i C_{1-6} alkilom; C_{1-6} alkiltriazolila; tetrazolila; pirolidinila; pirolila; piperidinil C_{1-6} alkiloksi; morfolinila; C_{1-6} alkilmorfolinila;
 25 morfolinil C_{1-6} alkiloksi; morfolinil C_{1-6} alkila; morfolinil C_{1-6} alkilamino; morfolinil C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; piperazinila; C_{1-6} alkilpiperazinila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkiloksi; piperazinil C_{1-6} alkila; naftalenilsulfonilpiperazinila; naftalenilsulfonil piperidinila; naftalenilsulfonila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilamino; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila;
 30 C_{1-6} alkilpiperazinilsulfonila; aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkiloksi; aminosulfonilpiperazinila; aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinila; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkiloksipiperidinila; C_{1-6} alkiloksipiperidinil C_{1-6} alkila; piperidinilamino C_{1-6} alkilamino; piperidinilamino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; (C_{1-6} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino; (C_{1-6} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-6} alkil) arino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; (hidroksi C_{1-6} alkil) (C_{1-6} alkil) amino; (hidroksi C_{1-6} alkil) (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkil; di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; pirolidinil C_{1-6} alkila; pirolidinil C_{1-6} alkiloksi; pirazolila; tiopirazolila; pirazolila supstituiranog s dva supstituenta izabrana između C_{1-6} alkila ili trihalo C_{1-6} alkila; piridinila; piridinila supstituiranog s C_{1-6} alkiloksi, ariloksi ili arilom; pirimidinila; tetrahidropirimidinilpiperazinila;

tetrahidropirimidinilpiperazinil C_{1-6} alkila; kinolinila; indola; fenila; fenila supstituiranog s jednim, dva ili tri supstituenta nezavisno izabrana između halo, amino, nitro, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, trifluometila, trifluometiloksi, hidroksi C_{1-4} alkiloksi, C_{1-4} alkilsulfonila, C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkiloksi, C_{1-4} alkiloksikarbonila, amino C_{1-4} alkiloksi, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkiloksi, di (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) aminokarbonila, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil), di (C_{1-4} alkil) amino (C_{1-4} alkil) amino, di(C_{1-4} alkil) amino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkil (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkil (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino, aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, cijano, piperidinil C_{1-4} alkiloksi, pirolidinil C_{1-4} alkiloksi, aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinil C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilpiperazinila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-4} alkila, hidroksi C_{1-4} alkilpiperazinila, hidroksi C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkiloksipiperidinila, C_{1-4} alkiloksipiperidinil C_{1-4} alkila, hidroksi C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkilpiperazinila, hidroksi C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkila, (hidroksi C_{1-4} alkil) (C_{1-4} alkil) amino, (hidroksi C_{1-4} alkil) (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (hidroksi C_{1-4} alkil) amino, di (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, furanila supstituiranog s -CH=CH=CH-, pirolidinil C_{1-4} alkilom, pirolidinil C_{1-4} alkiloksi, morfolinilom, morfolinil C_{1-4} alkiloksi, morfolinil C_{1-4} alkilom, morfolinil C_{1-4} alkilamino, morfolinil C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, piperazinilom, C_{1-4} alkilpiperazinilom, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkiloksi, piperazinil C_{1-4} alkilom, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkiloin, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkilamino, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkilamino C_{1-6} alkilom, tetrahidropirimidinilpiperazinilom, tetrahidropirimidinilpiperazinil C_{1-4} alkilom, piperidinilamino C_{1-4} alkilamino, piperidinilamino C_{1-4} alkilaitino C_{1-4} alkilom, (C_{1-4} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkilainino, (C_{1-4} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, piridinil C_{1-4} alkiloksi,

hidroksiC₁₋₄alkilamino, hidroksiC₁₋₄alkilaminoC₁₋₄alkilom, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkilamino, aminotiadiazolilom, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkiloksi, ili tiofenilC₁₋₄alkilamino;

svaki R⁶ i R⁷ može se postaviti na dušik kao zamjena vodika;

aril iznad je fenil, ili fenil supstituiran s jednim ili više supstituenata od kojih je svaki nezavisno izabran između halo, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkiloksi, trifluormetil, cijano ili hidroksikarbonila.

Pojam "histon deacetilazni inhibitor" ili "inhibitor histon deacetilaze" korišten je za identifikaciju spoja koji je sposoban reagirati s histon deacetilazom i inhibirati njezino djelovanje, posebno njezino enzimatsko djelovanje. Inhibiranje histon deacetilaznog enzimatskog djelovanja znači redukciju sposobnosti histon deacetilaze da ukloni acetilnu skupinu s histona. Poželjno je da takva inhibicija bude specifična, tj. inhibitor histon deacetilaze reducira sposobnost histon deacetilaze da ukloni acetilnu skupinu s histona pri koncentraciji koja je niža nego koncentracija inhibitore koji je potreban da bi se proizveo neki drugi, nevezani biološki učinak.

Kako se rabi u prethodnim definicijama i dalje, halo znači fluoro, kloro, bromo i jodo; C₁₋₄alkil definira zasićene ugljikovodične radikale ravnog ili razgranatog lanca koji imaju od 1 do 4 ugljikova atoma kao što je, npr. metil, etil, propil, butil, 1-metiletil, 2-metilpropil i slično; C₁₋₆alkil uključuje C₁₋₄alkil i njegove više homologe koji imaju od 5 do 6 ugljikovih atoma kao što je, primjerice, pentil, 2-metil-butil, heksil, 2-metilpentil i slično; C₁₋₆alkandiil definira dvovalentne zasićene ugljikovodične radikale ravnog ili razgranatog lanca koji imaju od 1 do 6 ugljikovih atoma kao što je, na primjer, metilen, 1,2-ctandiil, 1,3-propandiil, 1,4-butandiil, 1,5-pentandiil, 1,6-heksandiil i njihovi razgranati izomeri kao što je, 2-metilpentandiil, 3-metilpentandiil, 2,2-dimetilbutandiil, 2,3-dimetilbutandiil i slično; trihaloC₁₋₆alkil definira C₁₋₆alkil koji sadrži tri identična ili različita halo supstituenta, primjerice, trifluormetil; C₂₋₆alkendiil definira dvovalentne ugljikovodične radikale ravnog ili razgranatog lanca koji imaju jednu dvostruku vezu i 2 do 6 ugljikovih atoma kao što je, primjerice, etendiil, 2-propendiil, 3-butendiil, 2-pentendiil, 3-pentendiil, 3-metil-2-butendiil, i slično; aril definira fenil, i fenil supstituiran s jednim ili više supstituenata od kojih je svaki nezavisno izabran između halo, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkiloksi ili trifluormetila, cijano, hidroksikarbonila; aminoaril definira aril supstituiran s amino; C₃₋₁₀cikloalkil uključuje cikličke ugljikovodične skupine koje imaju od 3 do 10 ugljika, kao što je ciklopropil, ciklobutil, ciklopentil, ciklopentenil, cikloheksil, cikloheksenil, cikloheptil, ciklooktil i slično.

Pojam "druga Zn-helirajuća skupina" odnosi se na skupinu koja može reagirati s Zn-ionom, koji može biti prisutan na mjestu vezanja enzima.

Farmaceutski prihvatljive adicijske soli obuhvaćaju farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli i farmaceutski prihvatljive bazične adicijske soli. Farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli kako je prethodno spomenuto obuhvaćaju terapijski aktivne netoksične oblike kiselinskih adicijskih soli koje spojevi formule (I) mogu oblikovati. Spojevi formule (I) koji imaju bazična svojstva mogu se pretvoriti u njihove farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli obradom spomenutog bazičnog oblika s odgovarajućom kiselinom. Odgovarajuće kiseline uključuju, primjerice, anorganske kiseline kao što su halovodične kiseline, npr. klorovodična ili bromovodična kiselina; sulfatna; nitratna; fosfatna i slične kiseline; ili organske kiseline kao što su, na primjer, octena, trifluorocetna, propan, hidroksioctena, mliječna, piruvinska, oksalna, malonska, jantarna (tj. butandikiselina), malcinska, fumarna, jabučna, vinska, limunska, metansulfonska, etansulfonska, benzensulfonska, p-toluensulfonska, ciklamska, salicilna, p-amino-salicilna, pamoinjska i slične kiseline. Spojevi formule (I) koji imaju kiselinska svojstva mogu se pretvoriti u njihove farmaceutski prihvatljive bazične adicijske soli obradom spomenutog kiselinskog oblika s odgovarajućom organskom ili anorganskom bazom. Odgovarajući bazični oblici soli obuhvaćaju, na primjer, amonijeve soli, soli alkalijskih i zemnoalkalijskih metala, npr. litijeve, natrijeve, kalijeve, magnezijeve, kalcijeve soli i slično, soli s organskim bazama, npr. benzatinske, N-metil-D-glukaminske, hidrabaminske soli, i soli s aminokiselinama kao što je, na primjer, arginin, lizin i slično.

Pojam "kiselinske ili bazične adicijske soli" također uključuje hidrate i solvate koje spojevi formule (I) mogu oblikovati. Primjeri takvih oblika su npr. hidrati, alkoholi i slično.

Pojam "stereokemijski izomerni oblici spojeva formule (I)", kako se ovdje rabi, definira sve moguće spojeve načinjene od istih atoma vezanih istim slijedom veza, ali koji imaju različite trodimenzionalne strukture koje se ne mogu međusobno zamijeniti, koje spojevi formule (I) mogu imati. Ako drugačije nije spomenuto ili naznačeno, kemijska oznaka spoja obuhvaća smjesu svih mogućih stereokemijski izomernih oblika koje spomenuti spojevi mogu imati. Spomenuta smjesa može sadržavati sve diastereomere i/ili enantiomere bazične molekularne strukture spomenutog spoja. Svi stereokemijski izomerni oblici spojeva formule (I) i u čistom obliku i međusobno pomiješani nalaze se unutar dosega predloženog izuma.

Podrazumijeva se da N-oksidni oblici spojeva formule (I) obuhvaćaju one spojeve formule (I) u kojima je jedan ili nekoliko dušikovih atoma oksidirano u takozvani N-oksid, posebno one N-okside u kojima je jedan ili više piperidin-, piperazin ili piridazinil-dušika N-oksidirano.

- 5 Neki od spojeva formule (I) također mogu postojati u njihovim tautomernim oblicima. Takvi oblici premda nije eksplicitno naznačeno u gornjoj formuli nalaze se unutar dosega predloženog izuma.

Kada god se rabi od sada pa nadalje, pojam "spojevi formule(I)" također uključuje farmaceutski prihvatljive adicijske soli i sve stereoizomerne oblike.

10

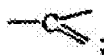
Kako se ovdje rabe, pojmovi "histon deacetilaza" i "HDAC" odnose se na bilo koji spoj iz obitelji enzima koji uklanja acetilne skupine s ϵ -amino skupina lizinskih dijelova na N-terminalnom dijelu histona. Ako drugačije nije naznačeno kontekstom, pojam "histon" odnosi se na bilo koji histonski protein, uključujući H1, H2A, H2B, H3, H4, i H5, od bilo koje vrste. Humani HDAC proteini ili genski produkti, uključuju, ali nisu ograničeni na, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7, HDAC-8, HDAC-9 i HDAC-10. Histon deacetilaza također se može izvesti iz protozoalnog ili fungalnog izvora.

15

Prva skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) za koje se primjenjuje jedno ili više od sljedećih ograničenja:

20

- a) n je 0, 1 ili 2;
b) t je 0, 1, 2 ili 3;



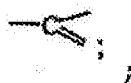
- c) svaki Q je
d) R^1 je $-C(O)NH(OH)$ ili $-NR^{11}C(O)C=N(OH)$ R^{10} pri čemu je R^{10} aril C_{1-6} alkil i R^{11} je vodik;
25 e) R^2 je vodik, C_{1-6} alkil ili naftalenilsulfonilpirazinil;
f) svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom;
h) R^4 je vodik, hidroksi, hidroksi C_{1-6} alkil ili C_{1-6} alkiloksi; i) R^5 je vodik, C_{1-6} alkil, hidroksi C_{1-6} alkil ili C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil;



- i) je radikal izabran između (a-1), (a-7) ili (a-20); j) svaki s je nezavisno 0 ili 1;
30 k) svaki R^6 je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila, benzofuranila; fenila; ili fenila supstituiranog s jednim supstituentom izabranim između C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkilsulfonila, ili di (C_{1-4} alkil) amino;
l) svaki R^7 je nezavisno izabran između vodika.

- 35 Druga skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) za koje se primjenjuje jedno ili više od sljedećih ograničenja:

- a) n je 1 ili 2;
b) t je 0, 1, 2 ili 3;



- 40 c) svaki Q je
d) R^1 je $-C(O)NH(OH)$;
e) R^2 je vodik ili C_{1-6} alkil;
f) svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom;
g) R^4 je vodik;
45 h) R^5 je vodik ili C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil;



- i) je radikal izabran između (a-1) ili (a-20);
j) svaki s je nezavisno 0 ili 1;
k) svaki R^6 je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila; benzofuranila; fenila; ili fenila supstituiranog s jednim supstituentom nezavisno izabranim između C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-6} alkila, ili di (C_{1-4} alkil) amino.
50

Treća skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima je R^2 vodik.

Četvrta skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima je R^1 $-C(O)NH(OH)$.

Peta skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima je R^1 -C(O)NH(OH) i R^2 vodik.

Šesta skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) za koje se primjenjuje jedno ili više od sljedećih ograničenja:

- a) t je 0;
- b) R^1 je $-C(O)NR^8R^9$, $-C(O)-C_{1-6}alkandilSR^{10}$, $-NR^{11}C(O)N(OH)R^{10}$, $-NR^{11}C(O)C_{1-6}alkandilSR^{10}$, $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ ili druga Zn-helirajuća skupina u kojoj su R^8 i R^9 , svaki nezavisno, izabrani između vodika, hidroksi, hidroksi $C_{1-5}alkila$, ili amino $C_{1-6}alkila$;
- c) R^2 je vodik, halo, hidroksi, amino, nitro, $C_{1-6}alkil$, $C_{1-6}alkiloksi$, trifluormetil ili di($C_{1-6}alkil$)amino;
- d) R^4 je vodik, hidroksi, amino, hidroksi $C_{1-6}alkil$, $C_{1-6}alkil$, $C_{1-6}alkiloksi$, aril $C_{1-6}alkil$, aminokarbonil, amino $C_{1-6}alkil$, $C_{1-6}alkilaminoC_{1-6}alkil$ ili di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkil$;
- e) R^5 je vodik;
- f)  je radikal izabran između (a-1), (a~3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) ili (a-51);
- g) svaki s je nezavisno 0, 1, 2, 3 ili 4;
- h) R^6 je vodik; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo $C_{1-6}alkil$; trihalo $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkil$; $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkilkarbonil$; $C_{1-6}alkiloksikarbonil$; $C_{1-6}alkilsulfonil$; hidroksi $C_{1-6}alkil$; ariloksi; di ($C_{1-6}alkil$) amino; cijano; tiofenil; furanil; furanil supstituiran s hidroksi $C_{1-6}alkilom$; benzofuranil; imidazolil; oksazolil; oksazolil supstituiran s arilom i $C_{1-6}alkilom$; $C_{1-6}alkil$ triazolil; tetrazolil; pirolidinil; pirolil; morfolinil; $C_{1-6}alkilmorfolinil$; piperazinil; $C_{1-6}alkil$ piperazinil; hidroksi $C_{1-6}alkil$ piperazinil; $C_{1-6}alkiloksi$ piperidinil; pirazolil; pirazolil supstituiran s jednim ili dva supstituenta izabrana između $C_{1-6}alkila$ ili trihalo $C_{1-6}alkila$; piridinil; piridinil supstituiran s $C_{1-6}alkiloksi$, ariloksi ili arilom; pirimidinil; kinolinil; indol; fenil; ili fenil supstituiran s jednim ili dva supstituenta nezavisno izabrana između halo, $C_{1-6}alkila$, $C_{1-6}alkiloksi$, ili tri fluormetila;
- i) R^7 je vodik; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo $C_{1-6}alkil$; trihalo $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkil$; $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkilkarbonil$; $C_{1-6}alkiloksikarbonil$; $C_{1-6}alkilsulfonil$; hidroksi $C_{1-6}alkil$; ariloksi; di ($C_{1-6}alkil$) amino; cijano; piridinil; fenil; ili fenil supstituiran s jednim ili dva supstituenta nezavisno izabrana između halo, $C_{1-6}alkila$, $C_{1-6}alkiloksi$ ili trifluormetila.
- Sedma skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) za koje se primjenjuje jedno ili više od sljedećih ograničenja:
- a) R^9 i R^9 je svaki nezavisno izabran između vodika, hidroksi, hidroksi $C_{1-6}alkila$, amino $C_{1-6}alkila$ ili aminoarila;
- b) R^5 je vodik, $C_{1-6}alkil$, $C_{3-10}ciklolkil$, hidroksi $C_{1-6}alkil$, $C_{1-6}alkiloksiC_{1-6}alkil$ ili di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkil$;
- c)  je radikal izabran između (a-1), (a-2), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-27), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42) (a-43) ili (a-44);
- e) svaki R^6 i R^7 su nezavisno izabrani između vodika; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo $C_{1-6}alkila$; trihalo $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkila$; $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkiloksiC_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkil$ karbonila; $C_{1-6}alkilsulfonila$; cijano $C_{1-6}alkila$; hidroksi $C_{1-6}alkila$; hidroksi $C_{1-6}alkiloksi$; hidroksi $C_{1-6}alkilamino$; amino $C_{1-6}alkiloksi$; di ($C_{1-6}alkil$) aminokarbonila; di (hidroksi $C_{1-6}alkil$) amino; aril ($C_{1-6}alkil$) amino; di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkiloksi$; di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkil$ ariamino; arilsulfonila; arilsulfonilamino; ariloksi; aril $C_{2-6}alkendiila$; di($C_{1-6}alkil$) amino; di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkila$; di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkil$ ($C_{1-6}alkil$)amino $C_{1-6}alkila$; cijano; tiofenila; tiofenila supstituiranog s di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkil$ ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkilom$, di ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkilom$, $C_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkilom$ ili di (hidroksi $C_{1-6}alkil$)amino $C_{1-6}alkilom$; furanila; imidazolila; $C_{1-6}alkil$ triazolila; tetrazolila; pirolidinila; piperidinil $C_{1-6}alkiloksi$; morfolinila; $C_{1-6}alkilmorfolinila$; morfolinil $C_{1-6}alkiloksi$; morfolinil $C_{1-6}alkila$; $C_{1-6}alkil$ piperazinila; $C_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkiloksi$; morfolinil $C_{1-6}alkila$; $C_{1-6}alkil$ piperazinila; $C_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkiloksi$; $C_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkila$; $C_{1-6}alkil$ piperazinilsulfonila; aminosul foni lpiperaz ini $C_{1-6}alkiloksi$; aminosulfonilpiperazinila; aminosulfonilpiperazinil $C_{1-6}alkila$; di ($C_{1-6}alkil$) aminosulfonilpiperazinila; di ($C_{1-6}alkil$) aminosulfonilpiperazinil $C_{1-6}alkila$; hidroksi $C_{1-6}alkil$ piperazinila; hidroksi $C_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkila$; $C_{1-6}alkil$ oksipiperidinila; $C_{1-6}alkiloksi$ piperidinil $C_{1-6}alkila$; hidroksi $C_{1-6}alkiloksiC_{1-6}alkil$ piperazinila; hidroksi $C_{1-6}alkiloksiC_{1-6}alkil$ piperazinil $C_{1-6}alkila$; (hidroksi $C_{1-6}alkil$) ($C_{1-6}alkil$) amino; (hidroksi $C_{1-6}alkil$) ($C_{1-6}alkil$) amino $C_{1-6}alkila$; pirolidinil $C_{1-6}alkiloksi$; pirazolila; tiopirazolila; pirazolila supstituiranog s dva supstituenta izabrana između $C_{1-6}alkila$ ili trihalo $C_{1-6}alkila$; piridinila; piridinila supstituiranog s $C_{1-6}alkiloksi$ ili arilom; pirimidinila; kinolinila; indola; fenila; fenila supstituiranog s jednim, dva ili tri supstituenta nezavisno izabrana između halo, amino, $C_{1-6}alkiloksi$, hidroksi $C_{1-6}alkila$, trifluormetila, trifluormetiloksi, hidroksi $C_{1-4}alkiloksi$, $C_{1-4}alkiloksiC_{1-4}alkiloksi$, amino $C_{1-4}alkiloksi$, di ($C_{1-4}alkil$) amino $C_{1-4}alkiloksi$, di ($C_{1-4}alkil$) amino, di ($C_{1-4}alkil$) amino $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$) amino $C_{1-4}alkil$ ($C_{1-4}alkil$) amino $C_{1-4}alkila$, piperidinil $C_{1-4}alkiloksi$, pirolidinil $C_{1-4}alkiloksi$, aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinil $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$)aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinil $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$) aminosulfonilpiperazinila, di($C_{1-4}alkil$)aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinil $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$) aminosulfonilpiperazinila, di($C_{1-4}alkil$)aminosulfonilpiperazinil $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$) aminosulfonilpiperazinila, di($C_{1-4}alkil$)aminosulfonilpiperazinil $C_{1-4}alkila$, di ($C_{1-4}alkil$

alkil) aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkiloksipiperidinila, C₁₋₄alkiloksipiperidinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkiloksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkoksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) amino, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkila, pirolidinilC₁₋₄alkoksi, morfolinilC₁₋₄alkiloksi, morfolinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkoksi, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilamino, di (hidroksiC₁₋₄alkil) amino, di(C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkilamino, aminotiadiazolila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkiloksi, ili tiofenilC₁₋₄alkilamino.

Skupina zanimljivih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima su R⁸ i R⁹, svaki nezavisno, izabrani između vodika, hidroksi, hidroksiC₁₋₆alkila, aminoC₁₋₆alkila ili aminoarila;

R⁵ je vodik, C₁₋₆alkil, C₃₋₁₀cikloalkil, hidroksiC₁₋₆alkil, C₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkil ili di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil;

 je radikal izabran između (a-1), (a-2), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-27), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-43) ili (a-44);

svaki R⁶ i R⁷ je nezavisno izabran između vodika; halo; hidroksi; amino; nitro; trihaloC₁₋₆alkila; trihaloC₁₋₆alkiloksi; C₁₋₆alkila; C₁₋₆alkoksi; C₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkoksi; C₁₋₆alkilkarbonila; C₁₋₆alkilsulfonila; cijanoC₁₋₆alkila; hidroksiC₁₋₆alkila; hidroksiC₁₋₆alkiloksi; hidroksiC₁₋₆alkilamino; aminoC₁₋₆alkiloksi; di (C₁₋₆alkil) aminokarbonila; di (hidroksiC₁₋₆alkil) amino; aril (C₁₋₆alkil) amino, di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkiloksi; di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkilamino; arilsulfonila; arilsulfonilamino; ariloksi; arilC₂₋₆alkendiila; di (C₁₋₆alkil) amino; di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkila; di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkila; cijano; tiofenila; tiofenila supstituiranog s di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkilom, di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkilom, C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkilom ili di (hidroksiC₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkilom; furanila; imidazolila;

C₁₋₆alkiltriazolila; tetrazolila; piperidinilC₁₋₆alkiloksi; morfolinila; C₁₋₆alkilmorfolinila; morfolinilC₁₋₆alkiloksi; morfolinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilpiperazinil; C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkiloksi;

C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilpiperazinilsulfonila; aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkiloksi; aminosulfonilpiperazinila; aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkila; di (C₁₋₆alkil) aminosulfonilpiperazinila; di (C₁₋₆alkil) aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkila; hidroksiC₁₋₆alkilpiperazinila; hidroksiC₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkiloksipiperidinila; C₁₋₆alkiloksipiperidinilC₁₋₆alkila; hidroksiC₁₋₆alkoksiC₁₋₆alkilpiperazinila; hidroksiC₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkila; (hidroksiC₁₋₆alkil) (C₁₋₆alkil) amino; (hidroksiC₁₋₆alkil) (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkila; pirolidinilC₁₋₆alkoksi; pirazolila; tiopirazolila; pirazolila supstituiranog s dva supstituenta izabrana između C₁₋₆alkila ili trihaloC₁₋₆alkila; piridinila; piridinila supstituiranog s C₁₋₆alkoksi ili arilom; pirimidinila; kinolinila; indola; fenila; fenila supstituiranog s jednim, dva ili tri supstituenta nezavisno izabrana između halo, amino, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkoksi, hidroksiC₁₋₆alkila, trifluorometila, trifluorometiloksi, hidroksiC₁₋₄alkiloksi, C₁₋₄alkiloksiC₁₋₄alkiloksi, aminoC₁₋₄alkiloksi, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkiloksi, di (C₁₋₄alkil) amino, piperidinilC₁₋₄alkoksi, pirolidinilC₁₋₄alkiloksi, aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, di (C₁₋₄alkil) aminosulfonil piperazinila, di (C₁₋₄alkil) aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkiloksipiperidinila, C₁₋₄alkiloksipiperidinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkiloksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkoksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) amino, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkila, pirolidinilC₁₋₄alkoksi, morfolinilC₁₋₄alkiloksi, morfolinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkoksi, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilamino, di (hidroksiC₁₋₄alkil) amino, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkilamino, aminotiadiazolila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkiloksi, ili tiofenilC₁₋₄alkilamino.

