



(19) REPUBLIKA HRVATSKA  
DRŽAVNI ZAVOD ZA  
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator  
dokumenta:

HR P20020802 A2

HR P20020802 A2

## (12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: C 07 D 295/08  
C 07 D 207/26  
C 07 C 229/12  
A 61 K 31/40  
A 61 K 31/195

(21) Broj prijave u HR: P20020802A  
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 07.10.2002.  
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 28.02.2005.  
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/IB01/00427  
Datum podnošenja međunarodne prijave 19.03.2001.  
(87) Broj međunarodne objave: WO 01/77093  
Datum međunarodne objave 18.10.2001.

(31) Broj prve prijave: 60/267,198 (32) Datum podnošenja prve prijave: 07.04.2000. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

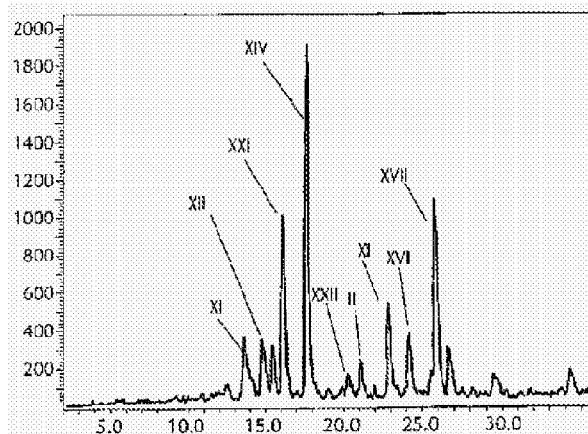
(72) Izumitelj:

Pfizer Products Inc., Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US  
Wesley Warren Day, Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US  
Kim Anne Johnson, Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US  
Chandra Aggarwal Prakash, Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US  
James Frederick Egler, Eastern Point Road, Groton, 06340 CT, US  
Hraste & Partneri odvjetničko društvo, Zagreb, HR

(74) Punomoćnik:

(54) Naziv izuma: METABOLITI ESTROGENSKOG AGONISTA/ANTAGONISTA

(57) Sažetak: Ovaj izum odnosi se na spojeve koji su kod sisavaca metaboliti (-)-cis-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola. Spojeve prema ovom izumu može se upotrijebiti kao standarde prilikom analitičkih testiranja ili kao međuprodukte u daljnjoj kemijskoj sintezi ili biosintezi kemijskih entiteta. Ovaj izum također se odnosi na farmaceutske pripravke za liječenje bolesti i postupke liječenja bolesti.



HR P20020802 A2

**OPIS IZUMA****Područje izuma**

- 5 Ovaj izum odnosi se na spojeve koji su metaboliti (–)-*cis*-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidro naftalen-2-ola kod sisavaca. Spojevi prema ovom izumu korisni su kao standardi u analitičkim testovima, te kao terapijska sredstva.

**Pozadina izuma**

- 10 Farmakološki, (–)-*cis*-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol (PPTN) je estrogenski agonist/antagonist, otkriven u US patentu br. 5,552,412. "Estrogenski agonist/antagonist" je spoj koji djeluje na neke od istih onih receptora na koje djeluje i estrogen, no ne nužno na sve, a u pojedinim slučajevima antagonizira, odnosno blokira estrogen. Također je poznat kao "selektivni modulator estrogenskih receptora" (*selective estrogen receptor*
- 15 *modulator*, SERM). Estrogenske agoniste/antagoniste također se može navoditi kao antiestrogene, iako na određenim receptorima estrogena pokazuju određenu estrogensku aktivnost. Prema tome, estrogenski agonisti/antagonisti nisu ono što se obično naziva "čistim antiestrogenima". Antiestrogene koji također mogu djelovati kao agonisti naziva se antiestrogenima tipa I. Antiestrogeni tipa I aktiviraju estrogenski receptor kako bi se tijekom duljeg vremena čvrsto vezao u jezgri, no uz otežano obnavljanje receptora (Clark i suradnici: "Steroids", 22: 707, (1973.); Capony i suradnici:
- 20 "Mol. Cell. Endocrinol.", 3: 233, (1975.)).

Spojevi prema ovom izumu su PPTN-ski metaboliti i vjeruje se da posjeduju značajne farmakološke aktivnosti slične ili istovjetne onima koje posjeduje roditeljski spoj, PPTN.

**Kratak opis crteža**

- 25 Slika 1 je primjer HPLC-radiokromatograma PPTN-skih metabolita u mokraći kod miševa nakon oralne primjene. Ljestvica na okomitoj osi je radioaktivnost u broju pulseva u minuti (*counts per minute*, CPM). Ljestvica na vodoravnoj osi je vrijeme zadržavanja u minutama.
- 30 Slika 2 je primjer HPLC-radiokromatograma PPTN-skih metabolita u izmetu kod miševa nakon oralne primjene. Ljestvica na okomitoj osi je radioaktivnost u broju pulseva u minuti (CPM). Ljestvica na vodoravnoj osi je vrijeme zadržavanja u minutama.
- Slika 3 je primjer HPLC-radiokromatograma PPTN-skih metabolita u krvotoku kod miševa nakon oralne primjene. Ljestvica na okomitoj osi je radioaktivnost u broju pulseva u minuti (CPM). Ljestvica na vodoravnoj osi je vrijeme zadržavanja u minutama.
- 35 Slika 4 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XI. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 5 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XII. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- 40 Slika 6 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XXI. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 7 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XIV. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 8 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita VI. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- 45 Slika 9 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita II. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 10 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XVI. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- 50 Slika 11 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita X. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 12 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XVII. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 13 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita IV. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- 55 Slika 14 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XV. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- Slika 15 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita V. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.
- 60 Slika 16 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita XIII. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj; m/z.

Slika 17 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita IX. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj;  $m/z$ .

Slika 18 prikazuje uzorak cijepanja i podatke spektra masa PPTN-skog metabolita VIII. Ljestvica na okomitoj osi je relativna zastupljenost. Ljestvica na vodoravnoj osi je odnos masa/naboj;  $m/z$ .

5

### **Bit izuma**

Ovaj izum odnosi se na spojeve koji su metaboliti estrogenskog agonista/antagonista kod sisavaca, PPTN-a.

10 Druga izvedba ovog izuma odnosi se na farmaceutske pripravke koji se sastoje od PPTN-skog metabolita ili njegovog optičkog ili geometrijskog izomera; ili njegove farmaceutski prihvatljive soli, *N*-oksida, estera, kvaterne amonijeve soli i farmaceutski prihvatljive podloge, vehikuluma ili razrjeđivača.

15 Treća izvedba ovog izuma odnosi se na postupke liječenja bolesti koji se sastoje u primjeni djelotvorne količine PPTN-skog metabolita koji posjeduju farmakološku aktivnost ili njegove farmaceutski prihvatljive soli, *N*-oksida, estera, ili kvaterne amonijeve soli. PPTN-ski metaboliti su djelotvorni, uz uglavnom smanjenu vjerojatnost istodobne pojave nepoželjnih učinaka povezanih s primjenom estrogena.

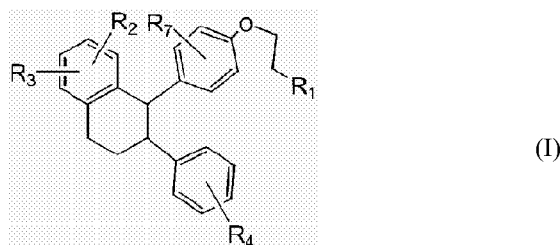
20 Kao četvrta izvedba ovaj izum osigurava komplete namijenjene upotrebi od strane korisnika u liječenju bolesti. Komplet se sastoji od a) PPTN-skog metabolita kod sisavaca; i izborno b) uputa u kojima se opisuje postupak upotrebe PPTN-skog metabolita u liječenju bolesti. Upute također mogu ukazivati da je komplet namijenjen liječenju bolesti, uz uglavnom smanjenu vjerojatnost istodobne pojave nepoželjnih učinaka povezanih s primjenom estrogena.

25 Peta izvedba ovog izuma odnosi se na komplete namijenjene upotrebi kao analitičkih standarda, prilikom mjerenja PPTN-skih metabolita ili njihovih farmaceutski prihvatljivih soli, *N*-oksida, estera, i kvaternih amonijevih soli. Kompleti sadrže uglavnom čist oblik PPTN-skog metabolita i ambalažu u kojoj se metabolit čuva.

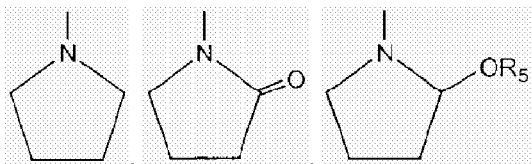
30 Kao šesta izvedba, ovaj izum osigurava upotrebu PPTN-skih metabolita kod sisavaca ili njihovih farmaceutski prihvatljivih soli, *N*-oksida, estera, i kvaternih amonijevih soli, u proizvodnji lijeka.

### **Detaljni opis izuma**

Ovaj izum odnosi se na PPTN-ske metabolite. Ti metaboliti odgovaraju spojevima prikazanim Formulom I:



35 gdje



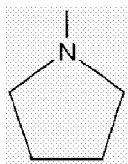
$R_1$  se bira između , , ili  $-NH(CH_2)_3COR_6$ ;

$R_5$  se bira između H,  $CH_3$ , glukuronske kiseline i  $SO_3H$ ;

40  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  i  $R_7$  su isti ili različiti i bira ih se između H i  $OR_5$ ; i

$R_6$  se bira između  $-OH$ ,  $-NHCH_2COOH$ , glukuronske kiseline i  $-NHCH_2CH_2SO_3H$ ,

uz uvjet da:



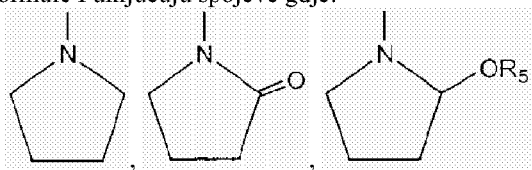
ako  $R_1$  je , ili  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,

$R_2$  je OH ili  $\text{OCH}_3$ , a  $R_3$  i  $R_7$  su H, ili ako  $R_1$  je definiran kao pod (a), gore, i

5  $R_2$  i  $R_7$  su H, a  $R_3$  je OH ili  $\text{OCH}_3$ ,

$R_4$  nije H.

Poželjni spojevi formule I uključuju spojeve gdje:



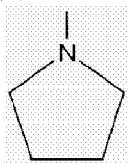
10  $R_1$  se bira između , , ili  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_3R_6$ ;

$R_5$  se bira između H ili  $\text{CH}_3$ ;

$R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  i  $R_7$  su isti ili različiti i bira ih se između H i  $\text{OR}_5$ ; i

15  $R_6$  se bira između  $-\text{OH}$ , ili  $-\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ,

uz uvjet da:



20 ako  $R_1$  je , ili  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,

$R_2$  je OH ili  $\text{OCH}_3$ , a  $R_3$  i  $R_7$  su H, ili ako  $R_1$  je definiran kao pod (a), gore, i

$R_2$  i  $R_7$  su H, a  $R_3$  je OH ili  $\text{OCH}_3$ ,

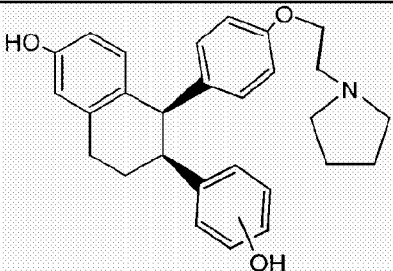
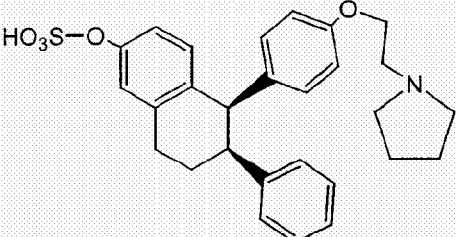
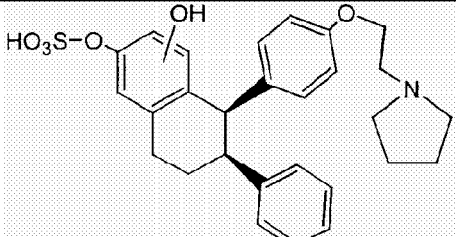
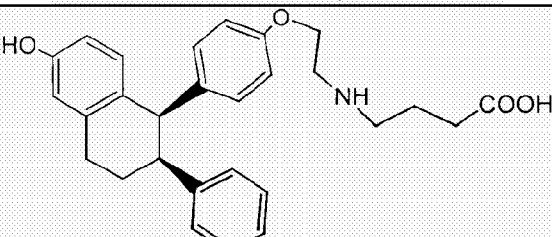
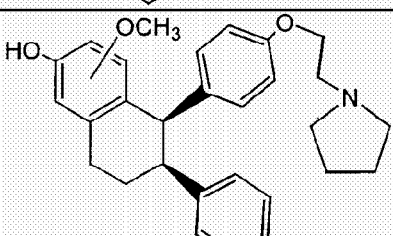
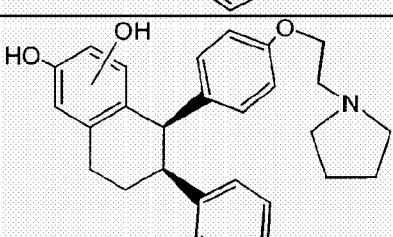
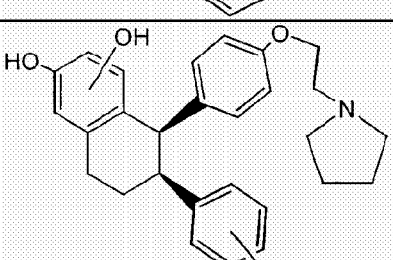
25  $R_4$  nije H.

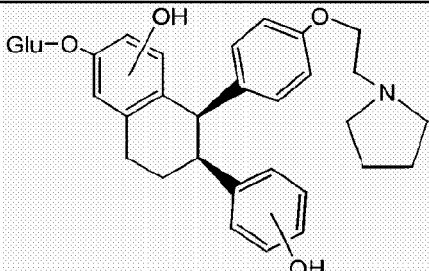
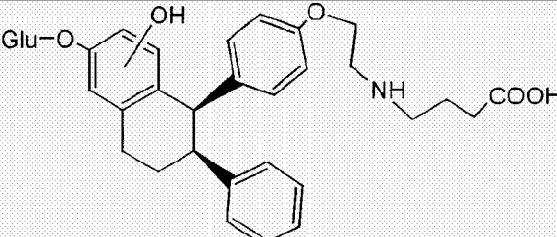
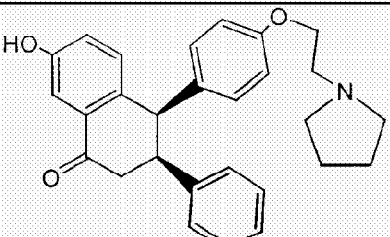
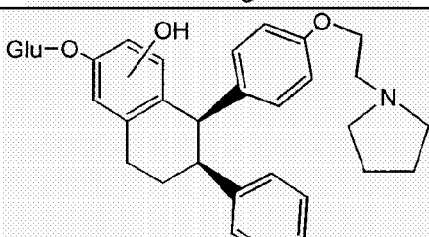
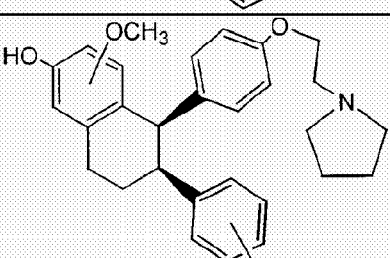
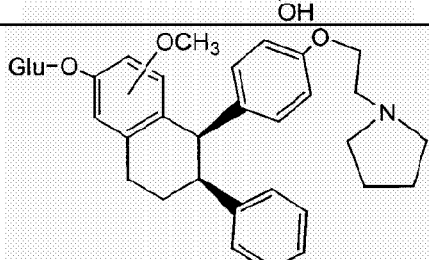
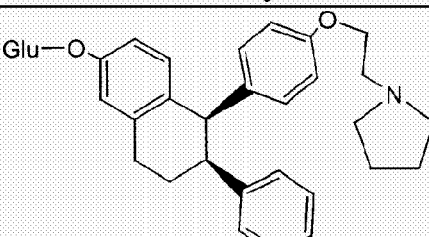
Spojevi koji su poželjni PPTN-ski metaboliti uključuju one prikazane u Tablici I.

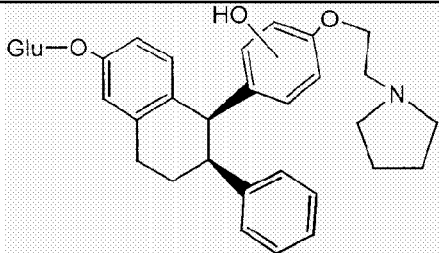
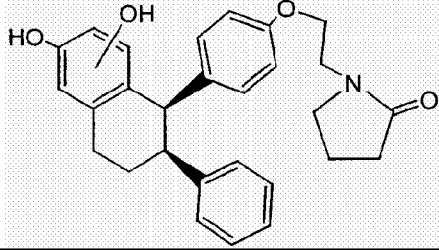
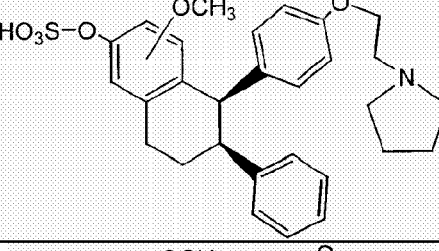
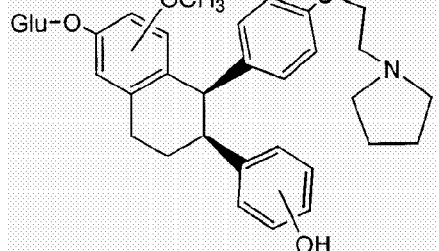
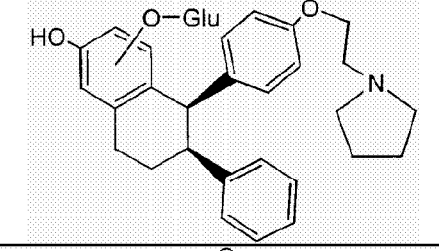
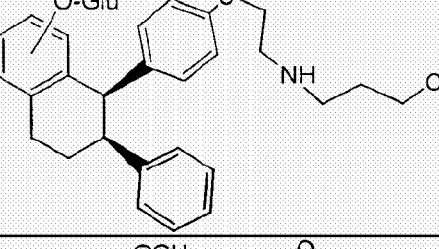
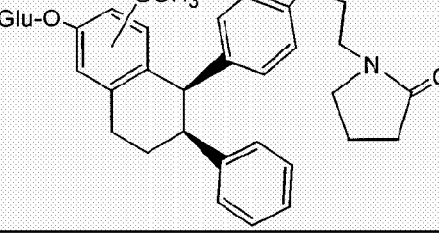
Tablica I: Poželjni PPTN-ski metaboliti:

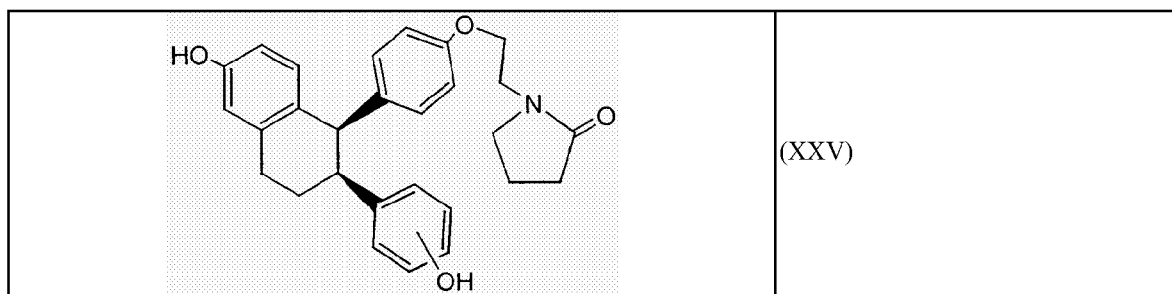
30

|  |       |
|--|-------|
|  | (II)  |
|  | (III) |

|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|    | (IV)   |
|    | (V)    |
|    | (VI)   |
|   | (VII)  |
|  | (VIII) |
|  | (IX)   |
|  | (X)    |

|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|    | (XI)   |
|    | (XII)  |
|    | (XIII) |
|   | (XIV)  |
|  | (XV)   |
|  | (XVI)  |
|  | (XVII) |

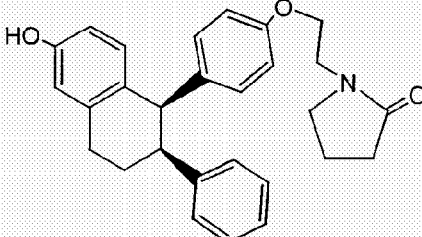
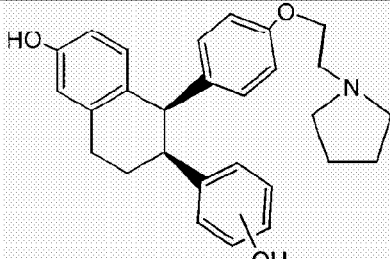
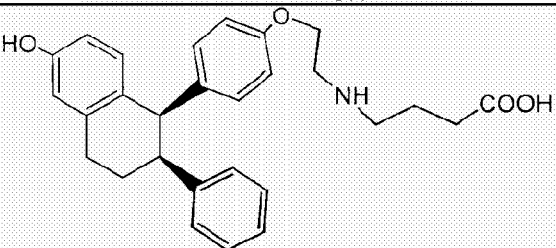
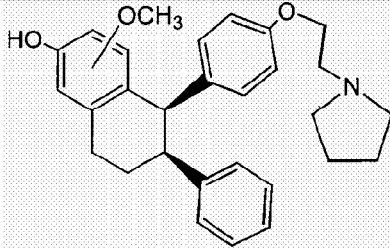
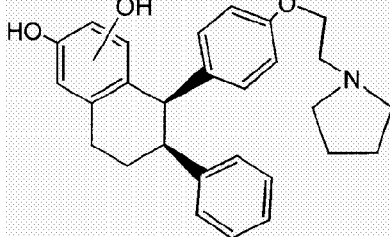
|                                                                                     |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|    | (XVIII) |
|    | (XIX)   |
|    | (XX)    |
|   | (XXI)   |
|  | (XXII)  |
|  | (XXIII) |
|  | (XXIV)  |



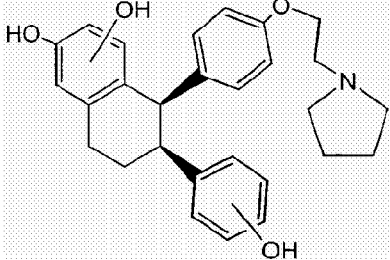
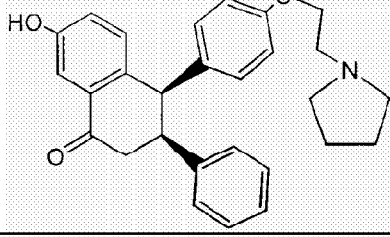
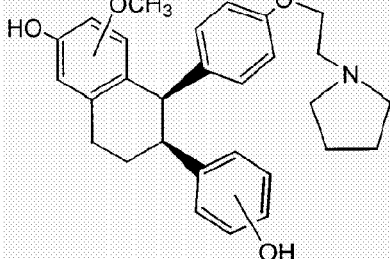
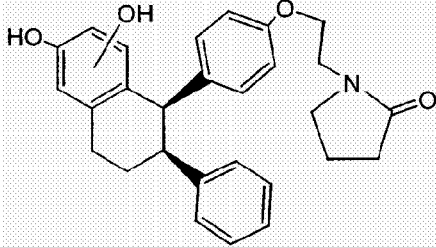
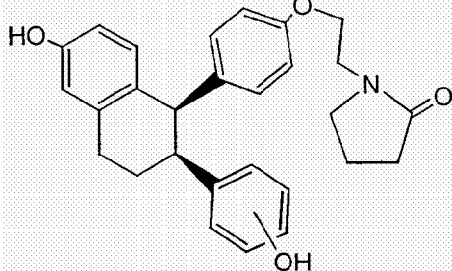
Spojevi koji su poželjniji PPTN-ski metaboli uključuju one prikazane u Tablici II.

