PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
308 056
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

C07D 487/04	(2006.01)
C07D 239/00	(2006.01)
C07D 231/00	(2006.01)
A61K 31/519	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

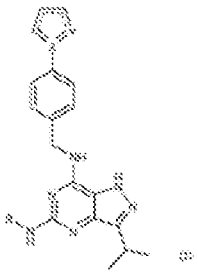
(21) Číslo přihlášky: **2015-509**
(22) Přihlášeno: **20.07.2015**
(40) Zveřejněno: **15.02.2017**
(Věstník č. 7/2017)
(47) Uděleno: **16.10.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **27.11.2019**
(Věstník č. 48/2019)

(56) Relevantní dokumenty:
CZ 294587; CZ 296816; CZ PV 2806-97; CZ PV 2805-97.

(73) Majitel patentu:
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., Praha 6 - Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Vladimír Kryštof, Olomouc, CZ
Ladislava Vymětalová, Jaroměřice, CZ
Libor Havlíček, Praha 4, CZ
Ing. Antonín Šturc, Praha 4, CZ
Radek Jorda, Olomouc, CZ
Tomáš Pospíšil, Olomouc, CZ
Miroslav Strnad, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice



(54) Název vynálezu:
5-Substituované-7-[4-(substituované)benzyl]amino-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny, jejich použití jako antirevmatika, a farmaceutické přípravky

(57) Anotace:
5-Substituované-7-[4-(substituovaných)benzyl]amino-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny, obecného vzorce I, které jsou účinnými inhibitory cyklin-dependentních kináz CDK5/7/9, a vykazují silné protizánětlivé účinky. Způsob jejich přípravy, farmaceutické přípravky obsahující tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu zánětlivých onemocnění, jako je rheumatoidní arthritida.

CZ 308056 B6

5–Substituované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny, jejich použití jako antirevmatika, a farmaceutické přípravky

Oblast techniky

Tento vynález se týká 5–substitutovaných–7–[4–(substituovaných)benzyl]amino–3–isopropyl-pyrazolo[4,3–d]pyrimidinů, způsobů jejich přípravy, farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu zánětlivých onemocnění.

Dosavadní stav techniky

Chronickými zánětlivými onemocněními (alergie, astma, nealergické autoimunitní poruchy – chronický zánět střev, revmatoidní artritida, chronické fibrózy – např. cirhóza jater) trpí v současnosti v Evropě přibližně 145 až 218 milionů obyvatel. Revmatoidní artritida (RA) byla vybrána jako primární klinická indikace v této oblasti. RA postihuje cca 1 % populace (celosvětově), postihuje obvykle starší osoby a vzhledem k průběžným demografickým změnám se dá očekávat nárůst počtu pacientů (Wolfe AM, Kellgren JH and Masi AT *Bull.Rheum.Dis.* 19:524–529, 1968). RA je chronické, systémové, zánětlivé onemocnění postihující především klouby, ale vyznačuje se také dalšími příznaky, včetně nárůstu kardiovaskulárních onemocnění. RA je nejčastěji se vyskytujícím autoimunitním onemocněním, jehož důsledkem bývá trvalá pracovní neschopnost a předčasné úmrtí. Navzdory dlouholetému intenzivnímu výzkumu se zatím nepodařilo vyvinout účinné terapeutické prostředky a RA má proto významný negativní ekonomický dopad, enormně zatěžující zdravotní systém. Incidence RA a jiných chronických zánětlivých onemocnění narůstá s věkem, což znamená, že nemocných bude postupně výrazně přibývat. Etiologie RA je poměrně málo prozkoumaná, ale je pravděpodobné, že začíná podobně jako ostatní zánětlivé poruchy akutní zánětlivou odpovědí, která přechází do chronické fáze s následujícím poškozením postižené tkáně. Současné terapeutické prostředky jsou zaměřeny na potlačování symptomů a stabilizaci RA, přičemž nijak nezlepšují stav pacienta a neléčí jej. Farmakologické přístupy jsou založeny na lécích nebo jejich kombinacích. Používají se analgetika a nesteroidní protizánětlivé léky ke tlumení bolesti, chorobu modifikující léky revmatoidní artritidy (DMARDs), biologika ovlivňující cytokiny a buňky imunitního systému a imunoadsorpci pro eliminaci autoprotilátek.

Biologická léčba je zaměřena na pro–zánětlivé cytokiny (anti–TNF terapie, antagonist receptor pro IL6) a buňky adaptivního imunitního systému (T buňky prostřednictvím CTLA4 agonistů, B buňky přes anti–CD20 agonistické protilátky). Přestože jsou tyto moderní léky poměrně úspěšné při stabilizaci RA, většina z nich nevede k vyléčení. Navíc poměrně významný podíl pacientů (cca třetina) na terapii zaměřenou proti TNF vůbec nereaguje (Gartlehner G et al Irheumatol. 33:2398–2408, 2007). Vzhledem k uvedeným skutečnostem je naprosto nezbytné vyvinout nové terapeutické prostředky pro tuto významnou skupinu pacientů.

Zablokování příspěvku neutrofilů a synoviálních fibroblastů v rané fázi RA představuje nový racionální terapeutický postup. V synoviální tekutině pacientů postižených RA predominují neutrofily, které přispívají k zánětu a poškození tkání, což je podstatou patologie tohoto onemocnění. Kromě kortikosteroidů nejsou žádnou z používaných terapeutických modalit nijak zasaženy, přestože představují jeden z hlavních mechanismů patologie RA. Ke chronickému zánětu a patologii navíc výrazně přispívá také expanse synoviální tkáně, způsobená intenzivní proliferací fibroblastů. Zbytnělá granulomatózní tkáň pak často invaduje chrupavku a kost, způsobuje erozi kloubů, a navíc produkuje zánětlivé cytokiny, které udržují zánětlivou odpověď. A ani synoviální fibroblasty nejsou v současné době v oblasti zájmu jako možný cíl pro terapii.