Daljnja skupina povoljnih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima:

t je 0;

R¹ je -C(O)NR⁸R⁹, -C(O)-C₁₋₆alkendiilSR¹⁰, -NR¹¹C(O)N(OH)R¹⁰, -NR¹¹C(O)C₁₋₆alkandiilSR¹⁰, -NR¹¹C(O)C=N(OH)R¹⁰ ili druga Zn-helirajuća skupina u kojoj su R⁸ i R⁹ svaki nezavisno izabran između vodika, hidroksi, hidroksiC₁₋₆alkila, ili aminod-6alkila;

R² je vodik, halo, hidroksi, amino, nitro, C₁₋₆alkil, C₁₋₆alkoksi, trifluorometil ili di (C₁₋₆alkil) amino;

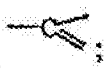
R⁴ je vodik, hidroksi, amino, hidroksiC₁₋₆alkil, C₁₋₆alkil, C₁₋₆alkoksi, arilC₁₋₆alkil, aminokarbonil, aminoC₁₋₆alkil, C₁₋₆alkilaminoC₁₋₆alkil ili di (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkil;

R⁵ je vodik;

 je radikal izabran između (a-1), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) ili (a-51); svaki s je nezavisno 0, 1, 2, 3 ili 4;

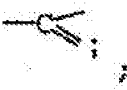
R^6 je vodik; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkil; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkil; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkilkarbonil; C_{1-6} alkiloksikarbonil; C_{1-6} alkilsulfonil; hidroksi C_{1-6} alkil; ariloksi; di(C_{1-6} alkil)amino; cijano; tiofenil; furanil; furanil supstituiran s hidroksi C_{1-6} alkilom; benzofuranil; imidazolil; oksazolil; oksazolil supstituiran s arilom i C_{1-6} alkilom; C_{1-6} alkiltriazolil; tetrazolil; pirolidinil; pirolil; morfolinil; C_{1-6} alkilmorfolinil; piperazinil; C_{1-6} alkilpiperazinil; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil; C_{1-6} alkiloksipiperidinil; pirazolil; pirazolil supstituiran s jednim ili dva supstituenta izabrana između C_{1-6} alkila ili trihalo C_{1-6} alkila; piridinil; piridinil supstituiran s C_{1-6} alkiloksi, ariloksi ili arilom; pirimidinil; kinolinil; indol; fenil; ili fenil supstituiran s jednim ili dva supstituenta nezavisno izabrana između halo, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi ili trifluormetila;

Skupina još povoljnijih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima n iznosi 0, 1 ili 2; t je 0, 1, 2 ili 3;

svaki Q je ; R^1 je $-C(O)NH(OH)$ ili $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ pri čemu je R^{10} aril C_{1-6} alkil i R^{11} vodik; R^2 je vodik, C_{1-6} alkil ili naftalenilsulfonilpirazinil; svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom; R^4 je vodik, hidroksi, hidroksi C_{1-6} alkil ili C_{1-6} alkiloksi; R^5 je vodik, C_{1-6} alkil, hidroksi C_{1-6} alkil ili C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil;

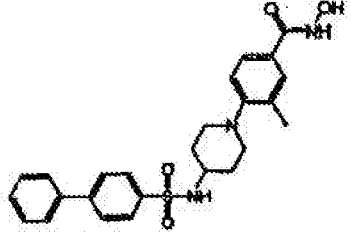
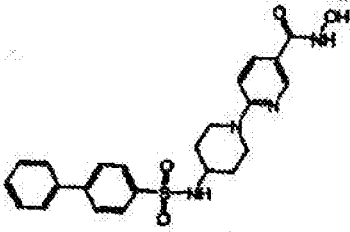
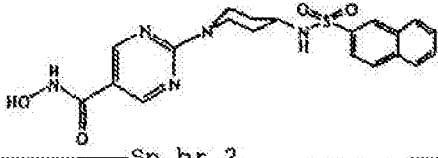
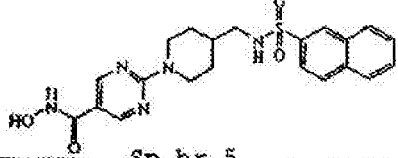
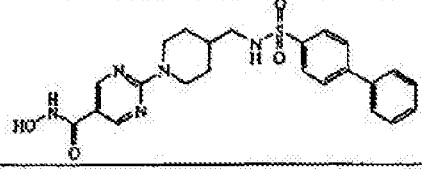
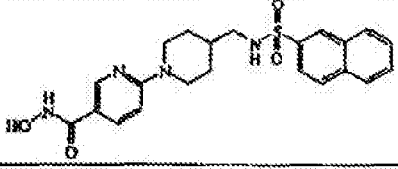
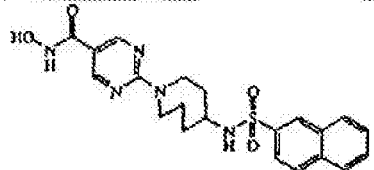
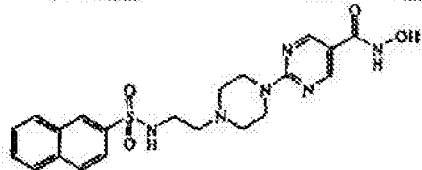
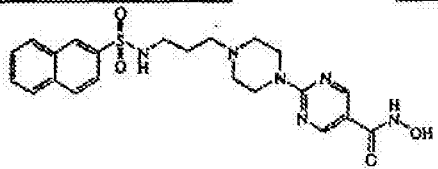
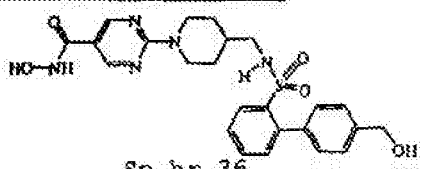
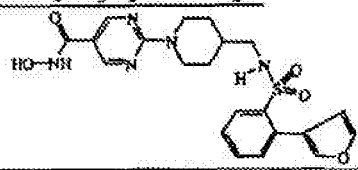
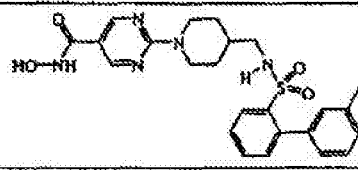
 je radikal izabran između (a-1), (a-7) ili (a-20); svaki s je nezavisno 0 ili 1; svaki R^6 je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila; benzofuranila; fenila; ili fenila supstituiranog s jednim, supstituentom nezavisno izabranim C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkilsulfonila ili di (C_{1-4} alkil) amino i svaki R^7 je nezavisno izabran između vodika.

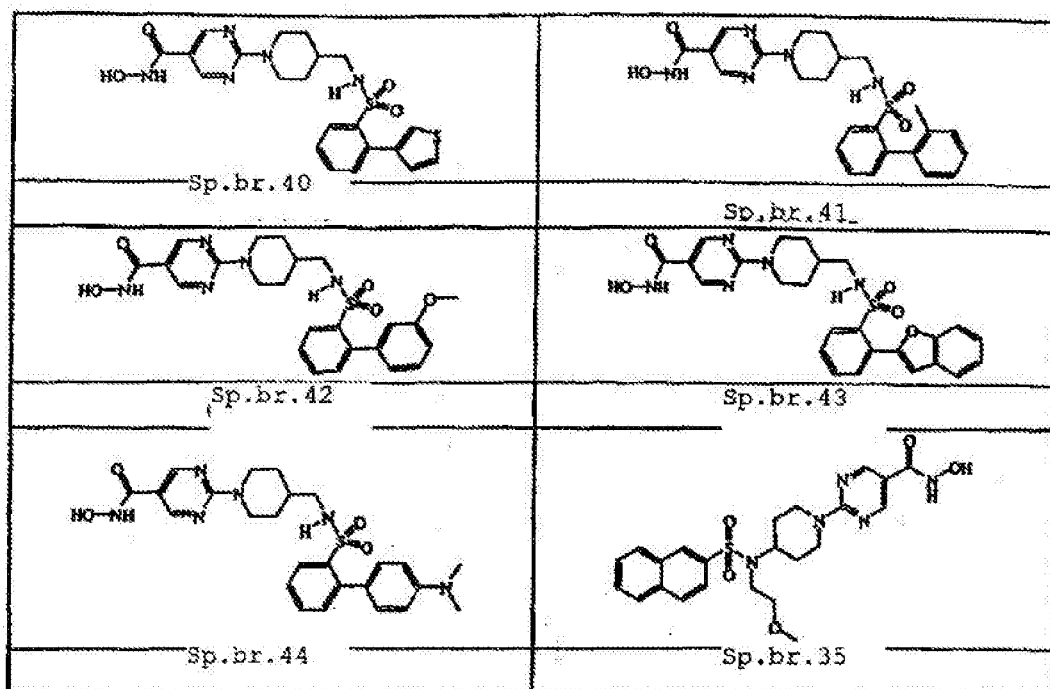
Skupina čak još povoljnijih spojeva sastoji se od onih spojeva formule (I) u kojima n iznosi 1 ili 2; t je 0, 1, 2 ili 3; svaki Q je

; R^1 je $-C(O)NH(OH)$; R^2 je vodik ili C_{1-6} alkil; svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom; R^4 je vodik; R^5 je vodik ili C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil;

 je radikal izabran između (a-1) ili (a-20); svaki s je nezavisno 0 ili 1; svaki R^6 je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila; benzofuranila; fenila; ili fenila supstituiranog s jednim, supstituentom nezavisno izabranim C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkilsulfonila ili di (C_{1-4} alkil) amino.

Najpovoljniji su spojevi br. 13, br. 15, br. 2, br. 5, br. 21, br. 4, br. 24, br. 32, br. 26, br. 36, br. 38, br. 39, br. 40, br. 41, br. 42, br. 43, br. 44 i br. 35.

 Sp.br.13	 Sp.br.15
 Sp.br.2	 Sp.br.5
 0.7 CH₃OH, Sp.br.21	 Sp.br.4
 0.23 C₆H₁₄O, Sp.br.24	 0.82 C₂HF₃O₂ 0.82 H₂O Sp.br.32
 0.85 C₂HF₃O₂ 1.11 H₂O Sp.br.26	 Sp.br.36
 Sp.br.38	 Sp.br.39

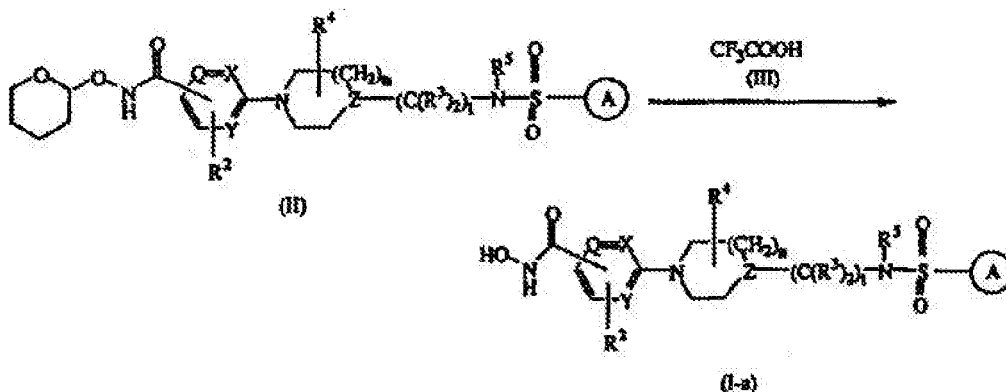


Spojevi formule (I) i njihove farmaceutski prihvatljive soli i N-oksidi i stereokemijski izomerni oblici mogu se pripraviti na uobičajeni način.

5

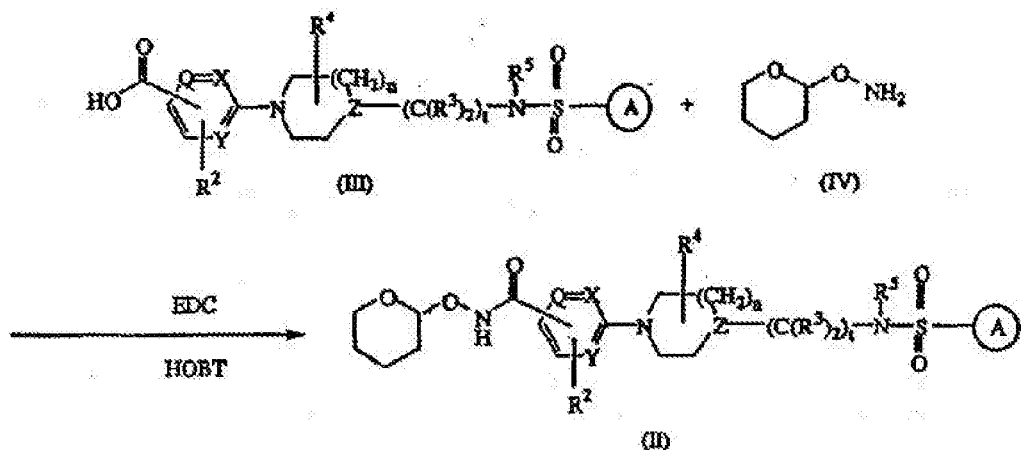
Kao primjer su uključena dva opća načina sinteze:

1a) Hidroksaminska kiselina formule (I) u kojoj je $R^1-C(O)NH(OH)$, spomenuti spojevi označeni su kao spojevi formule (I-a), može se pripraviti reakcijom intermedijara formule (II) s odgovarajućom kiselinom, kao što je primjerice, trifluoroctena kiselina. Spomenuta reakcija izvedena je u odgovarajućem otapalu, kao što je, na primjer, metanol.

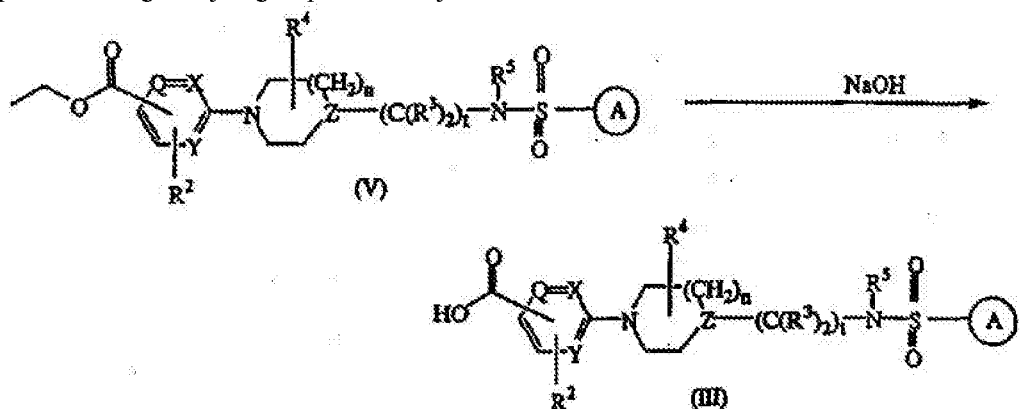


10

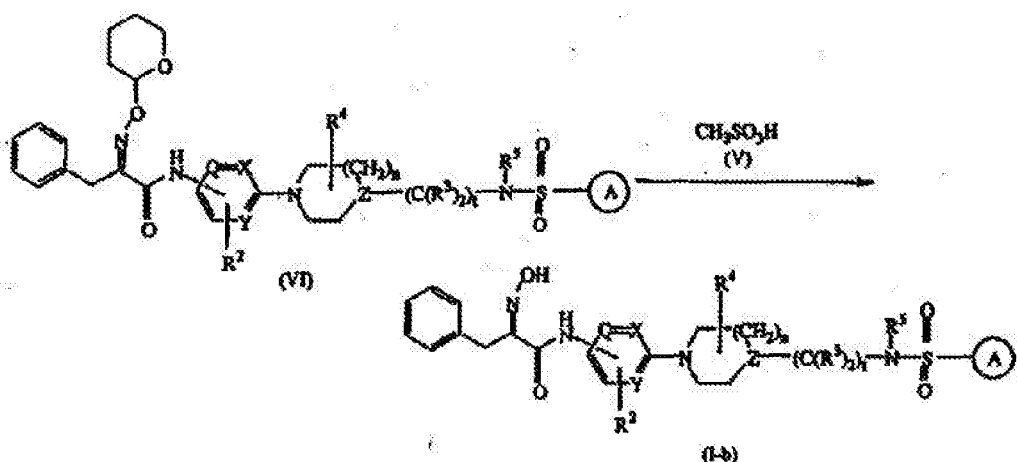
1b) intermedijari formule (II) mogu se pripraviti reakcijom intermedijara (III) s intermedijarom formule (IV) u prisutnosti odgovarajućih reagensa kao što je W-(etilkarbonimidolil)-N,N-dimetil-1,3-propandiamin, monohidroklorid (EDC) i 1-hidroksi-lif-benzotriazol (HOBT). Reakcija se može izvesti u odgovarajućem otapalu kao što je smjesa DCM i THF.



1c) intermedijari formule (III) mogu se pripraviti reakcijom intermedijara formule (V) s odgovarajućom bazom kao što je NaOH u prisutnosti odgovarajućeg otapala kao što je etanol.



- 5 2) Spojevi formule (I) u kojima je $R^1\text{-NHC(O)C=N(OH)}$ R^{10} , pri čemu je R^{10} aril C_{1-6} alkil, spomenuti spojevi označeni su kao spojevi formule (I-b), mogu se pripraviti reakcijom intermedijara formule (VI) s odgovarajućom kiselinom, kao što je primjerice metansulfonska kiselina. Spomenuta reakcija izvodi se u odgovarajućem otapalu, kao što je na primjer, metanol.



- 10 Spojevi formule (I) također se mogu prikladno pripraviti primjenom tehnika sinteze čvrste faze. Općenito, sinteza čvrste faze uključuje reakciju intermedijara u sintezi s polimerskom potporom. Taj se intermedijar s polimerskom potporom zatim može provesti kroz brojne korake sinteze. Nakon svakog koraka, smola se profiltrira i puno puta ispere s različitim otapalima kako bi se uklonile nečistoće. U svakom koraku smola se može razdvojiti kako bi reagirala s različitim intermedijarima u sljedećem koraku omogućujući tako sintezu velikog broja spojeva. Nakon posljednjeg
- 15 koraka u proceduri smola je obrađena s reagensom ili procesom koji uklanja smolu od uzorka. Detaljnije objašnjenje tehnika primjenjenih u kemiji čvrste faze opisano je u primjerice "The Combinatorial Index" (B. Bunin, Academic Press) i Novabiochemovom 1999 Katalogu & te priručniku sinteze peptida (Novabiochem AG, Switzerland) oba su ovdje uključena referencom.

Spojevi formule (I) i neki od intermedijara mogu u svojoj strukturi imati barem jedan kiralni centar. Taj kiralni centar može biti prisutan u R ili S konfiguraciji.

5 Spojevi formule (I) kako su pripremljeni u prethodno opisanim procesima općenito su racemske smjese enantiomera, koji se jedni od drugih mogu razdvojiti slijedeći u struci poznate procedure razlučivanja. Racemski spojevi formule (I) mogu se pretvoriti u odgovarajuće diastereomerne oblike soli reakcijom s odgovarajućom kiralnom kiselinom. Spomenuti diastereomerni oblici soli dalje su razdvojeni, na primjer, selektivnom ili frakcijskom kristalizacijom, a enantiomeri oslobođeni iz njih pomoću alkalija. Alternativni način odvajanja enantiomernih oblika spojeva formule (I) uključuje tekućinsku kromatografiju pomoću kiralne stacionarne faze. Spomenuti čisti stereokemijski izomerni oblici 10 također se mogu dobiti iz odgovarajućih čistih stereokemijski izomernih oblika odgovarajućih početnih materijala, uz uvjet da do reakcije dolazi stereospecifično. Poželjno je da ako je povoljan određeni stereoizomer, da se spomenuti spoj sintetizira stereospecifičnim postupcima pripremljanja. Za te postupke je povoljno upotrijebiti enantiomerno čiste početne materijale.

15 Spojevi formule (I), njihove farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli i stereoizomerni oblici imaju vrijedna farmakološka svojstva u tome da djeluju inhibicijski na histon deacetilazu (HDAC).

20 Ovaj izum donosi postupak inhibiranja abnormalnog rasta stanica, uključujući promijenjene stanice, davanjem djelotvorne količine spoja iz izuma. Abnormalan rast stanica odnosi se na rast koji je nezavisan od normalnih regulacijskih mehanizama (npr. gubitak kontaktne inhibicije). Ovo uključuje inhibiciju rasta tumora i izravno uzrokujući prekid rasta, terminalne diferencijacije i/ili apoptozu stanica karcinoma, i indirektno, inhibiranjem neovaskularizacije tumora.

25 Ovaj izum također donosi postupak inhibiranja rasta tumora davanjem djelotvorne količine spoja iz predloženog izuma, subjektu npr. sisavcu (posebno čovjeku) kojem je takvo liječenje potrebno. Posebno, ovaj izum donosi postupak inhibiranja rasta tumora davanjem djelotvorne količine spojeva iz predloženog izuma. Primjeri tumora koji se mogu inhibirati, ali nisu ograničeni na, su, karcinom pluća (npr. adenokarcinom i uključujući karcinom pluća ne-malih stanica), karcinomi pankreasa (npr. karcinom pankreasa kao što je, na primjer, egzokrin karcinom pankreasa), karcinome kolona (npr. kolorektalne karcinome, kao što je, na primjer, kolonski adenokarcinom i kolonski adenom), 30 karcinom prostate uključujući uznapredovalu bolest, hematopoetski tumori limfoidnog podrijetla (npr. akutna limfocitična leukemija, limfom B-stanica, Burkittov limfom), mijeloidne leukemije (na primjer, akutna mijeloidna leukemija (AML)), tiroidni folikularni karcinom, mijelodisplastički sindrom (MDS), tumori mezenhimalnog porijekla (npr. fibrosarkomi i rabdomiosarkomi), melanomi, teratokarcinomi, neuroblastomi, gliomi, benigni tumori kože (npr. keratoakantomi), karcinom dojke (npr. uznapredovali karcinom dojke), karcinom bubrega, karcinom jajnika, karcinom mjehura i epidermalni karcinom. 35

Spoj prema izumu može se upotrijebiti za ostale terapijske svrhe, primjerice:

- a) senzitivizacija tumora na radioterapiju davanjem spoja prema izumu prije, tijekom i nakon zračenja tumora radi liječenja karcinoma;
- 40 b) liječenje artropatija i osteopatoloških stanja kao što je reumatoidni artritis, osteoartritis, mladenački artritis, giht, poliartritis, psorijatički artritis, ankilozni spondilitis i sistemski lupus eritematosus;
- c) inhibiranje proliferacije stanica glatkog mišića uključujući vaskularne proliferacijske poremećaje, aterosklerozu i restenozu;
- d) liječenje upalnih stanja i dermatoloških stanja kao što je ulcerozni kolitis, Crohnova bolest, alergijski rinitis, reakcija 45 domaćina na transplantant, konjuktivitis, astma, ARDS, Behcetova bolest, odbacivanje transplantanta, utikarija, alergijski dermatitis, alopecija areata, skleroderma, egzantem, ekcem, dermatomiozitis, akne, dijabetes, sistemski lupus eritematosus, Kawasakijska bolest, multipla skleroza, emfizem, cistična fibroza i kronični bronhitis;
- e) liječenje endometriozе, uterinskog fibroida, disfunkcionalnog uterinskog krvarenja i endometrijske hiperplazije;
- f) liječenje očne vaskularizacije uključujući vaskulopatiju koja utječe na krvne žile retine i koroida;
- 50 g) liječenje srčane disfunkcije;
- h) inhibiranje imunosupresivnih stanja kao što je liječenje infekcija HIVom;
- i) liječenje bubrežne disfunkcije;
- j) supresija endokrinih poremećaja;
- 55 k) inhibiranje disfunkcije glukoneogeneze;
- l) liječenje neuropatologije primjerice Parkinsonove bolesti ili neuropatologije koja rezultira kognitivnim poremećajem, primjerice, Alzheimerova bolest ili neuronske bolesti povezane s poliglutaminom;
- m) inhibiranje neuromuskularne patologije, primjerice, amiotrofične lateralne skleroze;
- n) liječenje spinalne muskularne atrofije;
- 60 o) liječenje ostalih patoloških stanja podložnih liječenju potenciranjem ekspresije gena;
- p) poboljšanje genskog liječenja.

Prema tome, predloženi izum iznosi spojeve formule (I) za uporabu kao lijek kao i uporabu ovih spojeva formule (I) za proizvodnju lijeka za liječenje gore spomenutih stanja. Spojevi formule (I), farmaceutski prihvatljive kiselinske adicijske soli i njihovi stereoizomerni oblici mogu imati vrijedna dijagnostička svojstva u tome da se mogu upotrijebiti za detektiranje ili identifikaciju HDAC u biološkom uzorku koje uključuje detektiranje ili mjerenje nastanka kompleksa između označenog spoja i HDAC.