Tablica II: Poželjniji PPTN-ski metaboliti:

5

|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|    | (III)  |
|   | (IV)   |
|  | (VII)  |
|  | (VIII) |
|  | (IX)   |



|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
|    | (X)    |
|    | (XIII) |
|    | (XV)   |
|  | (XIX)  |
|  | (XXV)  |

U sljedećoj izvedbi ovaj izum odnosi se na uglavnom čiste PPTN-ske metabolite, kao što su opisani gore.

Ukoliko se ne navodi drugačije, vrijede sljedeće definicije:

- 5 "Liječenje", kao što ga se upotrebljava u ovoj specifikaciji, uključuje preventivno (npr. profilaktičko) i palijativno liječenje, a "liječiti", kao što ga se upotrebljava u ovoj specifikaciji, odnosi se na čin osiguravanja preventivnog i/ili palijativnog liječenja.
- 10 "Subjekt" je životinja, uključujući i ljudsku vrstu, koju se može liječiti spojevima, pripravcima, postupcima i kompletima prema ovom izumu. Izraz "subjekt" ili "subjekti" trebao bi se odnositi na oba spola, muški i ženski, ukoliko se specifično ne navodi jedan spol. Poželjni subjekti su žene nakon menopauze.
- 15 "Nepoželjni učinci povezani s estrogenom" uključuju osjetljivost dojki, rak dojke, nadutost, glavobolju, pojačano grušanje krvi, te menstrualno krvarenje kod žena. Čisto estrogenska terapija povećava opasnost od karcinoma endometrija. Žene pod dugotrajnom estrogenskom terapijom mogu biti pod povećanim rizikom, kojeg se ne može

poništiti suprimjenom progestina ("N. Engl. J. Med.", 332: 1589, (1995.)). Kod muškaraca nepoželjni učinci estrogena uključuju pojačano grušanje krvi, ginekomastiju, feminizaciju i smanjeni libido.

Izraz "žene nakon menopauze" tako je definiran da uključuje ne samo žene starije dobi koje su prošle menopauzu, već također i žene koje s histerektomijom ili im je iz nekog drugog razloga spriječen proizvodnja estrogena, poput onih koje su pod dugotrajnom kortikosteroidnom terapijom, pate od Cushingovog sindroma ili imaju disgenezu gonada.

"Rak dojke" definira se kao maligna proliferacija epitelnih stanica koje okružuju kanale i režnjeve dojke.

"Glukuronska kiselina" supstituent je kojeg se prenosi na metabolit ili na roditeljski spoj, tvoreći metabolit iz druge faze, konjugacijske reakcije glukuronidacije. Glukuronska kiselina reagira s kiselinskim ili alkoholnim ili fenolnim ostatkom na metabolitu ili roditeljskom spoju, tvoreći "glukuronid". Glukuronidni supstituent ovdje se skraćeno označuje u formulama kao "Glu" ili "Glukuronid".

"Sumporna kiselina" supstituent je kojeg se prenosi na metabolit ili na roditeljski spoj, tvoreći metabolit iz druge faze, konjugacijske reakcije sulfatacije. Sumporna kiselina reagira s alkoholnim ili fenolnim ostatkom na metabolitu ili roditeljskom spoju, tvoreći "sulfat".

"Suprimjena" kombinacije PPTN-skog metabolita i jednog ili više dodatnih spojeva znači da se te komponente može primijeniti zajedno, u obliku pripravka ili dijela istog, zajedničkog oblika doziranja. "Suprimjena" također uključuje primjenu jednog PPTN-skog metabolita i neovisno o tom jednog ili više dodatnih spojeva, no kao dio istog programa, odnosno režima, terapijskog liječenja. Komponente se ne mora nužno primijeniti uglavnom istodobno, iako ih se po želji može. Tako, "suprimjena" uključuje, primjerice, primjenu PPTN-skog metabolita i dodatnog spoja u obliku odvojenih doziranja, odnosno oblika doziranja, međutim, istodobno. "Suprimjena" također uključuje i odvojenu primjenu u različita vremena i bilo kojim redoslijedom. Primjerice, kada je to pogodno, pacijent može uzeti jednu ili više komponenti liječenja ujutro, a jednu ili više drugih komponenti navečer.

Prosječan kemičar shvatit će da će određeni spojevi prema ovom izumu sadržavati jedan ili više atoma koji mogu biti u određenoj stereokemijskoj ili geometrijskoj konfiguraciji, zbog čega dolazi do pojave stereoizomera i konfiguracionih izomera. Svi ovakvi izomeri i njihove smjese uključeni su u ovaj izum. Također su uključeni i hidrati spojeva prema ovom izumu.

Opisani izum također uključuje izotopski obilježene spojeve, istovjetne onima prikazanim u Formuli I-XXV, između ostalih spojeva obuhvaćenih ovim izumom, s tim što je jedan ili više atoma zamijenjeno atomom atomske mase ili masenog broja različitog od atomske mase ili masenog broja koji obično dolazi u prirodi. Primjeri izotopa koje se može ugraditi u spojeve prema ovom izumu izotopi su vodika, ugljika, dušika, kisika, fosfora, sumpora, fluora i klora, poput  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ , odnosno  $^{36}\text{Cl}$ . Spojevi prema ovom izumu, njihovi predliječkovi, kao i farmaceutski prihvatljive soli navedenih spojeva ili navedenih predliječkova, koji sadrže gore navedene izotope, i/ili druge izotope drugih atoma, ulaze u opseg zaštite ovog izuma. Određeni izotopski obilježeni spojevi prema ovom izumu, primjerice oni u koje su ugrađeni radioaktivni izotopi, poput  $^3\text{H}$  i  $^{14}\text{C}$ , korisni su u testovima raspodjele lijeka i/ili supstratnog tkiva. Izotopi tricij, tj.,  $^3\text{H}$  i ugljik-14, tj.  $^{14}\text{C}$  osobito su poželjni zbog lakoće svog dobivanja i detektibilnosti. Osim toga, supstitucija težim izotopima, poput deuterija, tj.  $^2\text{H}$ , može dovesti do izvjesnih terapijskih prednosti koje su rezultat veće metaboličke stabilnosti, primjerice povećanog poluvijeka *in vivo* ili smanjene količine potrebne doze te, prema tome, mogu biti poželjni u određenim okolnostima. Izotopski obilježene spojeve formula I-XXV prema ovom izumu, kao i njihove predliječkove, općenito, se može dobiti provedbom postupaka iznijetih niže u primjerima, ili onih poznatih u ovom području tehnike.  $^{14}\text{C}$ -PPTN može se dobiti postupcima opisanima i iznijetima kao primjeri u US patentu br. 5,552,412, zamjenom izotopski neobilježenog reagensa lako dostupnim izotopski obilježenim reagensom.

PPTN-ske metabolite, u svojim uglavnom čistim oblicima ili u smjesama poznatih pripravaka, može se upotrijebiti kao analitičke standarde u *in vitro* ili *in vivo* studijama metabolizma ili kao međuprodukte u kemijskoj sintezi ili biosintezi novih kemijskih entiteta. Metabolite se može izdvojiti u obliku krutina ili u otopinama.

Vjeruje se da spojevi prema ovom izumu mogu biti korisni u liječenju bolesti. Primjeri bolesti kod kojih ovi spojevi mogu biti djelotvorni uključuju osteoporozu, rak dojke, hiperlipidemiju, aterosklerozu, Alzheimerovu bolest, katarakte, gubitak libida, spolnu disfunkciju kod muškaraca, rak debelog crijeva, izboranu kožu, autoimunu bolest, alopeciju, akne, kardiovaskularne bolesti, katarakte, diabetes, endometrioza, spolnu disfunkciju kod žena, hiperglikemiju, pretilost, opsesivno-kompulzivni poremećaj, predmenstruacijski sindrom, karcinom prostate, benignu hiperplaziju prostate, plućnu hipertenziju, reperfuzijsko oštećenje, reumatoidni artritis, osteoartritis, seboreju, staračku ginekomastiju, nedostatak testosterona i stanja koja odgovoraju na porast testosterona, Turnerov sindrom, fibrozu

maternice, atrofični vaginitis, inkontinenciju, rak maternice, hirutizam, bulimiju, anoreksiju, smanjenu spolnu želju, poremećaj spolnog uzbuđenja, dispareuniju, vaginizam, te poticanje zacjeljivanja rane. Ovi spojevi mogu također biti djelotvorni u povećanju učestalosti orgazma, liječenju prolapsa, snižavanju vaginalog pH, liječenju infekcija mokraćnog sustava, liječenju ili sprječavanju inzulta, infarkta miokarda, akutnog ili kroničnog zatajenja bubrega, okluzivne bolesti perifernih arterija, Raynaudovog fenomena, te liječenju raka jajnika, jetre i gušterače, kao i raka ligamenata, glioma i raka renalnih stanica. Postupci liječenja jedne ili više gore navedenih bolesti ili stanja sastoje se u primjeni djelotvorne količine PPTN-skog metabolita.

U postupcima liječenja prema ovom izumu metabolit se može izravno primijeniti na subjektu, kao u tablici, ili se metabolit može primijeniti njegovom proizvodnjom u organizmu subjekta putem metabolizma. Primjerice, metabolit prema ovom izumu može se djelotvorno primijeniti na subjektu kako bi se liječilo bolesti ili stanja primjenom na subjektu određene količine PPTN-a, nakon čega traženi metabolit metabolički nastaje u tijelu subjekta. Osim toga, način primjene i doziranje PPTN-a mogu varirati, po želji, kako bi se postiglo tražene koncentracije *in vivo* i brzine proizvodnje metabolita.

Kada ih se upotrebljava u liječenju jednog ili više od gore navedenih stanja, PPTN-ske metabolite može se upotrijebiti (bilo suprimjenom, zasebno, ili unutar istog farmaceutskog pripravka) u kombinaciji s PPTN-om i statinima, poput simvastatina, otkrivenog u US patentu br. 4,444,784; pravastatina, otkrivenog u US patentu br. 4,346,227; cerivastatina, otkrivenog u US patentu br. 5,502,199; mevastatina, otkrivenog u US patentu br. 3,983,140; velostatina, otkrivenog u US patentu br. 4,448,784 i US patentu br. 4,450,171; fluvastatina, otkrivenog u US patentu br. 4,739,073; kompaktina, otkrivenog u US patentu br. 4,804,770; lovastatina, otkrivenog u US patentu br. 4,231,938; dalvastatina, otkrivenog u Evropskom patentu, objavljenom pod br. 738510 A2; fluindostatina, otkrivenog u Evropskom patentu, objavljenom pod br. 363934 A1; atorvastatina, otkrivenog u US patentu br. 4,681,893; atorvastatin-kalcija, otkrivenog u US patentu br. 5,273,995; dihidrokompektina, otkrivenog u US patentu br. 4,450,171; ZD-4522, otkrivenog u US patentu br. 5,260,440; bervastatina, otkrivenog u US patentu br. 5,082,859; i NK-104, otkrivenog u US patentu br. 5,102,888. PPTN-ske metabolite također se može upotrijebiti u kombinaciji s bisfosfonatnim spojevima, poput alendronske kiseline, alendronata, cimadronata, klodronske kiseline, klodronata, 1-hidroksi-3-(1-pirolidinil)propiliden-1,1-bisfosfonske kiseline, etidronske kiseline, ibandronata, neridronata, olpadronata, pamidronata, piridronata, rizedronata, tiludronata i zolendronata. Osim toga, PPTN-ske metabolite može se upotrijebiti u kombinaciji sa sredstvima za povećanje razine ciklički gvanozin-3',5'-monofosfata, poput sildenafil (1-[[3-6,7-dihidro-1-metil-7-okso-3-propil-1*H*-pirazolo[4,3-*d*]pirimidin-5-il)-4-etoksi-fenil]sulfonil]-4-metilpiperazin-citrata).

Farmaceutski prihvatljive kisele adicijske soli spojeva prema ovom izumu može se dobiti iz spoja kao takvog, ili bilo kojeg od njegovih estera, a uključuju farmaceutski prihvatljive soli koje se često u upotrebljava u farmaceutskoj kemiji. Primjerice, soli se može dobiti s anorganskim ili organskim kiselinama, poput klorovodične kiseline, bromovodične kiseline, jodovodične kiseline, sulfonskih kiselina, uključujući takva sredstva poput naftalensulfonske, metansulfonske i toluensulfonske kiseline, sumporne kiseline, dušične kiseline, fosforne kiseline, vinske kiseline, pirosumporne kiseline, metafosforne kiseline, jantarne kiseline, mravlje kiseline, ftalne kiseline, mliječne kiseline i slično, najpoželjnije s klorovodičnom kiselinom, limunskom kiselinom, benzojevom kiselinom, maleinskom kiselinom, octenom kiselinom i propionskom kiselinom.

Spojeve prema ovom izumu, kao što je raspravljeno gore, može se primijeniti u obliku farmaceutski prihvatljivih soli. Soli se na pogodan način dobiva, kao što je uobičajeno u organskoj kemiji, reakcijom spoja prema ovom izumu, kada je bazičan, s pogodnom kiselinom, poput onih opisanih gore. Soli se dobiva brzo, uz visoke prinose na umjerenim temperaturama, a često ih se dobiva jednostavnim izdvajanjem spoja iz pogodnog kiselog ispirka kao konačnom koraku sinteze. Kiselinu s kojom se tvori sol otopi se u odgovarajućem organskom otapalu, odnosno smjesi vode i organskog otapala, poput alkanola, ketona ili estera. S druge strane, ako je poželjno da spoj prema ovom izumu bude u obliku slobodne baze, izdvaja ga se, prema uobičajenoj praksi, u sljedećem koraku bazičnog ispiranja. Poželjna tehnika dobivanja hidroklorida je otapati slobodnu bazu u pogonom otapalu, a otopinu pomno osušiti, npr. preko molekularnih sita, prije no što se kroz nju propuhuje plinoviti klorovodik.

Kada ga se upotrebljava kao lijek, doza spoja prema ovom izumu koju treba primijeniti na čovjeku promjenjiva je u prilično širokim granicama, ovisno o procjeni nadležnog liječnika. Treba imati na umu da može biti potrebno podesiti dozu spoja prilikom njegove primjene u obliku soli, poput laurata, gdje ostatak koji tvori sol ima značajnu molekularnu masu. Općenito, raspon djelotvornih brzina primjene spojeva kreće se od oko 0,001-200 mg dnevno. Poželjni raspon je od oko 0,01-100 mg dnevno. Naravno, često je praktično dnevnu dozu primijeniti u obrocima, u različite sate tijekom dana. Međutim, u svakom pojedinom slučaju primijenjena količina spoja ovisit će o čimbenicima poput topivosti aktivne komponente, upotrijebljenoj formulaciji i načinu primjene.

Način primjene spojeva prema ovom izumu nije od kritične važnosti. Spojeve se može resorbarati iz probavnog sustava, međutim, po želji se spojeve može primijeniti perkutano, ili u obliku supozitorija za rektalnu resorpciju. Može se

upotrijebiti sve uobičajene tipove pripravaka, uključujući tablete, tablete za žvakanje, kapsule, otopine, parenteralne otopine, dražeje, supozitorije i suspenzije. Pripravke se tako formulira da sadrže dnevnu dozu, ili pogodan dio dnevne doze, u jedinici doziranja koja može biti jedna tableta ili kapsula, ili pogodan volumen tekućine.

5 Općenito, sve se ove pripravke priprema postupcima uobičajenim u farmaceutskoj kemiji i/ili izvaja iz *in vivo* ili *in vitro* metaboličkih reakcija, poput onih iznijetih u ovoj specifikaciji kao primjeri. Roditeljski spoj, PPTN, dobije se postupcima opisanim ili iznijetim kao primjeri u US patentu br. 5,552,412. Metabolite se može sintetizirati izravno ili ih se može dobiti enzimskim ili metaboličkim reakcijama *in vitro* ili *in vivo*, poput onih opisanih u Primjerima.

10 U ovom području tehnike dobro su poznati postupci pripreme formulacija i otkriveni su, primjerice, u Remington: "*The Science and Practice of Pharmacy*", Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19. izdanje, (1995). Farmaceutski pripravci namijenjeni upotrebi u okviru ovog izuma mogu biti u obliku sterilnih otopina ili suspenzija u nepirogenoj tekućini, obloženih kapsula, supozitorija, liofiliziranih prašaka, transdermalnih flastera ili u drugih oblika poznatih u ovom području tehnike.

15 Kapsule se priprema miješanjem spoja s pogodnim razrjeđivačem, te punjenjem odgovarajuće količine smjese u kapsule. Uobičajeni razrjeđivači uključuju inertne praškaste tvari, poput vrlo različitih vrsta škroba, celuloze u prahu, osobito kristalne i mikrokristalne celuloze, šećera, poput fruktoze, manitola i saharoze, žitnog brašna i sličnih jestivih prašaka.

20 Tablete se priprema izravnom kompresijom, vlažnom granulacijom, ili suhom granulacijom. Njihove formulacije obično sadrže razrjeđivače, veziva, maziva i sredstva za raspadanje, kao i spoj. Tipični razrjeđivači uključuju, primjerice, različite tipove škroba, laktozu, manitol, kaolin, kalcij-fosfat ili sulfat, anorganske soli, poput natrij-klorida i šećera u prahu. Također su upotrebljivi derivati celuloze u prahu. Tipična veziva za tablete tvari su poput škroba, 25 želatine i šećera, poput laktoze, fruktoze, glukoze i sl. Također su pogodne prirodne i sintetičke gume, uključujući arapsku gumu, alginat, metilcelulozu, polivinilpirolidin i sl. Polietilen-glikol, etilceluloza i voskovi također mogu služiti kao veziva.

30 Prilikom formuliranja tableta može biti potrebno mazivo kako bi se spriječilo lijepljenje tableta za žigove u kalupu. Maziva se bira između klizavih krutina poput talka, magnezija i kalcij-stearata, stearinske kiseline i hidrogeniranih biljnih ulja.

35 Tabletna sredstva za raspadanje tvari su koje pomažu raspadanje tableta kako bi se otpustilo spoj kada se tableta navlaži. Ona primjerice uključuju škrobove, gline, celuloze, algine i gume, točnije kukuruzni i krumpirov škrob, metilcelulozu, agar, bentonit, drvenu celulozu, prirodnu spužvu u prahu, ionskoizmenjivačke smole, alginsku kiselinu, guar-gumu, pulpu citrusa i karboksimetilcelulozu, koje se može upotrijebiti, kao i natrij-lauril-sulfat.

40 Tablete se često oblaže šećerom u svojstvu korigensa, odnosno brtvenc masce, ili zaštitnim sredstvima koja tvore film, kako bi se modificiralo svojstvima otapanja tablete. Spojeve se također može formulirati i kao tablete za žvakanje, upotrebom u formulaciji velikih količina tvari ugodnog okusa, poput manitola, kao što je danas dobro poznato u ovom području tehnike.

45 Kada se spoj želi primijeniti u obliku supozitorija može se upotrijebiti tipične podloge. Kakao-maslac je tradicionalna baza za supozitorije, koju se može modificirati dodatkom voskova kako bi se blago povisilo talište. U širokoj su upotrebi podloge za supozitorije mješljive s vodom, osobito polietilen-glikoli različitih molekulskih masa.

50 Učinak spojeva može se odgoditi ili produljiti pogodnom formulacijom. Primjerice, može se načiniti sporotopive granule spoja i ugraditi ih u tablete ili kapsule. Tehniku se može poboljšati pripremom granula s nekoliko različitih brzina otapanja, te punjenjem kapsula smjesom granula. Tablete ili kapsule može se oblagati filmom otpornim na otapanje tijekom predvidljivog vremenskog perioda. Čak se i parenteralne pripravke može učiniti dugodjelujućima, otapanjem ili suspendiranjem spoja u uljnim ili emulgiranim vehikulima koji mu dopuštaju samo sporo dispergiranje u serumu.

55 Izraz "predlijek" odnosi se na spojeve koji prolaze pretvorbu *in vivo* kako bi dali spoj prema ovom izumu. Pretvorbu se može ostvariti različitim mehanizmima, poput hidrolize u krvi. Dobru raspravu o upotrebi predlijeva pružaju T. Higuchi i W. Stella: "*Pro-drugs as Novel Delivery Systems*," svezak 14, A.C.S. Symposium Series, i Edward B. Roche: "*Bioreversible Carriers in Drug Design*", American Pharmaceutical Association i Pergamon Press, (1987.).

60 Primjerice, ako spoj prema ovom izumu nosi karboksilnokiselinsku funkcionalnu grupu predlijek može biti ester, dobiven zamjenom atoma vodika u kiselinskoj grupi grupom poput (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkila, (C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>)alkanoiloksimetila, 1-(alkanoiloksi)etila s 4-9 atoma ugljika, 1-metil-1-(alkanoiloksi)-etila s 5-10 atoma ugljika, alkoksikarboniloksimetila s

3-6 atoma ugljika, 1-(alkoksikarboniloksi)etila s 4-7 atoma ugljika, 1-metil-1-(alkoksikarboniloksi)etila s 5-8 atoma ugljika, *N*-(alkoksikarbonil)aminometila s 3-9 atoma ugljika, 1-(*N*-(alkoksikarbonil)amino)etila s 4-10 atoma ugljika, 3-ftalidila, 4-krotonolaktonila, gama-butirolakton-4-ila, di-*N,N*-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)alkilamino(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)alkila (poput β-dimetilamino etila), karbamoil-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)alkila, *N,N*-di(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)alkilkarbamoil-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)alkila i piperidino-, pirolidino- ili morfolino(C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>) alkila.

Slično tome, ako spoj prema ovom izumu nosi alkoholnu funkcionalnu grupu predlijek se može dobiti zamjenom atoma vodika u alkoholnoj grupi grupom poput (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkanoiloksimetila, 1-[(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkanoiloksi]etila, 1-metil-1-[(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkanoiloksi]etila, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkoksikarboniloksimetila, *N*-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkoksikarbonilaminometila, sukcinil, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkanoila, α-amino(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkanoila, arilacila i α-aminoacila, ili α-aminoacil-α-aminoacila, gdje se svaku α-aminoacilnu grupu neovisno bira između prirodnih L-aminokiselina, P(O)(OH)<sub>2</sub>, -P(O)(O(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkila)<sub>2</sub> ili glikozila (radikala dobivenog uklanjanjem hidroksilne grupe hemiacetalnog oblika ugljikohidrata).

Ako spoj prema ovom izumu nosi aminsku funkcionalnu grupu predlijek se može dobiti zamjenom atoma vodika u amino grupi grupom poput R<sup>x</sup>-karbonila, R<sup>x</sup>O-karbonila, NR<sup>x</sup>R<sup>x</sup>-karbonila, gdje svaki od R<sup>x</sup> i R<sup>x</sup> neovisno je ((C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)alkil, (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)cikloalkil, benzil, ili R<sup>x</sup>-karbonil je prirodni α aminoacil ili prirodni α-aminoacil-prirodni α-aminoacil, -C(OH)C(O)OY<sup>x</sup>, gdje (Y<sup>x</sup> je H, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkil ili benzil), -C(OY<sup>x0</sup>)Y<sup>x1</sup>, gdje Y<sup>x0</sup> je (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkil, a Y<sup>x1</sup> je ((C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkil, karboksi(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkil, amino(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alkil ili mono-*N*- ili di-*N,N*-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkilaminoalkil, -C(Y<sup>x2</sup>)Y<sup>x3</sup>, gdje Y<sup>x2</sup> je H ili metil, a Y<sup>x3</sup> je mono-*N*- ili di-*N,N*-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkilamino, morfolino, piperidin-1-il ili pirolidin-1-il.