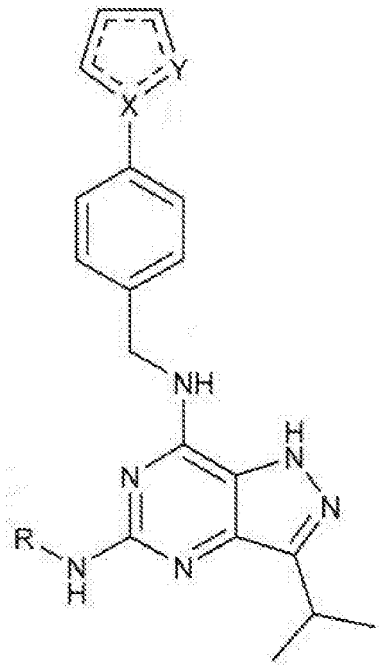
Další významný argument pro vývoj nových terapeutických modalit pro léčbu RA je velmi vysoká cena biologické léčby, která vede k omezování jejího použití z ekonomických důvodů, a

to včetně zemí Evropské unie. V současné době se také věnuje více pozornosti pacientům v raných stádiích onemocnění, aby se oddálil nebo zastavil průběh onemocnění do fáze, které již nákladnou biologickou léčbu vyžaduje. Terapie založené na DMARDS mohou v raných fázích RA zpomalit progresi onemocnění u některých pacientů, kteří tak budou vyžadovat v nejbližší době jiné léčebné postupy/prostředky.

Předmětem tohoto vynálezu jsou nové a velmi účinné protizánětlivé sloučeniny, které mohou být využity pro léčbu RA.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou 5–substituované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]pyrimidiny obecného vzorce I



(I),

ve kterém,

X je atom uhlíku nebo dusíku a Y je CH, O, S, nebo N, vazby označené čárkovaně jsou nezávisle jednoduché nebo dvojné vazby,

R je vybráno ze skupiny zahrnující

– C_2–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy a amino substituent, s výhodou jedním hydroxy a/nebo jedním amino substituentem;

– (dialkylamino)alkyl skupinu, kde každý alkyl je vybrán nezávisle ze skupiny zahrnující C_1–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl;

– C_3–C_{10} cykloalkyl, kde cykloalkyl znamená monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 10 uhlíkových atomů, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním

substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C_1–C_4 alkyl, C_1–C_4 alkoxy, C_1–C_4 hydroxyalkyl a amino substituent;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli, zejména s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo jejich adiční soli s kyselinami.

S výhodou je C_2–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný alespoň jednou hydroxy skupinou vybrán ze skupiny zahrnující 2–hydroxyethyl, 2(RS, R nebo S)–hydroxypropyl, 3–hydroxypropyl, 4–hydroxybut–2(RS, R, nebo S)–yl, 2–hydroxy–2–methylpropyl, 3–hydroxy–3–methylbutyl, 2,3–dihydroxypropyl, 1–hydroxy–3–methylbut–2–yl a (3RS)–2–hydroxypent–3–yl.

V dalším výhodném provedení je C_2–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný amino skupinou vybrán ze skupiny zahrnující 2–aminoethyl, 3–aminopropyl, 4–aminobutyl, 5–aminopentyl, 6–aminohexyl.

V dalším výhodném provedení je C_2–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný amino a hydroxy skupinou 3–amino–2–hydroxypropyl.

S výhodou je (dialkylamino)alkyl skupina vybrána ze skupiny zahrnující (dimethylamino)methyl, 2–(dimethylamino)ethyl, 3–(dimethylamino)propyl, 3–(dimethylamino)butyl, (diethylamino)methyl, 2–(diethylamino)ethyl, 3–(diethylamino)propyl a 4–(diethylamino)butyl.

Ve výhodném provedení je C_3–C_{10} cykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl a cyklohexyl.

S výhodou obsahuje struktura v poloze 4 benzylového substituentu v obecném vzorci I dvě dvojné nebo žádnou dvojnou vazbu. Výhodněji je vybraná ze skupiny zahrnující pyrrolidin–1–yl, 1H–pyrazol–1–yl, 1H–pyrrol–2–yl, thiofen–2–yl, furan–2–yl.

V případě, že sloučeniny podle předloženého vynálezu mají chirální centrum, vynález zahrnuje všechny opticky aktivní isomery, jejich směsi i racemáty. Tedy sloučeniny obecného vzorce I, nezávisle na (R) nebo (S) konfiguraci na chirálních centrech, jsou zahrnuty v tomto vynálezu.

5–Substitutované 7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití jako léčiva. Sloučeniny podle vynálezu zejména vykazují kombinovanou antiproliferativní, protizánětlivou a proapoptotickou aktivitu, zejména vhodnou pro léčbu onemocnění spojených se zánětem, aberantní proliferací a apoptózou.

V jednom provedení 5–substitutované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo-[4,3–d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití pro léčbu zánětlivých onemocnění. Konkrétněji jsou zejména vhodné pro použití pro léčbu revmatoidní artritidy.

V ještě dalším provedení 5–substitutované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropyl-pyrazolo[4,3–d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití pro inhibici kináz CDK5/7/9, které jsou jedním z klíčových komponent zapojených v regulaci dělení neutrofilů a fibroblastů a jejich migraci.

Dalším předmětem vynálezu je metoda léčby zánětlivých onemocnění spojených s aberantní buněčnou proliferací nebo apoptózou nebo buněčnou migrací, jako je revmatoidní artritida u savců vyžadujících takovouto léčbu podáváním terapeuticky účinných dávek alespoň jedné ze sloučenin obecného vzorce I savcům.

Vynález také zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující 5–substitutované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]pyrimidiny obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelné nosiče.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou deriváty obecného vzorce I, které nesou substituent R vybraný ze skupiny zahrnující: ethyl, propyl, butyl, 2–hydroxyethyl, 3–hydroxypropyl, 2(R)–hydroxypropyl, 2(S)–hydroxypropyl, 4–hydroxybut–2(R)–yl, 4–hydroxybut–2(S)–yl, 4–hydroxybut–2(R,S)–yl, 2–(hydroxy–2–methyl)propyl, 2,3–dihydroxypropyl, 1–hydroxy–3–methylbutyl, (R,S)–2–hydroxypent–3–yl, (R)–2–hydroxypent–3–yl, (S)–2–hydroxypent–3–yl, (*R*)–1–isopropyl–2–hydroxyethyl, (*S*)–1–isopropyl–2–hydroxyethyl, (2–aminoethyl, 3–aminopropyl, 4–aminobutyl, 5–aminopentyl, 6–aminohexyl, 3–amino–2–hydroxypropyl, 1–(dimethylamino)methyl, 2–(dimethylamino)ethyl, 3–(dimethylamino)-propyl, 4–dimethylamino)butyl, 2–(diethylamino)ethyl, 3–(diethylamino)propyl, *cis*–2–amino-cyklohexyl, *trans*–2–aminocyklohexyl, *cis,trans*–2–aminocyklohexyl, *cis,trans–3*–amino-cyklohexyl, *trans*–4–aminocyklohexyl, *cis*–4–aminocyklohexyl, *cis,trans–4*–aminocyklohexyl, *cis*–2–hydroxycyklohexyl, *trans*–2–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–2–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–3–hydroxycyklohexyl, *trans*–4–hydroxycyklohexyl, *cis*–4–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–hydroxycyklohexyl.