U postupcima detektiranja ili identifikacije mogu se upotrijebiti spojevi koji su označeni sa sredstvima za označavanje kao što su radioaktivni izotopi, enzimi, fluorescentne tvari, svjetleće tvari, itd. Primjeri radioaktivnih izotopa uključuju, ^{125}I , ^{131}I , ^3H i ^{14}C . Enzimi se obično pripremaju tako da se mogu detektirati konjugiranjem odgovarajućeg supstrata koji, zauzvrat, katalizira reakciju koja se može detektirati. Njihovi primjeri uključuju, na primjer, beta-galaktozidazu, beta-glukozidazu, alkalisku fosfatazu, peroksidazu i malat dehidrogenazu, poželjno peroksidazu hrena. Svjetleće tvari uključuju, primjerice, luminol, derivate luminola, luciferin, aekvorin i luciferazu.

Biološki uzorci mogu se definirati kao tjelesno tkivo ili tjelesni fluidi. Primjeri tjelesnih fluida su cerebrospinalni fluid, krv, plazma, serum, urin, sputum, slina i slično.

U pogledu njihovih korisnih farmakoloških svojstava, predmetni spojevi mogu se formulirati u različitim farmaceutskim oblicima u svrhu davanja.

Za pripremanje farmaceutskih pripravaka iz ovog izuma, djelotvorna količina određenog spoja, u obliku bazične ili kiselinske adicijske soli, kao aktivnog sastojka kombinirana je u temeljitoj smjesi s farmakološki prihvatljivim prijenosnikom, koji prijenosnik može poprimiti široki raspon oblika ovisno o obliku pripravka željenog za davanje. Poželjno je da ovi farmaceutski budu u jediničnom obliku doziranja prikladnom za, primjerice, oralno davanje, rektalno, perkutano, ili parenteralnom injekcijom. Na primjer, za pripremanje pripravka za oralni oblik davanja, može se upotrijebiti bilo koje od uobičajenih farmaceutskih sredstava, kao što je, na primjer, voda, glikoli, ulja, alkoholi i slično u slučaju oralnih tekućih pripravaka kao što su suspenzije, sirupi, eliksiri i otopine; ili čvrsti prijenosnici kao što su škrobovi, šećeri, kaolin, lubrikanti, veziva, sredstva za razgradnju i slično u slučaju prašaka, pilula, kapsula i tableta.

Zbog njihove jednostavnosti davanja, tablete i kapsule predstavljaju najpovoljniji jedinični oblik oralnog doziranja, u kojem slučaju su očigledno upotrijebljeni čvrsti farmaceutski prijenosnici. Za parenteralne pripreme, prijenosnik će obično obuhvaćati sterilnu vodu, barem velikim dijelom, premda mogu biti uključeni i ostali sastojci, primjerice za pospješivanje topljivosti. Injekcijske otopine, na primjer, mogu se pripremiti tako da prijenosnik obuhvaća slanu otopinu, otopinu glukoze ili kombinaciju slane otopine i otopine glukoze. Također se mogu pripremiti injekcijske suspenzije u kojem slučaju se mogu upotrijebiti tekući prijenosnici, suspenzijska sredstva i slično. U pripravcima prikladnim za perkutano davanje, prijenosnik može uključivati sredstvo za pospješivanje prodiranja i/ili odgovarajuće sredstvo za vlaženje, moguće u kombinaciji s odgovarajućim dodacima bilo koje prirode u sporednim omjerima, koji dodaci ne uzrokuju značajan štetan učinak na koži. Spomenuti dodaci mogu olakšati nanošenje na kožu i/ili mogu biti od pomoći za pripremanje željenih pripravaka. Ti pripravci mogu se davati na različite načine, npr., kao transdermalni flaster, kao spot-on ili kao mast.

Naročito je povoljno formulirati gore spomenute farmaceutske pripravke u jedinični oblik doziranja radi jednostavnosti davanja i jednoličnosti doziranja. Jedinični oblik doziranja kako se rabi ovdje u specifikaciji i zahtjevima odnosi se na fizički razdvojene jedinice prikladne kao jedinične doze, svaka jedinica sadrži prethodno određenu količinu aktivnog sastojka, izračunatu kako bi se proizveo željeni terapijski učinak, zajedno s potrebnim farmaceutskim prijenosnikom. Primjeri takvih jediničnih oblika doziranja su tablete (uključujući zarezane i obložene tablete), kapsule, pilule, paketići praha, vafli, injekcijske otopine ili suspenzije, čajne žličice, žlice i slično, te njihove razdvojene višestruke doze.

Oni vični struci mogli bi jednostavno odrediti djelotvornu količinu iz rezultata testiranja prikazanih ispod. Općenito se smatra da bi terapijski djelotvorna količina bila od 0.005 mg/kg do 100 mg/kg tjelesne mase, naročito od 0.005 mg/kg do 10 mg/kg tjelesne mase. Može biti prikladno davati potrebnu dozu kao dvije, tri, četiri ili više poddoza u odgovarajućim intervalima tijekom dana. Spomenute poddoze mogu se formulirati kao jedinični oblici doziranja, primjerice, koji sadrže 0.5 do 500 mg, posebno 10 mg do 500 mg aktivnog sastojka po jediničnom obliku doziranja.

Kao drugi aspekt predloženog izuma istražena je kombinacija inhibitora HDAC s drugim antikancerogenim sredstvom, posebno za uporabu kao lijek, naročito u liječenju karcinoma i srodnih bolesti.

Za liječenje gornjih stanja, spojevi iz izuma mogu se povoljno upotrijebiti u kombinaciji s jednim ili više ostalih medicinskih sredstava, još povoljnije, s ostalim antikancerogenim sredstvima. Primjeri antikancerogenih sredstava su:

- spojevi koji u koordinaciji imaju platinu, primjerice cisplatin, karboplatin ili oksaliplatin;
- taksanski spojevi, na primjer paklitaksel ili docetaksel;
- inhibitori topoizomerase I kao što su kamptotekinski spojevi, primjerice, irinotekan ili topotekan;
- inhibitori topoizomerase II kao što su antitumorski derivati podofilotoksina primjerice etopozid ili tenipozid;

- antitumorski vinca alkaloidi na primjer vinblastin, vinkristin ili vinorelbin;
- antitumorski derivati nukleoizida, na primjer, 5-fluoruracil, gemcitabin ili kapecitabine;
- alkilacijska sredstva kao što je dušikov mustard ili nitrozourea, primjerice, ciklofosfamid, klorambucil, karmustin ili lomustin;
- 5 - antitumorski derivati antraciklina, na primjer, daunorubicin, doksorubicin, idarubicin ili mitoksantron;
- HER2 protutijela, na primjer, trastuzumab;
- antagonisti estrogenskog receptora ili selektivni modulatori estrogenskog receptora, primjerice, tamoksifen, toremifen, droloksifen, fasloleks ili raloksifen;
- inhibitori aromataze kao što je eksemestan, anastrozol, letrozol i vorozol;
- 10 - diferencijacijska sredstva kao što su retinoidi, vitamin D i sredstva koja blokiraju metabolizam retinoične kiseline (RAMBA), na primjer, akutan;
- inhibitori DNA metil transferaze, na primjer, azacitidin;
- inhibitori kinaze, na primjer, flavoperidol, imatinibmezilat ili gefitinib;
- inhibitori farnesiltransferaze; ili - ostali inhibitori HDAC.

15 Pojam "spoj koji u koordinaciji ima platinu" ovdje je upotrijebljen kako bi se označio bilo koji spoj koji u koordinaciji ima platinu, a inhibira rast tumorske stanice koji daje platinu u obliku iona.

20 Pojam "taksanski spojevi" ukazuje na razred spojeva koji imaju taksanski prsten i povezani su ili su izvedeni iz ekstrakata određenih vrsta drveća tise (Taxus).

25 Pojam "inhibitori topoizomeraze" upotrijebljen je kako bi se označili enzimi koji mogu promijeniti topologiju DNA u eukariotskim stanicama. Oni su kritični za važne stanične funkcije i staničnu proliferaciju. U eukariotskim stanicama postoje dva razreda topoizomeraza, tip I i tip II. Topoizomeraza I je monomerni enzim od približno 100,000 molekularne mase. Enzim se veže na DNA i inducira prolazno kidanje jednolančanih regija, odmotava dvostruku uzvojnici (ili joj omogućuje da se odmoti) i zatim ponovo pričvršćuje mjesto prekida prije disocijacije od DNA stručaka. Topoizomeraza II ima sličan mehanizam djelovanja koji uključuje prekide DNA stručaka ili nastanak slobodnih radikala.

30 Pojam "kamptotekinski spojevi" upotrijebljen je kako bi se označili spojevi koji su povezani ili izvedeni iz roditeljskog kamptotekinskog spoja koji je alkaloid netopljiv u vodi dobiven iz kineskog drveta Camptothecin acuminata i indijskog drveta Nothapodytes foetida.

35 Pojam "podofilotoksinski spojevi" upotrijebljen je kako bi se označili spojevi koji su povezani ili izvedeni iz roditeljskog podofilotoksina, koji je ekstrahiran iz biljke mandragore.

Pojam "antitumorski vinca alkaloidi" upotrijebljen je kako bi se označili spojevi koji su povezani ili izvedeni iz ekstrakata biljke zimzelena (Vinca rosea).

40 Pojam "alkilacijska sredstva" obuhvaća različitu skupinu kemikalija kojima je zajedničko svojstvo da imaju kapacitet doprinijeti, u fiziološkim uvjetima, alkilnim skupinama biološki vitalnih makromolekula kao što je DNA. S najvažnijim sredstvima kao što su dušikovi muštardi i nitrozouree, aktivne alkilacijske skupine nastale su *in vivo* nakon kompleksnih reakcija razgradnje, od kojih su neke enzimatske. Najvažnija farmakološka djelovanja alkilacijskih sredstava su ona koja ometaju temeljne mehanizme povezane sa staničnom proliferacijom posebno sintezom DNA i staničnom diobom.

45 Kapacitet alkilacijskih sredstava da ometaju funkciju DNA i integritet u brzo rastućim tkivima daje bazu za njihove terapijske primjene i za mnoga od njihovih toksičnih svojstava.

50 Pojam "antitumorski derivati antraciklina" obuhvaća antibiotike dobivene iz gljive *Strep. peulcus var. caesius* i njihove derivate, kojima je svojstvo da u svojoj strukturi imaju tetraciklinski prsten s neuobičajenim šećerom, daunosaminom, vezanim glikozidnom vezom.

55 Pokazalo se da povećanje proteina receptora 2 za faktor rasta humanih epidermalnih stanica (HER 2) u primarnim karcinomima dojke korelira sa slabom kliničkom prognozom za određene pacijente. Trastuzumab je visokopročišćeno rekombinantno humanizirano monoklonalno IgG1 kapa protutijelo izvedeno iz DNA koje se s velikim afinitetom i specifičnošću veže na izvanstaničnu domenu HER2 receptora.

60 Mnogi karcinomi dojke imaju estrogenske receptore i rast tih tumora može se potaknuti estrogenom. Pojmovi "antagonisti estrogenskog receptora" i "selektivni modulatori estrogenskog receptora" upotrijebljeni su kako bi se označili kompetitivni inhibitori estradiola koji se veže na estrogenski receptor (ER). Selektivni modulatori estrogenskog receptora, kada su vezani na ER, induciraju promjenu u trodimenzionalnom obliku receptora, inhibiraju njegovo vezanje na element koji prima estrogen (ERE) na DNA.

U žena u postmenopauzi, glavni je izvor cirkulirajućeg estrogena od pretvaranja adrenalnih i ovarijskih androgena (androstendion i testosteron) u estrogene (estron i estradiol) pomoću enzima aromataze u perifernim tkivima. Gubitak estrogena inhibicijom aromataze ili inaktivacijom je djelotvorno i selektivno liječenje nekih pacijenata u menopauzi koji imaju karcinom dojke ovisan o hormonima.

Pojam "antiestrogensko sredstvo" ovdje se rabi kako bi uključio ne samo antagoniste estrogenskog receptora i selektivne modulatore estrogenskog receptora već također i inhibitore aromataze kako je razmatrano iznad.

Pojam "diferencijacijska sredstva" uključuje spojeve koji mogu, na različite načine, inhibirati proliferaciju stanica i inducirati diferencijaciju. Vitamin D i retinoidi poznati su da imaju glavnu ulogu u regulaciji rasta i diferencijacije velikog mnoštva normalnih i malignih stanica. Sredstva koja blokiraju metabolizam retinoidne kiseline (RAMBA) povećavaju razine endogene retinoidne kiseline inhibiranjem katabolizma retinoidnih kiselina posredovanog citokromom P450.

U humanoj neoplaziji su među najčešćim abnormalnostima promjene DNA metilacije. Hipermetilacija unutar promotora odabranih gena obično je povezana s inaktivacijom uključenih gena. Pojam "inhibitori DNA metil transferaze" upotrijebljen je kako bi se označili spojevi koji djeluju kroz farmakološku inhibiciju DNA metil transferaze ekspresije tumorskog supresorskog gena.

Pojam "inhibitori kinaze" obuhvaća moćne inhibitore kinaza uključene u napredovanje staničnog ciklusa i programiranu smrt stanice (apoptozu).

Pojam "inhibitori farnesil transferaze" upotrijebljen je kako bi se označili spojevi koji su dizajnirani kako da se spriječi farnelizacija Ras i ostalih unutarstaničnih proteina. Za njih je pokazano da djeluju na proliferaciju i opstanak malignih stanica.

Pojam "ostali inhibitori HDAC" obuhvaća, ali nije ograničen na:

- masne kiseline kratkog lanca, primjerice butirat, 4-fenilbutirat ili valproična kiselina;
- hidroksaminske kiseline, na primjer, suberoilanolid hidroksaminsku kiselinu (SAHA), biaril hidroksamat A-161906, bicikličke aril-N-hidroksikarboksamide, piroksamid, CG-1521, PXD-101, sulfonamid hidroksaminsku kiselinu, LAQ-824, trihostatin A (TSA), oksamflatin, skriptaid, m-karboksi cinaminsku kiselinu bishidroksaminsku kiselinu, ili analogon trapoksin-hidroksaminske kiseline;
- cikličke tetrapeptide, primjerice trapoksin, apidicin ili depsipectid;
- benzamide na primjer MS-275 ili CI-994, ili
- depudecin.

Za liječenje karcinoma spojevi prema predloženom izumu mogu se davati pacijentu kako je opisano iznad, zajedno sa zračenjem. Zračenje podrazumijeva ionizirajuće zračenje, posebno gama zračenje, posebno ono koje emitiraju linearni akceleratori ili radionuklidi koji su danas u uobičajenoj uporabi. Zračenje tumora radionuklidima može biti vanjsko ili unutarnje.

Predloženi izum također se odnosi na kombinaciju prema izumu antikancerogenog sredstva i inhibitora HDAC prema izumu.

Predloženi izum također se odnosi na kombinaciju prema izumu za uporabu u medicinskom liječenju, primjerice za inhibiranje rasta tumorskih stanica.

Predloženi izum također se odnosi na kombinacije prema izumu za inhibiranje rasta tumorskih stanica.

Predloženi izum također se odnosi na postupak inhibiranja rasta tumorskih stanica u čovjeka koji obuhvaća davanje subjektu djelotvorne količine kombinacije prema izumu.

Izum dalje donosi postupak inhibiranja abnormalnog rasta stanica, uključujući promijenjene stanice, davanjem djelotvorne količine kombinacije prema izumu.

Drugo medicinsko sredstvo i inhibitor HDAC mogu se dati istovremeno (npr. u odvojenim ili jediničnim pripravcima) ili u slijedu, bilo kojim redom. U potonjem slučaju, dva spoja dat će se u periodu i količini i na način koji je dovoljan da bude sigurno da je postignut povoljan ili sinergistički učinak. Podrazumijeva se da će postupak ili redoslijed davanja i pojedine količine doziranja i režimi za svaku komponentu kombinacije ovisiti o određenom drugom medicinskom sredstvu i inhibitoru HDAC koji se daje, načinu njihova davanja, tumoru kojeg se liječi te pacijentu kojeg se liječi. Optimalni postupak i redoslijed davanja i količine doze te režim mogu jednostavno odrediti osobe vične struci uobičajenim postupcima te s obzirom na ovdje iznesene informacije.

Povoljno je da se platinski koordinacijski spoj daje u dozi od 1 do 500 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, primjerice 50 do 400 mg/m^2 , posebno za cisplatin u dozi od oko 75 mg/m^2 i za karboplatin u oko 300 mg/m^2 tijekom liječenja.

5

Povoljno je da se taksanski spoj daje u dozi od 50 do 4 00 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, na primjer 75 do 250 mg/m^2 , posebno za paklitaksel u dozi od oko 175 do 250 mg/m^2 i ferdocetaksel u oko 75 do 150 mg/m^2 tijekom liječenja.

10 Povoljno je da se kamptotekinski spoj daje u dozi od 0.1 do 400 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, na primjer 1 do 300 mg/m^2 , posebno za irinotekan u dozi od oko 100 do 350 mg/m^2 i za topotekan u oko 1 do 2 mg/m^2 tijekom liječenja.

15 Povoljno je da se antitumorski derivat podofilotoksina daje u dozi od 30 do 300 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, primjerice 50 do 250 mg/m^2 , posebno za etopozid u dozi od oko 35 do 100 mg/m^2 i fortienipozid u oko 50 do 250 mg/m^2 po liječenju.

20 Povoljno je da se antitumorski vinca alkaloid daje u dozi od 2 do 30 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, posebno za vinblastin u dozi od oko 3 do 12 mg/m^2 , za vinkristin u dozi od oko 1 do 2 mg/m^2 , i za vinorelbin u dozi od oko 10 do 30 mg/m^2 po liječenju.

25 Povoljno je da se antitumorski nukleozidni derivat daje u dozi od 200 do 2500 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, na primjer 700 do 1500 mg/m^2 , posebno za 5-FU u dozi od 200 do 500 mg/m^2 , za gemcitabin u dozi od oko 800 do 1200 mg/m^2 i za kapecitabin u oko 1000 do 2500 mg/m^2 po liječenju.

30 Povoljno je da se alkilacijska sredstva kao što je dušikov mustard ili nitrozourea daju u dozi od 100 do 500 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, na primjer 120 do 200 mg/m^2 , posebno forciklofosfamid u dozi od oko 100 do 500 mg/m^2 , za klorambucil u dozi od oko 0.1 do 0.2 mg/kg , za karmustin u dozi od oko 150 do 200 mg/m^2 , i za lomustin u dozi od oko 100 do 150 mg/m^2 po liječenju.

35 Povoljno je da se antitumorski derivat antraciklina daje u dozi od 10 do 75 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, primjerice 15 do 60 mg/m^2 , posebno za doksorubicin u dozi od oko 40 do 75 mg/m^2 , za daunorubicin u dozi od oko 25 do 45 mg/m^2 , i za idarubicin u dozi od oko 10 do 15 mg/m^2 po liječenju.

40 Povoljno je da se trastuzumab daje u dozi od 1 do 5 mg po kvadratnom metru (mg/m^2) površine tijela, posebno 2 do 4 mg/m^2 po liječenju.

45 Povoljno je da se antiestrogensko sredstvo daje u dozi od oko 1 do 100 mg dnevno ovisno o određenom sredstvu i stanju koje se liječi. Povoljno je da se tamoksifen daje oralno u dozi od 5 do 50 mg, poželjno 10 do 20 mg dvaput dnevno, nastavljajući liječenje dovoljno vremena kako bi se postigao i održao terapijski učinak. Povoljno je da se toremifen daje oralno u dozi od 60 mg jedanput dnevno, nastavljajući liječenje dovoljno vremena kako bi se postigao i održao terapijski učinak. Povoljno je da se anastrozol daje oralno u dozi od oko 1 mg jedanput dnevno. Povoljno je da se droloksifen daje oralno u dozi od oko 20-100 mg jedanput dnevno. Povoljno je da se raloksifen daje oralno u dozi od oko 60 mg jedanput dnevno. Povoljno je da se eksemestan daje oralno u dozi od 25 mg jedanput dnevno.

Ove doze mogu se davati primjerice jedanput, dvaput ili više puta tijekom liječenja, koje se može ponoviti na primjer svakih 7, 14, 21 ili 28 dana.

50 U pogledu njihovih korisnih farmakoloških svojstava, komponente kombinacija prema izumu, tj. drugo medicinsko sredstvo i inhibitor HDAC mogu se formulirati u različitim farmaceutskim oblicima u svrhu davanja. Komponente mogu biti formulirane odvojeno u pojedinačnim farmaceutskim pripravcima ili kao jedinični farmaceutski pripravci koji sadrže obje komponente.

55 Prema tome predloženi izum također se odnosi na farmaceutski pripravak koji obuhvaća drugo farmaceutsko sredstvo i inhibitor HDAC zajedno s jednim ili više farmaceutskih prijenosnika.

Predloženi izum također se odnosi na kombinaciju prema izumu u obliku farmaceutskog pripravka koji obuhvaća antikancerogeno sredstvo i inhibitor HDAC inhibitor prema izumu zajedno s jednim ili više farmaceutskih prijenosnika.

60 Predloženi izum dalje se odnosi na primjenu kombinacije prema izumu u proizvodnji farmaceutskog pripravka za inhibiranje rasta tumorskih stanica.

Predloženi izum dalje se odnosi na produkt koji kao prvi aktivni sastojak sadrži inhibitor HDAC prema izumu i kao drugi aktivni sastojak antikancerogeno sredstvo, kao kombinirani pripravak za istovremenu, odvojenu ili sekvencijalnu uporabu u liječenju pacijenata koji pate od karcinoma.

5 Eksperimentalni dio

Sljedeći primjeri dani su u svrhu ilustracije.

Od sada pa nadalje "BINAP" znači 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil, "BSA" znači goveđi serum albumin, "DCM" znači diklorometan, "DIC" znači diizopropilkarbodiimid, "DIEA" znači diizopropiletilamin, "DIPE" znači diizopropileter, "DMAP" znači dimetilaminopiridin, "DMF" znači dimetilformamid, "EDC" znači N' - (etilkarbonimidol) -N,N-dimetil-1,3-propandiamin, monohidroklorid, "DMSO" znači dimetilsulfoksid, "EtOAc" znači etilacetat, "Hepes" znači 4-(-2-hidroksietil)-1-piperazin-etansulfonska kiselina, "iPrOH" znači izopropil, "HOBT" znači 1-hidroksi-1H-benzotriazol, "MeOH" znači metanol, "EtOH" znači etanol, "NMP" znači N-metilpirolidinon, "TEA" znači trietilamin, "TFA" znači trifluoroctena kiselina, "TIS" znači triizopropilsilan, "THF" znači tetrahidrofuran i "THP" znači tetrahidropiranol.

A. Pripravljane intermedijara

20 Primjer A1

a) TEA (0.088 mol, 12.4 ml) dodana je na 10°C otopini 4-amino-1-piperidinkarboksilne kiseline, etil-estera (0.044 mol, 7.6 g) u DCM (110 ml) u struji N₂. Dodana je kap po kap otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.044 mol) u DCM (50 ml). Smjesa je miješana na 10°C 1 sat i 30 minuta, ulivena u ledenu vodu te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak je umiješan u dietileter, talog profiltriran i isušen dajući 13.8g 4-[(2-naftalenilsulfonil)amino]-1-piperidinkarboksilne kiseline, etil estera, tališne točke 128°C, intermedijara 1.

b) Smjesa interm. 1 (0.072 mol) u HCl 12N (290 ml) miješana je i refluksirana 48 sati, zatim ohlađena na sobnu temperaturu, izlivena u ledenu vodu i zaluzena s NH₄OH. Talog je profiltriran, ispran s vodom, zatim s dietileterom i isušen, dajući 15.78 g (76%) N-4-piperidinil-2-naftalensulfonamida, tališne točke 172°C, intermedijara 2.

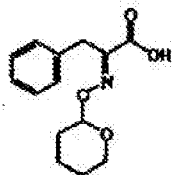
c) NaH 60% (0.0066 mol) dodan je u obrocima otopini interm. 2 (0.0033 mol) u THF(10 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat, zatim ohlađena na 0°C. Na brzinu je dodana je kap po kap otopina 2-(metilsulfonil)-5-pirimidinkarboksilne kiseline, etil estera (0.0043 mol) u THF (8 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 2 sata, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (1.64 g) je kristalizirao iz CH₃OH/dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.925 g (63%) 2-[4-[(2-naftalenilsulfonil)amino]-1-piperidinil]-5-pirimidinkarboksilne kiseline, etil estera, intermedijara 3.

d) Smjesa interm. 3 (0.0021 mol) i kalijeve hidroksida (0.0084 mol) u etanolu (20 ml) miješana je i refluksirana preko noći, zatim ohlađena na sobnu temperaturu, izlivena u ledenu vodu te zaluzena s HCl 3N. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.66 g (76%) 2-[4-[(2-naftalenilsulfonil)amino]-1-piperidinil]-5-pirimidinkarboksilne kiseline, tališne točke > 260°C, intermedijara 4.

e) TEA (0.0019 mol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etil-karbodimid hidroklorid (0.0019 mol), 1-hidroksibenzotriazol (0.0019 mol) i 0-(tetrahidro-2H-piran-2-il)-hidroksilamin (0.0019 mol) dodani su na sobnoj temperaturi otopini interm. 4 (0.0014 mol) u DCM/THF 50/50 (20 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 24 sata, izlivena u ledenu vodu. Dodan je DCM. Talog je profiltriran, ispran s vodom i isušen, dajući 0.261 g (34%) 2-[4-[(2-naftalenilsulfonil) amino]-1-piperidinil]-N-[(tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi]-5-pirimidincarboksamida, tališne točke 22 6°C, intermedijara 5.