Kao što ga se upotrebljava u ovoj specifikaciji, izraz "djelotvorna količina" odnosi se na količinu spoja iz postupaka prema ovom izumu koja može liječiti specifične bolesti i patološka stanja. Specifičnu dozu primijenjenog spoja prema ovom izumu odredit će se, naravno, posebnim okolnostima slučaja, uključujući, primjerice, primijenjeni spoj, način primjene, stanje subjekta, te težinu patološkog stanja kojeg se liječi.

Kao posebnu prednost ovaj izum također osigurava kompletne namijenjene upotrebi od strane konzumenta, u svrhu liječenja bolesti. Ti kompleti sadrže a) farmaceutski pripravak, koji se sastoji od estrogenskih agonista/antagonista i farmaceutski prihvatljive podloge, vehikuluma ili razrjeđivača; i, izborno, b) upute, koje opisuju način upotrebe farmaceutskog pripravka u liječenju specifične bolesti. Upute također mogu ukazivati da je komplet namijenjen liječenju bolesti, uz uglavnom smanjenu vjerojatnost istodobne pojave nepoželjnih učinaka povezanih s primjenom estrogena.

"Komplet", kada ga se upotrebljava za trenutnu (neposrednu) primjenu, uključuje ambalažu u kojoj se nalaze odvojene jedinice oblika doziranja, poput podijeljene boce ili podijeljenog paketa u foliji. Ambalaža može biti bilo kojeg uobičajenog oblika ili forme, kao što je poznato u ovom području tehnike, i od farmaceutski je prihvatljivog materijala, primjerice papir, karton, staklena ili plastična boca ili posuda, vreća koju se opetovano može hermetički zatvoriti (primjerice, za čuvanje rezervne šarže tableta za smještaj u različitoj ambalaži), ili blister-pakiranje s pojedinačnim dozama za istiskivanje iz pakiranja prema terapijskom rasporedu. Ambalaža koju se upotrebljava može ovisiti o određenom obliku doziranja, primjerice uobičajenu kartonsku kutiju općenito se neće upotrijebiti za čuvanje tekućih suspenzija. Prednost je ako se više od jedne ambalaže može upotrijebiti zajedno u zajedničkom pakiranju namijenjenom stavljanju na tržište pojedinog oblika doziranja. Primjerice, tablete se može držati u boci, koja se pri tom nalazi u kutiji.

Primjer takvog kompleta je takozvano blister-pakiranje. Blister-pakiranja dobro su poznata u industriji pakiranja i široko ih se upotrebljava za pakiranje farmaceutskih jedinica oblika doziranja (tablete, kapsule i sl.). Blister-pakiranja čini list od relativno krutog materijala prekritog folijom, po mogućnosti od prozirnog plastičnog materijala. Tijekom postupka pakiranja u plastičnoj foliji se oblikuje udubljena. Ove udubine imaju veličinu i oblik pojedinačnih tableta ili kapsula koje će se pakirati ili mogu imati veličinu i oblik prilagođen smještaju više tableta i/ili kapsula koje se pakira. Tablete ili kapsule se, zatim, odgovarajuće polaže u udubine, a list od relativno krutog materijala hermetički se pričvrsti na plastičnu foliju, na lice folije koje je okrenuto suprotno od pravca u kojem se oblikuje udubine. Kao rezultat, tablete ili kapsule su zatvorene pojedinačno, po želji, u udubinama između plastične folije i lista. Po mogućnosti, čvrstoća lista je takva da se tablete ili kapsule može ručno ukloniti iz blister-pakiranja pritiskom ruke na udubinu, pri čemu na listu nastaje otvor na mjestu udubine. Tablete ili kapsule se zatim može izvaditi kroz navedeni otvor.

Može biti poželjno osigurati pisano memorijsko pomagalo, gdje to pisano memorijsko pomagalo sadrži informacije i/ili upute liječniku, farmaceutu ili subjektu, npr. u obliku brojeva pored tableta ili kapsula, pri čemu brojevi odgovaraju danima režima kada se tablete ili kapsule treba progutati, ili karticu koja sadrži isti tip informacija. Drugi primjer takvog memorijskog pomagala je kalendar tiskan na kartici, npr. kao što slijedi "Prvi tjedan, ponedjeljak, utorak," ... itd. ... "Drugi tjedan, ponedjeljak, utorak ..." itd. Lako se može zamisliti i druge varijante memorijskih pomagala. "Dnevna doza" može biti jedna tableta ili kapsula, ili nekoliko tableta ili kapsula, koje se uzima u određenom danu.

Sljedeća specifična izvedba kompleta je dozator, predviđen izdavati dnevne doze jednu po jednu. Po mogućnosti, dozator je opremljen memorijskim pomagalom, tako da još više olakšava provedbu režima. Primjer takvog memorijskog pomagala mehaničko je brojilo, koje pokazuje broj izdanih dnevnih doza. Drugi primjer takvog memorijskog pomagala je baterijski napajan mikro-čip, povezan s čitačem od tekućeg kristala, ili zvučnim signalom kao podsjetnikom, koji, primjerice, očitava datum kada je uzeta posljednja dnevna doza i/ili podsjeća kada treba uzeti sljedeću dozu.

Na osnovu čitanja ovog opisa i zahtjeva, stručnjaku u ovom području tehnike bit će očite izvjesne modifikacije ovdje opisanih priprava i postupaka. Svrha zahtjeva pridruženih ovoj specifikaciji je obuhvatiti ove modifikacije.

Sve citirane reference i patentni uključeni su u ovu specifikaciju kao reference.

### **Primjeri**

U ovoj specifikaciji upotrebljava se sljedeće kratice.

|                   |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| HOAc              | octena kiselina                               |
| Ph                | fenil                                         |
| BuLi              | <i>n</i> -butilitij                           |
| Et <sub>2</sub> O | dietil-eter                                   |
| NBS               | <i>N</i> -bromsukcinamid                      |
| DMF               | dimetilformamid                               |
| AIBN              | azodiizobutironitril                          |
| Me                | metil                                         |
| EtOH              | etanol                                        |
| rt                | sobna temperatura ( <i>room temperature</i> ) |
| THN               | tetrahidronaftalen                            |

### **Primjer 1: Vezanje na estrogenski receptor**

Afinitet vezanja estrogena i PPTN-skog metabolita mjeri se prema sljedećem protokolu:

**cDNA-kloniranje ljudskog ER $\alpha$ :** Kodirajuću regiju ljudskog ER $\alpha$  klonira se postupkom RT-PCR s mRNA iz stanica ljudskog raka dojke, uređajem Ekspand<sup>TM</sup>, High Fidelity PCR System, prema uputama proizvođača (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN). PCR produkte klonira se u pCR2.1 TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), te odredi slijed. Svaku regiju koja kodira receptor supklonira se u sisavački ekspresijski vektor pcDNA3 ((Invitrogen, Carlsbad, CA).

**Ekspresija u stanici sisavca:** Receptorski proteini hiperekspimirani su u 293T stanicama. Ove stanice, izvedene iz HEK293 stanica (ATCC, Manassas, VA), dizajnirane su u cilju stabilne ekspresije velikog antigena T i stoga mogu replicirati plazmide koji sadrže ishodište replikacije iz SV40 do velikog broja kopija. 293T stanice transficira se bilo s hER $\alpha$ -pcDNA3 ili hER $\beta$ -pcDNA3, uz upotrebu lipofektamina, kao što to opisuje proizvođač (Gibco/BRL, Bethesda, MD). Stanice se prikupi u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (*phosphate buffered saline*, PBS), s 0,5 mM EDTA, 48 sati nakon transfekcije. Pelete stanica jednom se ispere s PBS/EDTA. Kompletne lizate stanica dobiva se homogenizacijom u TEG puferu (50 mM Tris pH 7,4, 1,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0,1 mg/ml Pefabloc<sup>TM</sup>; (Pentapharm AG, Basel, Switzerland), upotrebom Dounceovog homogenizatora. Ekstrakte se centrifugira na 100.000  $\times$  g tijekom 2 sata na 4 °C, te prikupi supernatante. BioRad reagensom (BioRad, HERcules, CA) odredi se ukupne koncentracije proteina.

**Test kompetitivnog vezanja:** Svojstvo PPTN-skih metabolita da inhibiraju vezanje [<sup>3</sup>H]-estradiola mjeri se testom kompetitivnog vezanja, uz upotrebu drvenog ugljena obloženog dekstranom, kao što je opisano (R.E. Leake i F. Habib: "Steroid hormone receptors: assay and characterization"; i B. Green i R.E. Leake: "Steroid Hormones: a Practical Approach", IRL Press Ltd., Oxford. 67-92, (1987.)). Ekstrakte 293T stanica koje ekspimiraju bilo hER $\alpha$  ili hER $\beta$  inkubira se u prisustvu rastućih koncentracija PPTN-skog metabolita i stalnih koncentracija [<sup>3</sup>H]-estradiola (141  $\mu$ Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) u 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 1,5 mM EDTA, 50mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM DTT, 0,5 mg/ml  $\beta$ -laktoglobulin u konačnom volumenu od 0,2 ml. Sve PPTN-ske metabolite otopi se u dimetil-sulfoksidu ili vodenom otapalu. Konačna koncentracija receptora je 50 pM, uz 0,5 nM [<sup>3</sup>H]-estradiola. Nakon 16 sati na 4 °C doda se drveni ugljen obložen dekstranom (20  $\mu$ l). Nakon 15 minuta na sobnoj temperature drveni ugljen se ukloni centrifugiranjem, a radioaktivni ligand prisutan u supernatantu mjeri se scintilacijskim brojanjem. Svi reagensi nabavljeni su od strane firme Sigma (St. Louis, MO), ukoliko se drugačije ne navodi.

**Primjer 2: Inhibicija rasta stanica ljudskog tumora dojke *in vitro***

Antiproliferativne učinke PPTN-skog metabolita *in vitro* ispituje se uz upotrebu dva tipa linija stanica ljudskog raka dojke: prvo, MCF-7 stanice, koje sadrže ER, kao i progesteronske receptore (PgR), i drugo, MDA-MB-231 stanice, bez ER i PgR, te omogućuju određivanje učinka neovisnog o ER mehanizmu. Učinak PPTN-skog metabolita na rast ovih različitih staničnih linija određuje se inkubacijom stanica s različitim koncentracijama agonista/antagonista tijekom 6 dana. Zatim se izravnim brojanjem stanica određuje antiproliferativne učinke.

**Primjer 3: Biosinteza PPTN-skih metabolita kod miševa**

Dozu  $^{14}\text{C}$ -PPTN-a pripravi se u obliku suspenzije u 0,5 % metilcelulozi (tež./tež.), u koncentraciji od oko 0,898 mg/g. Doziranu otopinu  $2 \times$  se testira prije i nakon doziranja. PPTN-ske metabolite određuje se visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (*high performance liquid chromatography*, HPLC), uz detekciju radioaktivnosti, te identificira analizom tekućinska kromatografija sa spektrometrijom masa/spektrometrija masa (LC/MS/MS).

U ovom Primjeru grupu CD-1 miševa ( $N = 9$  po spolu, 25-30 g) dozira se prisilnim oralnim hranjenjem i smješta odvojeno u grupe od po tri životinje po kavezu (3 po spolu) u Nalgene<sup>TM</sup>; kavezima za proučavanje metabolizma (Nalge Nunc International, Rochester, NY), radi odvojenog prikupljanja mokraće i izmeta. Cijev za prisilno hranjenje važe se prije i nakon doziranja kako bi se odredilo stvarnu dozu danu svakoj životinji. Mokraću, izmet i ispirke od pranja kaveza sedam dana se 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 i 144-168 sati nakon doziranja kvantitativno prikuplja u prethodno izvagane posude za uzorke iz svakog kaveza. Bilježi se težine mokraće, izmeta i ispirka dobivene u različitim vremenima. Uzorke mokraće i izmeta razdijeli se i do analize uskladišti u tami na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Drugu grupu životinja ( $N = 6$  po spolu, 25-30 g) dozira se prisilnim oralnim hranjenjem radi određivanja metabolita u krvotoku. U ovoj drugoj grupi 3 životinje svakog spola žrtvuje se 1 i 4 sata nakon doziranja, a krv prikupi u heparinizirane epruvete.

Centrifugira se mokraću od svake grupe (približno 3 ml od prikupljene količine iz 0-48 sati), a supernatant prebaci u čistu epruvetu i koncentrira u atmosferi dušika u otparivaču. Ostatak se otopi u približno 1 ml pokretne faze za HPLC, a alikvot (80-100  $\mu\text{l}$ ) injicira na HPLC bez daljeg pročišćavanja. Homogenate životinjskog izmeta ( $\sim 2$  g), 0-72 sata nakon doziranja, prikupi se na osnovu težina prikupljenih u svakom vremenskom intervalu, a prikupljene uzorke razrijedi acetonitrilom (6 ml). Suspenziju se miješa preko noći na magnetskoj miješalici i centrifugira. Supernatant se ukloni, a ekstrakciju ponovi metanolom (6 ml) i smjesom metanol:voda (50:50, 6 ml). Sve supernatante prikupi se zajedno, a male alikvote prebroji. Organsko otapalo otpari se u uređaju Turbo Vap. Ostatak se otopi u približno 1 ml smjese metanol:amonij-acetat (1:1). Alikvot (20-50  $\mu\text{l}$ ) se injicira na HPLC. Prikupljenu plazmu (2 ml, 1 i 4 sata) razrijedi se s 4 ml acetonitrila, a istaloženi protein ukloni centrifugiranjem. Pelet se ispere s još 2 ml acetonitrila, a oba supernatanta prikupi zajedno. Supernatante se koncentrira u otparivaču, a ostatke se rekonstituira u 500  $\mu\text{l}$  smjese metanol:amonij-acetat (1:1). Alikvot (100  $\mu\text{l}$ ) se injicira na HPLC.

HPLC se provodi Hewlett Packard HP 1100 kvaternom pumpom i automatskim uređajem za uzorkovanje (Hewlett Packard, Palo Alto, California), opremljenim detektorom radioaktivnosti ( $\beta$ -RAM, IN/US Systems, Inc., Tampa, FL). Kromatografiju se provodi na Beckman Ultrasphere<sup>TM</sup>; C-18 stupcu (4,6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) s binarnom smjesom 10 mM amonij-acetata (otapalo A) s metanolom (otapalo B). Pokretna faza sadrži inicijalno otapalo A/otapalo B (80:20), zatim je se linearno programira na otapalo A/otapalo B (20:80) tijekom 30 minuta, a zatim programira na otapalo A/otapalo B (5:95) tijekom 5 minuta i održava tijekom 5 minuta. Sastav pokretne faze vraća se na polaznu smjesu otapala tijekom 5 minuta. Sustav se pusti neka se uravnoteži tijekom približno 15 minuta prije provedbe sljedećeg injiciranja. U svim analizama upotrebljava se protok od 1,0 ml u minuti.

Kvantifikaciju metabolita provodi se mjerenjem radioaktivnosti na pojedinim istaknutim vrijednostima razdvojenim HPLC-om, pomoću detektora radioaktivnosti. Detektor radioaktivnosti osigurava integrirani ispis s brojem pulseva u minuti (*counts per minute*, CPM) i postotkom radioaktivno obilježenog materijala, kao i prikazom istaknutih vrijednosti. Detektor radioaktivnosti radi u modu homogenog tekućinskog scintilacijskog brojanja, uz dodavanje, brzinom od 3 ml u minuti, scintilacijskog koktela kompatibilnog s pokretnom fazom u izlaznu tekućinu nakon UV detekcije.

Identifikaciju metabolita provodi se uređajem Finnigan TSQ 7000 LC/MS/MS (Thermo Quest, San Jose, CA). Izlaznu tekućinu iz HPLC-stupca se razdijeli, te brzinom od približno 50  $\mu\text{l}$  u minuti uvodi u ionizirajući izvor spektrometra masa pod atmosferskim tlakom, putem pneumatski podržanog elektrosprej sučelja. Preostalu izlaznu tekućinu usmjerava se u protočnu ćeliju detektora radioaktivnosti. Odgovor detektora radioaktivnosti bilježi se u realnom vremenu pomoću podatkovnog sustava spektrometra masa koji osigurava istodobnu detekciju radioaktivnosti i praćenje podataka spektrometrije masa. Kašnjenje odgovora između ta dva detektora je oko 0,2 minuta, s tim što se odgovor spektrometra masa bilježi ranije. Elektrosprej sučelje radi na oko 4000 V, a spektrometar masa radi u pozitivnom modu.

Studije disocijacije izazvane sudarima (*collision induced dissociation*, CID) provodi se uz upotrebu plinovitog argona, pri energiji sudaranja od oko 30-40 eV i tlaku kolizijskog plina od oko 0,3 Pa (2,3 mTorr).

**Primjer 4: Biosinteza PPTN-skog metabolita kod ljudi**

5

Pripravi se  $^{14}\text{C}$ -PPTN (tartarat) specifične aktivnosti od oko 1,93 mCi/mmol.

10

Za sudjelovanje u studiji bira se normalne, zdrave muškarce od 18-45 godina. Subjekti ulaze u kliničku ustanovu približno 12 sati prije doziranja i ostaju tamo najmanje 576 sati nakon doziranja, pod stalnim medicinskim nadzorom. Svi subjekti gladuju najmanje 12 sati prije unosa jedne doze od otprilike 20 mg ekvivalenta slobodne baze  $^{14}\text{C}$ -PPTN (~80  $\mu\text{Ci}$ /subjekt). Dozu se primjenjuje ujutro, na različite načine. Uobičajeni obrok daje se 4 sata kasnije. Formulaciju doze pripravi se suspendiranjem radioaktivno obilježenog PPTN-a u vodi. Od subjekata se traži da se suzdrže od ležanja, jela i kofeiniziranih, te gaziranih pića tijekom prva 4 sata nakon primjene.

15

24 i 48 sati nakon doziranja uzima se uzorak krvi dovoljan za izdvajanje 20 ml plazme, kako bi se odredilo metabolite. Sve uzorke se obilježava i odmah smrzava.

20

Uzorke plazme (20 ml) iz svakog subjekta, uzete 24 odnosno 48 sati nakon doziranja, pomiješa se s 40 ml acetonitrila, protrese i sonificira. Smjesu se centrifugira, a supernatante ukloni. Pelete se pomiješa s 5 ml acetonitrila, centrifugira, a dva supernatanta prikupi zajedno. Supernatante se u atmosferi dušika koncentrira do suhog. Ostatke se rekonstituiru u 300  $\mu\text{l}$  smjese metanol/voda (1:1), centrifugira kako bi se odvojilo netopive tvari, a 100  $\mu\text{l}$  alikvota injicira u HPLC-stupac. PPTN-ske metabolite ekstrahira se iz uzoraka plazme i odredi HPLC-om, uz detekciju radioaktivnosti, te LC/MS/MS, kao što je opisano u Primjeru 3, gore.

25

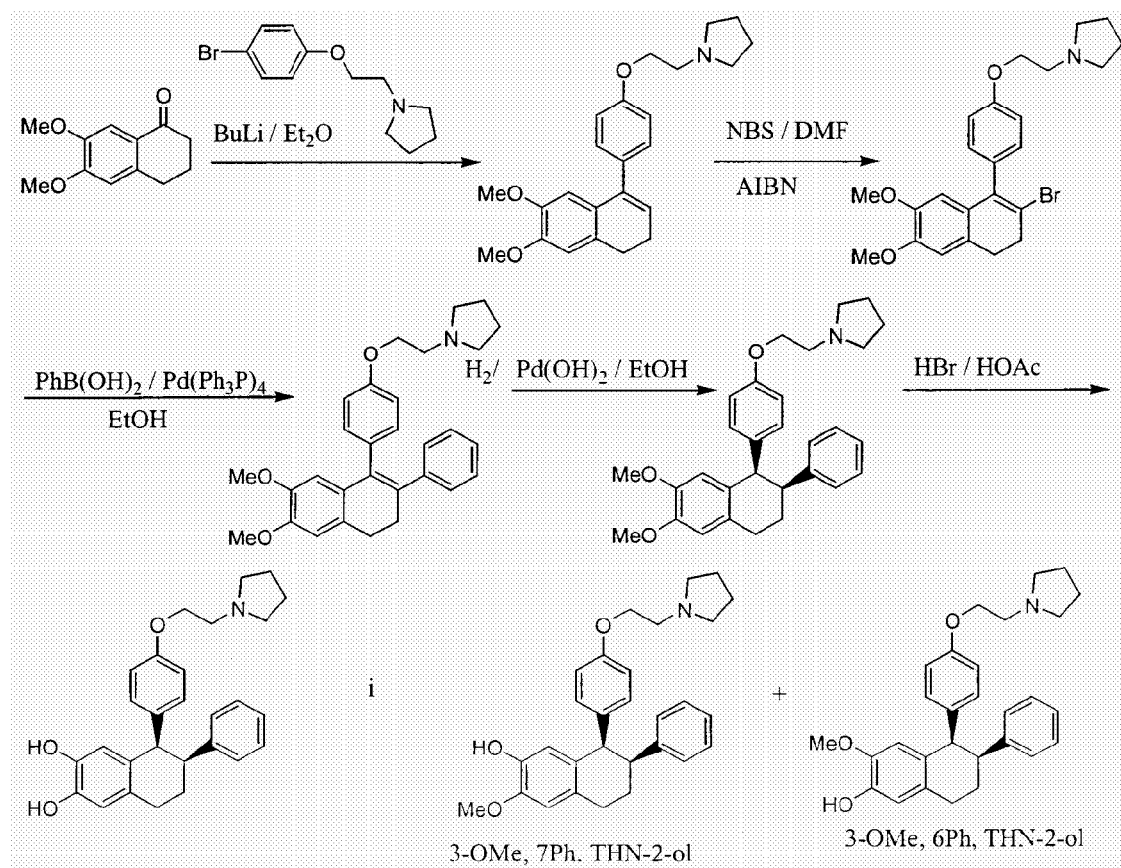
**Primjer 5: Izdvajanje i određivanje PPTN-skog metabolita kod miševa**

30

Biosintezu PPTN-skog metabolita provodi se kod miševa postupkom opisanim u Primjeru 3. Miševe se dozira s 20 mg/kg. Mokraću i izmet prikupi se iz grupe miševa. Dozira se i drugu grupu miševa, te se prikupi krv radi izdvajanja i određivanja metabolita u krvotoku. Rezultati studije prikazani su na Slikama 1-18. Slike 1-3 prikazuju radiokromatograme metabolita u mokraći, izmetu, odnosno u krvotoku. Reprezentativni podaci spektra masa, zajedno sa strukturnom građom metabolita izdvojenih HPLC-om prikazani su na Slikama 4-18.