Příprava látek obecného vzorce I vychází z 7–chlor–3–isopropyl–5–methylsulfonyl–1*H*–pyrazolo[4,3–d]pyrimidinu, kde se provede substituce atomu chloru 1–[fenyl]methanaminem substituovaným v poloze 4 fenylu, a následně se nahradí methylsulfonyl skupina substituentem R–NH– reakcí s aminem $R–NH_2$.

Farmaceutické kompozice

Vhodné cesty pro aplikaci jsou orální, rektální, vazální místní (zahrnující okulární, bukální a sublinguální), vaginální a parenterální (zahrnující subkutánní, intramuskulární, intravitreózní, nitrožilní, intradermální, intratekální a epidurální). Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy. Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovadla a/nebo emulgátory rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufry. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspense mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspense obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako, kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou

a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitaminu E, β–karotenu nebo 3,5–di–*tert*–butyl–4–hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono– nebo polyhydrická, např. mono–, di– nebo trihydrické alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, "Labrafil M 2375" (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoseé, Paříž), "Labrafil M 1944 CS" (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž), "Labrasol" (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž) a/nebo "Miglyol 812" (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C_8 až C_{12} od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přídavkem dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítěný polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát horečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulózových preparátů jako acetylcelulózaftalát, nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky. Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát horečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafínový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin. Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafínové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty, kde je to vhodné, a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervo vadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fázi tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafínový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a/nebo polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelínu nebo parafínový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono– a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo stearyl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafínový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween) dále polyoxyethylenové étery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N_2O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně–etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovadla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávadla jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolu, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Objasnění výkresů

Obrázek 1 ukazuje účinek látek 15 a 61 na apoptózu neutrofilů. Izolované neutrofily byly inkubovány s uvedenými látkami 8 hod, následně byly označeny annexinem V a analyzovány průtokovou cytometrií.

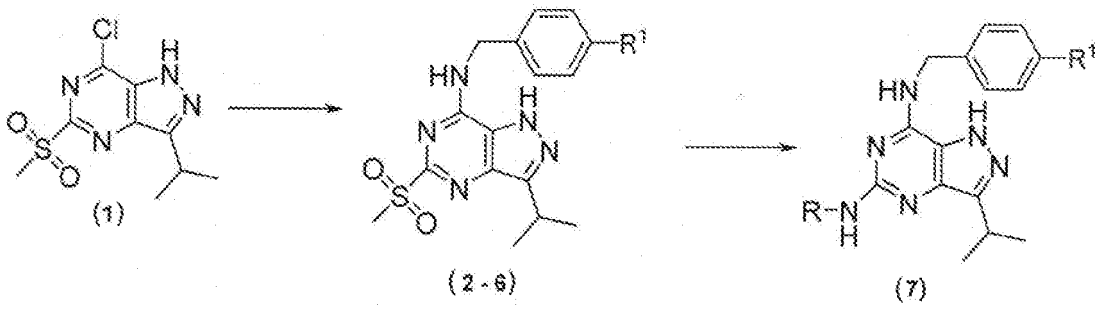
Obrázek 2 ukazuje časový průběh oxidativního vzplanutí neutrofilů indukované fMLP (Formyl–Methionyl–Leucyl–Fenylalanin) a jeho potlačení látkou 15. Izolované neutrofily byly inkubovány s GM–CSF a různými koncentracemi látky 15 po dobu 1 h. Tvorba ROS during po stimulaci fMLP byla kvantifikována chemiluminiscenční reakcí.

Obrázek 3 znázorňuje typickou imunudetekci protein Mcl–1 v neutrofilech ovlivněných různými koncentracemi sloučeniny 15 (konc. je uvedena v nM) po dobu 8 hod. Aktin byl detekován pro kontrolu vyrovnaného nanesení proteinů.

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález je popsán pomocí následujících příkladů, které ovšem nijak neomezují jeho rozsah.

Body tání byly stanoveny na Kofflerově bloku a nebyly korigovány. Všechny reagencie byly ze standardních komerčních zdrojů a analytické čistoty. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na destičkách silica gel F_{254} od Mercku. Skvrny byly vizualizovány pod UV světlem (254 nm). Elementární analýzy (C,H,N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Thermo Finnigan). ESI hmotová spektra byla naměřena za použití přímého nástřiku na Waters Micromass ZMD 2000 hmotovém spektrometru (con voltage 20 V). NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL 500 ECA při teplotě 300 K a frekvenci 500 MHz (^{1}H), respektive 125 MHz (^{13}C). Merck silikagel Kieselgel 60 (zrnitost 230 až 400) byl použit na sloupcovou chromatografii. Všechny sloučeniny vykázaly uspokojivé elementární analýzy (± 0,4 %).



R^1 = furan–2–yl (2)
thiofen–2–yl (3)
1H–pyrrol–2–yl (4)
pyrrolidin–1–yl (5)
1H–pyrazol–1–yl (6)

Příklad 1

3–Isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (2)

7–Chloro–3–isopropyl–5–methylsulfonyl–1*H*–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (1) (17,8 mmol) a ethyldiisopropylamin (22,5 mmol) byl zahříván v 80 mL *t*–BuOH na 60 °C.

Poté byl přidán roztok 1–[4–(furan–2–yl)phenyl]methanaminu (20,9 mmol) v 30 mL t–BuOH (při 50 °C) a reakční směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 1 hodiny.

Rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno a surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 1 % – 5 % MeOH v $CHCl_3$. Byla získána krystalická bezbarvá látka. Výtěžek 65 %, bod tání 180 až 190 °C.