Primjer A2

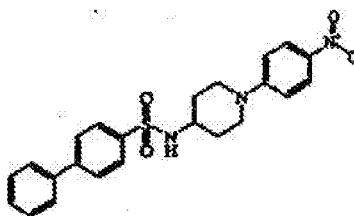
a) Pripravljanje



intermediara 6

5 (0-(tetrahydro-2H-piran-2-yl)-hidroksilamin (0.0085 mol) dodan je na sobnoj temperaturi smjesi α -okso-benzenpropan
kisljine (0.0078 mol) u piridinu (12 ml) i EtOH (23 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat. Otapalo je
upareno do suhog. Ostatak (2.6 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μ m) (eluens:
CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 85/15/1 70/30/3). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 1.7 g (83%)
intermedijara 6.

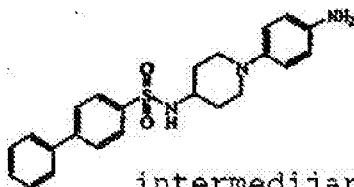
b) Pripravljanje



intermedijsara 7

15 [1,1'-bifenil]-4-sulfonil klorid (0.0085 mol) dodan je na 5°C smjesi 1-(4-nitrofenil)-4-piperidinamina (0.0071 mol) i TEA (0.0085 mol) u DCM (15 mol) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodan je 10% K₂CO₃. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄, profiltriran, i otapalo upareno do suhog, dajući 4.1 g (> 100%) intermedijara 7.

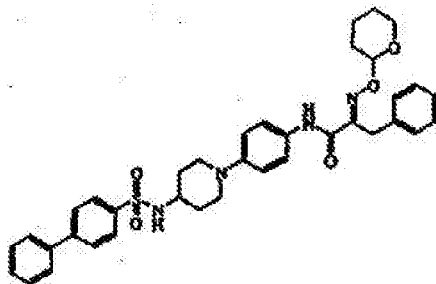
c) Pripravljanje



intermediijara 8

20 Titanov klorid (0.0568 mol) dodan je na sobnoj temperaturi smjesi intermedijara 7 (0.0071 mol) u THF (140 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati, izlivena na led, zaljučena s NaOH 3N, ekstrahirana s DCM i profiltrirana preko dijatomejske zemlje. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak je umiješan u dietileter. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.9 g (31%) intermedijara 8, tališne točke 200°C .

d) Pripravljanje



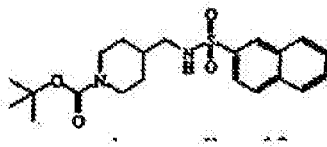
intermediara 9

EDC (0.0012 mol) je dodan smjesi intermedijara 8 (0.0009 mol), intermedijara 6 (0.0012 mol) i HOBT (0.0012 mol) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodan je 10% K₂CO₃. Smjesa je ekstrahirana s DCM.

Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (0.94 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 98.5/1.5/0.1). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.5 g, 78%) je kristalizirao iz CH_3CN /dietil etera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.426 g (66%) intermedijara 9, tališne točke 190°C .

Primjer A3

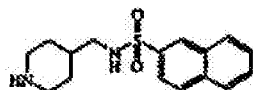
a) Pripravljjanje



intermedijara 10

- 10 Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.015 mol) u DCM (30 ml) dodana je na 0°C otopini 4-(aminometil)-1-piperidinkarboksilne kiseline, 1,1-dimetiletil estera (0.014 mol) i TEA (0.022 mol) u DCM (30 ml) u struji N_2 . Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je ispran s 10% K_2CO_3 , isušen (MgSO_4), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (6 g) je kristalizirao iz dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 4.8 g (84%) intermedijara 10, tališne točke 148°C .

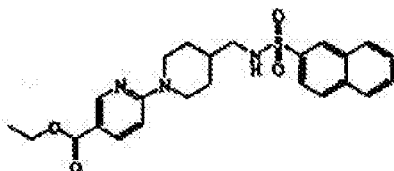
b) Pripravljjanje



intermedijara 11

- 20 Smjesa intermedijara 10 (0.0114 mol) u HCl 3N (50 ml) i THF (10 ml) miješana je na 80°C 12 sati, izlivena u ledenu vodu, zaluzena s NH_4OH i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno, dajući 2.6 g (74%) intermedijara 11, tališne točke 160°C .

c) Pripravljjanje

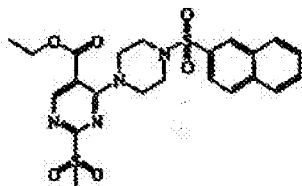


intermedijara 12

- 25 Natrijev hidrid 60% (0.0098 mol) u obrocima je dodan na 0°C smjesi intermedijara 11 (0.0049 mol) u DMF (20 ml) u struji N_2 . Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat. Dodana je otopina 6-kloro-3-piridinkarboksilne kiseline, etil estera (0.0064 mol) u DMF (10 ml). Smjesa je miješana na 80°C 12 sati, zatim ohlađena, izlivena u ledenu vodu i miješana na sobnoj temperaturi 1 sat. Talog je profiltriran, ispran s vodom, zatim s dietil-eterom i isušen, dajući 1.2 g (54%) intermedijara 12, tališne točke 172°C .

Primjer A4

Pripravljjanje



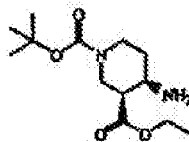
intermedijara 13

- 35 Natrijev hidrid 60% (0.015 mol) u obrocima je dodan na sobnoj temperaturi smjesi 1-(2-naftalenilsulfonil)-piperazina (0.0075 mol) u THF (35 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat i 30 minuta u struji N_2 . Dodana je kap po kap otopina 4-kloro-2-(metilsulfonil)-5-pirimidinkarboksilne kiseline, etil estera (0.0098 mol) u THF (35 ml). Smjesa je

miješana na sobnoj temperaturi 3 sata i 30 minuta, izlivena u ledenu vodu i ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (4.6 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: cikloheksan/EtOAc 80/20 do 20/80). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 0.9 g (24%) intermedijara 13, tališne točke 80°C .

Primjer A5

a) Pripravljajanje

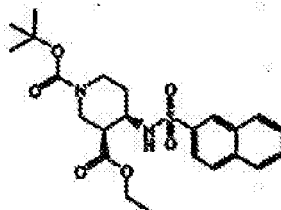


CIS

intermedijara 14

Smjesa 4-okso-1,3-piperidindikarboksilne kiseline, 1-(1,1-dimetiletil)-3-etil estera (0.02 mol), benzenmetanamina (0.022 mol) i Pd/C (1 g) u EtOH (100 ml) hidrogenirana je na 50°C 48 sati pod tlakom od 3 bara, zatim profiltrirana preko dijatomejske zemlje. Filtrat je uparen do suhog. Ostatak (5.9 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 93/7/0.5). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 2.6 g (48%) intermedijara 14 (CIS).

b) Pripravljajanje

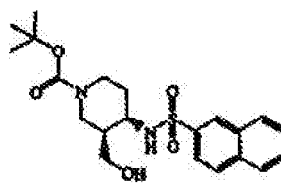


CIS

intermedijara 15

Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.0105 mol) u DCM (10 ml) dodana je na 5°C smjesi intermedijara 14 (0.0095 mol) i TEA (0.0134 mol) u DCM (30 ml). Smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi, izlivena u 10% K_2CO_3 i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog, dajući 5.1 g (> 100%) intermedijara 15 (CIS). Ovaj produkt je izravno upotrijebljen u sljedećem reakcijskom koraku.

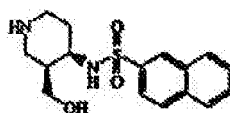
c) Pripravljajanje



CIS

intermedijara 16

Otopina intermedijara 15 (0.0089 mol) u THF (40 ml) dodana je kap po kap na 5°C smjesi tetrahidro-aluminata (1-), litij (0.0098 mol) u THF (40 ml) u struji N_2 . Smjesa je miješana 2 sata. Dodan je EtOAc, zatim hladna voda. Smjesa je ekstrahirana s EtOAc i profiltrirana preko dijatomejske zemlje. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (3.6 g) je kristalizirao iz DIPE. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 2.6 g (71%) intermedijara 16 (CIS), tališne točke 190°C .

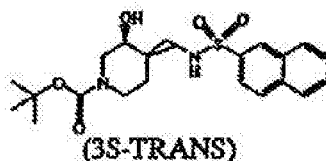
d) Pripravljnje

CIS

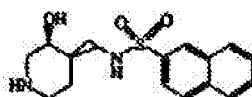
intermedijara 17

Smjesa intermedijara 16 (0.0061 mol) u HCl/iPrOH (50 ml) miješana je na 50°C 8 sati. Talog je profiltriran, ispran s dietil-eterom i isušen, dajući 1.6 g (73%) intermedijara 17 (CIS), tališne točke 206°C.

5

Pripravljnje A6a) Pripravljnje(3S-TRANS)
intermedijara 18

- 10 Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.016 mol) u DCM (40 ml) dodana je kap po kap na 0°C smjesi 1,1-dimetiletil(3S-trans)-4-(aminometil)-3-hidroksi-1-piperidin karboksilat α -hidroksibenzenacetata (1:1) (0.013 mol) i TEA (0.04 mol) u DCM (100 ml) u struji N₂. Smjesa je dovedena na sobnu temperaturu, miješana preko noći, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je ispran s 10% K₂CO₃, isušen (MgSO₄), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (5.5 g) je kristalizirao iz CH₃CN/DIPE. Talog je odfiltriran i isušen. Dio taloga (1 g) (4.4 g, 80%) je kristalizirao iz vrućeg
- 15 CH₃CN. Talog je profiltriran, ispran s dietileterom i isušen, dajući 0.3 g intermedijara 18 (3S-TRANS), tališne točke 160°C.

b) Pripravljnje

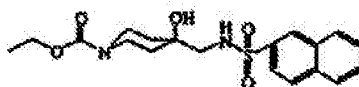
(3S-TRANS)

intermedijara 19

- 20 HCl/iPrOH (15 ml) dodana je na 0°C smjesi intermedijara 18 (0.0036 mol) u iPrOH (20 ml). Smjesa je dovedena na sobnu temperaturu, miješana i otapalo upareno. Dodani su led i voda. Organski sloj je zalužen s NH₄OH. Talog je profiltriran, ispran s dietileterom i isušen, dajući 0.9 g (78%) intermedijara 19 (3S-TRANS), tališne točke 200°C.

Primjer A7

25

a) Pripravljnje

intermedijara 20

- Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.0238 mol) u DCM (40 ml) dodana je kap po kap na 0°C smjesi 4-(aminometil)-4-hidroksi-1-piperidinkarboksilne kiseline, etil estera (0.0198 mol) i TEA (0.036 mol) u DCM (100 ml). Smjesa je preko noći dovedena do sobne temperature, izlivena u ledenu vodu i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je ispran s 10% K₂CO₃, isušen (MgSO₄), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (7.6 g) je kristalizirao iz CH₃CN/DIPE. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 6.2 g (80%) intermedijara 20, tališne točke 145°C.
- 30

b) Pripravljanje

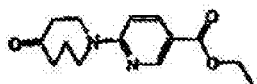
intermedijara 21

Smjesa intermedijara 20 (0.0076 mol) u HCl 6N (50 ml) miješana je i refluksirana 72 sata, zatim ohlađena na sobnu temperaturu i otapalo upareno. Smjesa je zaluzena s NaOH 3N. Dodan je EtOAc. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi preko noći. Talog je profiltriran i isušen, dajući 2.5 g (100%) intermedijara 21.

Primjer A8a) Pripravljanje

intermedijara 22

Natrijev hidrid, 60% u ulju (0.024 mol), u obrocima je na 5°C dodan smjesi 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.6]undekan (0.02 mol) u DMF (30 ml) u struji N₂. Smjesa je dovedena do sobne temperature i miješana 30 minuta. Dodan je etil ester 6-kloro-3-piridinkarboksilne kiseline (0.024 mol). Smjesa je miješana na 90°C 2 sata. Dodana je voda. Smjesa je nekoliko puta ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog, dajući 4.7 g (77%) intermedijara 22.

b) Pripravljanje

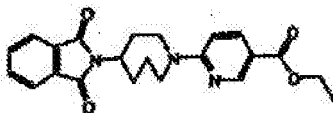
intermedijara 23

Smjesa intermedijara 22 (0.0153 mol) u HCl 3N (45 ml) i MeOH (20 ml) miješana je i refluksirana 18 sati, izlivna na led, zaluzena s NH₄OH i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (2.3 g, 57%) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-35 μm) (eluens: cikloheksan/EtOAc 60/40). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 1.1 g (27%) intermedijara 23.

c) Pripravljanje

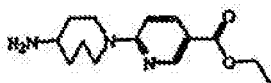
intermedijara 24

Natrijev borohidrid (0.0046 mol) dodan je na 5°C smjesi intermedijara 23 (0.0041 mol) u MeOH (10 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog, dajući 1.2 g (100%) intermedijara 24.

d) Pripravljanje

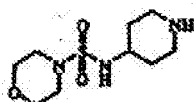
intermedijara 25

Smjesa intermedijara 24 (0.041 mol), 1H-izoindol-1,3(2H)-diona (0.0054 mol) i trifetilfosfina (0.0054 mol) u THF (10 ml) miješana je na sobnoj temperaturi u struji N₂. Kap po kap dodan je bis(1-metiletil)ester diazendikarboksilne kiseline, (0.0054 mol). Smjesa je miješana 18 sati. Dodan je 10% K₂CO₃. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (4.6 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (eluens: cikloheksan/EtOAc 70/30; 15-40 μm). Dvije frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 0.55 g (33%) intermedijara 25.

e) Pripravljanje

intermedijara 26

- 5 Hidrazin, monohidrat (0.54 mol) dodan je smjesi intermedijara 25 (0.0014 mol) u EtOH (6 ml). Smjesa je miješana i refluksirana 2 sata. Dodan je zasićeni NaCl. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), filtriran i otapalo upareno do suhog, dajući 0.4 g (> 100%) intermedijara 26.

Primjer A910 Pripravljanje

.HCl

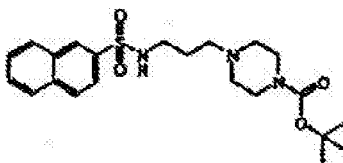
intermedijara 37

- 15 1-kloroetil ester kloroformat, (0.0088 mol) dodan je smjesi N-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-4-morfolinsulfonamida (0.0055 mol) u 1,2-dikloroetanu (20 ml). Smjesa je miješana i refluksirana 18 sati. Otapalo je upareno do suhog. Ostatak je umiješan u MeOH. Smjesa je miješana i refluksirana preko vikenda. Otapalo je upareno do suhog. Ostatak je kristalizirao iz EtOH/dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.95 g (60%) intermedijara 37, tališne točke 240°C.

Primjer A10a) Pripravljanje

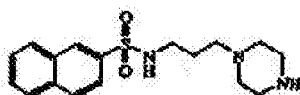
intermedijara 38

- 20 TEA (0.03 mol), zatim otopina 2-naftalensulfonil-klorida (0.01 mol) u DCM (20 ml) dodani su na 5°C otopini 3-bromo-1-propanamin, hidrobromida (0.01 mol) u DCM (25 ml) u struji N₂. Smjesa je dovedena na sobnu temperaturu, zatim miješana 2 sata i otapalo upareno na 40°C do suhog, dajući 3.28 g (> 100%) intermedijara 38.

25 b) Pripravljanje

intermedijara 39

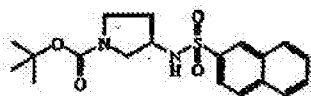
- 30 Smjesa intermedijara 38 (0.01 mol), 1,1-dimetiletil estera 1-piperazinkarboksilne kiseline, (0.011 mol) i kalijeva karbonata (0.03 mol) u acetonitrilu (40 ml) miješana je na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), filtriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (5.1 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: DCM/MeOH 98/2). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 3.7 g (85%) intermedijara 39.

c) Pripravljajanje

.HCl

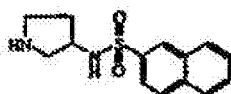
intermedijara 40

HCl 3N (35 ml) dodan je smjesi intermedijara 39 (0,0083 mol) u THF (10 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Otapalo je upareno do suhog. Ostatak je umiješan u EtOH. Otapalo je upareno do suhog. Ostatak je umiješan u dietileter. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 2.8 g (91%) intermedijara 40.HCl, tališne točke: 190°C.

Primjer A11a) Pripravljajanje

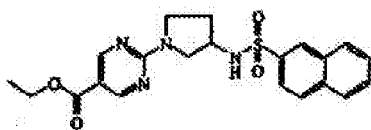
intermedijara 41

Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.043 mol) u DCM (50 ml) dodana je na 10°C otopini 1,1-dimetiletil estera 3-amino-1-pirolidinkarboksilne kiseline (0.041 mol) i TEA (0.0615 mol) u DCM (200 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 4 sata, zatim izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (46 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (20-45 um) (eluens:DCM/EtOAc 90/10 do DCM/MeOH 95/5). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 18 g (>100%) intermedijara 41.

b) Pripravljajanje

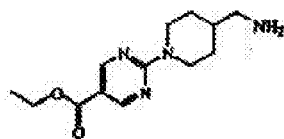
intermedijara 42

Smjesa intermedijara 41 (0.046 mol) u HCl 3N (180 ml) i THF (45 ml) miješana je na 80°C preko noći, zatim je ohlađena na sobnu temperaturu, izlivena u ledenu vodu, zaluzena s NH₄OH i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (17 g) je kristalizirao iz DIPE. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 9.33 g (73%) intermedijara 42, tališne točke 158°C.

c) Pripravljajanje

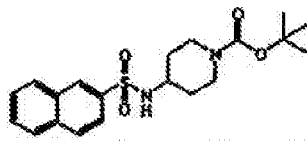
intermedijara 43

Otopina etil estera 2-(metilsulfonil)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0195 mol) u acetonitrilu (40 ml) dodana je kap po kap na 10°C otopini intermedijara 42 (0.015 mol) i kalijeva karbonata (0.03 mol) u acetonitrilu (100 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat i 30 minuta, izlivena u ledenu vodu i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (7.64 g) je kristalizirao iz CH₃CN/dietil etera. Talog je profiltriran, ispran s dietileterom i isušen, dajući 2.21 g (35%) intermedijara 43, tališne točke:180°C.

Primjer A12Pripravljanje

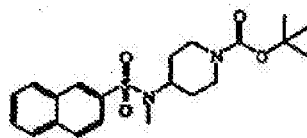
intermedijara 44

- 5 Otopina etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline, (0.0434 mol) u acetonitrilu (100 ml) dodana je kap po kap na 10°C otopini 4-piperidinmetanamina (0.0868 mol) i kalijeva karbonata (0.0434 mol) u acetonitrilu (200 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 2 sata, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (14.18 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (20-45 μm) (eluens: DCM/MeOH/NH₄OH 90/10/1 do 80/20/2). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 3.7 g (32%) intermedijara 44.

Primjer A13a) Pripravljanje

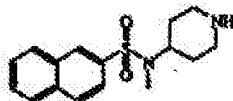
intermedijara 45

- 15 Smjesa 1,1-dimetiletil estera 4-amino-1-piperidinkarboksilne kiseline (0.025 mol) i TEA (0.035 mol) u DCM (30 ml) miješana je na 5°C u struji N₂. Dodana je otopina 2-naftalensulfonyl klorida (0.0275 mol) u DCM (20 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (11.6 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (20-45 μm) (eluens: DCM/MeOH 98/2). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 7.5 g (77%) intermedijara 45.

b) Pripravljanje

intermedijara 46

- 25 Natrijev hidrid, 60% u ulju, (0.0033 mol) u obrocima je dodan na sobnoj temperaturi smjesi intermedijara 45 (0.0028 mol) u DMF (15 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana 1 sat. Dodan je jodometan (0.0033 mol). Smjesa je miješana na 80°C 3 sata. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (1.24 g) je otopljen u acetonitrilu. Smjesa je kristalizirala iz DIPE. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.64 g (56%) intermedijara 46, tališne točke 130°C.

c) Pripravljanje

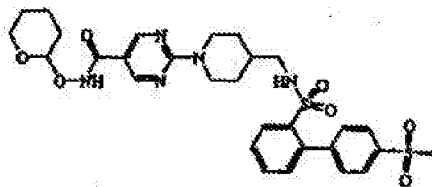
intermedijara 47

- 35 Trifluorooctena kiselina (1.5 ml) dodana je smjesi intermedijara 46 (0.0015 mol) u DCM (15 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 48 sati, izlivena na led i NH₄OH te ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog, dajući 0.474 g (100%) intermedijara 47.

Primjer A14

Bohdan Miniblock™ tresao 2 sata na sobnoj temperaturi. Smjese su odfiltrirane, smola isprana s DCM (2 mL), i filtrat koncentriran. Produkt je zatim obrađen sa smjesom THF (1 mL) i vodenom otopinom NaOH (1 mL, 1N) 48 sati na sobnoj temperaturi. Konačno, smjesa je neutralizirana dodatkom vodene otopine HCl (1 mL, 1 N), i isušena na 70°C u struji dušika, dajući intermedijar 50.

d) Prpripravljanje



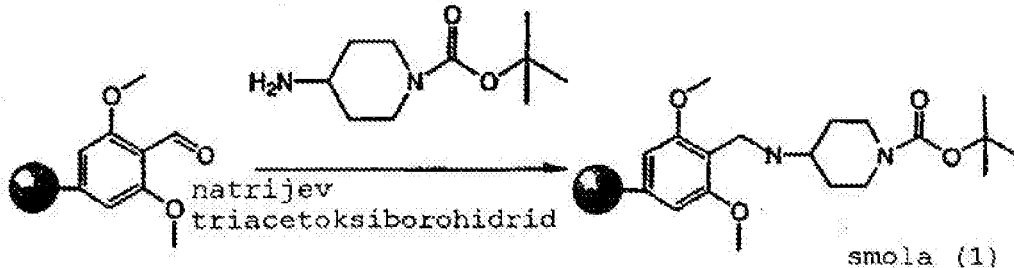
intermedijara 51

U intermedijar 50 (0.1 mmol) redom su dodani HOBT (0.13 mmol) otopljen u suhom THF (1 mL), EDCI (0.13 mmol), otopljen u suhom THF (1 mL), i TEA (0.15 mmol). Smjesa se tresla na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim je dodan tetrahidropiran-O-protektirani hidroksilamin (0.13 mmol) otopljen u suhom THF (1 mL) te se reakcijska smjesa tresla preko noći. Otapala su uparena i produkt pročišćen pomoću HPLC normalnih faza, dajući intermedijar 51.

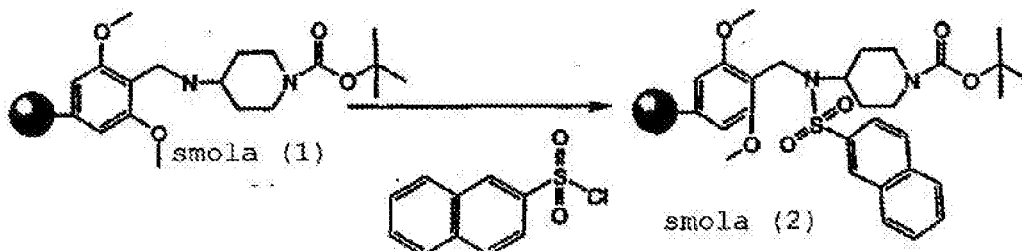
B. Pripravljanje konačnih spojeva

Primjer B1

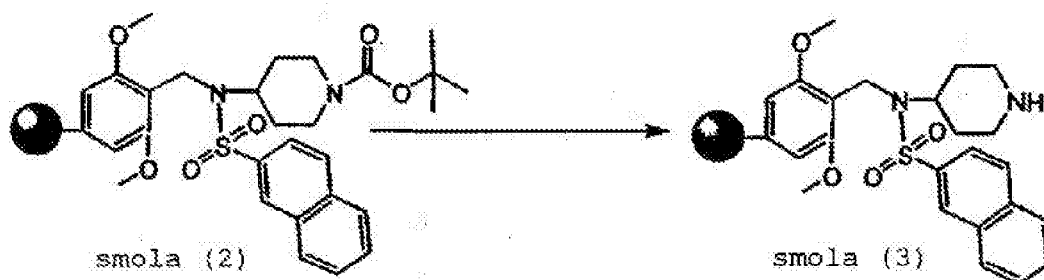
a) Pripravljanje smole (1): Smjesa Novabiochem 01-64-0261 komercijalne smole (200 mg, punjenje: 0,94 mmol/g), mono N-Boc-4-aminopiperidina (188 mg) i titan (IV) izopropoksida ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$) (277 μL) u DCM (4 mL) blago se tresla 90 minuta na sobnoj temperaturi. Dodan je natrijev triacetoksiborohidrid (199 mg) te se reakcijska smjesa blago tresla preko noći na sobnoj temperaturi, zatim je smola profiltrirana, jednom isprana s DCM, jednom s MeOH, zatim dvaput s DCM/DIEA 10%, triput isprana najprije s DCM, zatim triput s metanolom, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH. Ovo je dalo smolu koja je identificirana kao smola (1), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.