Shema 1

5 **Primjer 1**1-{2-[4-(6,7-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

Otopinu 6,75 g (0,025 mol) 1-(2-(4-bromfenoksi)etil)pirolidina u 250 ml etera ohladi se do -78°C u atmosferi N<sub>2</sub>. Doda se nekoliko ml THF-a kako bi se otopinu održalo bistrom. Ukapa se 16,7 ml 1,6 M *n*-butilitija, uz održavanje temperature ispod -70°C. Nakon 1 sata miješanja na -78°C 1 sat se ukapava otopinu 5 g (0,024 mol) 6,7-dimetoksi-1-tetralona u 25 ml THF-a, uz održavanje temperature ispod -70°C. Nakon 2,5 sati miješanja na -78°C reakciju se ugasi dodatkom 100 ml 2 N HCl. Reakcijsku smjesu pusti se neka se zagrije do sobne temperature, a pH dodatkom 5 N NaOH podesi na 7. Odvoji se Et<sub>2</sub>O sloj, a vodeni sloj 2 × ekstrahira s EtOAc. Prikupljene Et<sub>2</sub>O/EtOAc slojeve osuši se preko Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i otpari kako bi se dobilo 9 g sirovog produkta, kojeg se pročišćuje na 400 g silikagela, uz eluiranje smjesom 95/5CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH kako bi se uklonilo polazni tetralon, zatim smjesom 85/15 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH kako bi se dobilo 3,3 g produkta.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,97, bs, 4H), (2,55, m, 2H), (2,84, t, 2H), (2,98, bs, 4H), (3,19, s, 2H), (3,68, s, 3H), (3,84, s, 3H), (4,31, s, 2H), (5,93, t, 1H), (6,59, s, 1H), (6,73, s, 1H), (6,90, d, 2H), (7,25, d, 2H).

Spektar masa: (matični +1): 379,8.

Polazni materijali:

6,7-dimetoksi-1-tetralon (Aldrich, Milwaukee, WI).  
1-[2-(4-bromfenoksi)etil]pirolidin (Aldrich, Milwaukee, WI).

**Primjer 2**1-{2-[4-(2-brom-6,7-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

U otopinu 6 g (0,016 mol) {2-[4-(6,7-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina u 200 ml DMF-a, u atmosferi N<sub>2</sub>, na sobnoj temperaturi, ukapa se otopinu 2,8 g (0,016 mol) *N*-bromsukcinimida u 20 ml DMF-a. Doda se

AIBN (100 mg), a reakcijsku smjesu miješa 1 sat, zatim razrijedi vodom i ekstrahira s EtOAc. EtOAc sloj osuši se preko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i otpari kako bi se dobilo 7 g produkta, kojeg se bez pročišćavanja upotrebljava u sljedećem koraku.

NMR (aceton- $d_6$ ) ppm: (1,73, m, 4H), (2,55, m, 4H), (2,80, m, 4H), (3,48, s, 3H), (3,80, s, 3H), (4,15, s, 3H), (6,24, s, 1H), (6,84, s, 1H), (7,00, d, 2H), (7,13, d, 2H).

Spektar masa: (matični + 1): 458.

### Primjer 3

#### 1-{2-[4-(6,7-dimetoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

Smjesu 7 g (0,015 mol) 1-{2-[-(2-brom-6,7-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 5,6 g (0,047 mol) fenilboronske kiseline, 620 mg (0,00054 mol) tetrakis(trifenilfosfin)paladija i 7,6 g (0,072 mol) natrij-karbonata u 500 ml EtOH 10 sati se grije u atmosferi dušika. EtOH se otpari. Doda se vodu i EtOAc, a EtOAc sloj odvoji, osuši preko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i otpari kako bi se dobilo 9 g sirovog produkta u obliku ulja. Ulje se pročišćuje na 600 g silikagela, uz eluiranje smjesom  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9/1 kako bi se dobilo 3,6 g produkta.

NMR (aceton- $d_6$ ) ppm: (1,74, m, 4H), (2,60, bs, 2H), (2,71, m, 2H), (2,85, m, 6H), (3,48, s, 3H), (3,82, s, 3H), (4,10, t, 2H), (6,35, s, 1H), (6,80-7,16, m, 10H).

Spektar masa: (matični + 1): 456.

### Primjer 4

#### 1-{2-[4-(6,7-dimetoksi-2-fenil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

Otopinu 3,6 g (0,0079 mol) 1-{2-[4-(6,7-dimetoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 10 ml 2 N HCl, 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  i 100 ml EtOH s 1,9 g paladij-hidroksida na ugljiku 15 sati se trese u Parrovoj tresilici na 50°C pod atmosferom  $\text{H}_2$ , pod tlakom od 206,843 kPa (30 psi). Reakcijsku smjesu filtrira se kako bi se uklonilo katalizator, a EtOH otpari, doda se 5 N NaOH kako bi se pH vodene otopine podesilo na 8. Vodenu otopinu ekstrahira se s EtOAc, a EtOAc sloj osuši i otpari kako bi se dobilo 3,0 g produkta u obliku žutog ulja.

NMR (aceton- $d_6$ ) ppm: (1,65, m, 4H), (1,74, m, 1H), (1,90, d, 1H), (2,20, m, 1H), (2,53, bs, 4H), (2,63, t, 2H), (3,00, m, 2H), (2,53, d, 1H), (3,60, s, 3H), (3,80, s, 3H), (3,93, t, 2H), (4,20, d, 1H), (6,35, d, 2H), (6,45, s, 1H), (6,53, d, 2H), (6,68, s, 1H), (7,10, m, 3H).

34

Spektar masa: (matični + 1): 458.

### Primjer 5

#### 6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2,3-diol

i

Smjesa 3-metoksi-7-fenil-8-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola i 3-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola

Otopinu 2 g (0,0044 mol) 1-{2-[4-(6,7-dimetoksi-2-fenil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 80 ml HOAc i 80 ml 48 % vodene otopine HBr 2 sata se grije na 90°C u atmosferi  $\text{N}_2$ . Reakcijsku smjesu se zatim ohladi do 0°C u ledenoj kupelji. Doda se 30 % vodene otopine  $\text{NH}_4\text{OH}$  kako bi se pH podesilo na 10. Vodenu otopinu ekstrahira se s EtOAc, a prikupljene EtOAc slojeve osuši i otpari kako bi se dobilo 1,6 g sirovih produkata. Ovaj materijal pročišćuje se na 120 g silikagela, uz eluiranje smjesom  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99/1, zatim 95/5, zatim 90/10, te konačno 85/15, kako bi se dobilo 520 mg smjese 3-metoksi-7-fenil-8-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola i 3-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola.

NMR (aceton- $d_6$ ) ppm: (1,05, m, 1H), (1,24, d, 1H), (1,76, bs, 5H), (2,20, m, 1H), (3,00, m, 4H), (3,31, d, 1H), (3,82, s, 3H), (4,05, t, 2H), (4,18, d, 1H), (6,34, m, 3H), (6,53, d, 2H), (6,78, s, 1H), (7,85, d, 2H), (7,15, m, 3H), (8,20, bs, 1H).

Spektar masa: (matični + 1): 444.

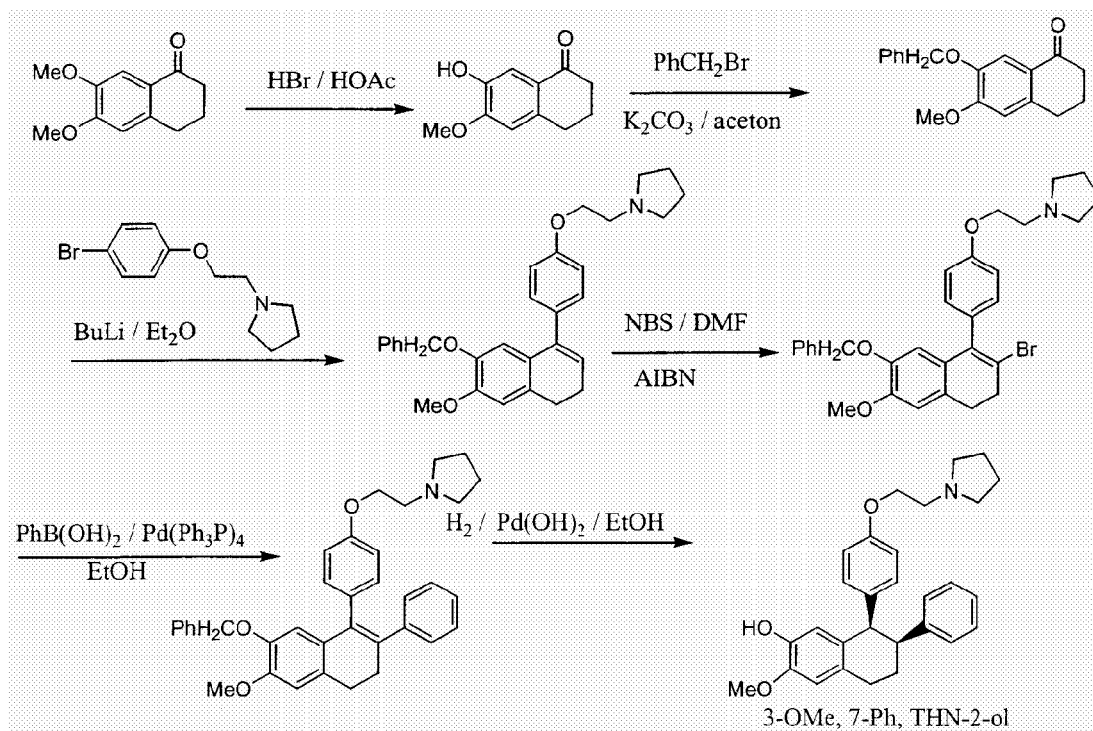
Zatim 180 mg 6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2,3-diol.

- 5 NMR (aceton- $d_6$ ): (1,65, m, 4H), (2,20, m, 1H), (2,50, m, 4H), (2,80, m, 4H), (2,95, m, 1H), (3,50, d, 1H), (3,95, t, 2H), (4,05, d, 1H), (6,33, m, 2H), (6,60, d, 2H) (6,66, s, 1H), (6,84, d, 2H), (7,10, m, 3H), (7,55, s, 2H).

Spektar masa: (matični + 1): 430.

- 10 Talište: 132-134 °C.

## Shema 2



15

## Primjer 6

### 7-hidroksi-6-metoksi-1-tetralon

- 20 Otopinu 10 g (0,048 mol) 6,7-dimetoksi-1-tetralona u 100 ml HOAc i 100 ml 48 % vodene otopine HBr 7 sati se grije na 95°C. Reakcijsku smjesu ohladi se do sobne temperature, prebaci u vodu i ekstrahira s EtOAc. EtOAc sloj osuši se i otpari do 12 g sirovog produkta. Pročišćavanjem na 1200 g silikagela, uz eluiranje smjesom 10 % Et<sub>2</sub>O u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dobije se 7,5 g produkta.

- 25 Talište 147-148 °C (talište prema literaturi: 148-152°C, "Journal of Organic Chemistry", 33, str. 508, (1968.)).

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (2,09, m, 2H), (2,58, m, 2H), (2,85, m, 2H), (3,90, s, 3H), (5,50, bs, 1H), (6,64, s, 1H), (7,55, s, 1H).

- 30 Spektar masa: (matični + 1): 193.

Polazni materijal:

6,7-dimetoksi-1-tetralon (Aldrich, Milwaukee, WI).

35

**Primjer 7**7-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-on

- 5 Smjesa 4,5 g (0,0233 mol) 7-hidroksi-6-metoksi-1-tetralona, 5,4 g (0,032 mol) benzil-bromida i 10 g (0,072 mol)  $K_2CO_3$  u 150 ml acetona grije se do refluksa preko noći. Reakcijsku smjesu se ohladi, prebaci u vodu i ekstrahira s EtOAc. EtOAc sloj osuši se preko  $Na_2SO_4$  i otpari kako bi se dobilo 7 g sirovog produkta. Kristalizacijom s  $Et_2O$  dobije se 4,13 g produkta u obliku bijele krutine, tališta 110-111 °C.
- 10 NMR ( $CDCl_3$ ) ppm: (2,09, m, 2H), (2,55, t, 2H), (2,87, t, 2H), (3,90, s, 3H), (5,14, s, 2H), (6,65, s, 1H), (7,25-7,45, m, 5H), (7,58, s, 1H).

Spektar masa: (matični + 1): 283.

15 **Primjer 8**1-{2-[4-(7-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

- Postupkom analognim onom u Primjeru 1 iz 5,13 g (0,0182 mol) 7-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-ona, 13,63 ml 1,6 M *n*-butilitija u heksanu, i 5,16 g (0,019 mol) 1-(2-(4-bromfenoksi)etil)pirolidina dobije se 3,5 g naslovnog spoja.

NMR ( $CDCl_3$ ) ppm: (2,05, bs, 4H), (2,30, m, 2H), (2,74, t, 2H), (3,10-3,40, m, 6H), (3,90, s, 3H), (4,45, bs, 2H), (4,95, s, 2H), (5,90, t, 1H), (6,58, s, 1H), (6,74, s, 1H), (6,80, d, 2H), (7,10, d, 2H), (7,25, m, 5H).

25 Spektar masa: (matični + 1): 456.

**Primjer 9**30 1-{2-[4-(7-benziloksi-2-brom-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

- Postupkom analognim onom u Primjeru 2 iz 2,47 g (0,0054 mol) 1-{2-[4-(7-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina 965 mg (0,0054 mol) NBS-a i 90 mg AIBN-a u 50 ml DMF-a, dobije se 2,37 g naslovnog spoja.

35 NMR ( $CDCl_3$ ) ppm: (1,90, bs, 4H), (2,69, s, 4H), (2,88, bs, 4H), (3,10, t, 2H), (3,83, t, 2H), (4,83, s, 2H), (6,20, s, 1H), (6,65, s, 1H), (6,90, d, 2H), (7,00, d, 2H), (7,21, m, 5H)

40 Spektar masa: (matični + 1): 536.

**Primjer 10**1-{2-[4-(7-benziloksi-6-metoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

- 45 Postupkom analognim onom u Primjeru 3 iz 2,37 g (0,0044 mol) 1-{2-[4-(7-benziloksi-2-brom-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 1,35 g (0,011 mol) fenilboronske kiseline, 153 mg (0,13 mmol) tetrakis(trifenilfosfin)paladija i 1,88 g (0,017 mol)  $Na_2CO_3$  u 50 ml EtOH dobije se 1,38 g naslovnog spoja.

50 NMR ( $CDCl_3$ ) ppm: (1,83, bs, 4H), (2,70, m, 6H), (2,86, m, 2H), (2,96, m, 2H), (3,90, s, 3H), (4,14, t, 2H), (6,37, s, 1H), (6,65-7,30, m, 15H).

Spektar masa: (matični + 1): 532.

**Primjer 11**55 3-metoksi-7-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ol

- Smjesu 1,38 g (0,0026 mol) 1-{2-[4-(7-benziloksi-6-metoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil} pirolidina, 1,46 g paladij-hidroksida na ugljiku, 4 ml 2 N HCl, 15 ml  $H_2O$  i 100 ml EtOH 36 sati se trese u Parrovoj tresilici na 50 °C u atmosferi  $H_2$ , pod tlakom od 207 kPa (30 psi). Reakcijsku smjesu filtrira se kako bi se odvojilo katalizator, a

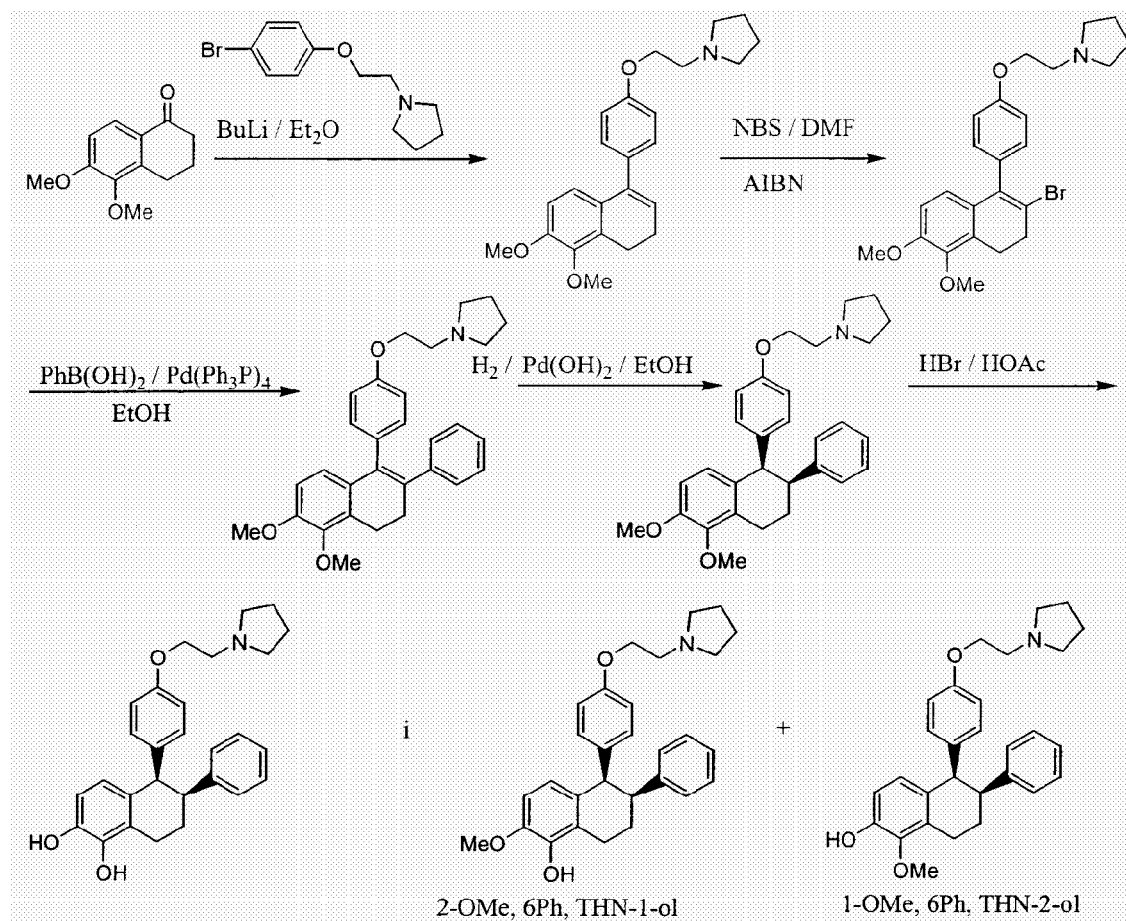
EtOH otpari. Doda se 1 N NaOH kako bi se pH podesilo na 8, vođeni sloj ekstrahira se s EtOAc. EtOAc sloj osuši se i otpari kako bi se dobilo 640 mg naslovnog spoja.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,80, d, 1H), (1,95, bs, 4H), (2,10, m, 1H), (2,85-3,20, m, 7H), (3,30, d, 1H), (3,88, s, 3H), (4,14, t, 2H), (6,30, d, 2H), (6,43, s, 1H), (6,50, d, 2H), (6,68, s, 1H), (6,80, m, 2H), (7,18, m, 3H).

Spektar masa: (matični +1): 444.

2-OMe, 1-OH metabolit i 3-OH, 2-OMe metabolit može se sintetizirati postupcima opisanim u Shemama 4 i 5. 3-metoksi-6-fenil-tetrahidronaftalen-2-olni metabolit može se sintetizirati postupkom opisanim u Shemi 5.

### Shema 3



### Primjer 12

#### 1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

Postupkom analognim onom u Primjeru 1 iz 10 g (0,048 mol) 5,6-dimetoksi-1-tetralona, 33,4 ml 1,6 M *n*-butillitija u heksanu i 13,5 g 1-(2-(4-bromfenoksi)etil)pirolidina dobije se 6,5 g naslovnog spoja.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,90, bs, 4H), (2,31, m, 2H), (2,87, t, 2H), (2,90, bs, 4H), (3,10, bs, 2H), (3,78, s, 3H), (3,82, s, 3H), (4,28, bs, 2H), (5,90, s, 1H), (6,63, d, 1H), (6,70, d, 1H), (6,90, d, 2H), (7,22, d, 2H).

Spektar masa: (matični + 1): 379,8.

Polazni materijal:

5,6-dimetoksi-1-tetralon; ref.: "Organic Process Research & Development", 3, 71-72, (1999.).

**Primjer 13**

1-{2-[4-(2-brom-5,6-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

5 Postupkom analognim onom u Primjeru 2 iz 5,33 g (0,14 mol) 1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 2,5 g (0,014 mol) NBS-a i 230 mg AIBN-a u 50 ml DMF-a, dobije se 6,25 g naslovnog spoja.

10 NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,96, bs, 4H), (2,90, m, 6H), (3,05, t, 2H), (3,15, t, 2H), (3,80, s, 6H), (4,30, t, 2H), (6,35, d, 1H), (6,53, d, 1H), (6,95, d, 2H), (7,10, d, 2H).

Spektar masa: (matični + 1): 458.

**Primjer 14**

15

1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

Postupkom analognim onom u Primjeru 3 iz 6,25 g (0,0136 mol) 1-{2-[4-(2-brom-5,6-dimetoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 4,16 g (0,034 mol) fenilboronske kiseline, 472 mg (0,41 mmol) tetrakis(trifenilfosfin)paladija i 5,78 g (0,054 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 200 ml EtOH dobije se 6,3 g naslovnog spoja.

20 NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,80, bs, 4H), (2,65, bs, 4H), (2,73, t, 2H), (2,90, t, 2H), (3,00, t, 2H), (3,83, s, 6H), (4,08, t, 2H), (6,53, d, 1H), (6,60, d, 1H), (6,74, d, 2H), (6,95, d, 2H), (7,05, m, 5H).

25 Spektar masa: (matični + 1): 456.

**Primjer 15**

30

1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-2-fenil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)-fenoksi]etil}pirolidin

Postupkom analognim onom u Primjeru 4 iz 6,3 g (0,0138 mol) 1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 7,7 g (0,055 mol) paladij-hidroksida na ugljiku, 5 ml 2 N HCl i 10 ml H<sub>2</sub>O u 100 ml EtOH dobije se 5,06 g naslovnog spoja.

35 NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>) ppm: (1,95, bs, 4H), (2,70, m, 1H), (2,85, bs, 4H), (2,95, m, 1H), (3,20, bs, 2H), (3,38, bs, 2H), (3,78, s, 3H), (3,82, s, 3H), (4,40, bs, 2H), (6,43, d, 1H), (6,74, d, 1H), (6,85-7,15, m, 7H).

Spektar masa: (matični + 1): 458.

**Primjer 16**

40

6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1,2-diol

i

45

Smjesa 2-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-ola i 1-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola

50 Postupkom analognim onom u Primjeru 5 iz 2,3 g (0,005 mol) 1-{2-[4-(5,6-dimetoksi-2-fenil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 80 ml HOAc i 80 ml 48 % vodene otopine HBr dobije se 650 mg smjese 2-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-ola i 1-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola.

55 NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,88, bs, 6H), (2,10, m, 1H), (2,84, bs, 4H), (3,00, bs, 2H), (3,25, dt, 1H), (3,35, d, 2H), (3,85, s, 3H), (4,10, bs, 2H), (4,25, d, 1H), (6,25-6,88, m, 8H), (7,15, m, 3H).