ESI+ m/z 412,1 $[M+H]^+$, ESI– m/z 410,1 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,32 (d, *J* = 7,03 Hz, 6H, –CH–(CH_3)$_2$); 2,41 (s, 3H, –CH_3); 3,33 – 3,35 (m, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 4,65 (bs, 2H, –NH–CH_2–); 6,58 – 6,61 (m, 1H, ArH); 6,89 – 6,91 (m, 1H, ArH); 7,48 (d, *J* = 7,03 Hz, 2H, ArH); 7,75 – 7,77 (m, 1H, ArH); 7,92 (d, *J* = 7,95 Hz, 1H, ArH).

Příklad 2

3–Isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(thiofen–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (3)

7–Chloro–3–isopropyl–5–methylsulfonyl–1*H*–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (1) (17,8 mmol) a ethyldiisopropylamin (22,5 mmol) byl zahřán v 80 mL *t*–BuOH na 60 °C. Poté byl přidán roztok 1–[4–(thiofen–2–yl)fenyl]methanaminu (20,9 mmol) v 30 mL *t*–BuOH (při 50 °C) a reakční směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 1 hodiny.

Rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno a surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 1% –5 % MeOH v $CHCl_3$. Byla získána krystalická bezbarvá látka. Výtěžek 80 %, bod tání 163 až 170 °C.

ESI+ m/z 428,1 $[M+H]^+$, ESI– m/z 426,1 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,31 (d, *J* = 7,03 Hz, 6H, –CH–(CH_3)$_2$); 2,51 (s, 3H, –CH_3); 3,40 – 3,44 (m, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 4,68 (bs, 2H, –NH–CH_2–); 7.10 – 7,13 (m, 1H, ArH); 7,38 – 7,40 (m, 1H, ArH); 7,46 (d, *J* = 7,03 Hz, 2H, ArH); 7,70 – 7,72 (m, 1H, ArH); 7,85 (d, *J* = 7,95 Hz, 1H, ArH).

Příklad 3

3–Isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(1H–pyrazol–1–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidin (6)

7–Chloro–3–isopropyl–5–methylsulfonyl–1*H*–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (1) (17,8 mmol) a ethyldiisopropylamin (22,5 mmol) byl zahřán v 80 mL *t*–BuOH na 60 °C. Poté byl přidán roztok 1–[4–(1*H*–pyrazol–1–yl)fenyl]methanaminu (20,9 mmol) v 30 mL t–BuOH (při 50 °C) a reakční směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 1 hodiny.

Rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno a surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 1% –5 % MeOH v $CHCl_3$. Byla získána krystalická bezbarvá látka. Výtěžek 80 %, bod tání 195 až 200 °C po rekrystalizaci z MeOH.

ESI+ m/z 412,2 $[M+H]^+$, ESI– m/z 410,2 $[M–H]^–$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6):1,39 (d, *J* = 7,03 Hz, 6H, –CH(CH_3)$_2$); 3,26 (s, 3H, –CH_3); 3,37 (sept., *J* = 6,72 Hz, 1H, –C*H*(CH_3)$_2$); 4,79 (bs, 2H, –CH_2–); 6,51 (dd, *J* = 2,45 Hz, *J* = 1,83 Hz, 1H, ArH); 7,54 (d, *J* = 8,25 Hz, 2H, ArH); 7,70 (d, *J* = 1,53 Hz, 1H, ArH); 7,79 (d, *J* = 8,39 Hz, 2H, ArH); 8,44 (d, *J* = 2,45 Hz, 1H, ArH).

^{13}C (125 MHz; DMSO–d_6): 21,6; 25,6; 39,5, 43,1 107,7; 118.2; 118,3; 127,6; 128,2; 128,9; 132,3; 138,8; 140,8; 158,1.

Příklad 4

(R/S)–3–Isopropyl–5–(2–hydroxypropyl)amino–7–[4–(1H–pyrazol–1–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (62)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(1*H*–pyrazol–1–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo–4,3–d]pyrimidinu 6 (1,42 mmol) a 1–amino–2–propanolu (14 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 135 °C po dobu 8 hodin. Po ochlazení byla směs nalita do směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 3%, 5%, 7%, 10% MeOH v $CHCl_3$. Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 33 %.

ESI+ m/z 407,2 [M+H]+, ES– m/z 405,2 $[M–H]^–$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,00 (d, *J* = 6,42 Hz, 3H, –CH–CH_3–); 1,27 (d, *J* = 6,72 Hz, 6H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 3,07 – 3,13 (m, 2H, –CH_2–); 3,20 – 3,25 (m, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 3,71 – 3,77 (m, 1H, –CH–); 4,66 (bd, *J* = 4,89 Hz, 2H, –NH–*C*H_2-); 6,05 (bs, 1H, –NH–CH_2–); 6,47 – 6,48 (m, 1H, ArH); 7,45 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H, ArH); 7,66 – 7,68 (m, 1H, ArH); 7,74 – 7,76 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H, ArH); 8,40 (d, *J* = 2,45 Hz, 1H, ArH).

^{13}C (125 MHz; DMSO–d_6): 21,9, 22,1, 26,7, 31,3, 42,9, 49,9, 66,9, 108,0, 108,2, 118,5, 118,9, 128,1, 129,2, 139,2, 141,3

Příklad 5

3–Isopropyl–5–(2–hydroxy–2–methylpropyl)amino–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (31)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidinu 2 (1,42 mmol) a 1–amino–2–methyl–2–propanolu (14 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 135 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byla směs nalita do směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny

nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 4%, 6% MeOH v $CHCl_3$. Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 23 %.

ESI+ m/z 421,2 $[M+H]^+$, ES– m/z 419,2 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,06 (s, 6H, –C–(CH_3)$_2$); 1,31 (d, J = 7,03 Hz, 6H, –CH–(CH_3)$_2$); 3,24 (sept, J = 7,03 Hz, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 3,20 (d, J = 5,81 Hz, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 4,68 (d, J = 4,89 Hz, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 6,12 (bs, 1H, –N*H*–CH_2–); 6,58 – 6,61 (m, 1H, ArH); 6,89 – 6,91 (m, 1H, ArH); 7,48 (d, J = 7,03 Hz, 2H, ArH); 7,75 – 7,77 (m, 1H, ArH); 7,92 (d, J = 7,95 Hz, 1H, ArH).