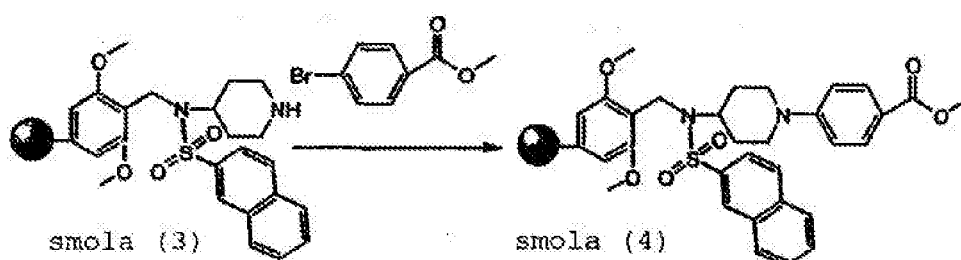
b) Pripravljanje smole (2): Smola (1) triput je isprana s DCM. Smoli (1) dodan je 2-naftalensulfonil klorid (215 mg) u 4 mL DCM i DIEA (307 μL), smola se blago tresla preko noći, smola je profiltrirana, isprana 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH. Ovo je dalo smolu (2), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.



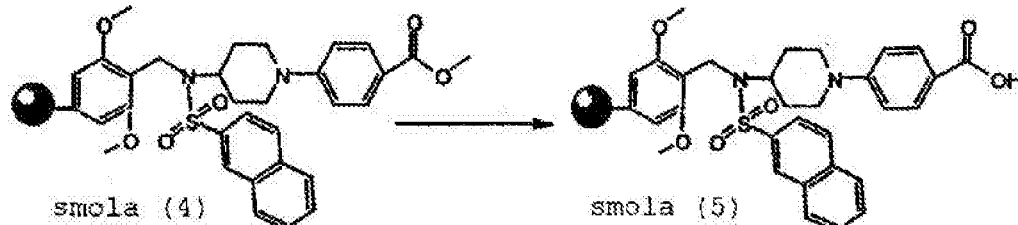
c) Pripravljanje smole (3): Smola (2) triput je isprana s DCM. U smolu (2) dodano je 4 mL TMSOTf-2,6-lutidina (1M/1,5M) u DCM, smola se blago tresla 3 h na sobnoj temperaturi, smola je profiltrirana, isprana s 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH. Ovo je dalo smolu (3), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.



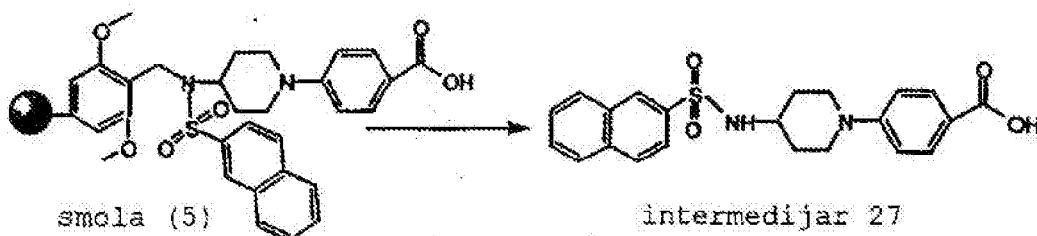
d) Pripravljanje smole (4): Smola (3) triput je isprana s toluenom. U smolu (3) dodan je 4-bromo metilbenzoat (606 mg) u 3 ml toluena i BINAP (117 mg) i Cs_2CO_3 (326 mg), smola se blago tresla 45 min na sobnoj temperaturi pod dušikom. Reakcijskoj smjesi dodan je $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ u 1 ml toluena. Smola se blago tresla 18 h na 110°C pod dušikom. Smola je topla profiltrirana, isprana 3x s DMF na 80°C , 3x s H_2O na 80°C , 3x s DMF na 80°C , isprana 3x s DMF na sobnoj temperaturi, 3x s H_2O , 3x s DMF, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM. Ovo je dalo smolu (4), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.



e) Pripravljanje smole (5): Smola (4) triput je isprana s NMP. U smolu (4) dodan je kalijev trimetilsilanolat (KOSiMe_3) (240 mg) u 4 ml NMP, smola se blago tresla 24 h na 50°C , smola je profiltrirana, isprana s 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH, 3x DCM, 3x MeOH. Ovo je dalo smolu (5), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.



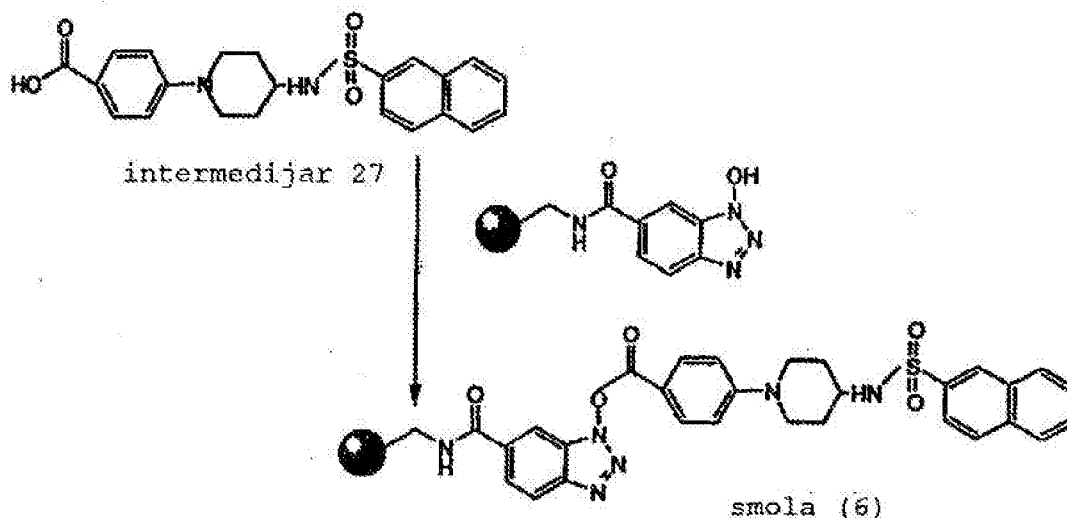
f) Pripravljanje intermedijara 27: Smola (5) triput je isprana s DCM. U smolu (5) dodano je 5 ml TFA/TIS/DCM (5:2:93), smola se blago tresla 2 h na sobnoj temperaturi, smola je profiltrirana, isprana s DCM. Na filtrat je osušen upuhivanjem dušika na 50°C , dodan je DCM (2 ml) te je osušen upuhivanjem dušika na 50°C , dodan je DCM (2 ml) te je osušen upuhivanjem dušika na 50°C . Ovo je dalo slobodnu karboksilnu kiselinu (intermedijar 27) kao TFA-sol; donos 66 mg.



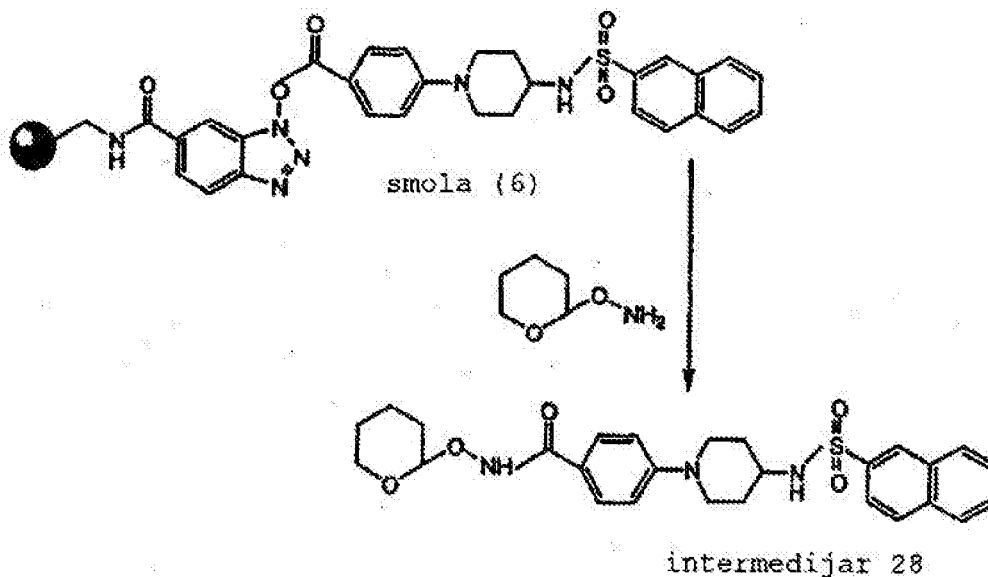
g) Pripravljanje smole (6) postupak A:

Intermedijar 27 koncentriran je na 50°C u dušiku s tionil-kloridom (SOCl_2) (1 ml), dodan je DCM (2ml) te je osušen upuhivanjem dušika na 50°C , dodan je DCM (2 ml) te je osušen upuhivanjem dušika na 50°C . Dodan je DCM (3 ml) te je otopina dodana komercijalnoj smoli Novabiochem 01-64-0425 (300 mg, punjenje: 1,3 mmol/g), smjesi je dodan 1 ml 2,6-lutidina i 1 ml DCM. Smola se blago tresla 1 h, smola je profiltrirana, isprana s 3x DMF, 3x DCM, 3x DMF. Ovo je dalo smolu (7), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.

- h) Pripravljane smole (6) postupak B: Intermedijar 27 obrađen je s DCM, NEt_3 i H_2O i nekoliko kapi MeOH . Ovo je osušeno preko extrelute 3N i osušeno upuhivanjem dušika na 50°C . Triput je dodan DCM (3 ml) te je osušeno upuhivanjem dušika na 50°C . Slobodna baza otopljen je u DCM/DMF ml/ml te je otopina dodana komercijalnoj smoli Novabiochem 01-64-0425 (300 mg, punjenje: 1,3 mmol/g), u smjesu je dodan DMAP (10 mg). Smola se blago tresla 15 min na sobnoj temperaturi, dodan je DPCDI (70 μl). Smola se blago tresla 4 h na sobnoj temperaturi, smola je profiltrirana, isprana s 3x DMF, 3x DCM, 3x DMF. Ovo je dalo smolu (7), koja je upotrijebljena u sljedećem reakcijskom koraku bez daljnjeg pročišćavanja.

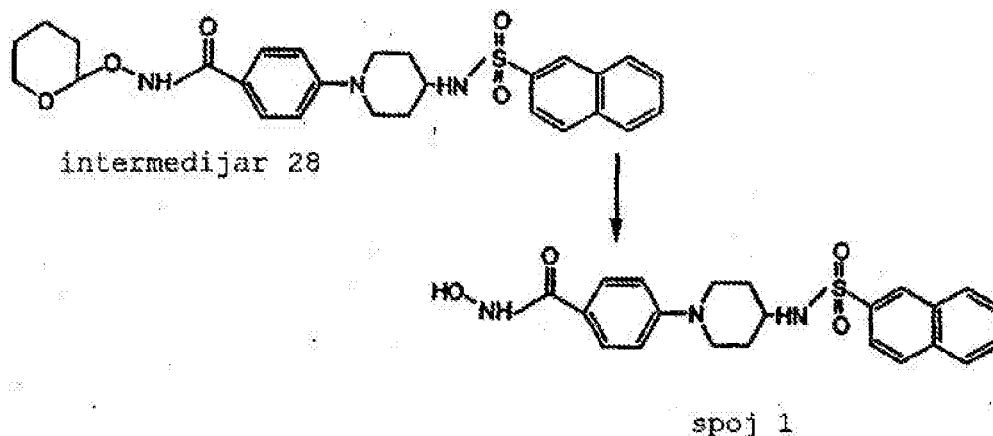
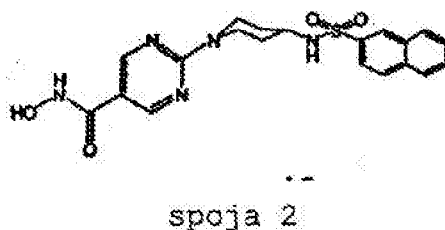


- i) Pripravljane intermedijara 28: U smolu (6) dodan je O-(tetrahidr-2H-piran-il)-hidroksilamin (60 mg) u 4 ml DCM, smola se blago tresla 18 h na sobnoj temperaturi, te je profiltrirana isprana s DCM (2 ml), profiltrirana i osušena upuhivanjem dušika na 50°C . Ovo je dalo intermedijar 28; donos 32 mg.



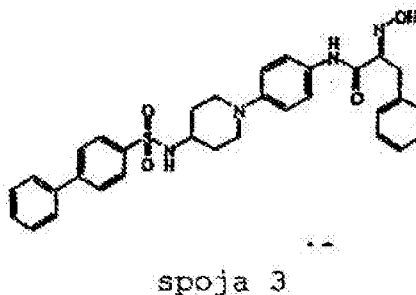
- j) Pripravljane spoja 1: Intermedijar 28 miješan je preko noći u 5 % TFA u MeOH (5 ml), reakcijska smjesa je izlivena u 4 ml H_2O i NaHCO_3 (300 mg), produkt je dvaput ekstrahiran s DCM (5 ml), DCM sloj je isušen na MgSO_4 , profiltriran i osušen upuhivanjem dušika na 50°C . Ovo je dalo konačni spoj 1; donos 10 mg.

Opaska: THP-protektirana piridin hidroksaminska kiselina 2x je deprotektirana. Nekad je spoj 1 suspendiran u DIPE kako bi se uklonio THP-ONH_2

Primjer B25 Pripravljanje

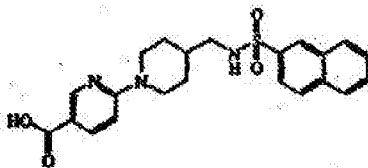
TFA (4 ml) dodana je na 0°C otopini interm. 5 (0.0004 mol) u MeOH (20 ml) i DCM (20 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 48 sati. Otapalo je upareno. Ostatak je kristalizirao iz dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.137 g (72%) spoja 2, tališne točke 200°C.

10

Primjer B3Pripravljanje

15 Metansulfonska kiselina (0.25 ml) dodana je na sobnoj temperaturi smjesi intermedijara 9 (0.0003 mol) u MeOH (3ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je metansulfonska kiselina (0.25 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodan je led. Smjesa je zaluzena s 10% K₂CO₃ i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran i otapalo upareno do suhog. Ostatak (0.21 g, 100%) je kristalizirao iz DCM/MeOH. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.155 g (71%) spoja 3, tališne točke 262°C.

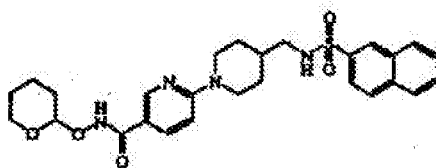
20

Primjer B4Pripravljjanje

natrijeve soli

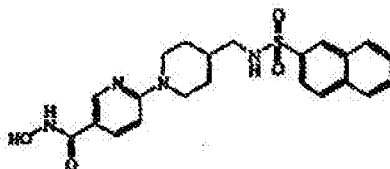
intermedijara 29

- 5 a) Smjesa intermedijara 12 (0.0024 mol) i NaOH (0.0048 mol) i EtOH (60 ml) miješana je i refluksirana 48 sati, zatim ohlađena. Talog je profiltriran, ispran s EtOH, zatim s dietileterom i isušen; donos 0.95 g (89%) intermedijara 29 (Na).

Pripravljjanje

intermedijara 30

- 10 b) O-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-hidroksilamin (0.0028 mol), zatim otopina EDC (0.0028 mol) u DCM (20 ml), zatim otopina HOBt (0.0028 mol) u THF (20 ml) dodani su na sobnoj temperaturi smjesi intermedijara 29 (0.0021 mol) u DCM (10 ml) i THF (10 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 12 sati, izlivena u vodu i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (1.2 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: CH₂Cl₂/CH₃OH/NH₄OH 96/4/0.1). Čiste frakcije su skupljene i
- 15 otapalo upareno. Ostatak (0.38 g) je kristalizirao iz dietiletera. Ostatak je odfiltriran i isušen, dajući 0.2 g intermedijara 30, tališne točke 138°C.

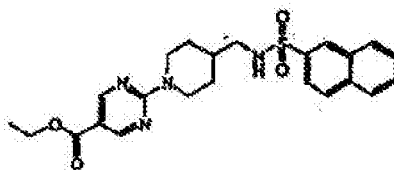
Pripravljjanje

spoja 4

- 20 c) Trifluorooctena kiselina (1 ml) dodana je na 0°C smjesi intermedijara 30 (0.0009 mol) u MeOH (15 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 72 sata. Otapalo je upareno. Ostatak je umiješan u CH₃CN/dietil eter. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.29 g (69%) spoja 4, tališne točke 173°C.

Primjer B5

25

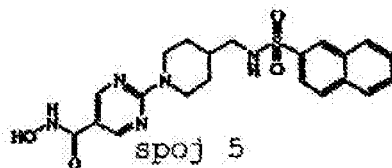
Pripravljjanje

intermedijara 31

- NaH (0.005 mol) dodan je na 0°C otopini intermedijara 11 (0.0033 mol) u THF (20 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na 0°C 1 sat. Dodana je otopina etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0043 mol) u THF(10 ml).
- 30 Smjesa je miješana na 0°C 2 sata, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen

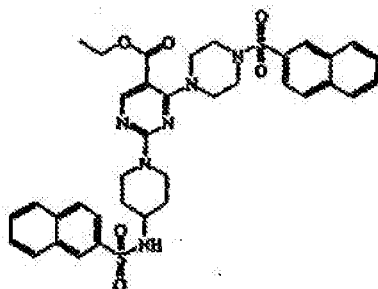
(MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak (1.4 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-35 µm) (eluens: cikloheksan/EtOAc 70/30). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.94 g, 63%) je kristalizirao iz dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.65 g intermedijara 31, tališne točke 186°C.

Intermedijar 31 obrađen je analogno kako je opisano u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.246 (77% zadnjeg koraka) spoja 5, tališne točke 262°C.



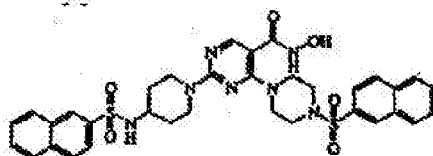
Primjer B6

Pripravljanje



intermedijara 32

Natrijev hidrid 60% (0.0006 mol) u obrocima je dodan na sobnoj temperaturi otopini N-4-piperidinil-benzensulfonamid monohidroklorida (0.0004 mol) u THF (4 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat i 30 minuta. Dodana je kap po kap otopina intermedijara 13 (0.0004 mol) u THF (4 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 2 sata, izlivena u ledenu vodu i ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (0.68 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (10 µm) (eluens: DCM 100). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.37 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (10 µm) (eluens: cikloheksan/EtOAc 70/30). Dvije frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak je nekoliko puta sušen s dietileterom, dajući 0.208 g (36%) intermedijara 32. Intermedijar 32 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.03 g (50%) spoja 6, tališne točke 80°C.

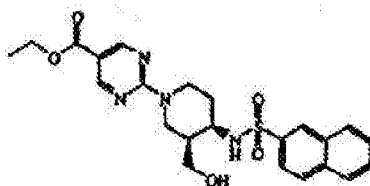


trifluoracetat

(1:1) spoj 6

Primjer B7

Pripravljanje

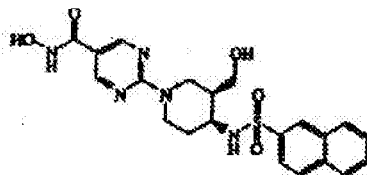


CIS

intermedijara 33

Smjesa intermedijara 17 (0.0024 mol), etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline, (0.0032 mol) i K_2CO_3 (0.0074 mol) u acetonitrilu (15 ml) miješana je na 90°C 8 sati, izlivena u vodu i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen ($MgSO_4$), profiltriran i otapalo upareno do suhog. Ostatak (0.63 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_4OH$ 98/2/0.1). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.75 g, 64%) je kristalizirao iz CH_3CN /diethyl etera/DIPE. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.5 g (43%) intermedijara 33 (CIS), tališne točke 155°C.

Intermedijar 33 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.16 g (75%) spoja 7 (CIS), tališne točke 203°C.

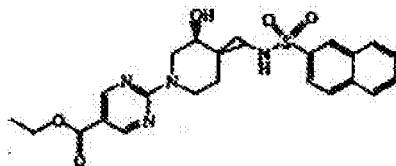


(CIS)

spoj 7

Primjer B8

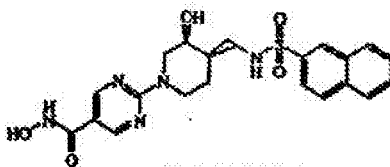
Pripravljajanje



(3S-TRANS)

intermedijara 34

Smjesa intermedijara 19 (0.0028 mol), etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0034 mol) i K_2CO_3 (0.0056 mol) u acetonitrilu (40 ml) miješana je na sobnoj temperaturi 12 sati, izlivena u vodu i ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je ispran s vodom, isušen ($MgSO_4$), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (1.3 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μm) (eluens: $CH_2Cl_2/CH_3OH/NH_4OH$ 98/2/0.1). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.91 g, 68%) je kristalizirao iz acetonitrila. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.45 g intermedijara 34 (3S-TRANS), tališne točke 130°C. Intermedijar 34 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.09 g (53%) spoja 8 (3S-TRANS), tališne točke 224°C.

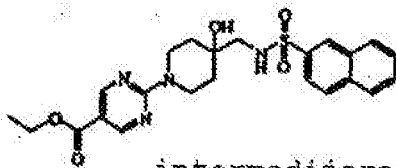


(3S-TRANS)

spoj 8

Primjer B9

Pripravljajanje

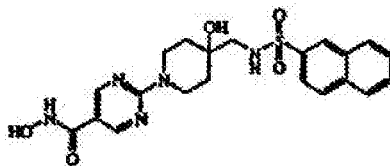


intermedijara 35

Smjesa intermedijara 21 (0.0056 mol), etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0073 mol) i K_2CO_3 (0.0112 mol) u acetonitrilu (80 ml) miješana je na sobnoj temperaturi preko noći, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je ispran s vodom, isušen ($MgSO_4$), profiltriran i otapalo upareno. Ostatak (2 g) je pročišćen

kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μ m) (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 96/4/0.1). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno. Ostatak (0.4 g, 15%) je kristalizirao iz dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.28 g intermedijara 35, tališne točke 208°C.

Intermedijar 35 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.125 g spoja 9, tališne točke 228°C.



spoj 9

5

Primjer B10

Pripravljanje



intermedijara 36

- 10 Otopina 2-naftalensulfonil klorida (0.0043 mol) u DCM (10 ml) dodana je na sobnoj temperaturi smjesi intermedijara 2 6 (0.0036 mol) i TEA (0.005 mol) u DCM (10 ml) u struji N_2 . Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (1.69 g) je pročišćen kolonskom kromatografijom preko silikagela (15-40 μ m) (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 98/2/0.1). Čiste frakcije su skupljene i otapalo upareno, dajući 1 g (61%) intermedijara 36.

- 15 Intermedijar 36 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.7 g (93%) spoja 10, tališne točke 142°C.

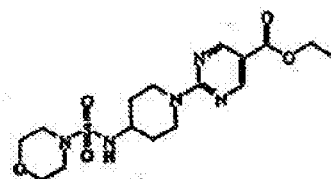


trifluoracetat (1:1)

spoj 10

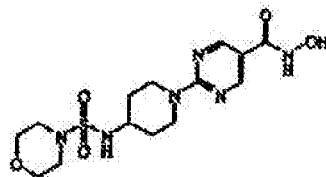
Primjer B11

Pripravljanje

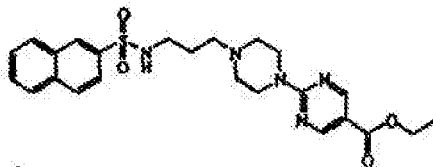


intermedijara 52

- Smjesa intermedijara 37 (0.0017 mol), etil estera 2-(metilsulfonil)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0022 mol) i kalijeva karbonata (0.0052 mol) u acetonitrilu (10 ml) miješana je na sobnoj temperaturi 2 sata. Dodana je voda. Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO_4), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (0.78 g) je kristalizirao iz dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.426 g (61%) intermedijara 52, tališne točke 135°C. Intermedijar 52 opisan je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.064 g (78%) spoja 25, tališne točke 217°C.

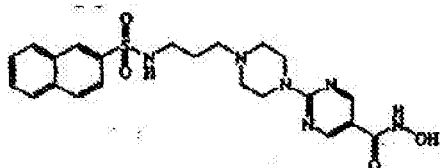


spoj 25

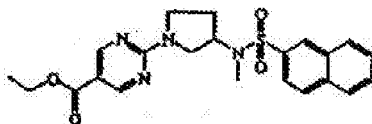
Primjer B12Pripravljanje

intermedijara 53

- 5 Smjesa intermedijara 40 (0.0027 mol), etil estera 2-(metilsulfonyl)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0035 mol) i kalijeva karbonata (0.0081 mol) u acetonitrilu (10 ml) miješana je na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda. Talog je profiltriran, ispran s vodom, zatim s dietileterom i isušen, dajući 0.96 g (74%) intermedijara 53, tališne točke 132°C. Intermedijar 53 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.106 g (59%) spoja 26, tališne točke 115°C.