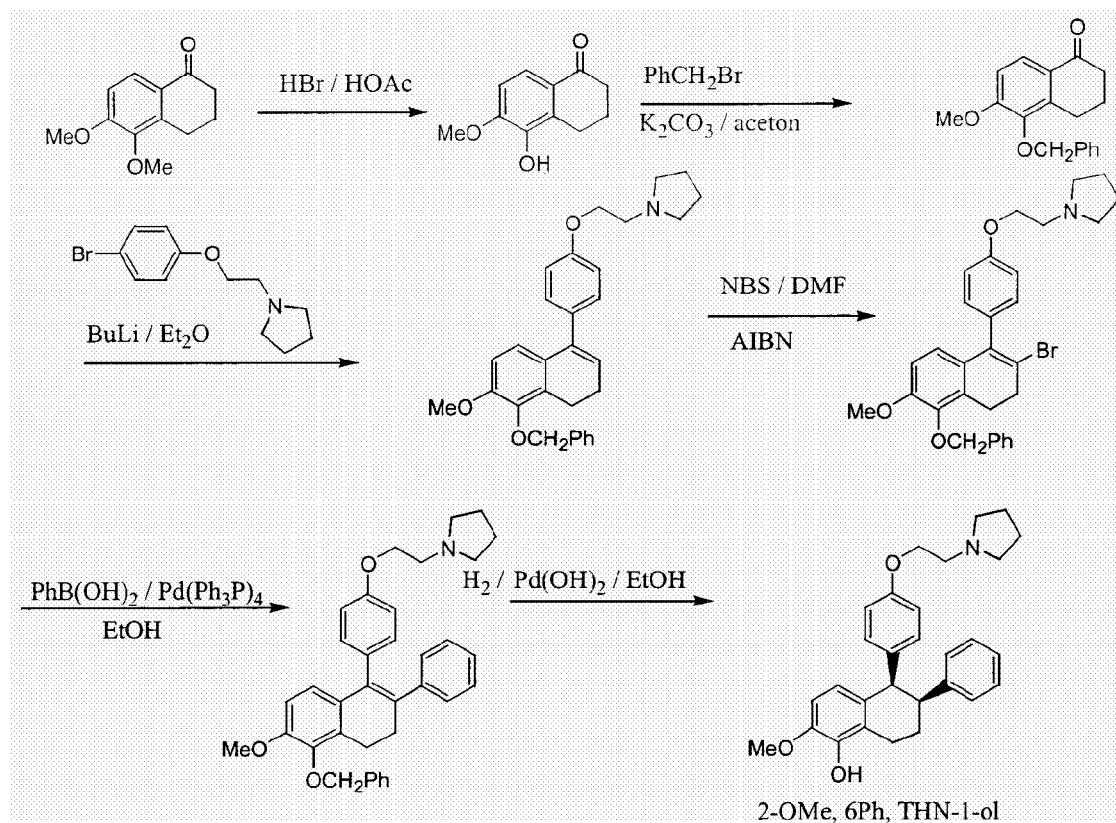
Spektar masa: (matični + 1): 444.

Zatim 140 mg 6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1,2-diola.

60

Spektar masa: (matični + 1): 430.

Shema 4



5

**Primjer 17**5-hidroksi-6-metoksi-1-tetralon

- 10 Postupkom analognim onom u Primjeru 6 iz 10 g (0,048 mol) 5,6-dimetoksi-1-tetralona, 100 ml HOAc i 100 ml 48 % vodene otopine HBr dobije se 7 g naslovnog spoja, tališta 163 °C.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (2,09, m, 2H), (2,67, t, 2H), (2,90, t, 2H), (3,92, s, 3H), (5,70, bs, 1H), (6,80, d, 1H), (7,68, d, 1H).

- 15 Spektar masa: (matični +1): 193.

Polazni materijal:

5,6-dimetoksi-1-tetralon; ref: "Organic Process Research and Development", 3, 71-72, (1999.).

20 **Primjer 18**5-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-on

- 25 Postupkom analognim onom u Primjeru 7 iz 4,5 g (0,024 mol) 5-hidroksi-6-metoksi-1-tetralona, 5,4 g (0,031 mol) benzil-bromida i 10 g (0,072 mol K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 100 ml acetona), kristalizacijom s eterom dobije se naslovni spoj (5,13 g) u obliku bijele krutine, tališta, 90 °C.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (2,10, m, 2H), (2,55, t, 2H), (2,88, t, 2H), (3,88, s, 3H), (5,11, s, 2H), (6,63, s, 1H), (7,20-7,45, m, 5H), (7,60, s, 1H).

30

Spektar masa: (matični +1): 283.

**Primjer 19**1-{2-[4-(5-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

- 5 Postupkom analognim onom u Primjeru 1 iz 10 g (0,3555 mol) 5-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona, 9,88 g (0,366 mol) 1-(2-(4-bromfenoksi)etil)pirolidina i 13,63 ml 1,6 M *n*-butillitija u heksanu dobije se 4,3 g naslovnog spoja.

10 NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,90, bs, 4H), (2,20, m, 2H), (2,78, t, 2H), (2,90, bs, 2H), (3,10, bs, 1H), (3,84, s, 3H), (4,26, t, 2H), (4,98, s, 2H), (5,86, t, 1H), (6,65, d, 1H), (6,74, d, 1H), (6,88, d, 2H), (7,25, d, 2H), (7,28-7,50, m, 5H).

**Primjer 20**1-{2-[4-(5-benziloksi-2-brom-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidin

- 15 Postupkom analognim onom u Primjeru 2 iz 4,3 g (0,0094 mol) 1-{2-[4-(5-benziloksi-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina 1,68 g (0,0094 mol) NBS-a i 156 mg AIBN-a u 50 ml DMF-a, dobije se 4 g naslovnog spoja.

20 NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,95, bs, 4H), (2,75, t, 2H), (2,90, t, 2H), (3,00, bs, 4H), (3,10, bs, 2H), (3,80, s, 3H), (4,33, s, 2H), (6,35, d, 1H), (6,57, d, 1H), (6,93, d, 2H), (7,15-7,30, m, 5H).

Spektar masa: (matični + 1): 536.

**Primjer 21**

25 1-{2-[4-(5-benziloksi-6-metoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksil]etil}pirolidin

- 30 Postupkom analognim onom u Primjeru 3 iz 4,0 g (0,0075 mol) 1-{2-[4-(5-benziloksi-2-brom-6-metoksi-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 2,28 g (0,186 mol) fenilboronske kiseline, 259 mg (0,224 mmol) tetrakis(trifenil fosfin)paladija, 3,7 g (0,03 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 150 ml EtOH dobije se 3,2 g naslovnog spoja.

NMR (CDCl<sub>3</sub>) ppm: (1,84, bs, 4H), (2,83, m, 2H), (2,74, m, 4H), (2,95, m, 4H), (3,84, s, 3H), (4,10, t, 2H), (5,03, s, 2H), (6,55, d, 1H), (6,65, d, 1H), (6,75, d, 2H), (6,90-7,50, m, 12H).

- 35 Spektar masa: (matični + 1): 532.

**Primjer 22**2-metoksi-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-ol

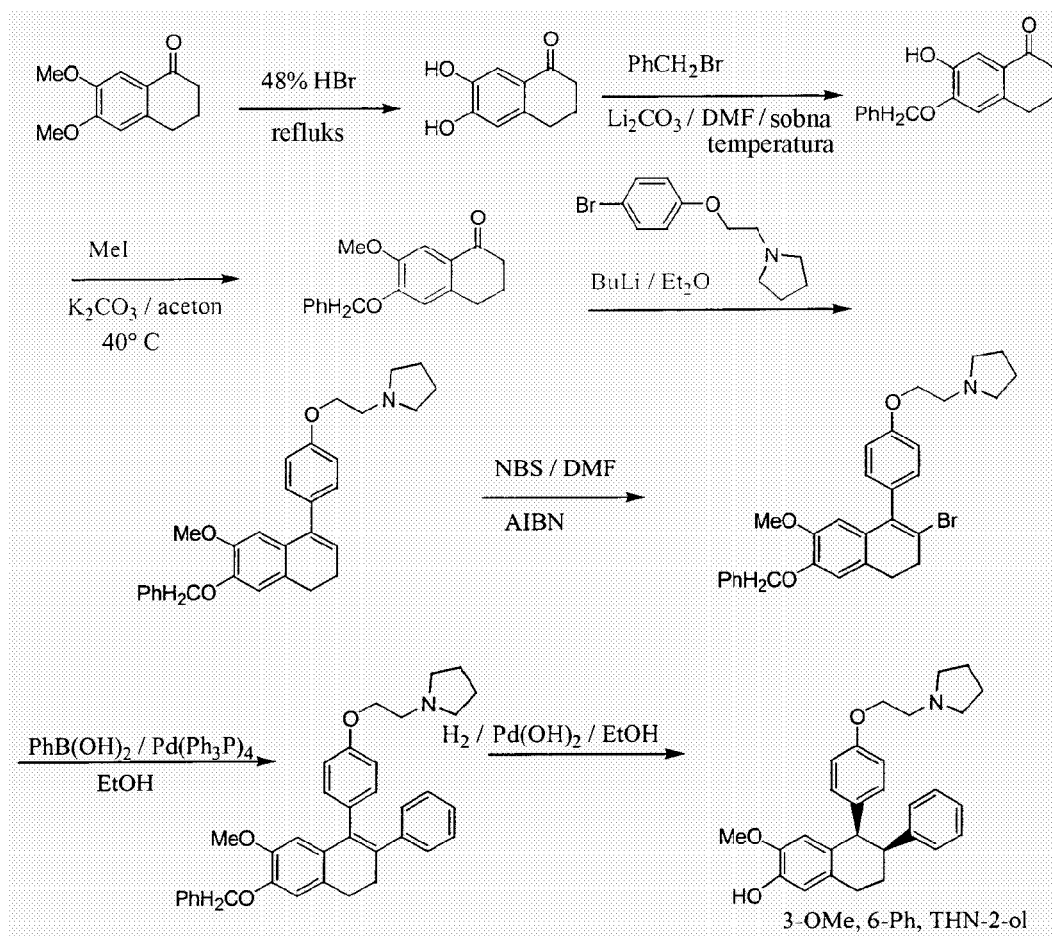
- 40 Postupkom analognim onom u Primjeru 11 iz 3,2 g (0,007 mol) 1-{2-[4-(5-benziloksi-6-metoksi-2-fenil-3,4-dihidronaftalen-1-il)fenoksi]etil}pirolidina, 3,4 g paladij-hidroksida na ugljiku, 10 ml 2 N HCl, 30 ml H<sub>2</sub>O i 100 ml EtOH dobije se 2,2 g produkta.

- 45 Spektar masa: (matični +1): 444.

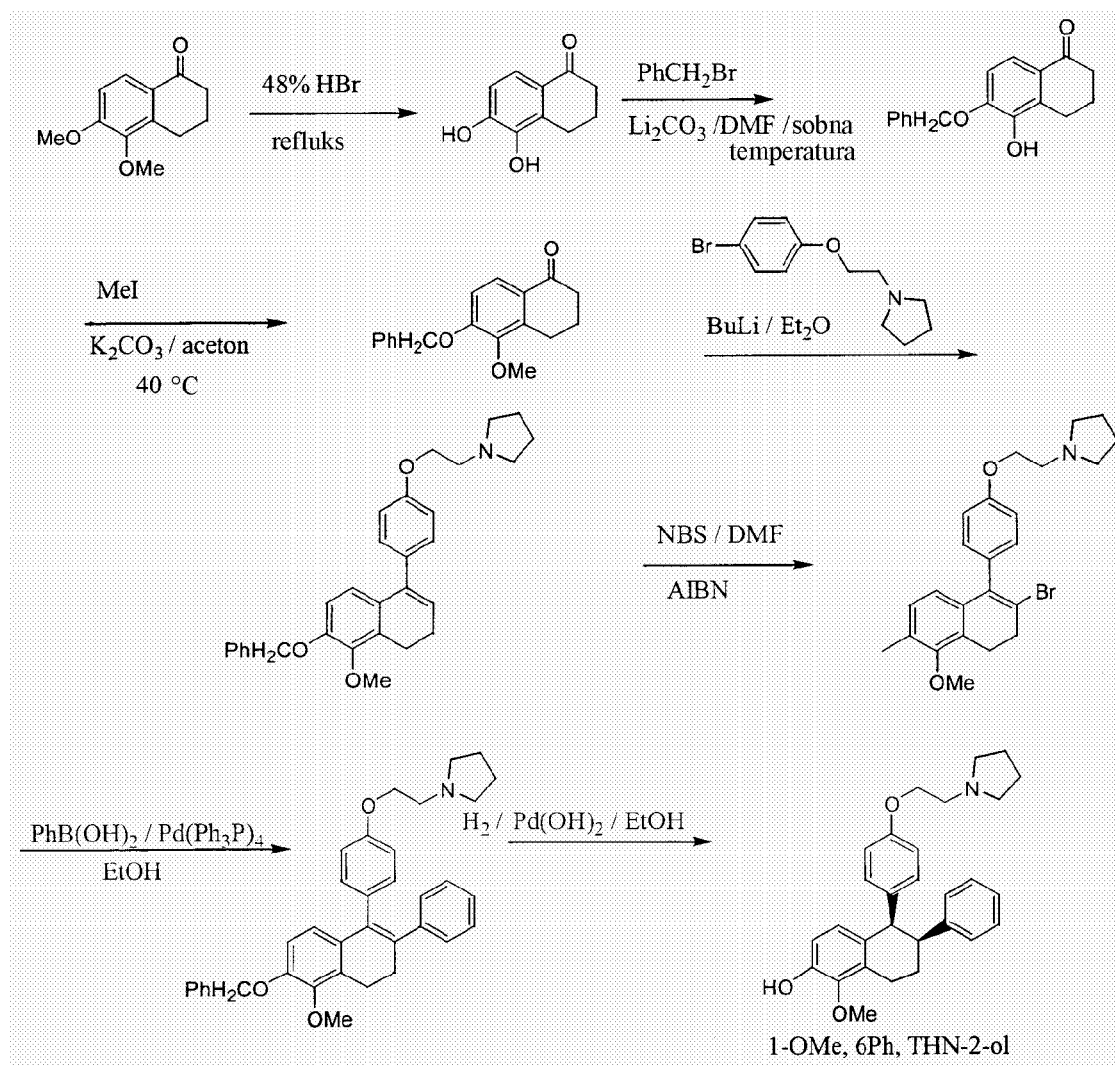
1-metoksi-6-fenil-tetrahidronaftalen-2-olni metabolit može se sintetizirati kao što je opisano u Shemi 6.



Shema 5



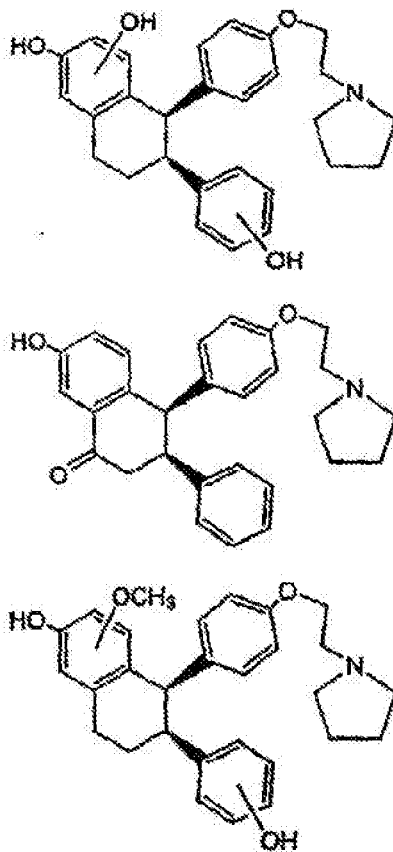
Shema 6



5

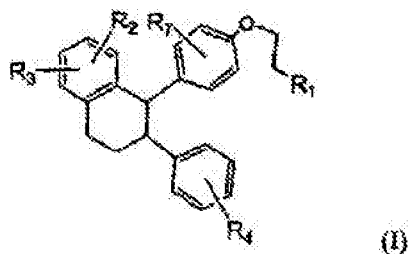
## PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Metabolit(-)*cis*-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-il-etoksi)-fenil]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ola, **naznačen time**, da je odabran iz grupe koju čine:



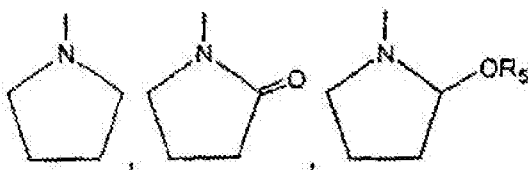
njihovih stereoizomera, tautomera, regio i konilguracijskih izomera, kao i njihovih farmaceutski prihvatljivih soli.

2. Upotreba metabolita (-)-*cis*-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)-fenil]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ola, formule I



gdje se:

$R_1$  se bira između



ili  $-NH(CH_3)_3COR_6$ ;

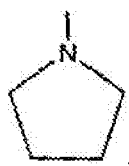
$R_5$  se bira između H ili  $CH_3$ ;

$R_2, R_3, R_4$  i  $R_7$  su isti ili različiti i bira ih se između H i  $OR_5$  i

$R_6$  se bira između  $-OH$ , ili  $-NHCH_2COOH$ ,

uz uvjet da:

(a) ako  $R_1$  je



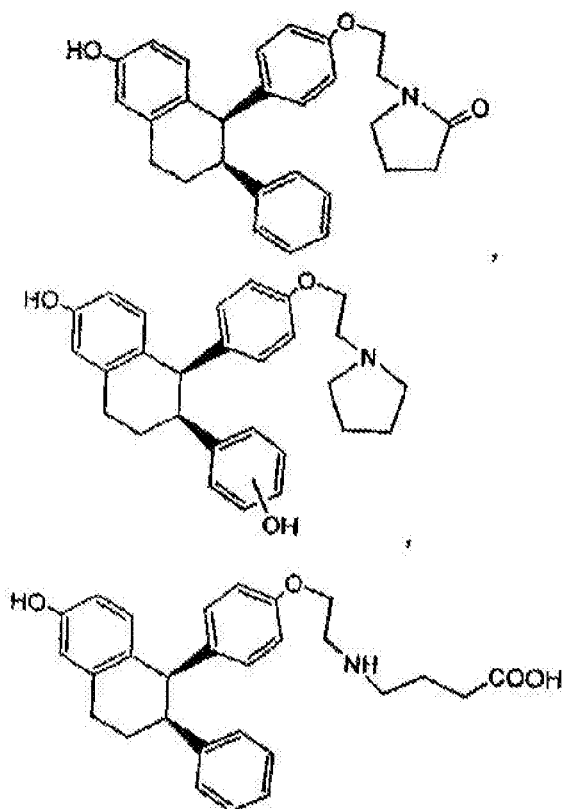
ili  $-NH(CH_2)_3COOH$ , i

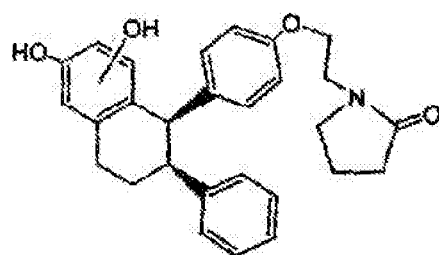
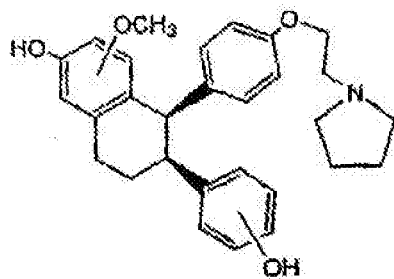
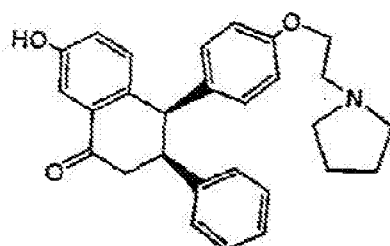
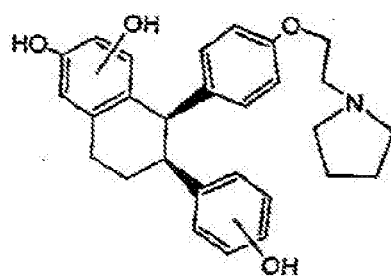
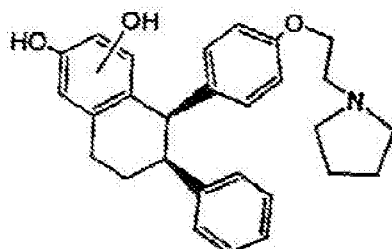
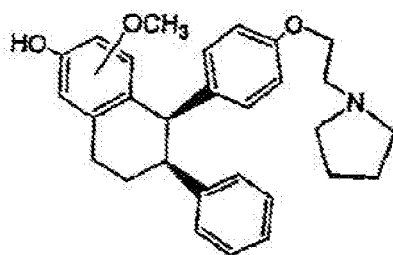
(b)  $R_2$  je  $OH$  ili  $OCH_3$ , a  $R_3$  i  $R_7$  su H, ili ako  $R_1$  je definiran kao u (a), gore, i

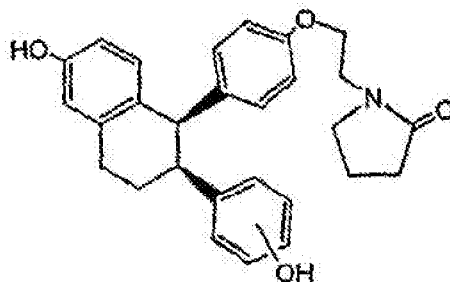
(c)  $R_2$  i  $R_7$  su H, a  $R_3$  je OH ili  $OCH_3$ ,  $R_4$  nije H; ili njegov optički, stereo-, regio- ili konfiguracijski izomer ili geometrijski izomer, ili tautomer, ili farmaceutski prihvatljiva sol,

**naznačena time,**

- 5 da se spomenuti metabolit koristi za proizvodnju medikamenta za liječenje osteoporoze, raka dojke, hiperlipidemije, ateroskleroze, Alzheimerove bolesti, katarakta, gubitka libida, muške seksualne disfunkcije, raka debelog crijeva, naboranosti kože, autoimunih bolesti, ćelavosti, akni, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, endometrioze, ženske seksualne disfunkcije, hiperglikemije, pretilosti, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, predmenstrualnog sindroma, karcinoma prostate, benigne hiperplazije prostate, plućne hipertenzije, reperfuzijskih povreda, reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, seboreje, senilne ginekomastije, testosteronske deficijencije, Tumerova sindroma, fibroze maternice, atrofno vaginitisa, inkontinencije, raka maternice, dlakavosti, bulimije, anoreksije, hipoaktivne seksualne želje, poremećaja seksualne uzbuđenosti, disparenije, vaginizma, prolapse, infekcija urinarnog trakta, udara, infarkta miokarda, akutnog ili kroničnog zatajenja bubrega, okluzivne bolesti perifernih arterija, Raynaudova fenomena, kancera jajnika, jetre i pankreasa, kao i dezmoidnog kancera, glioma, i karcinoma bubrežnih stanica, ili pospješivanja zacjeljivanja povreda, povećanja frekvencije orgazama i snižavanja vaginalnog pH.
- 10
- 15
3. Upotreba prema zahtjevu 2, **naznačena time**, da je spomenuti metabolit (-)-cis-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-il-etoksi)-fenil]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ol odabran iz grupe koju čine:

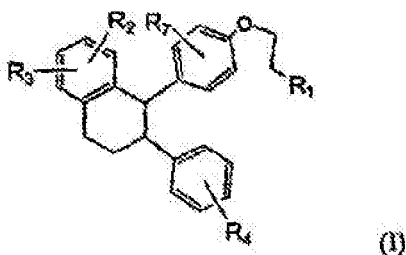






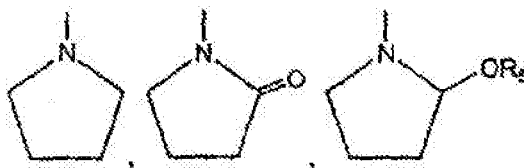
i njihovi stereoizomeri, tautomeri, regio- i konfiguracijski izomeri;  
i njihove farmaceutski prihvatljive soli.