Příklad 6

3–Isopropyl–5–(2–hydroxy–2–methylpropyl)amino–7–[4–(thiofen–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (32)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(thiofen–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidinu 3 (1,2 mmol) a 1–amino–2–methyl–2–propanolu (12 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 135 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení byla směs nalita do směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 4%, 6% MeOH v $CHCl_3$. Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 35 %.

ESI+ m/z 437,2 $[M+H]^+$, ES– m/z 435,2 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,06 (s, 6H, –C–(CH_3)$_2$); 1,31 (d, J = 7,03 Hz, 6H, –CH–(CH_3)$_2$); 3,24 (sept, J = 7,03 Hz, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 3,20 (d, J = 5,81 Hz, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 4,68 (d, J = 4,89 Hz, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 6,12 (bs, 1H, –N*H*–CH_2–); 7,11 – 7,13 (m, 1H, ArH); 7,37 – 7,40 (m, 1H, ArH); 7,46 (d, J = 7,23 Hz, 2H, ArH); 7,68 – 7,71 (m, 1H, ArH); 7,83 (d, J = 8,15 Hz, 1H, ArH).

Příklad 7

3–Isopropyl–5–(3–amino–2–hydroxypropyl)amino–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (15)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidinu 2 (1,64 mmol), 1,3–diamino–2–propanolu (95 mmol) a 1–methyl–2–pyrolidonu (2 mL) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 135 °C po dobu 6 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 5%, 8%, 11%, 14% MeOH v $CHCl_3$ s trochou koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 24 %.

ESI+ m/z 422,2 $[M+H]^+$, ESI– m/z 420,2 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,25 (d, J = 7,03 Hz, 6H, –CH–(CH_2)$_3$); 2,40 – 2,50 (m, 2H, –CH_2–); 3,10 – 3,20 (m, 2H, –CH_2–); 2,28–2,33 (m, 1H, –CH–); 3,45–3,49 (m, 1H, –C*H*–(CH_3)$_2$); 4,69 (bs, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 6,06 (app. bt, 1H, –N*H*–CH_2–); 6,60 – 6,61 (m, 1H, ArH); 6,87 – 6,91 (m, 1H, ArH); 7,44 (d, J = 8,25 Hz, 2H, ArH); 7,75 – 7,77 (m, 1H, ArH); 8,01 (d, J = 8,56 Hz, 2H, ArH).

Příklad 8

3–Isopropyl–5–(3–amino–2–hydroxypropyl)amino–7–[4–(1H–pyrazol–1–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (61)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(1H–pyrazol–1–yl)benzyl]amino–1*H*–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin 6 (1,64 mmol), 1,3–diamino–2–propanolu (95 mmol) a 1–methyl–2–pyrolidonu (2 mL) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 135 °C po dobu 6 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 5%, 8%, 11%, 14% MeOH v $CHCl_3$ s trochou koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 35 %.

ESI+ m/z 422,2 $[M+H]^+$, ESI– m/z 420,2 $[M–H]^–$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,25 (d, *J* = 7,03 Hz, 6H, –CH–(C*H*$_3$)$_2$); 2,40 – 2,50 (m, 2H, –C*H*$_2$–); 3,10 – 3,20 (m, 2H, –C*H*$_2$–); 2,28–2,33 (m, 1H, –CH–); 3,45–3,49 (m, 1H, –C*H*–(CH$_3$)$_2$); 4,69 (bs, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 6,06 (app. bt, 1H, –N*H*–CH$_2$–); 6,49 (dd, *J* = 2,45 Hz, *J* = 1,83 Hz, 1H, ArH); 7,40 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H, ArH); 7,61 (d, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7,80 (d, *J* = 8,56 Hz, 1H, ArH); 8,39 (d, *J* = 2,14 Hz, 1H, ArH).

Příklad 9

3–Isopropyl–5–(trans–2–aminocyklohexyl)amino–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (17)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidinu 2 (3,32 mmol) a 1,2–*trans*–diaminocyklohexanu (68 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 145 °C po dobu 20 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 4%, 8%, 11%. 14% MeOH v $CHCl_3$ s trochou koncentrovaného vodného amoniaku Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 13 %.

ESI+ m/z 446,2 $[M+H]^+$, ESI– m/z 444,3 $[M–H]^–$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,13–1,20 (m, 4H, –CH$_2$–); 1,25 (bs, 6H, –CH–(C*H*$_3$)$_2$); 1,57 – 1,59 (m, 2H, –CH$_2$–); 1,86 (bs, 2H, –CH$_2$–); 2,47 (bs, 1H, –CH–); 3,15 (sept., *J* = 6,42 Hz, 1H, –C*H*–(CH$_3$)$_2$); 3,56 (bs, 1H, –CH–); 4,57 (bs, 2H, –NH–C*H*$_2$–); 6,58 – 6,61 (m, 1H, ArH); 6,89 – 6,91 (m, 1H, ArH); 7,48 (d, *J* = 7,13 Hz, 2H, ArH); 7,75 – 7,77 (m, 1H, ArH); 7,92 (d, *J* = 7,15 Hz, 1H, ArH).

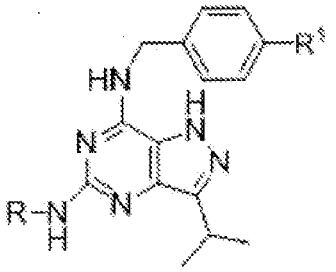
Příklad 10

3–Isopropyl–5–(trans–4–aminocyklohexyl)amino–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]pyrimidin (20)

Směs 3–isopropyl–5–methylsulfonyl–7–[4–(furan–2–yl)benzyl]amino–1H–pyrazolo[4,3–d]-pyrimidinu 2 (0,71 mmol) a 1,4–*trans*–diaminocyklohexanu (44 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 145 °C po dobu 20 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H_2O a $CHCl_3$. Vodná fáze byla vyextrahována pomocí $CHCl_3$, spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem horečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 4%, 8%, 11%, 14% MeOH v $CHCl_3$ s trochou koncentrovaného vodného amoniaku Byla získána amorfní bezbarvá látka. Výtěžek 15 %.