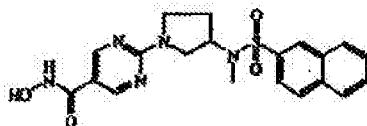
.0.85 C₂HF₃O₂.1.11 H₂O spoj 26

10

Primjer B13Pripravljanje

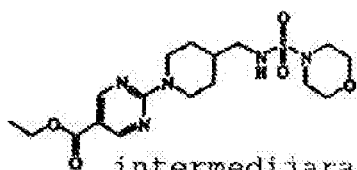
intermedijara 54

- 15 Natrijev hidrid (0.0017 mol) dodan je na sobnoj temperaturi otopini intermedijara 43 (0.0008 mol) u DMF (5 ml) u struji N₂. Smjesa je miješana 30 minuta. Dodan je jodometan (0.0013 mol). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 1 sat, izlivena u ledenu vodu te ekstrahirana s EtOAc. Organski sloj je ispran s vodom, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno, dajući 0.38 g (100%) intermedijara 54. Intermedijar 54 obrađen je analogno opisanom primjeru [B4] čime je dobiveno 0.155 g (73%) spoja 27, tališne točke 158°C.

0.51 C₂HF₃O₂

spoj 27

20

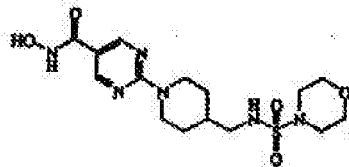
Primjer B14Pripravljanje

intermedijara 55

Otopina 4-morfolinsulfonil klorida (0.0061 mol) u 1,2-dikloro etanu (3 ml) dodana je kap po kap na sobnoj temperaturi otopini intermedijara 44 (0.0061 mol) i TEA (0.0122 mol) u 1,2-dikloroetanu (7 ml). Smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 24 sata, izlivena u ledenu vodu i ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄),

5 profiltriran, i otapalo upareno. Ostatak je kristalizirao iz MeOH/dietiletera. Talog je profiltriran, ispran s dietileterom i isušen, dajući 1.245 g (49%) intermedijara 55, tališne točke 189°C.

Intermedijar 55 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.449 g (83%) spoja 28, tališne točke 217°C.

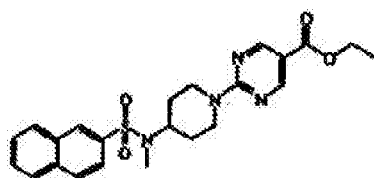


spoj 28

Primjer B15

10

Pripravljanje

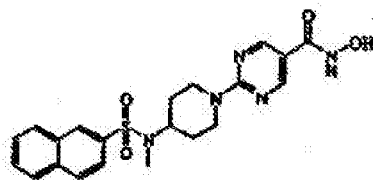


intermedijara 56

Smjesa intermedijara 47 (0.0015 mol), etil estera 2-(metilsulfonil)-5-pirimidinkarboksilne kiseline (0.0018 mol) i kalijeva karbonata (0.0045 mol) u acetonitrilu (10 ml) miješana je na sobnoj temperaturi 18 sati. Dodana je voda.

15 Smjesa je ekstrahirana s DCM. Organski sloj je odvojen, isušen (MgSO₄), profiltriran, i otapalo upareno do suhog. Ostatak (0.78 g) je kristalizirao iz DIPE/dietiletera. Talog je odfiltriran i isušen, dajući 0.42 g (61%) intermedijara 56, tališne točke: 143°C.

Intermedijar 56 obrađen je analogno opisanom u primjeru [B4] čime je dobiveno 0.2 g (75%) spoja 29, tališne točke > 260°C.

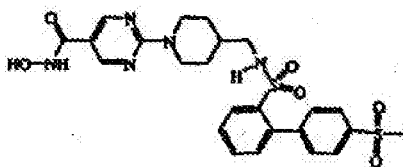


spoj 29

20

Primjer B16

Pripravljanje



spoja 30

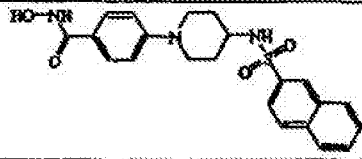
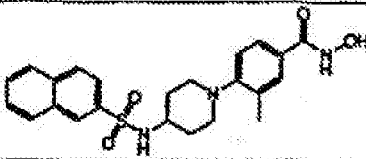
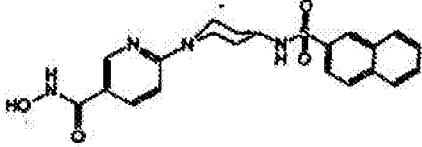
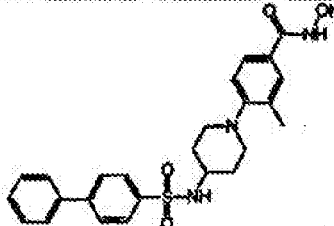
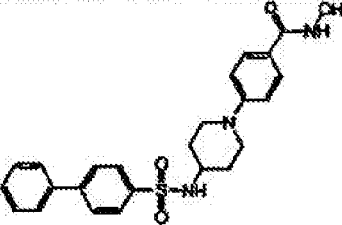
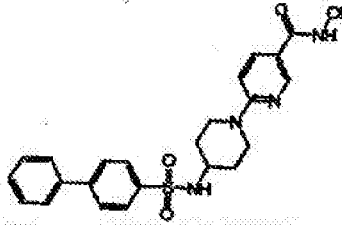
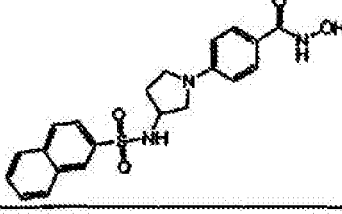
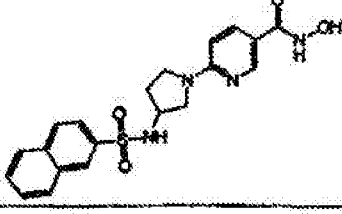
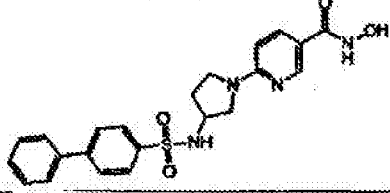
25 Intermedijar 51 obrađivan je s 5% otopinom trifluoroctene kiseline u smjesi DCM/MeOH (1/1,2ml) 7 dana. Otapala su uparena na sobnoj temperaturi u struji dušika i rezultirajuća ulja drugi put obrađena s 5% otopinom trifluoroctene kiseline u smjesi DCM/MeOH (1/1,2ml). Rezultirajuća reakcijska smjesa tresla se još 7 dana. Otapala su zatim uparena na sobnoj temperaturi u struji dušika, za čim je slijedilo dodavanje 1,4-dioksana i ponavljanje procedure koncentracije. Zatim, uzorci su sušeni u struji dušika preko noći na 40°C kako bi se uspostavilo potpuno deprotektiranje, dajući 7 mg

30 spoja 30.

Tablica F-1 prikazuje spojeve koji su pripremljeni prema jednom od gornjih primjera. U tablicama su upotrijebljene sljedeće kratice: C₂HF₃O₂ je trifluoracetatna sol, Sp. Br. je spoj broj, Pr. [Bn°] odnosi se na isti postupak kako je opisan u Bn° primjerima, Neki spojevi karakterizirani su tališnom točkom (tt.).

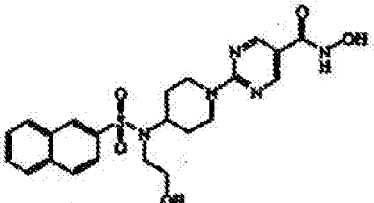
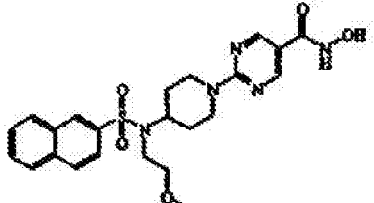
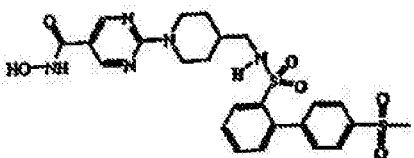
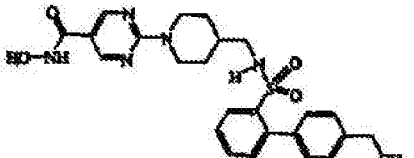
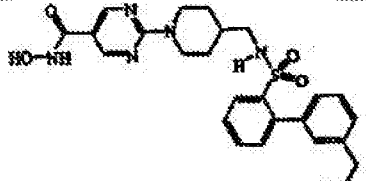
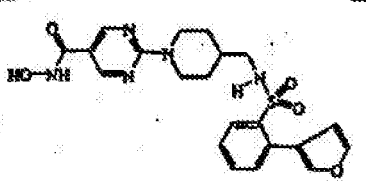
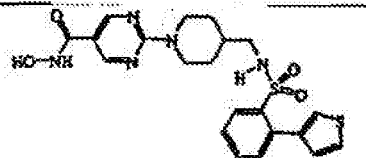
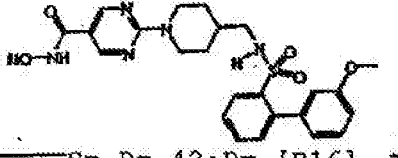
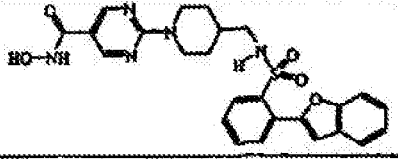
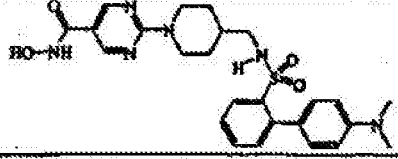
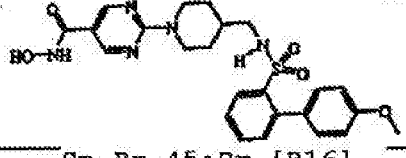
Tablica F-1

5

	
Sp.Br.1; Pr. [B1]	Sp.Br.11; Pr. [B1]
	
Sp.Br.12; Pr. [B1]; tt 163°C	Sp.Br.13; Pr. [B1]
	
Sp.Br.14; Pr. [B1]	Sp.Br.15; Pr. [B1]
	
Sp.Br.16; Pr. [B1]	Sp.Br.17; Pr. [B1]
	
Sp.Br.18; Pr. [B1]	

Sp.Br.2; Pr. [B2]; tt. 200°C	Sp.Br.3; Pr. [B3]; tt. 262°C
Sp.Br.19; Pr. [B3]; tt. 255°C	Sp.Br.4; Pr. [B4]; tt. 173°C
C ₂ HF ₃ O ₂ ; Sp.Br.20; Pr. [B4]; tt. 220°C	Sp.Br.5; Pr. [B5]; tt. 262°C
0.7 CH ₃ OH; Sp.Br.21; Pr. [B5]; tt. 284°C	C ₂ HF ₃ O ₂ ; Sp.Br.6; Pr. [B6]; tt. 80°C
(CIS); Sp.Br.7; Pr. [B7]; tt. 203°C	(3S-TRANS); Sp.Br.8; Pr. [B8]; tt. 224°C
Sp.Br.9; Pr. [B9]; tt. 228°C	CIS; Sp.Br.22; Pr. [B9]; tt. 245°C

(B-CIS); Sp.Br.23; Pr. [B9]; tt. 210°C	C ₂ HF ₃ O ₂ ; Sp.Br.10; Pr. [B10]; tt. 142°C
.023 C ₆ H ₁₄ O; Sp.Br.24; Pr. [B10]; tt. 110°C	
Sp.Br.31; Pr. [B5]; tt. 190°C	Sp.Br.25; Pr. [B11]; tt. 217°C
0.82C ₂ HF ₃ O ₂ .1.11H ₂ O; Sp.Br.26; Pr. [B12]; tt. 115°C	0.82C ₂ HF ₃ O ₂ .0.82H ₂ O; Sp.Br.32; Pr. [B12]; tt. 145°C
C ₂ HF ₃ O ₂ ; Sp.Br.27; Pr. [B13]; tt. 158°C	Sp.Br.28; Pr. [B14]; tt. 217°C
Sp.Br.29; Pr. [B15]; tt. >260°C	Sp.Br.33; Pr. [B15]; tt. 230°C

	
Sp.Br.34;Pr. [B15]; tt. 202°C	Sp.Br.35;Pr. [B15]; tt. 211°C
	
Sp.Br.30;Pr. [B16]	Sp.Br.36;Pr. [B16]
	
Sp.Br.37;Pr. [B16]	Sp.Br.38;Pr. [B16]
	
Sp.Br.39;Pr. [B16]	Sp.Br.40;Pr. [B16]
	
Sp.Br.41;Pr. [B16]	Sp.Br.42;Pr. [B16]
	
Sp.Br.43;Pr. [B16]	Sp.Br.44;Pr. [B16]
	
Sp.Br.45;Pr. [B16]	

C. Farmakološki primjer:

- 5 *In vitro* ispitivanje inhibicije histon deacetilaze (vidi primjer C1) mjeri inhibiciju HDAC enzimatske aktivnosti dobivenu sa spojevima formule (I).

Stanična aktivnost spojeva formule (I) određena je na tumorskim stanicama A2780 primjenom kolorimetrijskog ispitivanja stanične toksičnosti ili opstanka (Mosmann Tim, Journal of Immunological Methods 65: 55-63,1983) (vidi primjer C.2).

10

Kinetička topljivost u vodenom mediju mjeri sposobnost spoja da ostane u vodenoj otopini nakon razrjeđenja (vidi primjer C.3).

DMSO-štok otopine razrijeđene su s jednim vodenim puferim otapalom u 3 uzastopna koraka. Za svako razrjeđenje mjerena je mutnoća s nefelometrom.

Permeabilnost lijeka izražava njegovu sposobnost da se kreće iz jednog medija u ili kroz drugi. Posebno, njegovu sposobnost da se kreće kroz intestinalnu membranu u krvotok i/ili od krvotoka na ciljno mjesto. Permeabilnost (vidi primjer C.4) se može mjeriti oblikovanjem umjetne membrane fosfolipidnog dvosloja učvršćene filterom. U ispitivanju umjetnom membranom učvršćenom filterom, napravljen je "sendvič" s mikrotitarskom pločom od 96 jažica i filterskom pločom od 96 jažica, tako da je svaka kombinirana jažica podijeljena u dvije komorice s donorskom otopinom na dnu i akceptorskom otopinom na vrhu, koje su odvojene s 125 µm mikrofilterskom pločicom (pore 0.45 µm), obložena s 2% (wt/v) dodekanskim otopinom dioleoilfosfatidil-kolina, u uvjetima u kojima unutar filterskih kanala nastaju multilamelarni dvoslojevi kada sistem dođe u kontakt s vodenom otopinom pufera. Permeabilnost spojeva kroz tu umjetnu membranu mjeri se u cm/s. Svrha je istražiti prodiranje lijekova kroz paralelnu umjetnu membranu pri 2 različita pH: 4.0 i 7.4. Detekcija spoja načinjena je s UV-spektrometrijom na optimalnoj valnoj dužini od 250 i 500 nm.

Metabolizam lijekova znači da je ksenobiotski ili endobiotski lijek topljiv u lipidima enzimatski pretvoren u polarni, topljiv u vodi, i izlučiv metabolit. Glavni organ za metabolizam lijeka je jetra. Metabolički produkti su često manje aktivni nego roditeljski lijekovi ili neaktivni. Međutim, neki metaboliti imaju poboljšanu aktivnost ili toksične učinke. Prema tome, metabolizam lijeka može uključiti i procese "detoksikacije" i "toksikacije". Jedan od glavnih enzimskih sistema koji određuje sposobnost organizma da upravlja lijekovima i kemikalijama predstavljen je citokrom P450 monooksigenazama, a to su enzimi ovisni o NADPH. Metabolička stabilnost spojeva može se odrediti *in vitro* primjenom substaničnog humanog tkiva (vidi primjer C.5). Ovdje je metabolička stabilnost izražena kao % lijeka metaboliziranog nakon 15 minuta inkubacije tih spojeva s mikrosomima. Količina spojeva određena je LC-MS analizom.

Tumor supresor p53 transkripcijski aktivira brojne gene uključujući WAF1/CIP1 gen kao odgovor na oštećenje DNA. Produkt 21 kDa WAF1 gena pronađen je u kompleksu koji uključuje cikline, kinaze ovisne o ciklinu (CDK), i nuklearni antigen proliferirajućih stanica (PCNA) u normalnim stanicama, ali ne i u transformiranim stanicama i izgleda da je univerzalni inhibitor aktivnosti CDK. Jedna posljedica vezanja p21WAF1 na i inhibiranja CDK je spriječiti fosforilaciju ovisnu o CDK i daljnju inaktivaciju Rb proteina, koja je bitna za napredovanje staničnog ciklusa.

Prema tome, indukcija p21WAF1 kao odgovor na stanični kontakt s inhibitorom HDAC je moćan i specifični indikator inhibicije napredovanja staničnog ciklusa i na G1 i G2 kontrolnim točkama.

Kapacitet spojeva da induciraju p21WAF1 mjereno je ispitivanjem p21WAF1 imunoenzimskim postupkom ELISA (WAF1 ELISA of Oncogene). Ispitivanje p21WAF1 je imunoenzimsko ispitivanje "sendvič" postupkom u kojem se rabe i mišja monoklonalna i zečja poliklonalna protutijela. Zečje poliklonalno protutijelo, specifično za humani WAF1 protein, učvršćeno je na površinu plastičnih jažica koje su dane u priboru. Bilo koji p21WAF prisutan u uzorku kojeg treba ispitati vezat će se na "capture" protutijelo. Biotinilirani detektor monoklonalno protutijelo također prepoznaje humani p21WAF1 protein, i vezat će se na bilo koji p21WAF1, kojeg je zadržalo "capture" protutijelo. Detektor protutijelo, zauzvrat, je vezan streptavidinom konjugiranim peroksidazom hrena, Peroksidaza hrena katalizira pretvaranje kromogenog supstrata tetra-metilbenzidina od bezbojne otopine do plave otopine (ili žute nakon dodavanja reagensa za zaustavljanje reakcije), čiji je intenzitet proporcionalan količini p21WAF1 proteina vezanog na ploču. Količina obojenog produkta reakcije određena je spektrofotometrom. Određivanje količine postiglo se konstrukcijom standardne krivulje pomoću poznatih koncentracija p21WAF1 (uz uvjet liofilizacije) (vidi primjer C.6).

Specifični inhibitori HDAC ne bi trebali inhibirati ostale enzime kao što su obilno zastupljeni proteini CYP P450. Proteini CYP P450 (ekspresirani *E. coli*) proteini 3A4, 2D6 i 2C9 pretvaraju njihove specifične supstrate u fluorescentnu molekulu. Protein CYP3A4 pretvara 7-benziloksi-trifluormetil kumarin (BFC) u 7-hidroksi-trifluormetil kumarin. Protein CYP2D6 pretvara 3-[2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil]-7-metoksi-4-metilkumarin (AMMC) u 3-[2-(N,N-dietilamino)etil]-7-hidroksi-4-metilkumarin hidroklorid i protein CYP2C9 pretvara 7-metoksi-4-trifluormetil kumarin (MFC) u 7-hidroksi-trifluormetil kumarin. Spojevi koji inhibiraju enzimatsku reakciju rezultirat će smanjenjem fluorescentnog signala (vidi primjer C.7).

Primjer C1 : In Vitro ispitivanje inhibicije histondeacetilaze:

HeLa ekstrakti jezgre (dobavljač: Biomol) inkubirani su pri 60 µg/ml s 2×10^{-8} M radioaktivno označenog peptidnog supstrata. Kao supstrat za mjerenje aktivnosti HDAC upotrijebljen je sintetički peptid, tj. aminokiseline 14-21 histona H4. Supstrat je biotinilirani na NH₂-terminalnom dijelu s 6-aminoheksankiselinom, i protektiran na COOH-terminalnom dijelu s amidnom skupinom i specifično [³H]acetiliran na lizinu 16. Supstrat, biotin- (6-aminoheksan) Gly-Ala-([³H]-

acetil-Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-NH₂), dodan je u pufernu otopinu 25 mM Hepesa, 1 M sukroze, 0.1 mg/ml BSA i 0.01% Triton X-100 pri pH 7.4. Nakon 30 min reakcija deacetiliranja prekinuta je dodatkom HCl i octene kiseline, (konačna koncentracija 0.035 mM i 3.8 mM, redom). Nakon zaustavljanja reakcije, slobodni ³H-acetat ekstrahiran je s etilacetatom. Nakon miješanja i centrifugiranja, na β-brojaču određena je radioaktivnost u alikvotu gornje (organske) faze.

Za svaki eksperiment, kontrole (koje su sadržavale HeLa ekstrakt jezgre i DMSO bez spoja), prazna inkubacija (koja je sadržavala DMSO, ali ne HeLa ekstrakt jezgre ili spoj) i uzorci (koji su sadržavali spoj otopljen u DMSO i HeLa ekstrakt jezgre) pušteni su paralelno. U prvom primjeru, spojevi su testirani pri koncentraciji od 10⁻⁵ M. Kada su spojevi pokazali aktivnost na 10⁻⁵ M, načinjena je krivulja koncentracije-odgovora pri čemu su spojevi testirani pri koncentracijama od 10⁻⁵ M i 10⁻¹² M. U svakom testu vrijednost praznog uzorka oduzeta je od vrijednosti i za kontrolne i za prave uzorke. Kontrolni uzorci predstavljali su 100% deacetiliranja supstrata. Za svaki uzorak radioaktivnost je izražena kao postotak srednje vrijednosti kontrola. Kada su izračunate odgovarajuće vrijednosti IC₅₀ (koncentracija lijeka, potrebna za smanjenje metabolita na 50% kontrolne) primjenom probit analize za stupnjevanje podatke. Ovdje su učinci testnih spojeva izraženi kao pIC₅₀ (negativna log vrijednost IC₅₀). Svi testirani spojevi pokazali su enzimsku aktivnost pri testnoj koncentraciji od 10⁻⁵ M i 42 spoja imalo je pIC₅₀ > 5 (vidi tablicu F-2).

Primjer C.2: Određivanje antiproliferacijskog djelovanja na stanicama A2780

Svi testirani spojevi otopljeni su u DMSO i daljnja razrjeđenja načinjena u sredstvu za uzgoj kulture. U staničnim proliferacijskim ispitivanjima konačne koncentracije DMSO nisu nikad prešle 0.1 % (v/v). Kontrole su sadržavale stanice A2780 i DMSO bez spoja, a prazne probe DMSO bez stanica. MTT otopljen je pri 5 mg/ml u PBS. Pripravljen je glicinski pufer koji je sadržavao 0.1 M glicina i 0.1 M NaCl, podešen na pH 10.5 s NaOH (1 N) (svi reagensi Merck). Humane stanice karcinoma jajnika A2780 (ljubazni dar dr. T. C. Hamiltona [Fox Chase Cancer Centre, Pennsylvania, USA]) uzgojene su u RPMI 1640 mediju koji je sadržavao 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml gentamicina i 10 % fetalnog goveđeg seruma. Stanice su rutinski čuvane kao monoslojne kulture na 37°C u vlažnoj atmosferi 5 % CO₂. Stanice su razdvajane (tj. prenošene u daljnje subkulture, "passaged") jedanput tjedno pomoću otopine tripsina/EDTA u omjeru cijepanja od 1:40. I medij i suplementi dobiveni su od Life Technologies. Stanice nisu bile kontaminirane mikoplazmom kako je određeno pomoću pribora "Gen-Probe Mvco-plasma Tissue Culture" (dobavljač: BioMerieux). Stanice su stavljene u NUNCTM ploče za uzgoj kulture tkiva s 96-jažica (Dobavljač: Life Technologies) i ostavljene da prijanaju uz plastiku preko noći. Gustoće stanica bile su 1500 stanica po jažici u ukupnom volumenu od 200 µl medija. Nakon adhezije stanica uz ploču, medij je promijenjen te su konačnom volumenu od 200 µl dodani lijekovi i/ili otapala. Nakon četiri dana inkubacije, medij je zamijenjen s 200 µl svježeg medija te je ispitivanjem baziranom na MTT vrednovana stanična gustoća i vitalnost. Svako jažici, dodano je 25 µl otopine MTT te su stanice dalje inkubirane 2 sata na 37°C. Medij je zatim pažljivo aspiriran i plavi MTT-formazanski produkt solubiliziran dodatkom 25 µl glicinskog pufera, a zatim 100 µl DMSO. Ploče za mikrotestiranje tresene su 10 min na tresilici za mikroploče te je na 540 nm mjerena apsorbanacija pomoću "Emax 96-well" spektrofotometra (Dobavljač: Sopachem). U sklopu eksperimenta, rezultati za svako eksperimentalno stanje predstavljaju srednju vrijednost 3 ponovljene jažice. Za inicijalne svrhe screeninga, spojevi su testirani pri jednoj, fiksnoj koncentraciji od 10⁻⁶ M. Za aktivne spojeve, eksperimenti su ponovljeni kako bi se dobile potpune krivulje koncentracije-odgovora. Za svaki eksperiment, kontrola (koja nije sadržavala lijek) i prazne inkubacije (koja nije sadržavala niti lijek niti stanice) puštene su paralelno. Vrijednost praznog uzorka oduzeta je od vrijednosti i za kontrolne i za prave uzorke. Za svaki uzorak, srednja vrijednost za stanični rast (u jedinicama apsorbanacije) izražena je kao postotak srednje vrijednosti staničnog rasta kontrolnih uzoraka. Kada je to bilo prikladno, vrijednosti IC₅₀ (koncentracija lijeka, potrebna za 50% smanjenje rasta stanica u odnosu na kontrolne uzorke) izračunate su primjenom probit analize za stupnjevanje podatke (Finney, D. J., Probit Analyses, 2. izd. poglavlje 10, Graded Responses, Cambridge University Press, Cambridge 1962). Ovdje su učinci testnih spojeva izraženi kao pIC₅₀ (negativna log vrijednost IC₅₀). Većina testiranih spojeva pokazala je staničnu aktivnost pri testnoj koncentraciji od 10⁻⁶ M, a 41 spoj imao je IC₅₀ ≥ 5 (vidi tablicu F-2).