4. Farmaceutski pripravak, **naznačen time**, da sadrži metabolit (-)-cis-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-il-etoksi)-fenil]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ol, formule I;



gdje se:

R<sub>1</sub> se bira između



ili -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COR<sub>6</sub>\*;

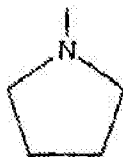
R<sub>3</sub> se bira između H ili CH<sub>3</sub>;

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> i R<sub>7</sub> su isti ili različiti i bira ih se između H i OR<sub>5</sub>;

R<sub>6</sub> se bira između -OH, ili -NHCH<sub>2</sub>COOH,

uz uvjet da:

(d) ako R<sub>1</sub> je



ili -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH, i

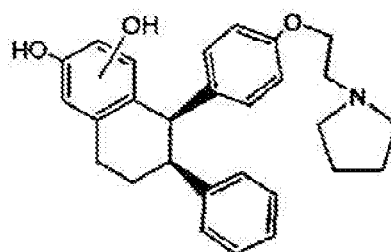
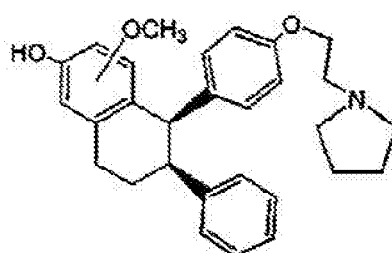
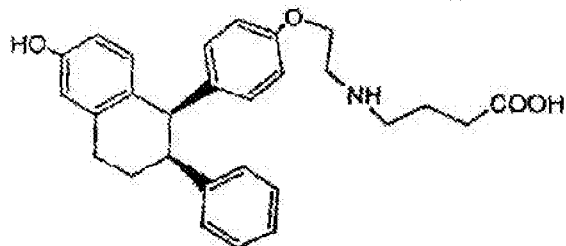
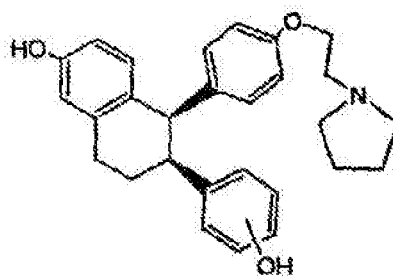
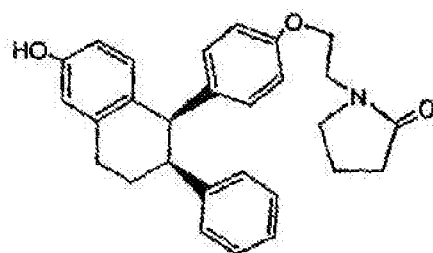
(e) R<sub>3</sub> je OH ili OCH<sub>3</sub>, a R<sub>3</sub> i R<sub>7</sub>, su H, ili ako R<sub>1</sub> je definiran kao u (a), gore, i

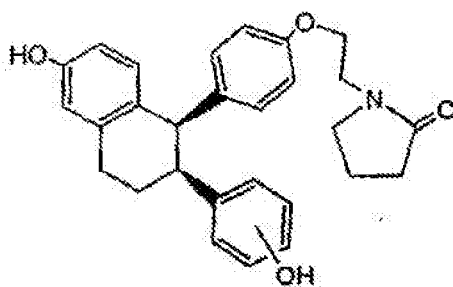
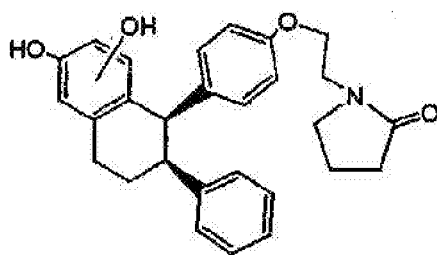
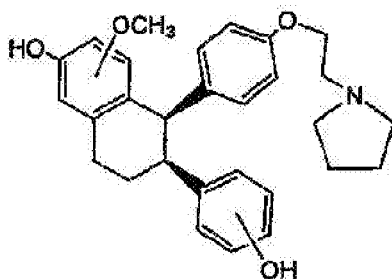
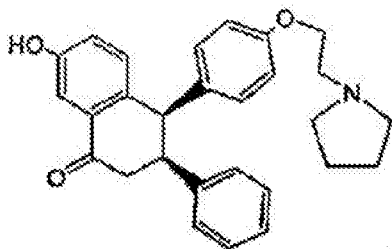
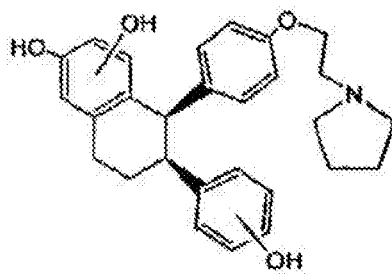
(f) R<sub>2</sub> i R<sub>7</sub> su H, a R<sub>3</sub> je OH ili OCH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> nije H; ili

njegov optički, stereo-, regio- ili konfiguracijski izomer ili geometrijski izomer, ili tautomer, ili farmaceutski prihvatljiva sol, i

farmaceutski prihvatljiv nosač, vehikl ili razrjeđivač.

5. Pripravak prema zahtjevu 4, **naznačen time**, da je metabolit (-)-cis-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-il-etoksi)-fenil]-5,6,7,8-tetrahidro-naftalen-2-ol odabran iz grupe koja se sastoji od:





i njihovih stereoizomera, tautomera, regio i konfiguracijskih izomera, kao i njihovih farmaceutski prihvatljivih soli.

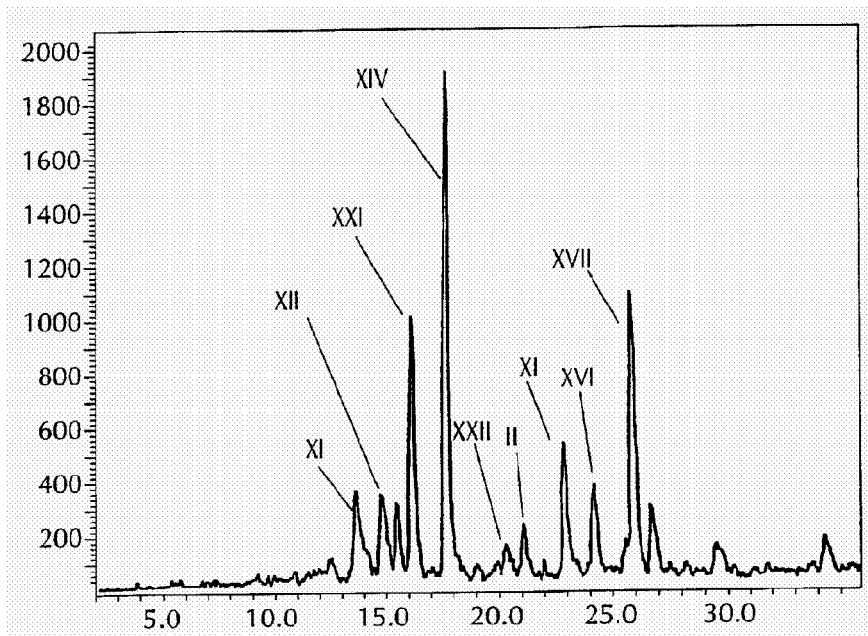
5

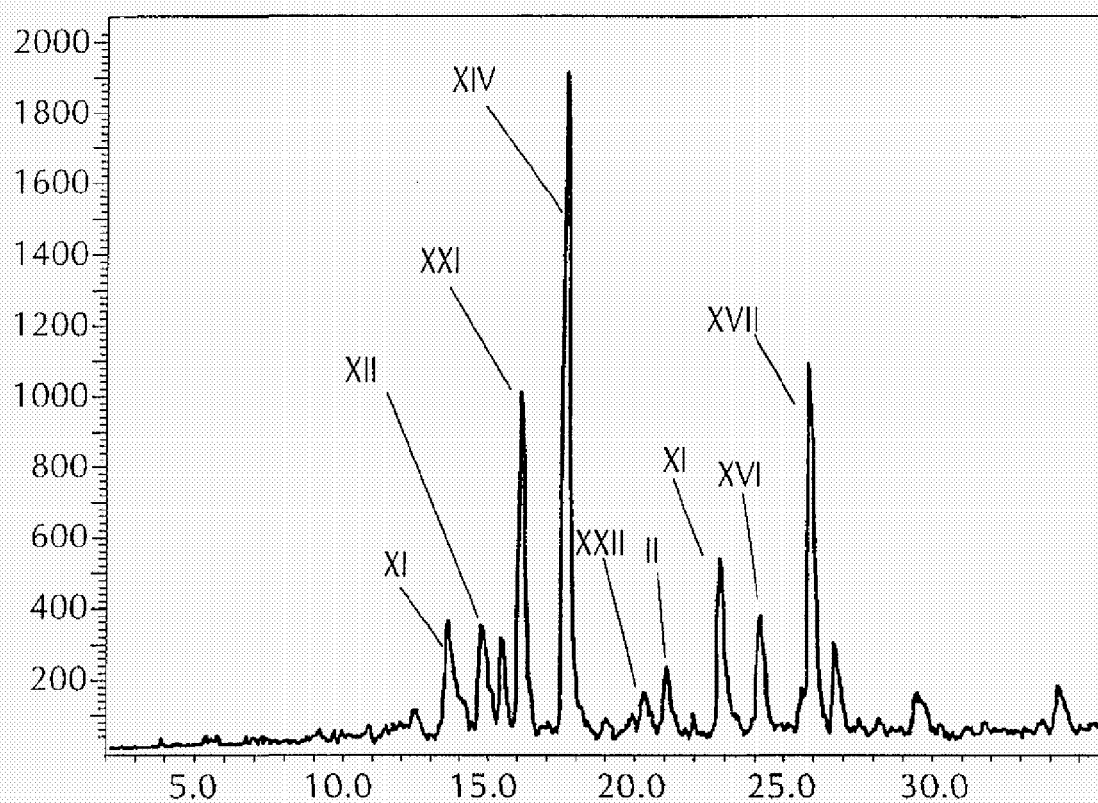
10



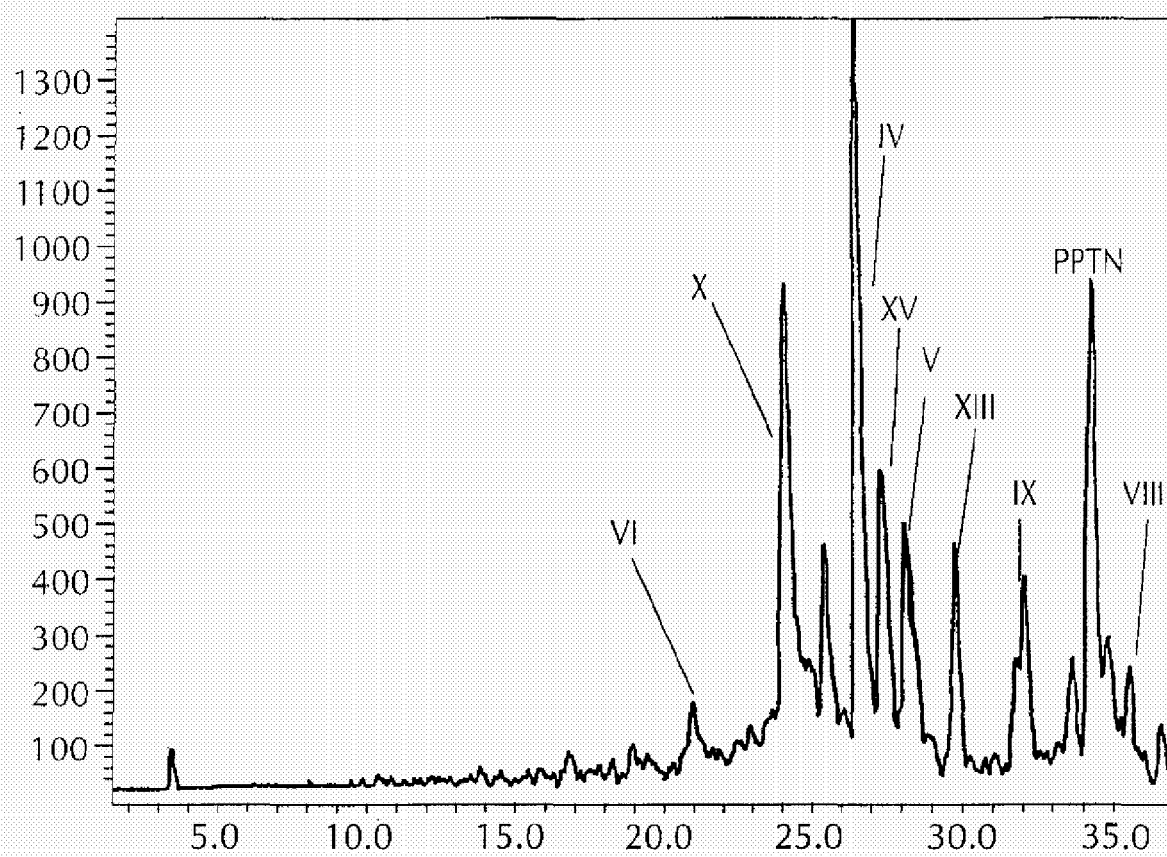
## SAŽETAK

5 Ovaj izum odnosi se na spojeve koji su kod sisavaca metaboliti (–)-*cis*-6-fenil-5-[4-(2-pirolidin-1-iletoksi)fenil]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ola. Spojeve prema ovom izumu može se upotrijebiti kao standarde prilikom analitičkih testiranja ili kao međuprodukte u daljnjoj kemijskoj sintezi ili biosintezi kemijskih entiteta. Ovaj izum također se odnosi na farmaceutske pripravke za liječenje bolesti i postupke liječenja bolesti.