ESI+ m/z 446,2 $[M+H]^+$, ESI– m/z 444,3 $[M–H]^-$. ^1H (500 MHz; DMSO–d_6): 1,08 – 1,18 (m, 4H, 2x $–CH_2–$); 1,27 (d, J = 7,03 Hz, 6H, $–CH–(CH_3)_2$); 1,71 – 1,72 (m, 2H, $–CH_2–$); 1,85 – 1,87 (m, 2H, $–CH_2–$); 2,50 – 2,52 (m, 1H, –C*H*–NH–); 3,11 (sept, J = 7,03 Hz, 1H, $–CH–(CH_3)_2$); 3,54 – 3,56 (m, 1H, –C*H*–NH–); 4,68 (bd, J = 4,58 Hz, 2H, $–NH–CH_2–$); 5,69 (bd, J = 7,34 Hz, 1H, –N*H*–CH–); 6,58 – 6,61 (m, 1H, ArH); 6,89 – 6,91 (m, 1H, ArH); 7,48 (d, J = 7,13 Hz, 2H, ArH); 7,75 – 7,77 (m, 1H, ArH); 7,92 (d, J = 7,15 Hz, 1H, ArH).

Tabulka 1: Látky připravené podle metod ukázaných v příkladech 4 až 10.



Č.	SUBSTITUENT R	SUBSTITUENT R^1	CHN ANALÝZA [%]	MS (ZMD)-ANALÝZY	
				$[M-H]^-$ a)	$[M+H]^+$ b)
7	2-hydroxyethyl	furan-2-yl	C = 64,26; H = 6,14; N = 21,40	391,2	393,2
8	(R/S)-2-hydroxypropyl	furan-2-yl	C = 65,05; H = 6,40; N = 20,70	405,2	407,2
9	(R)-2-hydroxypropyl	furan-2-yl	C = 65,00; H = 6,45; N = 20,65	405,2	407,2
10	(S)-2-hydroxypropyl	furan-2-yl	C = 64,92; H = 6,48; N = 20,72	405,2	407,2
11	3-hydroxypropyl	furan-2-yl	C = 65,02; H = 6,48; N = 20,68	405,2	407,2
12	(R/S)-4-hydroxybut-2-yl	furan-2-yl	C = 65,72; H = 6,71; N = 19,99	419,3	421,2
13	(R)-4-hydroxybut-2-yl	furan-2-yl	C = 65,70; H = 6,75; N = 19,97	419,3	421,2
14	(S)-4-hydroxybut-2-yl	furan-2-yl	C = 65,68; H = 6,69; N = 20,02	419,3	421,2
15	3-amino-2-hydroxypropyl	furan-2-yl	C = 62,69; H = 6,46; N = 23,30	420,2	422,2
16	*cis*-2-aminocyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,45; H = 7,00; N = 22,01	444,2	446,2
17	*trans*-2-aminocyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,39; H = 6,99; N = 22,02	444,3	446,2
18	*cis,trans*-2-aminocyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,45; H = 7,07; N = 21,98	444,3	446,2
19	*cis,trans*-3-aminocyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,37; H = 7,01; N = 22,04	444,2	446,2
20	*trans*-4-aminocyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,40; H = 7,01; N = 22,03	444,3	446,2
21	*trans*-2-hydroxycyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,29; H = 6,78; N = 18,79	445,2	447,2
22	*trans*-3-hydroxycyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,24; H = 6,72; N = 18,89	445,2	447,2
23	*trans*-4-hydroxycyklohexyl	furan-2-yl	C = 67,21; H = 6,75; N = 18,84	445,2	447,2
24	(R)-1-(hydroxymethyl)propyl	furan-2-yl	C = 65,70; H = 6,73; N = 20,01	419,2	421,2
25	(S)-1-(hydroxymethyl)propyl	furan-2-yl	C = 65,68 H = 6,68; N = 19,96	419,2	421,2

26	2-aminoethyl	furan-2-yl	C = 64,45; H = 6,46; N = 25,06	390,2	392,2
27	3-aminopropyl	furan-2-yl	C = 65,18; H = 6,73; N = 24,20	404,2	406,2
28	4-aminobutyl	furan-2-yl	C = 65,82; H = 7,00; N = 23,38	418,2	420,2
29	5-aminopentyl	furan-2-yl	C = 66,47; H = 7,22; N = 22,62	432,3	434,3
30	6-aminohexyl	furan-2-yl	C = 67,11; H = 7,45; N = 21,95	446,3	448,3
31	2-hydroxy-2-methylpropyl	furan-2-yl	C = 65,69; H = 6,70; N = 19,96	419,2	421,2
32	2-hydroxy-2-methylpropyl	thiofen-2-yl	C = 63,25; H = 6,49; N = 19,30	435,2	437,2
33	3-hydroxy-3-methylbutyl	thiofen-2-yl	C = 63,99; H = 6,75; N = 18,66	449,3	451,2
34	2,3-dihydroxypropyl	thiofen-2-yl	C = 60,21; H = 6,05; N = 19,20	437,2	439,2
35	1-hydroxy-3-methylbut-2-yl	thiofen-2-yl	C = 63,97; H = 6,73; N = 18,59	449,2	451,2
36	(R/S)-2-hydroxypent-3-yl	thiofen-2-yl	C = 63,95; H = 6,80; N = 18,70	449,2	451,2
37	(R)-2-hydroxypent-3-yl	thiofen-2-yl	C = 63,92; H = 6,71; N = 18,55	449,2	451,2
38	(S)-2-hydroxypent-3-yl	thiofen-2-yl	C = 63,95; H = 6,75; N = 18,65	449,2	451,2
39	2-hydroxyethyl	thiofen-2-yl	C = 61,75; H = 5,94; N = 20,59	407,2	409,2
40	(R/S)-2-hydroxypropyl	thiofen-2-yl	C = 62,54; H = 6,24; N = 19,90	421,2	423,2
41	(R)-2-hydroxypropyl	thiofen-2-yl	C = 62,50; H = 6,19; N = 19,92	421,2	423,2
42	(S)-2-hydroxypropyl	thiofen-2-yl	C = 62,53; H = 6,21; N = 19,88	421,2	423,2
43	3-hydroxypropyl	thiofen-2-yl	C = 62,52; H = 6,18; N = 19,92	421,2	423,2
44	(R/S)-4-hydroxybut-2-yl	thiofen-2-yl	C = 63,30; H = 6,47; N = 19,25	435,2	437,2
45	(R)-4-hydroxybut-2-yl	thiofen-2-yl	C = 63,27; H = 6,49; N = 19,26	435,2	437,2
46	(S)-4-hydroxybut-2-yl	thiofen-2-yl	C = 63,28; H = 6,46; N = 19,22	435,2	437,2
47	2-aminoethyl	1H-pyrrol-2-yl	C = 64,59; H = 6,78; N = 28,64	389,3	391,3
48	3-aminopropyl	1H-pyrrol-2-yl	C = 65,33; H = 6,99; N = 27,72	403,2	405,2
49	4-aminobutyl	1H-pyrrol-2-yl	C = 66,08; H = 7,25; N = 26,78	417,3	419,3
50	5-aminopentyl	1H-pyrrol-2-yl	C = 66,69; H = 7,45; N = 25,92	431,3	433,3
51	6-aminohexyl	1H-pyrrol-2-yl	C = 67,26; H = 7,69; N = 25,10	445,3	447,3
52	1-(dimethylamino)methyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 62,25; H = 6,72; N = 31,11	404,2	406,2
53	2-(dimethylamino)ethyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 62,96; H = 6,99; N = 30,05	418,3	420,3
54	3-(dimethylamino)propyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 63,70; H = 7,25; N = 29,08	432,3	434,3
55	4-(dimethylamino)butyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 64,42; H = 7,45; N = 28,17	446,3	448,3
56	2-aminoethyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 61,39; H = 6,48; N = 32,24	390,2	392,2
57	3-aminopropyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 62,23; H = 6,70; N = 31,07	404,2	406,2
58	4-aminobutyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 62,98; H = 6,99; N = 30,08	418,3	420,3
59	5-aminopentyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 63,72; H = 7,22; N = 29,10	432,3	434,3
60	6-aminohexyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 64,46; H = 7,47; N = 28,17	446,3	448,3
61	3-amino-2-hydroxypropyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 59,85; H = 6,45; N = 29,95	420,2	422,2
62	(R/S)-2-hydroxypropyl	1H-pyrazol-1-yl	C = 62,15; H = 6,45; N = 27,55	405,2	407,2
63	2-(diethylamino)ethyl	pyrrolidin-1-yl	C = 66,61; H = 8,49; N = 24,82	449,3	451,3
64	3-(diethylamino)propyl	pyrrolidin-1-yl	C = 67,20; H = 8,70; N = 24,16	463,3	465,3