Primjer C.3: Kinetička topljivost u vodenom mediju

U prvom koraku razrjeđivanja, 10 µl koncentrirane štok otopine aktivnog spoja, solubilizirane u DMSO (5 mM), dodano je u 100 µl fosfat-citrat pufera pH 7.4 i miješano. U drugom koraku razrjeđivanja, alikvot (20 µl) iz prvog koraka razrjeđenja dalje je stavljen u 100 µl fosfat-citrat pufera pH 7.4 i miješan. Konačno, u trećem koraku razrjeđivanja, uzorak (20 µl) iz drugog koraka razrjeđenja dalje je razrijeđen u 100 µl fosfat-citrat pufera pH 7.4 i miješan. Sva razrjeđivanja izvedena na mikrotitarskim pločama od 96 jažica. Neposredno nakon posljednjeg razrjeđivanja nefelometrom je mjerena mutnoća tri uzastopna koraka razrjeđivanja. Za svaki spoj načinjena su tri uzorka razrjeđenja kako bi se isključile povremene pogreške. Bazirano na mjerenjima mutnoće, izvedeno je redanje u 3 razreda. Spojevi s velikom topljivosti dobili su 3 boda i za te spojeve prvo razrjeđenje bilo je bistro. Spojevi sa srednjom topljivosti dobili su 2 boda. Za te spojeve prvo razrjeđenje nije bilo bistro, a drugo razrjeđenje je bilo bistro. Spojevi s malom topljivosti dobili su 1 bod, a za te spojeve oba razrjeđenja, i prvo i drugo, nisu bila bistra. Mjerena je topljivost 9 spojeva. Od tih spojeva 4 su imala 3 boda, jedan je imao 2 boda i 4 su imala 1 bod (vidi tablicu F-2).

Primjer C.4: Analiza permeabilnosti paralelne umjetne membrane

Štok uzorci (aliquoti od 10 μ l štok otopine od 5 mM u 100 % DMSO) razrijeđeni su u dubokoj jažici ili "Pre-mix" ploči koja je sadržavala 2 ml vodenog pufera, pH 4 ili pH 7.4 (PSR4 koncentrat sistema otopina (pION)).

Prije dodavanja uzoraka referentnoj ploči, jažicama je dodano 150 μ l pufera te je izvedeno UV mjerenje praznog uzorka. Nakon toga je pufer odbačen i ploča upotrijebljena kao referentna ploča. Sva mjerenja izvedena su na pločama otpornim na UV (dobavljač: Costar ili Greiner).

Nakon mjerenja praznog uzorak na referentnoj ploči, referentnoj ploči je dodano 150 μ l razrijeđenih uzoraka i 200 μ l razrijeđenih uzoraka dodano je donorskoj ploči 1. Akceptorska filter ploča 1 (dobavljač: Millipore, tip: MAIP N45) obložena je s 4 μ l otopine koja stvara umjetnu membranu (1,2-Dioleoil-sn-Glicer-3-Fosfokolin u dodekanu koji je sadržavao 0.1% 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenola i stavljen je na vrh donorske ploče 1 kako bi nastao "sendvič". Pufer (200 μ l) je stavljen u akceptorske jažice na vrhu. Sendvič je pokriven s poklopcem i pohranjen 18 h na sobnoj temperaturi u mraku. Prazno mjerenje akceptorske ploče 2 izvedeno je dodavanjem 150 μ l pufera u jažice, a zatim je mjereno pomoću UV. Nakon praznog mjerenja akceptorske ploče 2 pufer je odbačen i 150 μ l akceptorske otopine preneseno iz akceptorske filter ploče 1 u akceptorsku ploču 2. Zatim je akceptorska filter ploča 1 uklonjena iz sendviča. Nakon praznog mjerenja donorske ploče 2 (vidi iznad), 150 μ l donorske otopine preneseno je iz donorske ploče 1 u donorsku ploču 2. UV spektar donorske ploče 2, akceptorske ploče 2 i jažica referentne ploče je skeniran (sa SpectraMAK 190). Svi spektri su obrađeni kako bi se izračunala permeabilnost uz pomoć PSR4p Command softvera. Svi spojevi su triput mjereni. Karbamazepin, griseofulvin, aciklogvanizin, atenolol, furosemid, i klorotiazid upotrijebljeni su kao standardi u svakom mjerenju. Spojevi su poredani u 3 kategorije, niske permeabilnosti (srednji učinak $< 0.5 \times 10^{-6}$ cm/s; bod 1), srednje permeabilnosti (1×10^{-6} cm/s $>$ srednji učinak $> 0.5 \times 10^{-6}$ cm/s ; bod 2) ili visoke permeabilnosti ($> 0.5 \times 10^{-6}$ cm/s; bod 3). Dva od 7 testiranih spojeva imalo je rezultat od barem 2 u jednom od oba pH koji su mjereni i 5 spojeva imalo je samo rezultat 1 u jednom od mjerenih pH.

Primjer C.5: Metabolička stabilnost

Substancijski tkivni pripravci načinjeni su prema Gorrod *et al.* (Xenobiotica 5: 453-462, 1975) centrifugalnim razdvajanjem nakon mehaničke homogenizacije tkiva. Jetreno tkivo isplahnuto je u ledeno-hladnom 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) puferu kako bi se isprao suvišak krvi. Tkivo je zatim osušeno blot tehnikom, izvagano i krupno narezano pomoću kirurških škara. Komadići tkiva homogenizirani su u 3 volumena ledeno-hladnog 0.1 M fosfatnog pufera (pH 7.4) pomoću bilo Potter-S (Braun, Italy) opremljenog s teflonskim batičem ili Sorvall Omni-Mix homogenizatorom, 7 x 10 sek. U oba slučaja, tijekom procesa homogenizacije posuda je čuvana u na ledu.

Homogenati tkiva centrifugirani su na 9000 x g 20 minuta na 4°C pomoću Sorvall centrifuge ili Beckman Ultracentrifuge. Rezultirajući supernatant pohranjen je na -80°C i označen s "S9".

Frakcija S9 može se dalje centrifugirati na 100.000 x g 60 minuta (4°C) pomoću Beckman ultracentrifuge. Rezultirajući supernatant pažljivo je aspiriran, podijeljen u alikvote te označen s "citosol". Pelet je ponovo suspendiran u 0.1 M fosfatnom puferu (pH 7.4) u konačni volumen od 1 ml na 0.5 g originalne mase tkiva i označen s "mikrosomi".

Sve substancijske frakcije bile su podijeljene u alikvote, odmah zamrznute u tekućem dušiku i do uporabe pohranjene na -80°C.

Za uzorke koje je trebalo testirati, inkubacijska smjesa sadržavala je PBS (0.1 M), spoj (5 μ M), mikrosome (1 mg/ml) i sistem za generiranje NADPH (0.8 mM glukoza-6-fosfat, 0.8 mM magnezijev klorid i 0.8 jedinica glukoza-6-fosfat dehidrogenaze). Kontrolni uzorci sadržavali su isti materijal, ali su mikrosomi zamijenjeni s mikrosomima inaktiviranim toplinom (10 min na 95 stupnjeva Celzijusa). Oporavak spojeva u kontrolnim uzorcima bio je uvijek 100%. Smjese su prethodno inkubirane 5 min na 37 stupnjeva Celzijusa. Reakcija je započela u vremenskoj točki nula (t = 0) dodavanjem 0.8 mM NADP te su uzorci inkubirani 15 min (t = 15). Reakcija je prekinuta dodavanjem 2 volumena DMSO. Uzorci su zatim centrifugirani 10 min na 900 x g i supernatanti pograničeni na sobnoj temperaturi ne dulje od 24 h prije analize. Sve inkubacije izvedene su duplo. Analize supernatanta izvedene su LC-MS analizom. Elucija uzoraka izvedena je na Xterra MSC18 (50 x 4.6 mm, 5Zm, Waters, US). Upotrijebljen je HPLC sistem Alliance 2790 (Supplier: Waters, US). Elucija je obavljena puferom A (25 mM amonijevacetat (pH 5.2) u H20/acetonitrilu (95/5)), otapalo B je acetonitril i otapalo C metanol brzinom protoka od 2.4 ml/min. Korišteni gradijent je povećanje koncentracije organske faze od 0 % preko 50% B i 50% C u 5 min sve do 100% B u 1 min na linearan način, a koncentracija organske faze održavana je stacionarnom dodatnih 1.5 min. Ukupan injekcijski volumen uzoraka bio je 25 μ l.

Kao detektor korišten je A Quattro (dobavljač: Micromass, Manchester, UK) maseni spektrometar opremljen s izvorom ESI. Izvor i temperatura uklanjanja otapala podešeni su redom na 120 i 350°C, a kao raspršivač i plin za sušenje upotrijebljen je dušik. Podaci su dobiveni u "positive scan" modu (jedna ionska reakcija). Napon glave podešen je na 10 V i vrijeme zadržavanja bilo je 1 sek. Metabolička stabilnost izražena je kao % metabolizma spoja nakon 15 min

inkubacije u prisutnosti aktivnih mikrosoma (E (akt)) (% metabolizam = $100\% - (\text{Ukupna ionska struja (TIC) E (akt) u } t = 15) / \text{TIC od E (akt) u } t = 0) \times 100$). Spojevi koji su imali TIC od E (akt) u $t = 0$ postotak metabolizma manji od 20 % definirani su kao metabolički visoko stabilni. Spojevi koji su imali metabolizam između 20 i 70 % definirani su kao srednje stabilni, a spojevi koji su imali postotak metabolizma viši od 70 definirani su kao metabolički slabo stabilni. Tri referentna spoja uključena su uvijek kada je izvođen screening metaboličke stabilnosti. Verapamil je uključen kao spoj niske metaboličke stabilnosti (% metabolizma = 73 %). Cisaprid je uključen kao spoj srednje metaboličke stabilnosti (% metabolizma 45 %) i propanol je uključen kao spoj srednje do visoke metaboličke stabilnosti (25% metabolizma). Ovi referentni spojevi upotrijebljeni su kako bi se potvrdilo ispitivanje metaboličke stabilnosti. Testirano je jedanaest spojeva. Osam spojeva imalo je postotak metabolizma manji od 20 %, dva spoja imala su postotak metabolizma između 20 i 70% i jedan spoj imao je postotak metabolizma više od 70%.

Primjer C.6: Indukcijski kapacitet p21

Sljedeći protokol primijenjen je kako bi se odredila razina ekspresije proteina p21 u humanim stanicama karcinoma jajnika A2780. Stanice A2780 (20000 stanica/180 μl) stavljene su u mikrotitratske ploče s 96 jažica u RPMI 1640 mediju koji je sadržavao 2 mM L-glutamina, 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina i 10 % fetalnog govedeg seruma. 24 sata prije razgradnje stanica, dodani su spojevi u konačnim koncentracijama od 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} i 10^{-8} M. Svi testirani spojevi otopljeni su u DMSO a daljnja razrjeđenja načinjena su u mediju za uzgoj kulture. 24 sata nakon dodavanja spoja, supernatanti su uklonjeni od stanica. Stanice su isprane s 200 μl ledeno-hladnog PBS. Jažice su aspirirane te je dodano 30 μl pufera za razgradnju (50 mM Tris.HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet p40 i 10 % glicerol). Ploče su inkubirane preko noći na -70°C . Odgovarajući broj mikrotitratskih ploča je uklonjen s podloge i stavljen u prazan držač ploča. Pripravljena je radna otopina (1 x) od pufera za ispiranje (20 x koncentrat za ispiranje ploče: 100 ml 20-struko koncentrirana otopina PBS i surfaktant. Sadrži 2% kloroacetamida). Liofilizirani standard p21WAF rekonstituiran je s destiliranom H_2O i dalje razrijeđen s uzorkom razrjeđivača (danog u priboru). Uzorci su pripremljeni njihovim razrjeđivanjem 1:4 u razrjeđivaču uzoraka. Uzorci (100 μl) i standardi p21WAF1 (100 μl) pipetirani su u odgovarajuće jažice i inkubirani na sobnoj temperaturi 2 sata. Jažice su isprane 3 puta s 1 x puferom za ispiranje i zatim je u svaku jažicu odpipetirano 100 μl reagensa detektora protutijela (otopina biotiniziranog monoklonalnog protutijela p21WAF1). Jažice su inkubirane na sobnoj temperaturi 1 sat i zatim isprane tri puta s 1 x puferom za ispiranje. Razrijeđen je konjugat 400 x (peroksidaza streptavidin konjugat: 400-struko koncentrirana otopina) i 100 μl 1 x otopine dodano jažicama. Jažice su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 min i zatim isprane 3 puta s 1 x puferom za ispiranje i 1 puta s destiliranom H_2O . Jažicama je dodana otopina supstrata (kromogeni supstrat) (100 μl) te su jažice inkubirane 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Svako jažici dodana je otopina za zaustavljanje reakcije, istim redoslijedom kao prethodno dodana otopina supstrata. Apsorbancija u svakoj jažici mjerena je pomoću spektrofotometrijskog čitača mikroploče za dvostruku valnu dužinu od 450/595 nm. Za svaki eksperiment, paralelno su puštene kontrola (koja nije sadržavala lijek) i prazna inkubacija (koja nije sadržavala niti lijek niti stanice). Vrijednosti za praznu inkubaciju oduzete su od svih kontrolnih vrijednosti i vrijednosti uzoraka. Za svaki uzorak, vrijednost indukcije p21WAF1 (u jedinicama apsorbancije) izražena je kao postotak vrijednosti za p21WAF1 prisutan u kontroli. Postotak indukcije viši od 130 % definiran je kao značajna indukcija. U ovom ispitivanju testirano je trinaest spojeva. Jedanaest je pokazalo značajnu indukciju.

Primjer C.7: Inhibicijski kapacitet P450

Svi testirani spojevi otopljeni su u DMSO (5 mM), a daljnje razrjeđenje na 5×10^{-4} M načinjeno je u acetonitrilu. Daljnja razrjeđenja načinjena su u puferu za ispitivanje (0.1M NaK fosfatni pufer pH 7.4), a konačna koncentracija otapala nikada nije bila viša od 2 %.

Ispitivanje za protein CYP3A4 po jažici uključuje 15 pmol P450/mg proteina (u 0.01M NaK fosfatnog pufera + 1.15% KCl), i sistem za generiranje NADPH (3.3 mM glukoza-6-fosfata, 0.4 J/ml glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, 1.3 mM NADP i 3.3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u puferu za ispitivanje) i spoj u ukupnom volumenu za ispitivanje od 100 μl . Nakon 5 min predinkubacije na 37°C enzimatska reakcija započela je dodatkom 150 μM supstrata za fluorescentnu sondu BFC u pufer za ispitivanje. Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi reakcija je prekinuta nakon dodavanja 2 volumena acetonitrila. Fluorescentna određivanja izvedena su na valnoj dužini ekscitacije od 405 nm i valnoj dužini emisije od 535 nm. U ovaj eksperiment kao referentni spoj uključen je ketokonazol (vrijednost- $\text{IC}_{50} = 3 \times 10^{-8}\text{M}$). Ispitivanje za protein CYP2D6 po jažici uključuje 6 pmol proteina P450/mg (u 0.01 M NaK fosfatnog pufera + 1.15% KCl), i sistem za generiranje NADPH (0.41 mM glukoza-6-fosfata, 0.4 J/ml glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, 0.0082 mM NADP i 0.41 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u puferu za ispitivanje) i spoja u ukupnom volumenu za ispitivanje od 100 μl . Nakon 5 min predinkubacije na 37°C enzimatska reakcija započela je dodatkom 3 μM supstrata za fluorescentnu sondu AMMC u puferu za ispitivanje. Nakon 45 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi reakcija je prekinuta nakon dodavanja 2 volumena acetonitrila. Fluorescentna određivanja izvedena su na valnoj dužini ekscitacije od 405 nm i valnoj dužini emisije od 460 nm. U ovaj eksperiment kao referentni spoj uključen je kvinidin (vrijednost- $\text{IC}_{50} < 5 \times 10^{-8}\text{M}$).

- Ispitivanje za protein CYP2C9 po jažici uključuje 15 pmol proteina P450/mg (u 0.01 M NaK fosfatnog pufera + 1.15% KCl)/ i sistem za generiranje NADPH (3.3 mM glukoza-6-fosfata, 0.4 J/ml glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, 1.3 mM NADP i 3.3 mM MgCl₂·6H₂O u puferu za ispitivanje) i spoja u ukupnom volumenu za ispitivanje od 100 µl. Nakon 5 min predinkubacije na 37°C enzimatska reakcija započela je dodatkom 200 µM supstrata za fluorescentnu sondu MFC u puferu za ispitivanje. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi reakcija je prekinuta nakon dodavanja 2 volumena acetonitrila. Fluorescentna određivanja izvedena su na valnoj dužini ekscitacije od 405 nm i valnoj dužini emisije od 535 nm. U ovaj eksperiment kao referentni spoj uključen je sulfafenazol (vrijednost-IC₅₀ = 6.8 X 10⁻⁷ M). Za inicijalne svrhe screeninga, spojevi su testirani pri jednoj, fiksnoj koncentraciji od 10⁻⁶ M. Za aktivne spojeve, eksperimenti su ponovljeni kako bi se dobile potpune krivulje koncentracije-odgovora. Za svaki eksperiment, kontrola (koja nije sadržavala lijek) i prazne inkubacija (koja nije sadržavala niti lijek niti stanice) puštene su paralelno. Svi spojevi ispitani su četiri puta. Vrijednost praznog uzorka oduzeta je od vrijednosti i za kontrolne i za prave uzorke. Za svaki uzorak, srednja vrijednost aktivnosti P450 uzorka (u jedinicama relativne fluorescencije) izražena je kao postotak srednje vrijednosti aktivnosti P450 kontrole. Postotak inhibicije izražen je kao 100% minus srednja vrijednost aktivnosti P450 uzorka. Kada je to bilo prikladno, izračunate su vrijednosti IC₅₀ (koncentracija lijeka, potrebna da bi se reducirala aktivnost P450 na 50% od kontrolne). U ovom ispitivanju analiziran je jedan spoj. S ovim spojem nije se mogla ustanoviti inhibicija različitih enzima P450.

Tablica F-2: Tablica F-2 prikazuje rezultate za spojeve koji su testirani prema primjeru C1, C.2, i C.3.

Sp. br.	Enzimska aktivnost pIC ₅₀ .	Stanična aktivnost pIC ₅₀ .	Rezultat topljivosti
1	6.523	5.277	
2	6.104	7.567	3
3	<5	5.744	
4	7.574	5.866	1
5	8.123	6.433	1
6	<5	5.68	
7	7.533	5.017	3
8	7.355	5.517	3
9	7.579	<5	2
10	6.893	5.673	
11	5.829	5.784	
12	7.438	5.536	
13	5.428	6.156	
14	6.116	5.68	
15	7.413	5.907	1
16	6.293	<5	
17	6.95	<5	
18	5.321	7.303	
19	<5	5.367	
20	7.294	5.556	1
21	8.199	6.441	
22	7.212	5.536	3
23	6.662	5.472	
24	7.903	5.97	
31	7.857	5.225	
25	6.449	<5	
32	7.526	6.255	
26	7.85	6.263	
27	7.49	5.781	
30	7.614	5.669	
36	7.265	5.977	
37	7.341	5.661	
38	7.154	5.937	
39	7.126	6.053	
40	7.273	6.164	
41	7.403	6.327	
42	7.584	6.342	

43	7.469	6.132	
44	7.432	6.192	
45	7.371	6.29	
28	7.074	5.109	
29	7.04	5.429	
33	6.837	5.653	
34	7.337	5.62	
35	7.046	5.935	

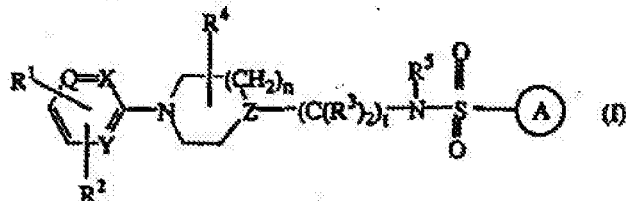
D. Primjer pripravka: Filmom obložene tablete

Pripravljanje jezgre tablete

- 5 Smjesa od 100 g spoja formule (I), 570 g laktoze i 200 g škroba dobro je pomiješana i zatim navlažena otopinom 5 g natrij dodecil sulfata i 10 g polivinilpirolidona u oko 200 ml vode. Vlažna smjesa u prahu je prosijana, isušena i ponovo prosijana. Zatim je dodano 100 g mikrokristalne celuloze i 15 g hidrogeniranog biljnog ulja. Sve je dobro pomiješano i prešano u tablete, dajući 10.000 tableta, svaka je sadržavala 10 mg spoja formule (I).
- 10 Obloga
- U otopinu 10 g metilceluloze u 75 ml denaturiranog etanola dodana je otopina 5 g etilceluloze u 150 ml diklorometana. Zatim je dodano 75 ml diklorometana i 2.5 ml 1,2,3-propantriola. 10 g polietilen glikola rastaljeno je i otopljeno u 75 ml diklorometana. Potonja otopina dodana je prethodnoj i zatim je dodano 2.5 g magnezijevog oktaedekanoata, 5 g polivinilpirolidona i 30 ml koncentrirane suspenzije boje te je cjelina homogenizirana. Jezgre tableta obložene su tako
- 15 dobivenom smjesom u uređaju za oblaganje.