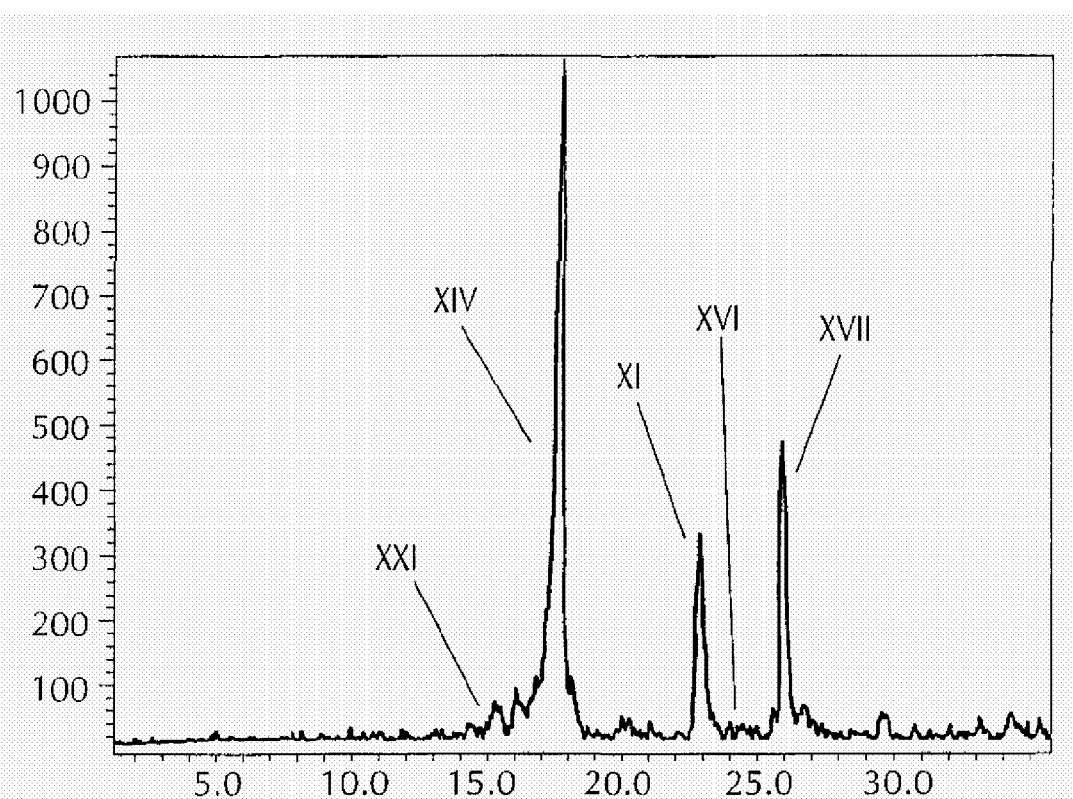




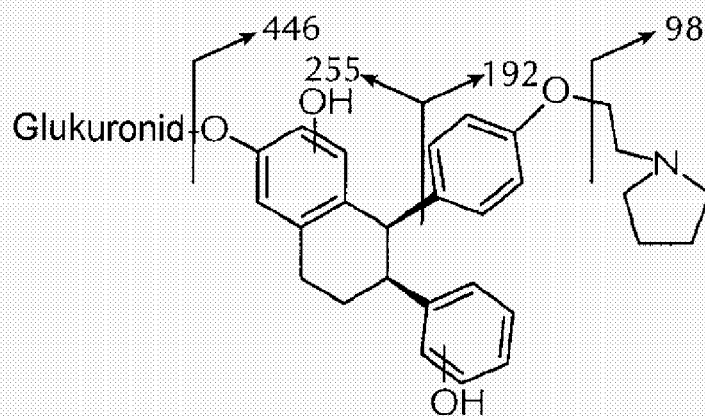
SLIKA 1



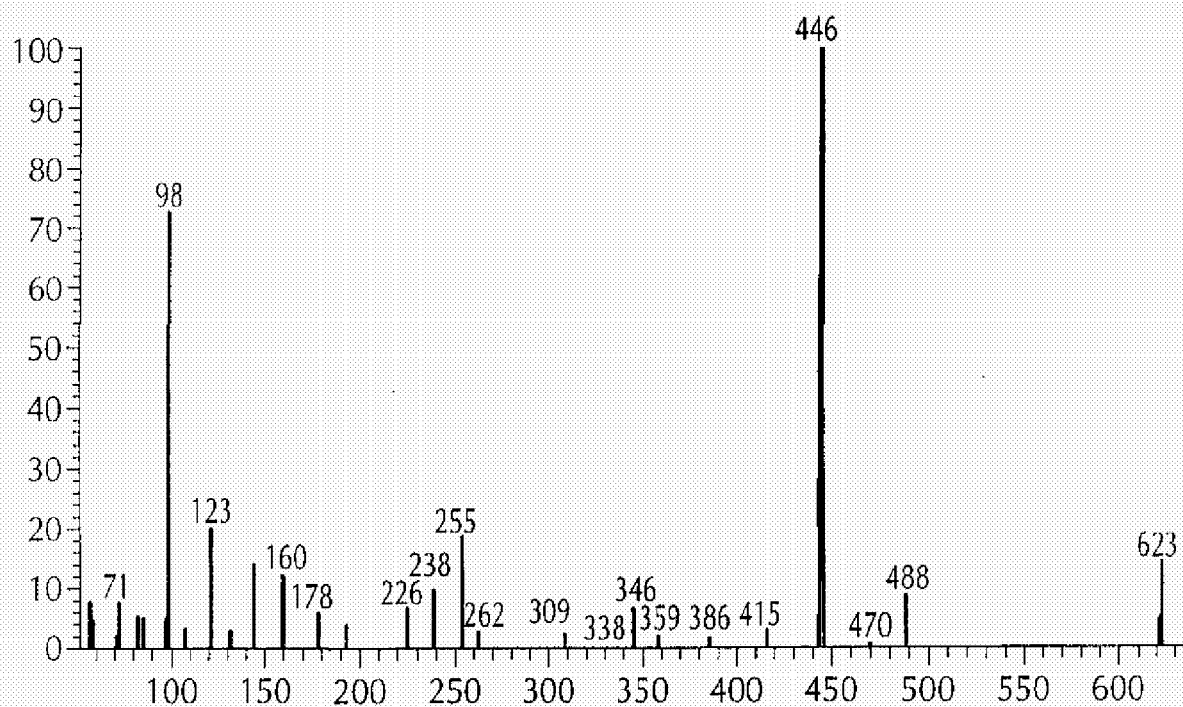
SLIKA 2



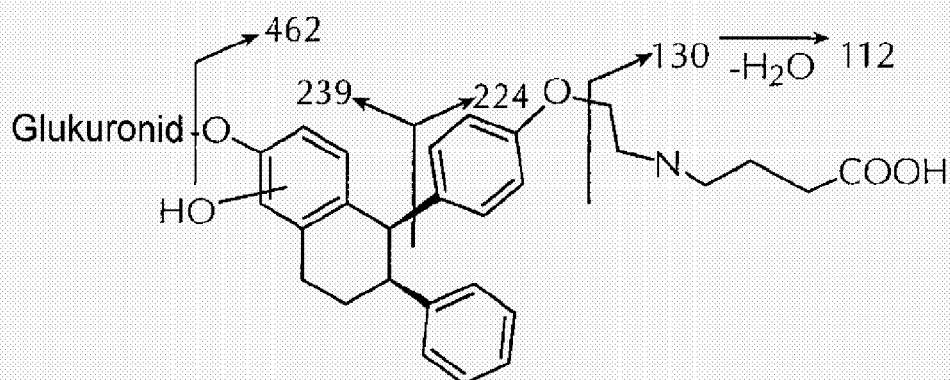
SLIKA 3



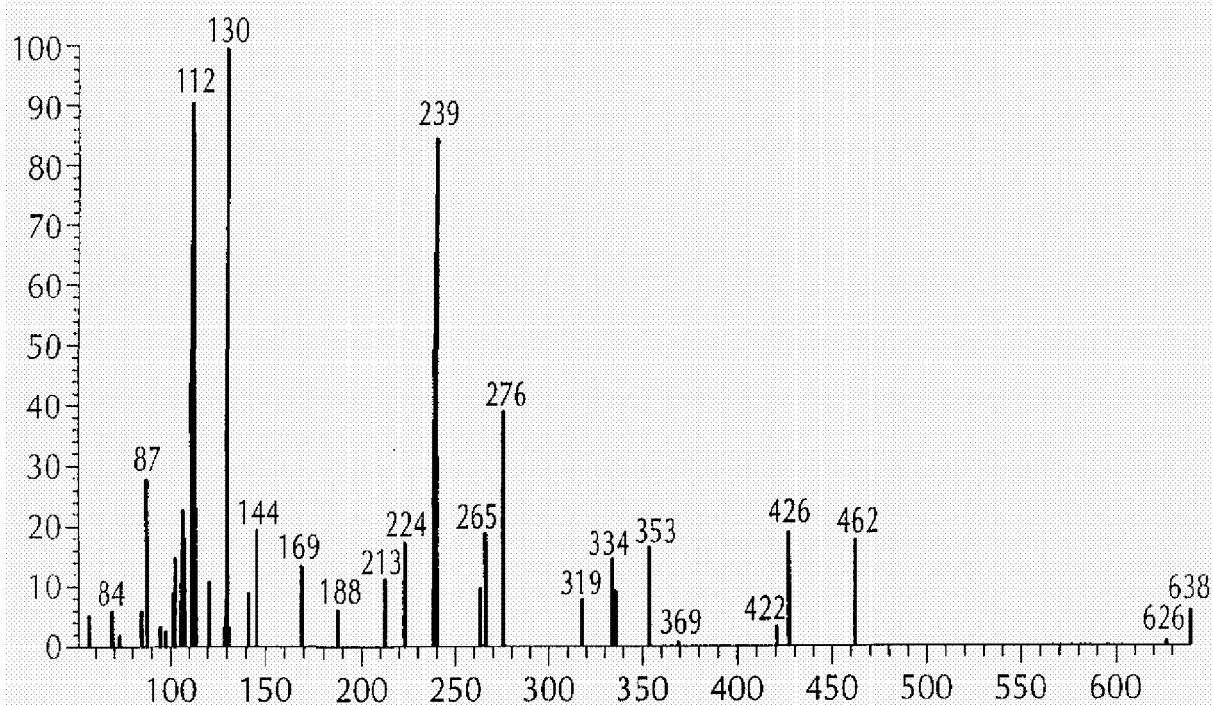
SLIKA 4A



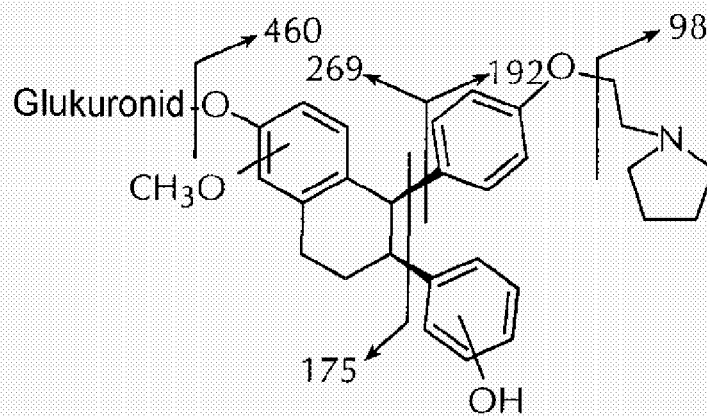
SLIKA 4B



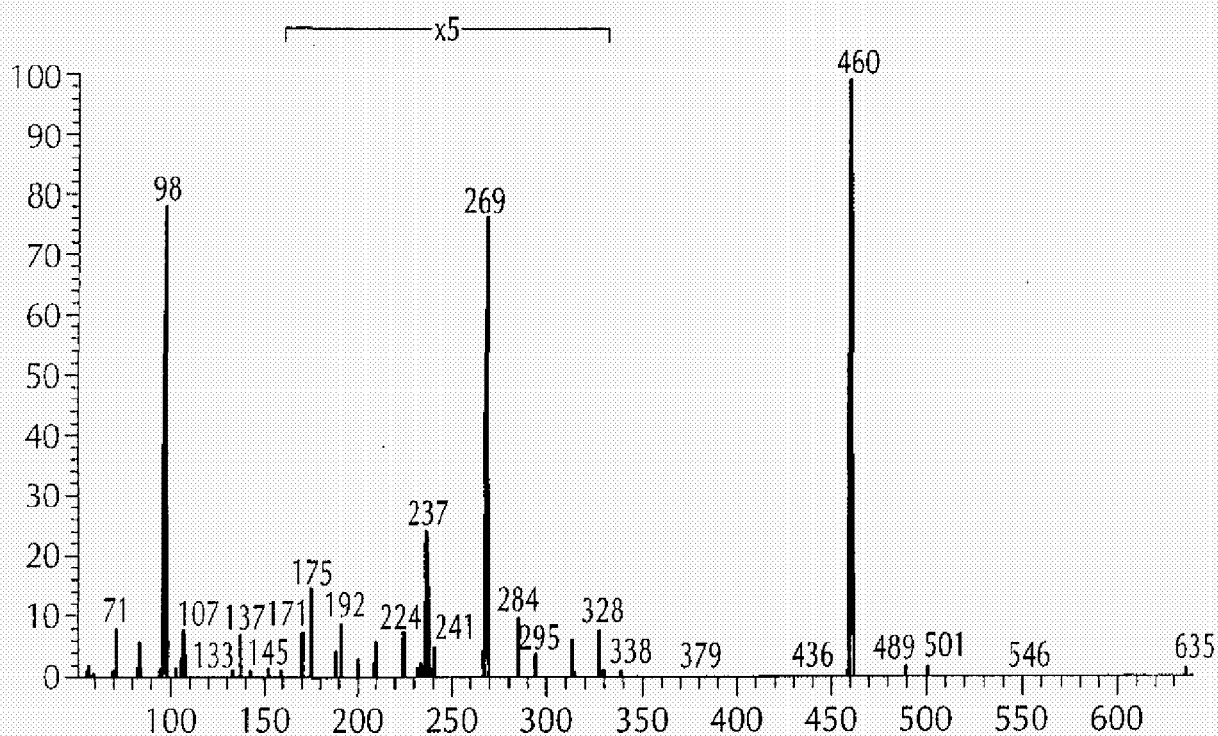
SLIKA 5A



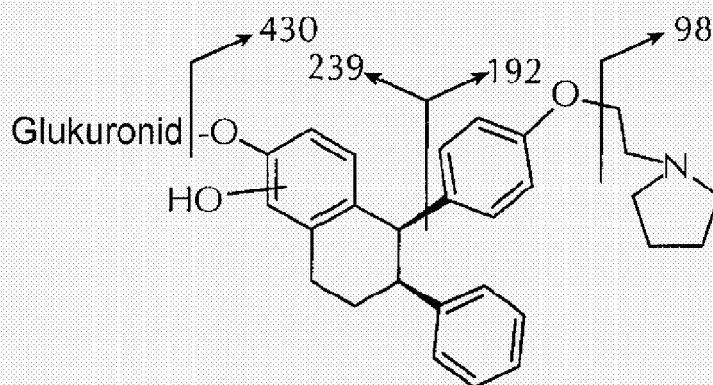
SLIKA 5B



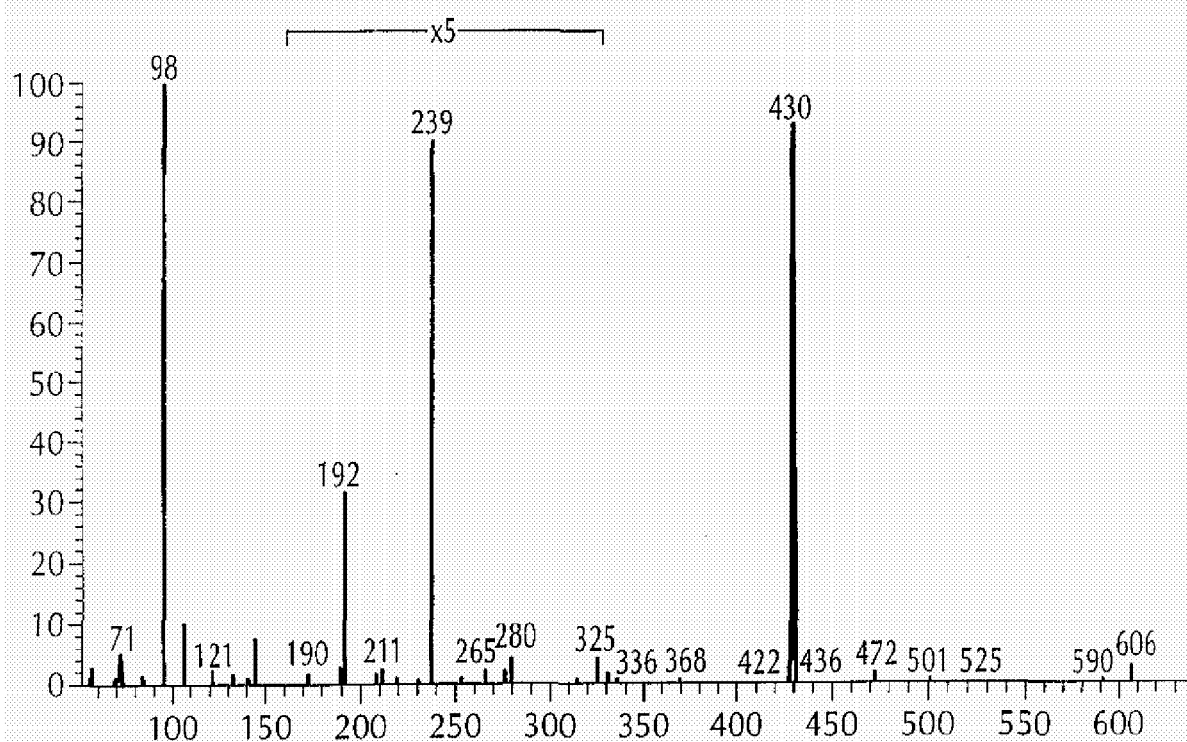
SLIKA 6A



SLIKA 6B

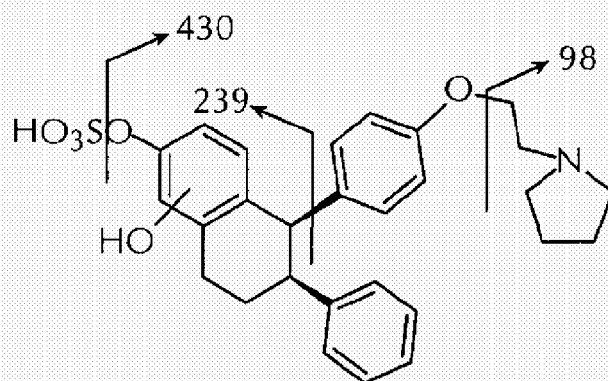


SLIKA 7A

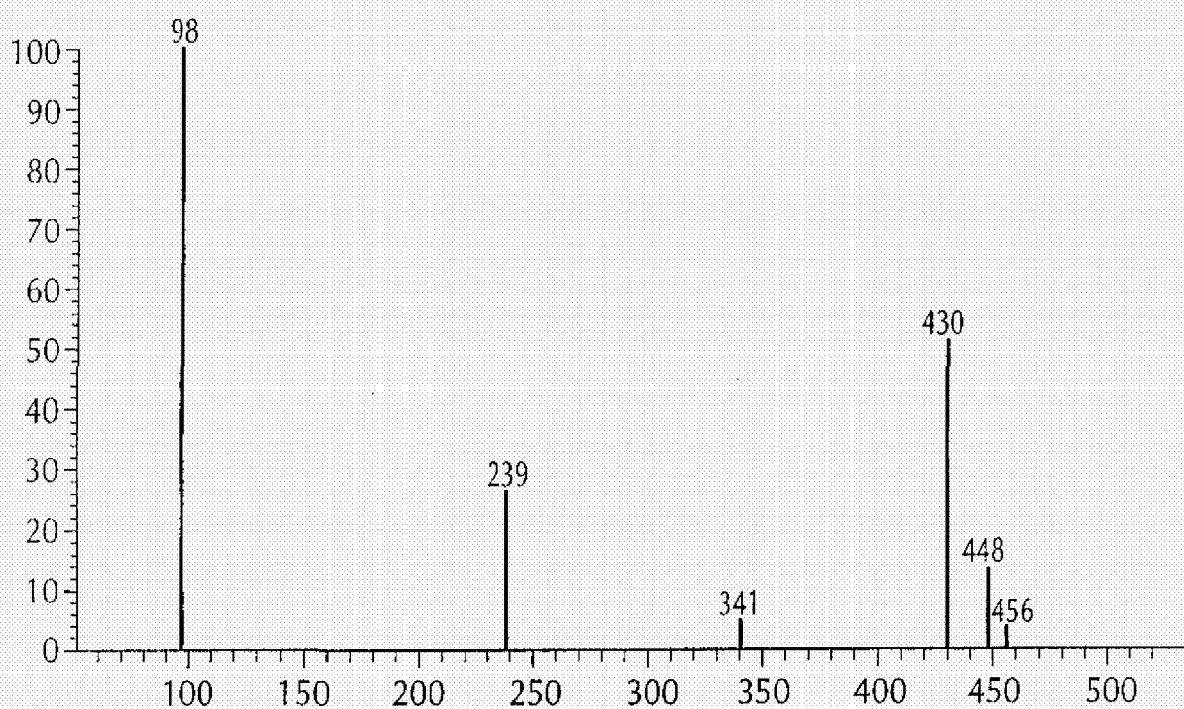


SLIKA 7B

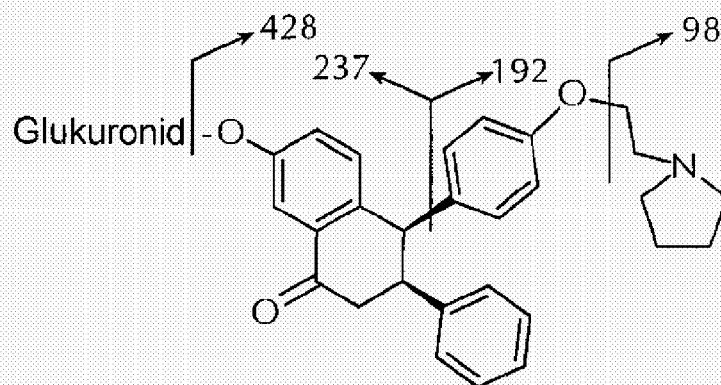




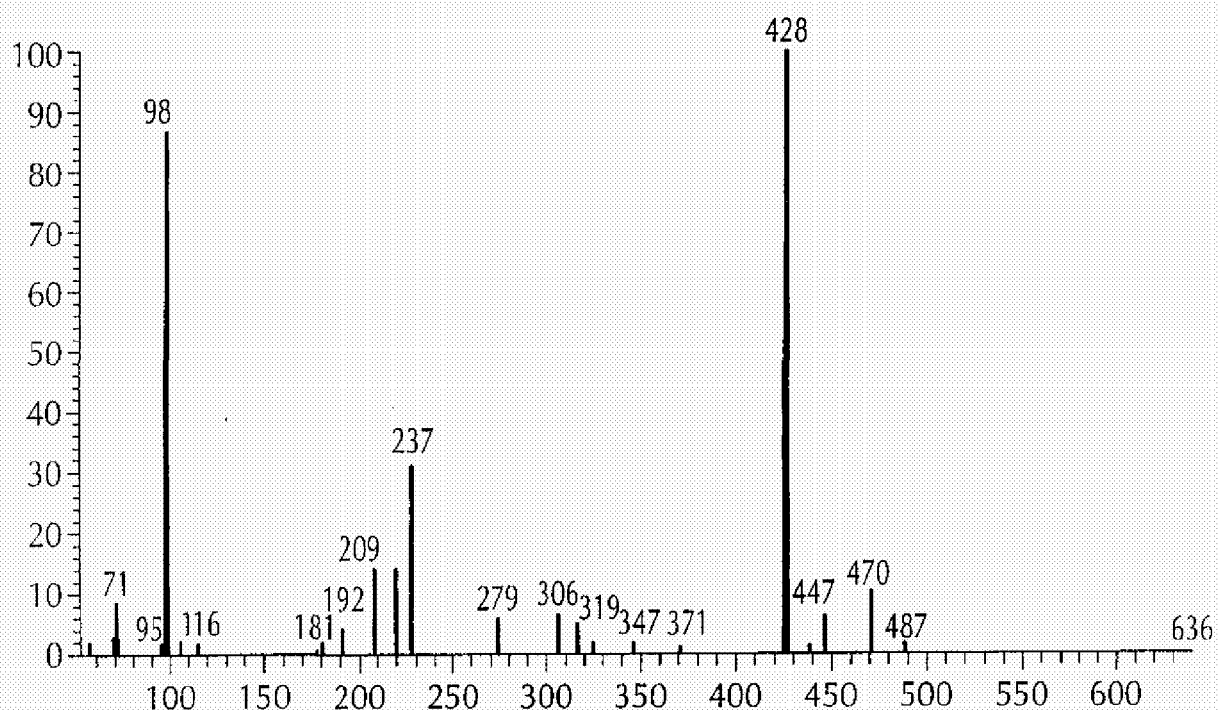
SLIKA 8A



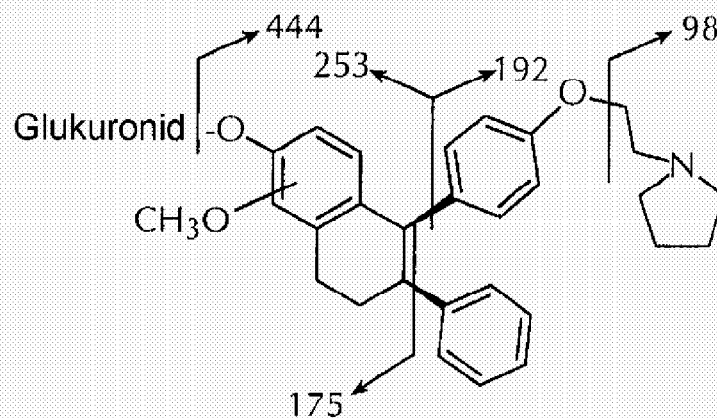
SLIKA 8B



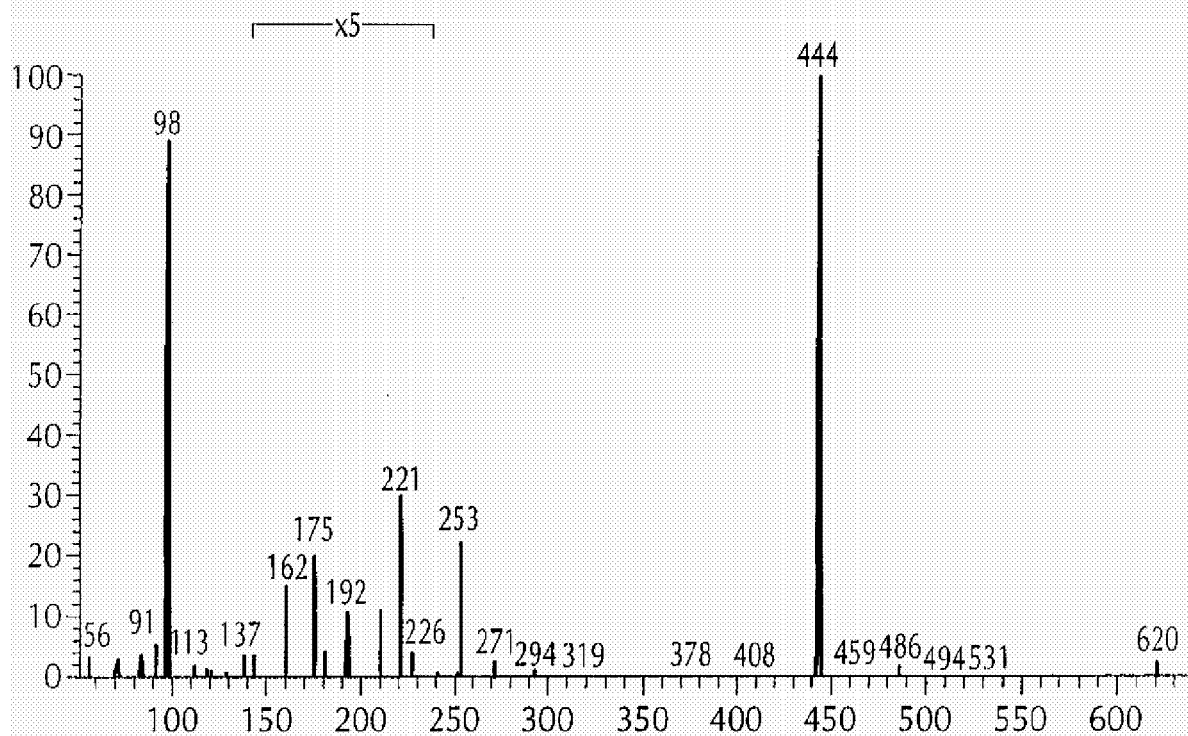
SLIKA 9A



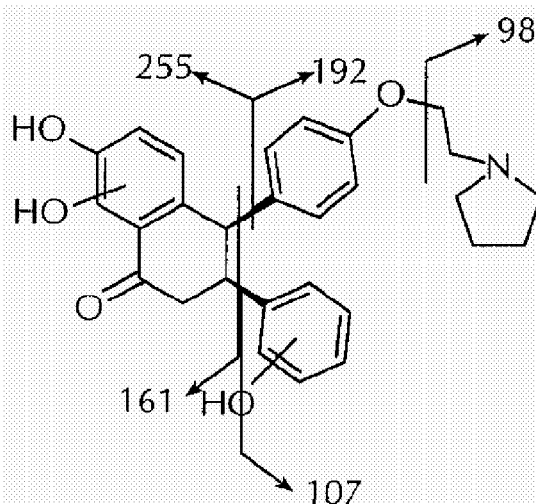
SLIKA 9B