65	3-(diethylamino)butyl	pyrrolidin-1-yl	C = 67,73; H = 8,86; N = 23,40	477,4	479,3
66	2-hydroxy-2-methylpropyl	pyrrolidin-1-yl	C = 65,25; H = 7,88; N = 23,18	422,3	424,3
67	3-hydroxy-3-methylbutyl	pyrrolidin-1-yl	C = 65,90; H = 8,05; N = 22,46	436,3	438,3
68	2,3-dihydroxypropyl	pyrrolidin-1-yl	C = 62,13; H = 7,35; N = 23,02	424,2	426,2
69	1-hydroxy-3-methylbut-2-yl	pyrrolidin-1-yl	C = 65,90; H = 8,09; N = 22,45	436,3	438,3

Příklad 11

Měření apoptózy neutrofilů

Neutrofily byly izolovány z periferní krve zdravých dárců podle popsané metodiky (Afford et al 1992). Krev byla sbírána do zkumavek obsahujících EDTA, erytrocyty byly sedimentovány ve 2% dextranu. Neutrofily pak byly izolovány z leukocytové vrstvy diskontinuální gradientovou centrifugací (Percoll, Sigma–Aldrich, UK) a resuspendovány v médiu RPMI 1640 (Sigma–Aldrich) doplněném 10% tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem (Sera Laboratories International, Bolney, UK), 2 mM glutaminem, 100 U/ml penicillinem a 100 μg/ml streptomycinem (Sigma–Aldrich). Čistota izolovaných neutrofilů byla ověřena mikroskopicky po barvení Giemsa (Diff–Quick, Baxter Healthcare, UK) a činila obvykle více než 97 %. Neutrofily byly dále kultivovány v přítomnosti nově vyvinutých sloučenin (jednobodová měření s 10 nM sloučeninou, nebo vícebodová měření v rozsahu od 10 nM do 1 μM) a dalších stimulačních fakturu po dobu 8 h.

Pro kvantifikaci rané apoptózy byly neutrofily značeny protilátkou proti annexinu V konjugovanou s FITC (BD Pharmingen), která označuje extracelulární fosfatidylserin, a propidium jodidem detekujícím pozdně apoptotické a nekrotické buňky. Ošetřené i kontrolní buňky byly opláchnuty v PBS a resuspendovány ve vhodném pufru (10 mM HEPES, pH 7.4; 140 mM NaCl; 2,5 mM $CaCl_2$). Po přídavku protilátky byly buňky inkubovány 10, dobarveny propidium jodidem a analyzovány průtokovým cytometrem (BD Accuri C6 Flow Cytometer, Accuri Cytometers Inc.), přičemž za apoptotické byly považovány buňky pozitivní na Annexin V a negativní na propidum jodid. Výsledná data jsou uvedena v tabulce 2. Některé nově připravené sloučeniny byly testovány ve více koncentracích. Zřejmý koncentračně závislý účinek je ilustrován obrázkem 1.

Proapoptotický účinek nových sloučenin byl potvrzen morfologicky, mikroskopickým pozorováním jader neutrofilů barvených Giemsa. Působení nových látek téměř vždy vedlo ke změnám, které jsou považovány za průkaz apoptózy. Také tyto účinky byly evidentně závislé na koncentraci použité sloučeniny.