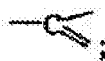
PATENTNI ZAHTEJEVI

- 20 1. Spoj, **naznačen time**, da je formule (I),

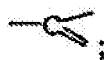


njegovi N-oksidni oblici, farmaceutski prihvatljive adicijske soli i stereokemijski izomerni oblici, pri čemu n je 0, 1, 2 ili 3 i kada je n jednak 0 tada to znači direktnu vezu;

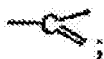
- 25 t je 0, 1, 2, 3 ili 4 i kada je t jednak 0 tada to znači direktnu vezu;
svaki Q je dušik ili



svaki X je dušik ili



- 30 svaki Y je dušik ili



svaki Z je dušik ili



- 35 R¹ je -C(O)NR⁸R⁹, -N(H)C(O)R¹⁰, -C(O)-C₁₋₆alkandiilSR¹⁰, -NR¹¹C(O)C₁₋₆alkandiilSR¹⁰, -NR¹¹C(O)C=N(OH)R¹⁰ ili druga Zn-helirajuća-skupina u kojoj R⁸ i R⁹ je svaki nezavisno izabran između vodika, hidroksi, C₁₋₆alkila, hidroksiC₁₋₆alkila, aminoC₁₋₆alkila ili aminoarila;
R¹⁰ je nezavisno izabran između vodika, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkilkarbonila, arilC₁₋₆alkila, C₁₋₆alkilpirazinila, piridinona, piroldinona ili metilimidazolila;
40 R¹¹ je nezavisno izabran između vodika ili C₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilkarbonila, arilC₁₋₆alkila, C₁₋₆alkilpirazinila;

R^{10} je nezavisno izabran između vodika ili C_{1-6} alkila;

R^2 je vodik, halo, hidroksi, amino, nitro, C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi, trifluometil, di (C_{1-6} alkil) amino, hidroksiaicino ili naftalenilsulfonilpirazinil;

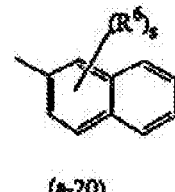
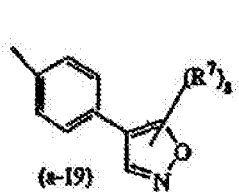
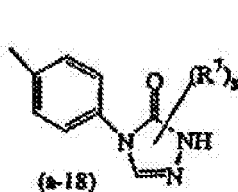
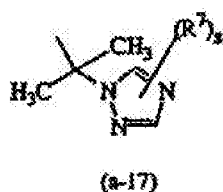
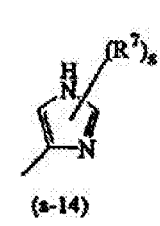
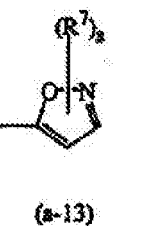
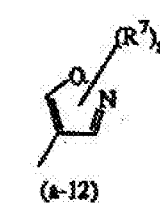
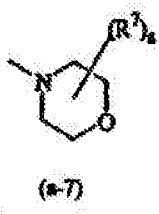
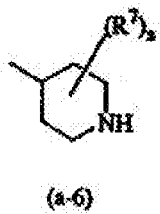
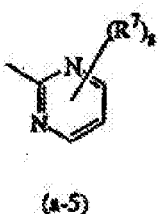
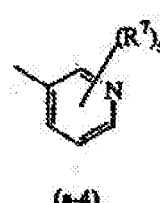
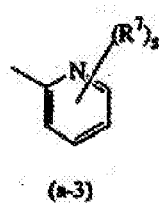
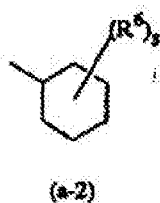
svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom i jedan vodikov atom može biti zamijenjen supstituentom izabranim između arila;

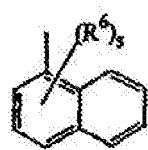
R^4 je vodik, hidroksi, amino, hidroksi C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi, aril C_{1-6} alkil, aminokarbonil, hidroksikarbonil, amino C_{1-6} alkil, aminokarbonil C_{1-6} alkil, hidroksikarbonil C_{1-6} alkil, hidroksiaminokarbonil, C_{1-6} alkiloksikarbonil, C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkil ili di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil;

R^5 je vodik, C_{1-6} alkil, C_{3-10} cikloalkil, hidroksi C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil, di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil ili aril;

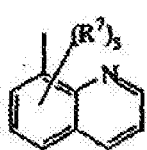


je radikal izabran između

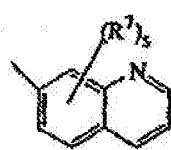




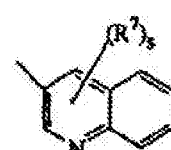
(a-21)



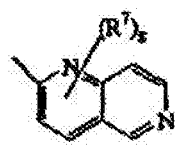
(a-22)



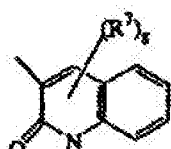
(a-23)



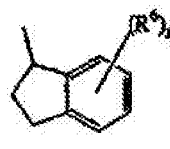
(a-24)



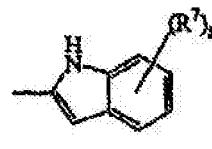
(a-25)



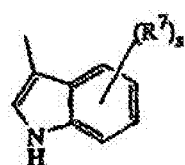
(a-26)



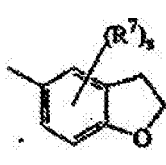
(a-27)



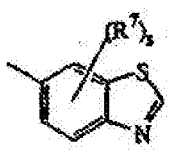
(a-28)



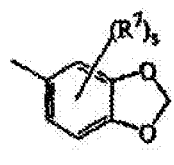
(a-29)



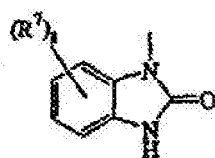
(a-30)



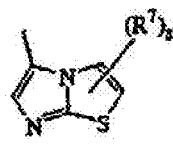
(a-31)



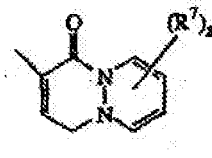
(a-32)



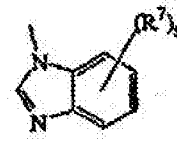
(a-33)



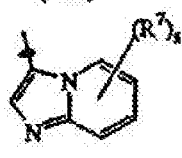
(a-34)



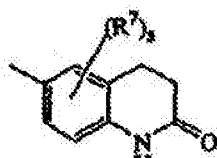
(a-35)



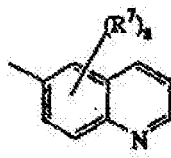
(a-36)



(a-37)



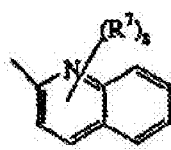
(a-38)



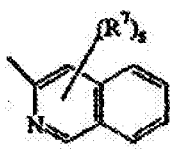
(a-39)



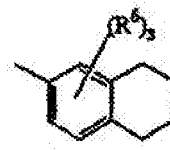
(a-40)



(a-41)



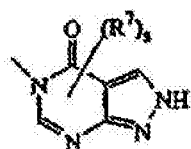
(a-42)



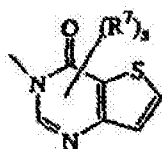
(a-43)



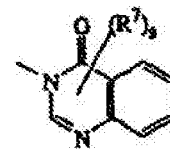
(a-44)



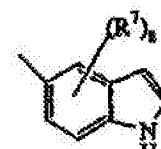
(a-45)



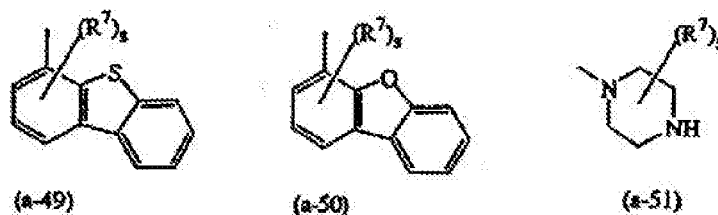
(a-46)



(a-47)



(a-48)



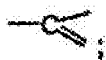
pri čemu je svaki s nezavisno 0, 1, 2, 3, 4 ili 5;

svaki R^6 i R^7 su nezavisno izabrani između vodika; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkila; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkila supstituiranog s arilom i C_{3-10} cikloalkilom; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkilkarboni 1 a; C_{1-6} alkiloksikarbonila; C_{1-6} alkilsulfonila; cijano C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi; hidroksi C_{1-6} alkilamino; amino C_{1-6} alkiloksi; di (C_{1-6} alkil) aminokarbonila; di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino; (aril) (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkiloksi; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino; di(C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; arilsulfonila; arilsulfonilamino; ariloksi; ariloksi C_{1-6} alkila; aril C_{1-6} alkendiila; di (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) amino (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino; aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; cijano; tiofenila; tiofenila supstituiranog s di(C_{1-6} alkil)amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom, hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom, hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom, di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkilom, C_{1-6} alkiloksipiperidinilom, C_{1-6} alkiloksipiperidinil C_{1-6} alkilom, morfolinil C_{1-6} alkilom, hidroksi C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, ili di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom; furanila; furanila supstituiranog s hidroksi C_{1-6} alkilom; benzofuranila; imidazolila; oksazolila; oksazolila supstituiranog s arilom i C_{1-6} alkilom; C_{1-6} alkiltriazolila; tetrazolila; pirolidinila; pirolila; piperidinil C_{1-6} alkiloksi; morfolinila; C_{1-6} alkilmorfolinila; morfolinil C_{1-6} alkiloksi; morfolinil C_{1-6} alkila; morfolinil C_{1-6} alkilamino; morfolinil C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; piperazinila; C_{1-6} alkilpiperazinila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkiloksi; piperazinil C_{1-6} alkila; naftalenilsulfonilpiperazinila; naftalenilsulfonil piperidinila; naftalenilsulfonila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilamino; C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkilpiperazinilsulfonila; aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkiloksi; aminosulfonilpiperazinila; aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinila; di (C_{1-6} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinila; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkiloksipiperidinila; C_{1-6} alkiloksipiperidinil C_{1-6} alkila; piperidinilamino C_{1-6} alkilamino; piperidinilamino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; (C_{1-6} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilamino; (C_{1-6} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-6} alkil) arino C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkila; (hidroksi C_{1-6} alkil) (C_{1-6} alkil) amino; (hidroksi C_{1-6} alkil) (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkil; di(hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; pirolidinil C_{1-6} alkila; pirolidinil C_{1-6} alkiloksi; pirazolila; tiopirazolila; pirazolila supstituiranog s dva supstituenta izabrana između C_{1-6} alkila ili trihalo C_{1-6} alkila; piridinila; piridinila supstituiranog s C_{1-6} alkiloksi, ariloksi ili arilom; pirimidinila; tetrahidropirimidinilpiperazinila; tetrahidropirimidinilpiperazinil C_{1-6} alkila; kinolinila; indola; fenila; fenila supstituiranog s jednim, dva ili tri supstituenta nezavisno izabrana između halo, amino, nitro, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, trifluormetila, trifluormetiloksi, hidroksi C_{1-4} alkiloksi, C_{1-4} alkilsulfonila, C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkiloksi, C_{1-4} alkiloksikarbonila, amino C_{1-4} alkiloksi, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkiloksi, di (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) aminokarbonila, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil), di (C_{1-4} alkil) amino (C_{1-4} alkil) amino, di(C_{1-4} alkil) amino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkil (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkil (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino, aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilamino (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, cijano, piperidinil C_{1-4} alkiloksi, pirolidinil C_{1-4} alkiloksi, aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinil C_{1-4} alkila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilpiperazinila, di (C_{1-4} alkil) aminosulfonilpiperazinil C_{1-4} alkila, hidroksi C_{1-4} alkilpiperazinila, hidroksi C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkiloksipiperidinila, C_{1-4} alkiloksipiperidinil C_{1-4} alkila, hidroksi C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkilpiperazinila, hidroksi C_{1-4} alkiloksi C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkila, (hidroksi C_{1-4} alkil) (C_{1-4} alkil) amino, (hidroksi C_{1-4} alkil) (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, di (hidroksi C_{1-4} alkil) amino, di (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkila, furanila, furanila supstituiranog s -CH=CH-CH=CH-, pirolidinil C_{1-4} alkilom, pirolidinil C_{1-4} alkiloksi, morfolinilom, morfolinil C_{1-4} alkiloksi, morfolinil C_{1-4} alkilom, morfolinil C_{1-4} alkilamino, morfolinil C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, piperazinilom, C_{1-4} alkilpiperazinilom, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkiloksi, piperazinil C_{1-4} alkilom, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkiloin, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkilamino, C_{1-4} alkilpiperazinil C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, tetrahidropirimidinilpiperazinilom, tetrahidropirimidinilpiperazinil C_{1-4} alkilom, piperidinilamino C_{1-4} alkilamino, piperidinilamino C_{1-4} alkilaitiino C_{1-4} alkilom, (C_{1-4} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkilainino, (C_{1-4} alkilpiperidinil) (hidroksi C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, piridinil C_{1-4} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkilamino, hidroksi C_{1-4} alkilamino C_{1-4} alkilom, di (C_{1-4} alkil) amino C_{1-4} alkilamino, aminotiadiazolilom, aminosulfonilpiperazinil C_{1-4} alkiloksi, ili tiofenil C_{1-4} alkilamino;

svaki R^6 i R^7 može se postaviti na dušik kao zamjena vodika;

aril iznad je fenil, ili fenil supstituiran s jednim ili više supstituenata od kojih je svaki nezavisno izabran između halo, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, trifluometil, cijano ili hidroksikarbonila.

2. Spoj kao što je naveden u zahtjevu 1, **naznačen time**, da n je 0, 1 ili 2; t je 0, 1, 2 ili 3; svaki Q je



R^1 je $-C(O)NH(OH)$ ili $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ pri čemu je R^{10} aril C_{1-6} alkil i R^{11} je vodik; R^2 je vodik, C_{1-6} alkil ili naftalenilsulfonilpirazinil; svaki R^3 nezavisno predstavlja vodikov atom; R^4 je vodik, hidroksi, hidroksi C_{1-6} alkil ili d- C_{1-6} alkiloksi; R^5 je vodik, C_{1-6} alkil, hidroksi C_{1-6} alkil ili C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil;



je radikal izabran između (a-1), (a-7) ili (a-20); svaki s je nezavisno 0 ili 1; svaki R^6 je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila, benzofuranila; fenila; ili fenila supstituiranog s jednim supstituentom izabranim između C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, hidroksi C_{1-4} alkila, C_{1-4} alkilsulfonila, ili di (C_{1-4} alkil)amino; svaki R^7 je nezavisno izabran između vodika.

3. Spoj kao što je naveden u zahtjevu 1, **naznačen time**, da t je 0;

R^1 je $-C(O)NR^8R^9$, $-C(O)-C_{1-6}alkandilSR^{10}$, $-NR^{11}C(O)N(OH)R^{10}$, $-NR^{11}C(O)C_{1-6}alkandilSR^{10}$, $-NR^{11}C(O)C=N(OH)R^{10}$ ili druga Zn-helirajuća skupina u kojoj su R^8 i R^9 , svaki nezavisno, izabrani između vodika, hidroksi, hidroksi C_{1-6} alkila, ili amino C_{1-6} alkila;

R^2 je vodik, halo, hidroksi, amino, nitro, C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi, trifluometil ili di (C_{1-6} alkil) amino;

R^4 je vodik, hidroksi, amino, hidroksi C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi, aril C_{1-6} alkil, aminokarbonil, amino C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkilamino C_{1-6} alkil ili di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil;

R^5 je vodik;



je radikal izabran između (a-1), (a-3), (a-4),

(a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42), (a-44), (a-45), (a-46), (a-47), (a-48) ili (a-51);

svaki s je nezavisno 0, 1, 2, 3 ili 4;

R^6 je vodik; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkil; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkil; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkilkarbonil; C_{1-6} alkiloksikarbonil; C_{1-6} alkilsulfonil; hidroksi C_{1-6} alkil; ariloksi; di (C_{1-6} alkil) amino; cijano; tiofenil; furanil; furanil supstituiran s hidroksi C_{1-6} alkilom; benzofuranil; imidazolil; oksazolil; oksazolil supstituiran s arilom i C_{1-6} alkilom; d- C_{1-6} alkiltriazolil; tetrazolil; pirolidinil; pirolil; morfolinil; C_{1-6} alkilmorfolinil; piperazinil; C_{1-6} alkil piperazinil; hidroksi C_{1-6} alkilpiperazinil; C_{1-6} alkiloksi piperidinil; pirazolil; pirazolil supstituiran s jednim ili dva supstituenta izabrana između C_{1-6} alkila ili trihalo C_{1-6} alkila; piridinil; piridinil supstituiran s C_{1-6} alkiloksi, ariloksi ili arilom; pirimidinil; kinolinil; indol; fenil; ili fenil supstituiran s jednim ili dva supstituenta nezavisno izabrana između halo, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi, ili trifluometila; i

R^7 je vodik; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkil; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkil; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkilkarbonil; C_{1-6} alkiloksikarbonil; C_{1-6} alkilsulfonil; hidroksi C_{1-6} alkil; ariloksi; di (C_{1-6} alkil) amino; cijano; piridinil; fenil; ili fenil supstituiran s jednim ili dva supstituenta nezavisno izabrana između halo, C_{1-6} alkila, C_{1-6} alkiloksi ili trifluometila.

4. Spoj kao što je naveden u zahtjevu 1, **naznačen time**, da

R^8 i R^9 je svaki nezavisno izabran između vodika, hidroksi, hidroksi C_{1-6} alkila, amino C_{1-6} alkila ili aminoarila;

R^5 je vodik, C_{1-6} alkil, C_{3-10} ciklolkil, hidroksi C_{1-6} alkil, C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkil ili di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil;

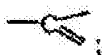


je radikal izabran između (a-1), (a-2), (a-3), (a-4), (a-5), (a-6), (a-7), (a-8), (a-9), (a-10), (a-11), (a-12), (a-13), (a-14), (a-15), (a-16), (a-17), (a-18), (a-19), (a-20), (a-21), (a-22), (a-23), (a-24), (a-25), (a-26), (a-27), (a-28), (a-29), (a-30), (a-31), (a-32), (a-33), (a-34), (a-35), (a-36), (a-37), (a-38), (a-39), (a-40), (a-41), (a-42) (a-43) ili (a-44);

svaki R^6 i R^7 su nezavisno izabrani između vodika; halo; hidroksi; amino; nitro; trihalo C_{1-6} alkila; trihalo C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkila; C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkiloksi C_{1-6} alkiloksi; C_{1-6} alkil karbonila; C_{1-6} alkilsulfonila; cijano C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkila; hidroksi C_{1-6} alkiloksi; hidroksi C_{1-6} alkilamino; amino C_{1-6} alkiloksi; di(C_{1-6} alkil)aminokarbonila; di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino; aril (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkiloksi; di (C_{1-6} alkil)amino C_{1-6} alkilariamino; arilsulfonila; arilsulfonilamino; ariloksi; aril C_{2-6} alkendiila; di (C_{1-6} alkil) amino; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkila; cijano; tiofenila; tiofenila supstituiranog s di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkil (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, di (C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom, C_{1-6} alkilpiperazinil C_{1-6} alkilom ili di (hidroksi C_{1-6} alkil) amino C_{1-6} alkilom; furanila; imidazolila; C_{1-6} alkiltriazolila; tetrazolila; pirolidinila;

piperidinilC₁₋₆alkiloksi; morfolinila; C₁₋₆alkilmorfolinila; morfolinilC₁₋₆alkiloksi; morfolinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilpiperazinila; C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkiloksi; morfolinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilpiperazinila; C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkiloksi; C₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkilpiperazinilsulfonila; aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkiloksi; aminosulfonilpiperazinila; aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkila; di (C₁₋₆alkil) aminosulfonilpiperazinila; di (C₁₋₆alkil) aminosulfonilpiperazinilC₁₋₆alkila; hidroksiC₁₋₆alkil piperazinila; hidroksiC₁₋₆alkilpiperazinilC₁₋₆alkila; C₁₋₆alkil oksipiperidinila; C₁₋₆alkiloksipiperidinilC₁₋₆alkila; hidroksi C₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkilpiperazinila; hidroksiC₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkil piperazinilC₁₋₆alkila; (hidroksiC₁₋₆alkil) (C₁₋₆alkil) amino; (hidroksiC₁₋₆alkil) (C₁₋₆alkil) aminoC₁₋₆alkila; pirolidinilC₁₋₆alkiloksi; pirazolila; tiopirazolila; pirazolila supstytuiranog s dva supstituenta izabrana između C₁₋₆alkila ili trihaloC₁₋₆alkila; piridinila; piridinila supstytuiranog s C₁₋₆alkiloksi ili arilom; pirimidinila; kinolinila; indola; fenila; fenila supstytuiranog s jednim, dva ili tri supstituenta nezavisno izabrana između halo, amino, C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkiloksi, hidroksiC₁₋₄alkila, trifluometila, trifluometiloksi, hidroksiC₁₋₄alkiloksi, C₁₋₄alkiloksiC₁₋₄alkiloksi, aminoC₁₋₄alkiloksi, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkiloksi, di (C₁₋₄alkil) amino, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkila, di (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkil (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkila, piperidinilC₁₋₄alkiloksi, pirolidinilC₁₋₄alkiloksi, aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, di (C₁₋₄alkil) aminosulfonilpiperazinila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, di (C₁₋₄alkil)aminosulfonilpiperazinila, di(C₁₋₄alkil) aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkiloksipiperidinila, C₁₋₄alkiloksipiperidinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkiloksiC₁₋₄alkilpiperazinila, hidroksiC₁₋₄alkoksiC₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) amino, (hidroksiC₁₋₄alkil) (C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkila, pirolidinilC₁₋₄alkoksi, morfolinilC₁₋₄alkiloksi, morfolinilC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkoksi, C₁₋₄alkilpiperazinilC₁₋₄alkila, hidroksiC₁₋₄alkilamino, di (hidroksiC₁₋₄alkil) amino, di(C₁₋₄alkil) aminoC₁₋₄alkilamino, aminotiadiazolila, aminosulfonilpiperazinilC₁₋₄alkiloksi, ili tiofenilC₁₋₄alkilamino.

5. Spoj kao što je naveden u zahtjevu 1 i 2, **naznačen time**, da n je jednak 1 ili 2; t je 0, 1, 2 ili 3; svaki Q je



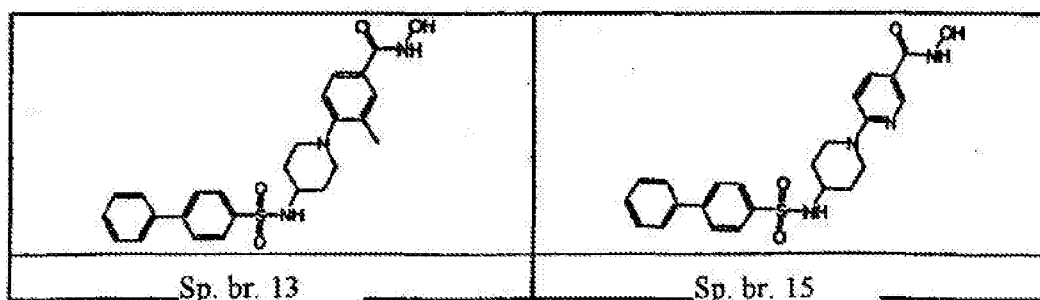
R¹ je -C(O)NH(OH); R² je vodik ili C₁₋₆alkil; svaki R³ nezavisno predstavlja vodikov atom; R⁴ je vodik; R⁵ je vodik ili C₁₋₆alkiloksiC₁₋₆alkil;



je

radikal izabran između (a-1) ili (a-20); svaki s je nezavisno 0 ili 1; svaki R⁶ je nezavisno izabran između vodika; tiofenila; furanila; benzofuranila; fenila; ili fenila supstytuiranog s jednim, supstituentom nezavisno izabranim C₁₋₆alkila, C₁₋₆alkiloksi, hidroksiC₁₋₄alkila, C₁₋₄alkilsulfonila ili di (d-4alkil) amino.

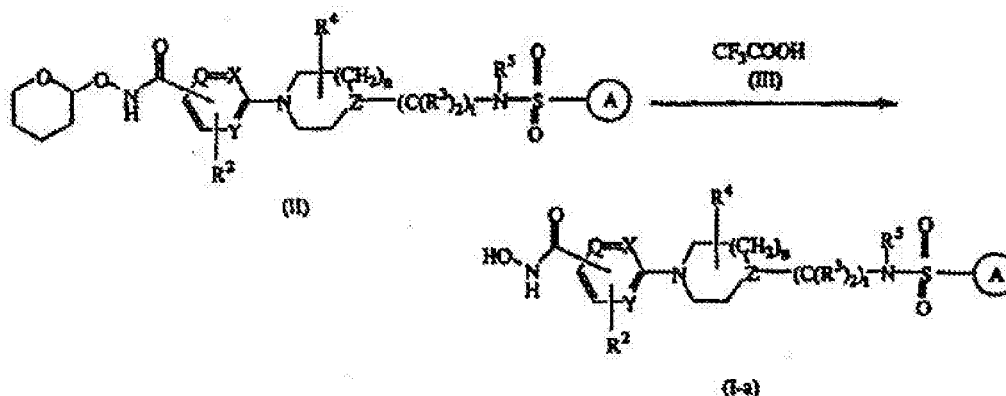
6. Spoj u skladu sa zahtjevom 1, 2 ili 5, **naznačen time**, da se bira između spojeva br. 13, br. 15, br. 2, br. 5, br. 21, br. 4, br. 24, br. 32, br. 26, br. 36, br. 38, br. 39, br. 40, br. 41, br. 42, br. 43, br. 44 i br. 35.



Sp. br. 2	Sp. br. 5
0.7 CH ₃ OH; Sp. br. 21	Sp. br. 4
0.23 C ₆ H ₁₄ O; Sp. br. 24	0.82 C ₂ HF ₃ O ₂ 0.82 H ₂ O; Sp. br. 32
0.85 C ₂ HF ₃ O ₂ 1.11 H ₂ O (Sp. br. 26	Sp. br. 36
Sp. br. 38	Sp. br. 39

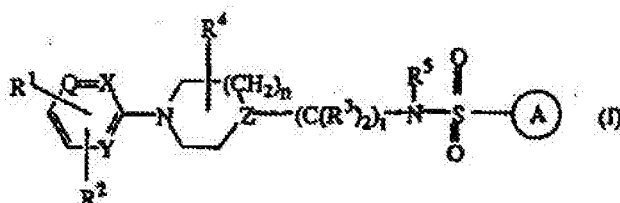
Sp. br. 40	(Sp. br. 41
Sp. br. 42	Sp. br. 43
Sp. br. 44	Sp. br. 35

7. Farmaceutski pripravak, **naznačen time**, da uključuje farmaceutski prihvatljive prijenosnike i kao aktivni sastojak terapijski djelotvornu količinu spoja kako je navedeno u zahtjevima 1 do 6.
8. Proces pripravljanja farmaceutskog pripravka kao što je navedeno u zahtjevu 7, **naznačen time**, da su farmaceutski prihvatljivi prijenosnici i spoj kakav je naveden u zahtjevima 1 do 6 temeljito pomiješani.
- 5 9. Spoj kakav je naveden u bilo kojem od zahtjeva 1 do 8, **naznačen time**, da je za uporabu kao lijek.
10. Uporaba spoja kakav je naveden u bilo kojem od zahtjeva 1 do 6, **naznačena time**, da je za izradu lijeka za liječenje proliferacijskih bolesti.
11. Proces za pripravljanje spoja kakav je naveden u zahtjevu 1, **naznačen time**, da uključuje reakciju intermedijara formule (II) s prikladnom kiselinom, kao što je, primjerice, trifluoroctena kiselina, čime se dobiva hidroksaminska kiselina formule (I-a), pri čemu je $R^1-C(O)NH(OH)$
- 10



12. Postupak za otkrivanje ili identifikaciju HDAC u biološkom uzorku, **naznačen time**, da uključuje otkrivanje ili mjerenje oblikovanja kompleksa između označenog spoja kako je definiran u zahtjevu 1 i HDAC.
12. Kombinacija, **naznačena time**, da sadrži sredstvo protiv karcinoma i inhibitor HDAC kakav je naveden u bilo kojem od zahtjeva 1 do 6.
- 15

SAŽETAK



- 20 Ovaj izum obuhvaća nove spojeve formule (I) u kojoj n , m , t , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , L , Q , X , Y , Z imaju definirana značenja, s djelovanjem inhibiranja enzima histon deacetilaze; njihovo pripravljanje, pripravke koji ih sadrže i njihovu uporabu kao lijeka.