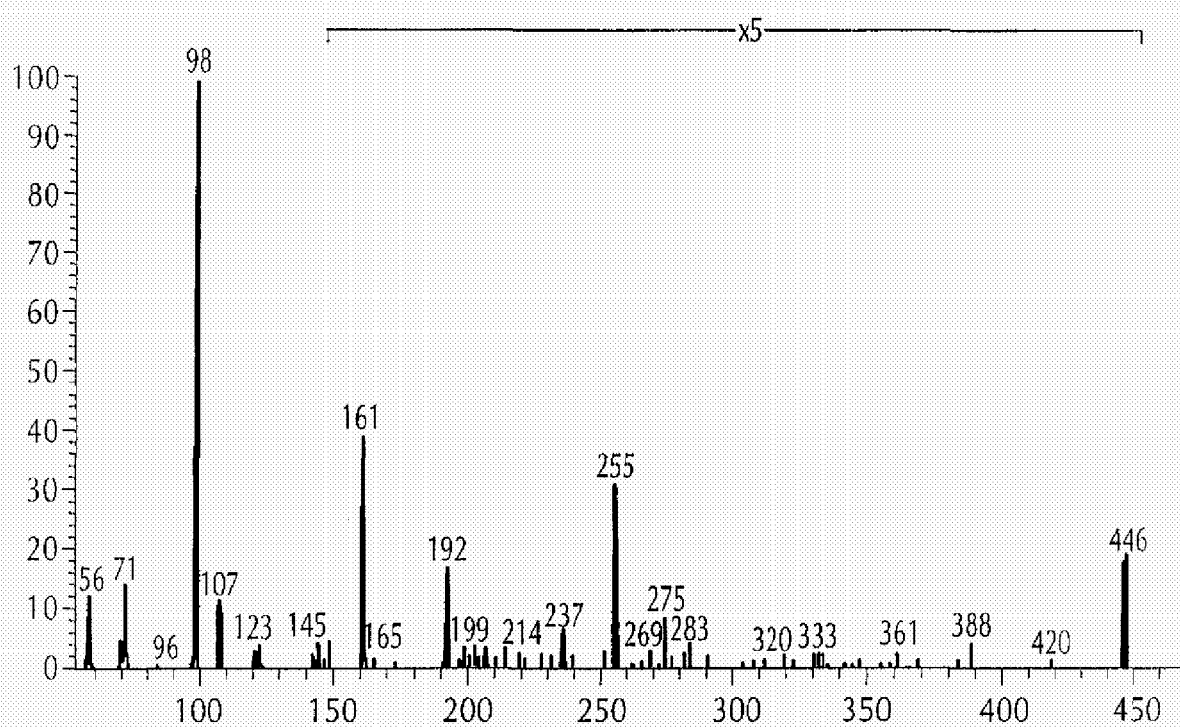
SLIKA 10A



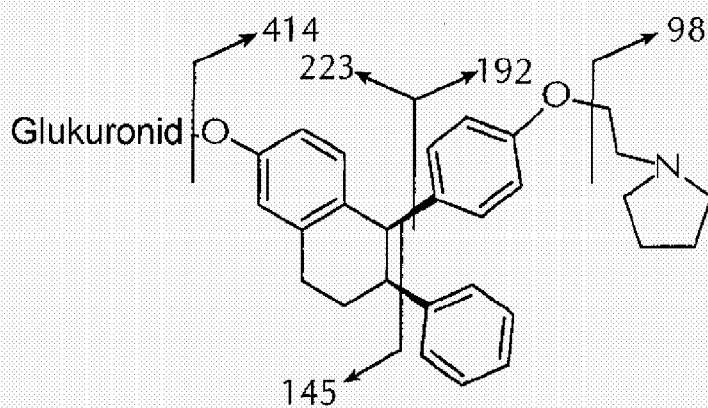
SLIKA 10B



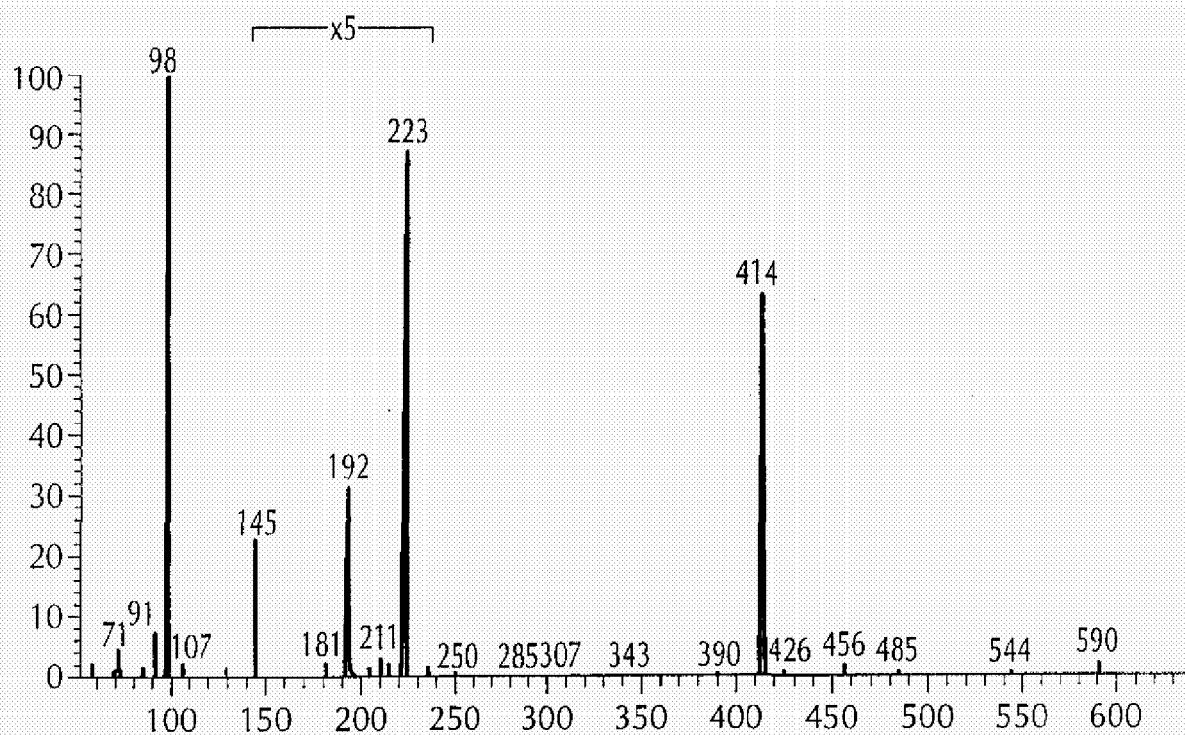
SLIKA 11A



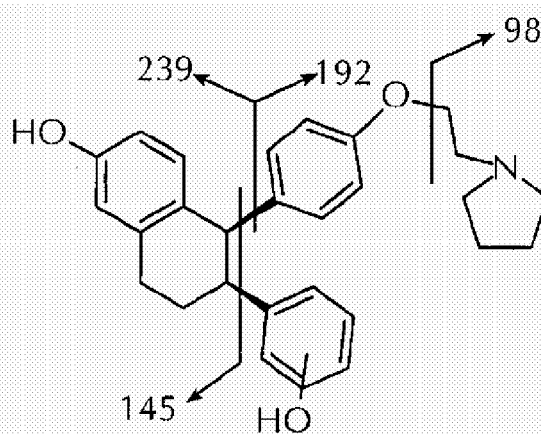
SLIKA 11B



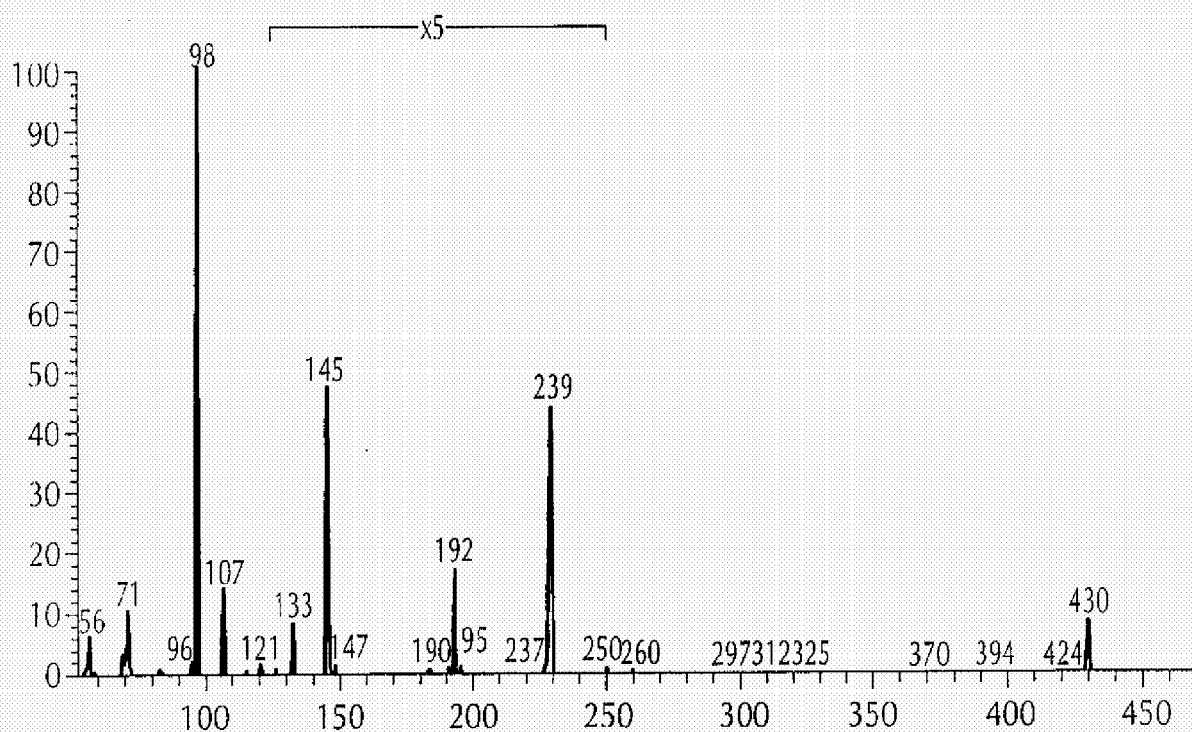
SLIKA 12A



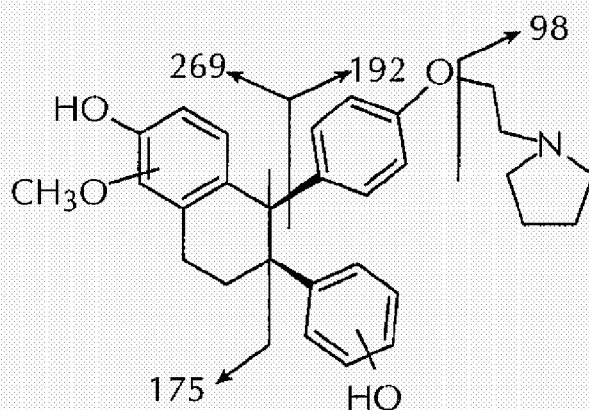
SLIKA 12B



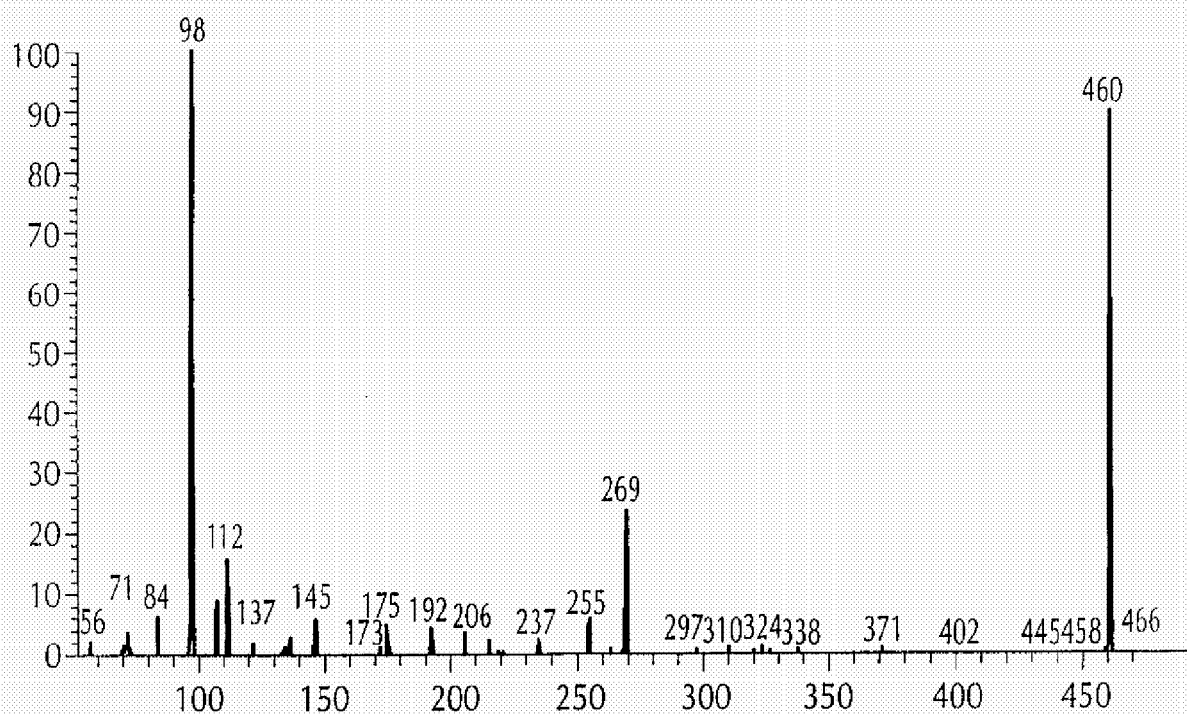
SLIKA 13A



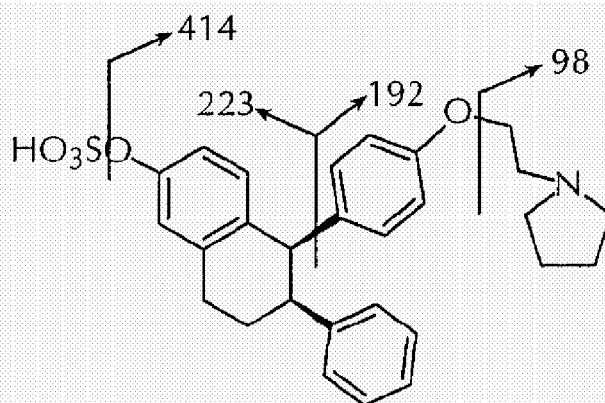
SLIKA 13B



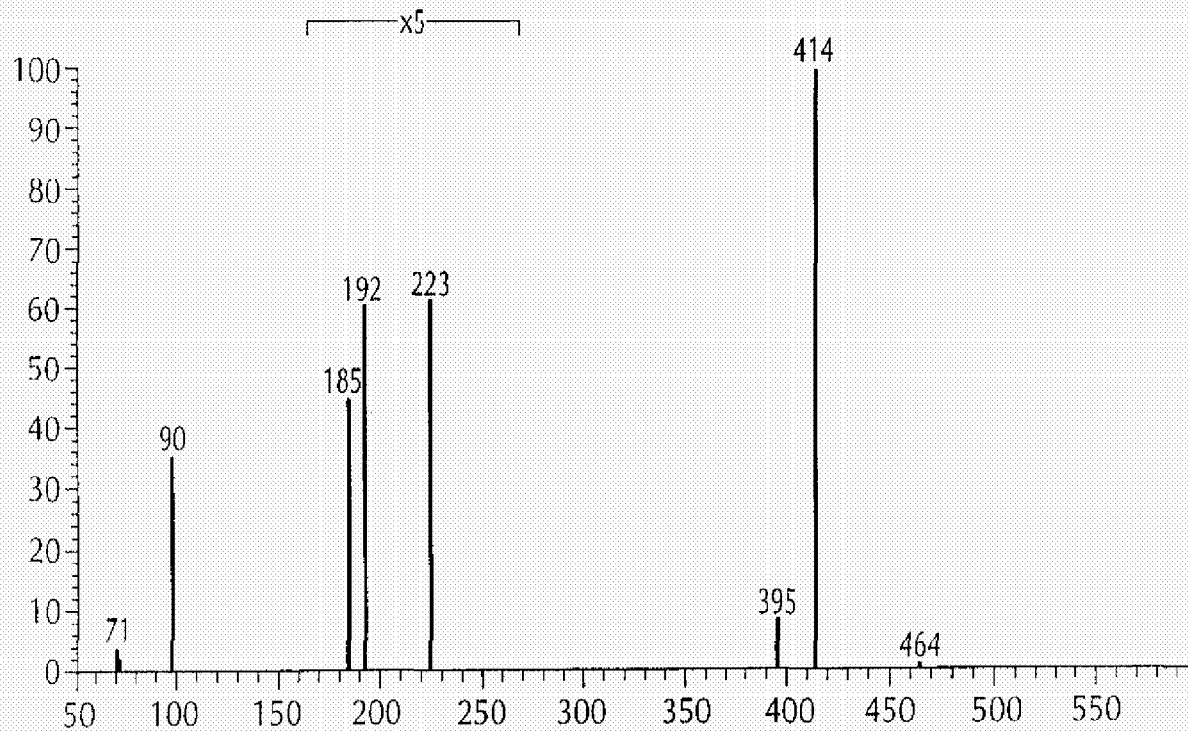
SLIKA 14A



SLIKA 14B

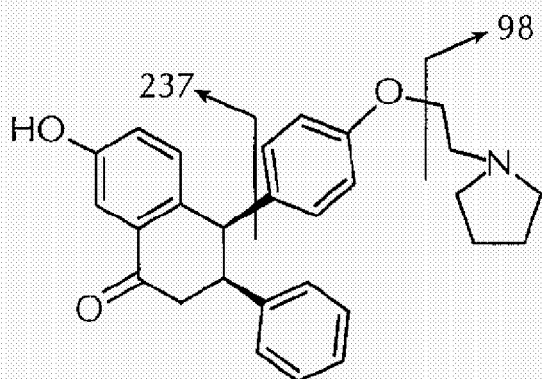


SLIKA 15A

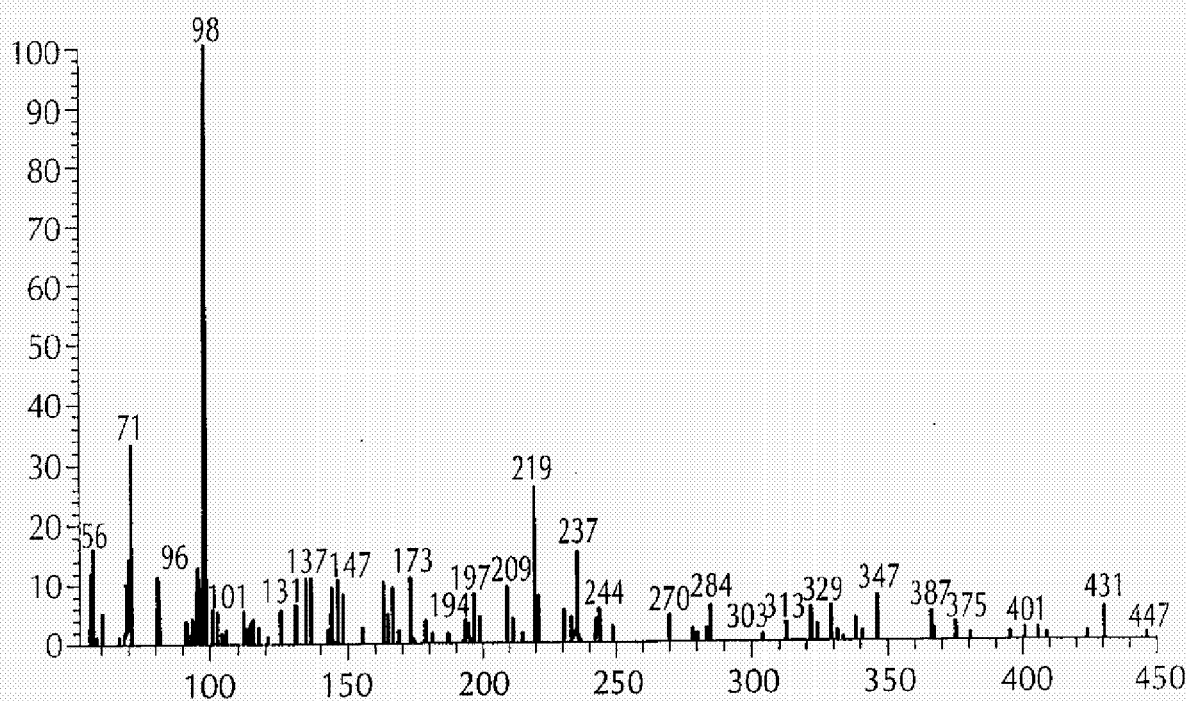


SLIKA 15B

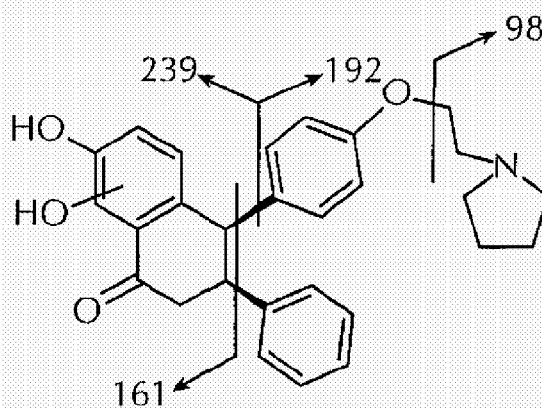




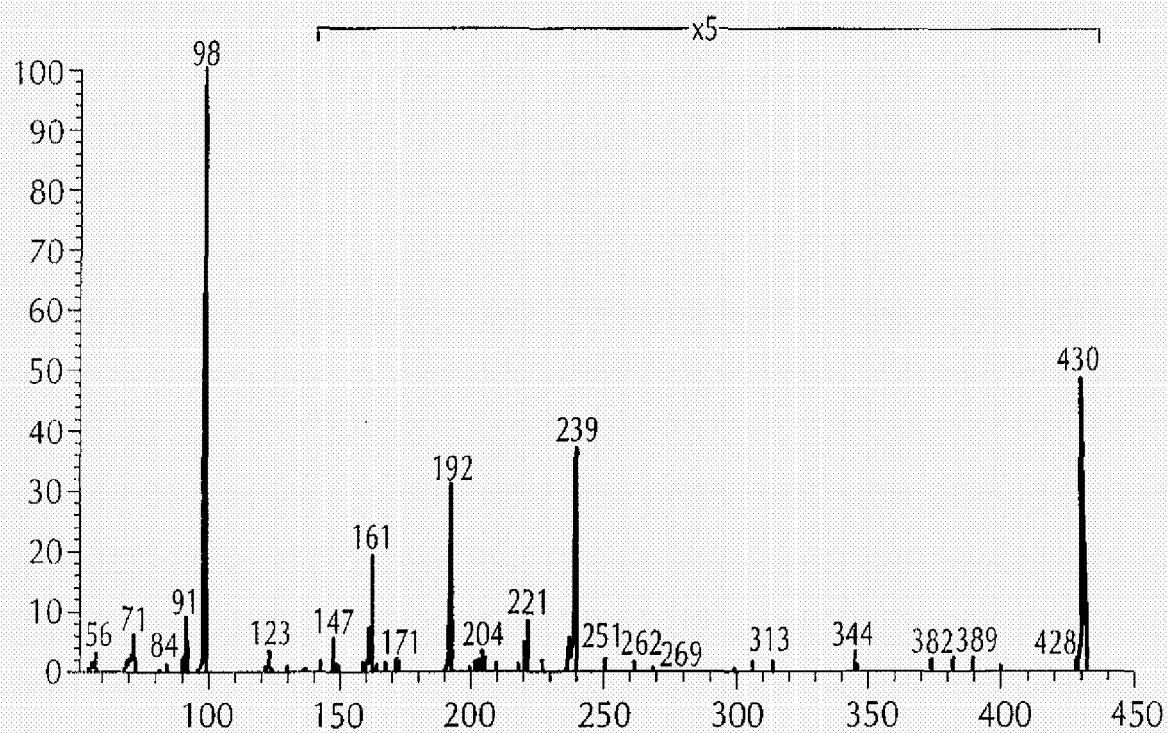
SLIKA 16A



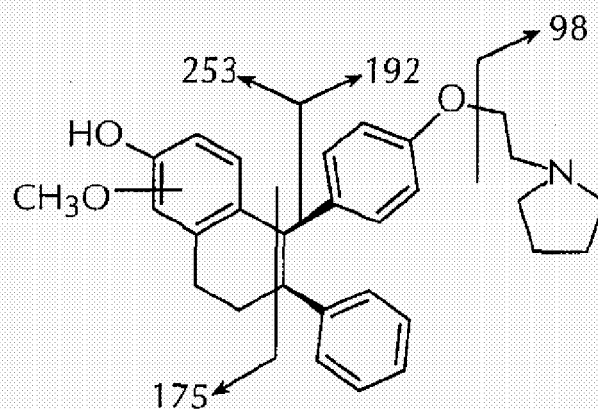
SLIKA 16B



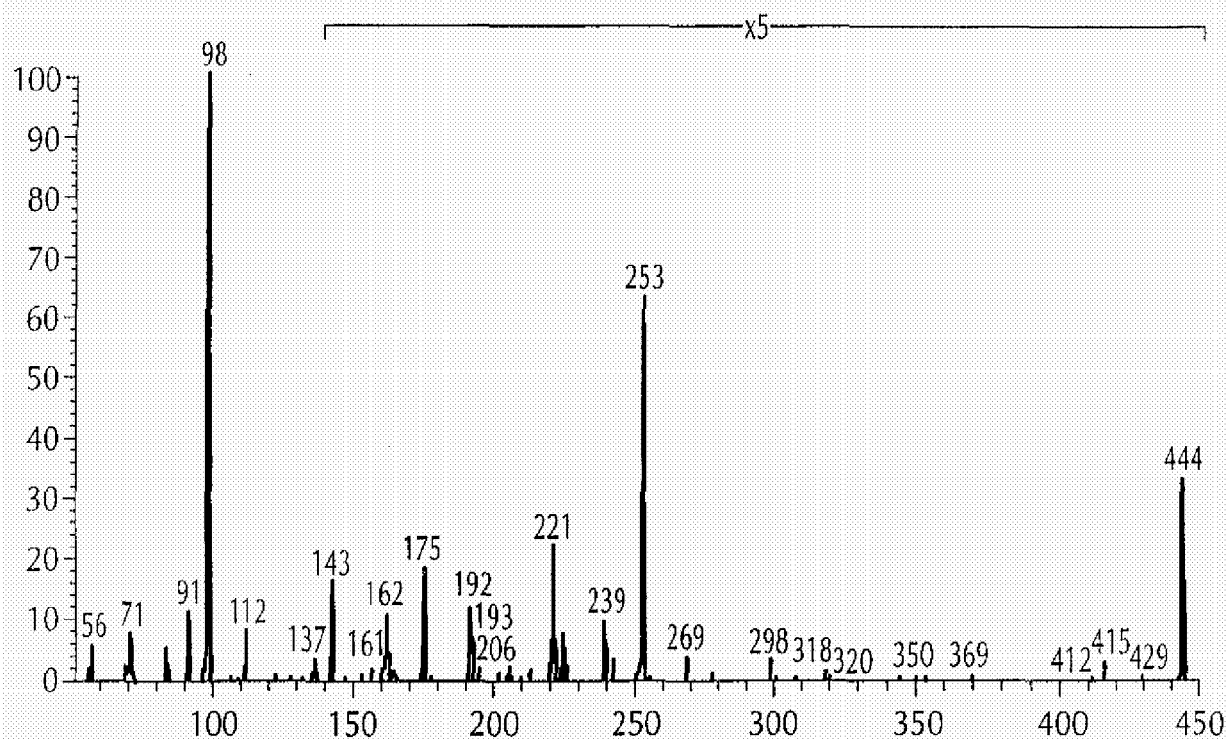
SLIKA 17A



SLIKA 17B



SLIKA 18A



SLIKA 18B