Tabulka 2. Indukce apoptózy v neutrofilech vyvolané novými sloučeninami (10 nM).

sloučenina	% apoptotických buněk
1	32
2	41
3	58
4	46
5	40
6	36
7	47
15	52
30	39
31	50
32	48
33	36
34	52
42	57
44	38
45	33
58	44
59	49
60	60
61	40
63	39
65	56
66	34

Příklad 12

Tvorba superoxidu

Hladina reaktivních kyslíkových forem (ROS) produkovaných neutrofily byla měřena chemiluminiscenčně s využitím luminolu dle popsané metody (Gyllenhammar 1987). Po inkubaci s novými sloučeninami byly neutrofily resuspendovány v HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) obsahujícím vápenaté a horečnaté ionty a přeneseny do mikrotitračních destiček z neprůhledného plastu (Greiner Bio–One GmbH). Do každé jamky byl přidán luminol (finální koncentrace – 100 μM) a stimulační faktor fMLP (2,5 μM), přičemž byla diskontinuálně měřena chemiluminiscence v jednominutových intervalech po dobu 30 minut na luminometru Centro LB 960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). Účinek nově připravených sloučenin byl jednoznačně koncentračně závislý (viz Obrázek 2).

Příklad 13

Downregulace proteinu Mcl–1

Dalším markerem apoptózy byla hladina mitochondriálního proteinu Mcl–1 v neutrofilech. Neutrofily byly po ovlivnění novými sloučeninami resuspendovány v SDS–PAGE pufru (125 mM HCl, pH 6,8; 5% glycerol; 2% SDS; 1% β–merkaptoethanol; 0,003% bromfenolová modř), lyzáty byly dále tepelně zdenaturovány (10 min, 100 °C), protein separovány SDS–PAGE

a přeblotovány na PVDF membránu. Před vlastní imunodetekcí byla membrána zablokována 5% BSA. Membrány byly posléze inkubovány s primárními protilátkami proti Mcl–1 (1:500), Bak (1:500) aβ–aktinu (1:1000), a dále se sekundárními protilátkami označenými peroxidasou (GE Healthcare, Sweden). Proteiny byly vizoalizovány činidlem ECL dle návodu výrobce (GeneFlow, UK). Denzitometrická analýza byla provedena pomocí programu Mul ti Gauge (FujiFilm).

Po 8 hodinovém působení nových sloučenin na neutrofily došlo k výraznému poklesu hladiny Mcl–1 (obrázek 3). Proapoptotický protein Bak naopak vykazoval koncentračně závislý nárůst.

Příklad 14

Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení

Aktivní složka	1250 g
Talek	180 g
Pšeničný škrob	120 g
Magnezium stearát	80 g
Laktóza	20 g

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 15

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

Složení,

Aktivní složka	250 g
Lauroglykol	2 litry

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoseé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 16

Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce **I**, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

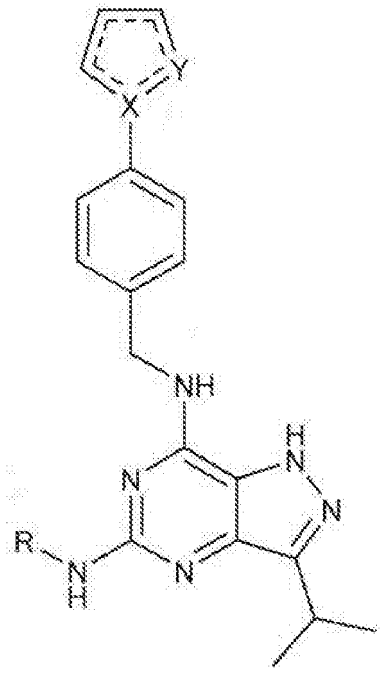
Složení

Aktivní složka	250 g
PEG 400	1 litr
Tween 80	1 litr

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween® 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 5–Substituované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny obecného vzorce I



(I),

ve kterém,

X je atom uhlíku nebo dusíku a Y je CH, O, S, nebo N, vazby označené čárkovaně jsou nezávisle jednoduché nebo dvojné vazby,

R je vybráno ze skupiny zahrnující

– C_2–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy a amino substituent, s výhodou jedním hydroxy a/nebo jedním amino substituentem;
– (dialkylamino)alkyl skupinu, kde každý alkyl je vybrán nezávisle ze skupiny zahrnující C_1–C_{10} lineární nebo rozvětvený alkyl;
– C_3–C_{10} cykloalkyl, což znamená monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 10 uhlíkových atomů, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním

substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C_1–C_4 alkyl, C_1–C_4 alkoxy, C_1–C_4 hydroxyalkyl a amino substituent;

a jejich farmaceuticky přijatelné soli, zejména s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo jejich adiční soli s kyselinami.

2. 5–Substituované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny podle nároku 1, obecného vzorce I, kde R je vybraný ze skupiny zahrnující ethyl, propyl, butyl, 2–hydroxyethyl, 3–hydroxypropyl, 2(R)–hydroxypropyl, 2(S)–hydroxypropyl, 4–hydroxybut–2(R)–yl, 4–hydroxybut–2(S)–yl, 4–hydroxybut–2(R,S)–yl, 2–(hydroxy–2–methyl)propyl, 2,3–dihydroxypropyl, 1–hydroxy–3–methylbutyl, (R,S)–2–hydroxypent–3–yl, (R)–2–hydroxypent–3–yl, (S)–2–hydroxypent–3–yl, (*R*)–1–isopropyl–2–hydroxyethyl, (*S*)–1–isopropyl–2–hydroxyethyl, 2–aminoethyl, 3–aminopropyl, 4–aminobutyl, 5–aminopentyl, 6–aminohexyl, 3–amino–2–hydroxypropyl, 1–(dimethylamino)methyl, 2–(dimethylamino)ethyl, 3–(dimethylamino)propyl, 4–(dimethylamino)butyl, 2–(diethylamino)ethyl, 3–(diethylamino)propyl, *cis*–2–aminocyklohexyl, *trans*–2–aminocyklohexyl, *cis,trans*–2–aminocyklohexyl, *cis,trans*–3–aminocyklohexyl, *trans*–4–aminocyklohexyl, *cis*–4–aminocyklohexyl, *cis,trans*–4–aminocyklohexyl, *cis*–2–hydroxycyklohexyl, *trans*–2–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–2–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–3–hydroxycyklohexyl, *trans*–4–hydroxycyklohexyl, *cis*–4–hydroxycyklohexyl, *cis,trans*–4–hydroxycyklohexyl.

3. 5–Substituované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny

podle nároku 1 nebo 2, obecného vzorce I, kde struktura je vybraná ze skupiny zahrnující pyrrolidin–1–yl, 1H–pyrazol–1–yl, 1H–pyrrol–2–yl, thiofen–2–yl, furan–2–yl.

4. 5–Substituované –7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro použití jako léčiva.

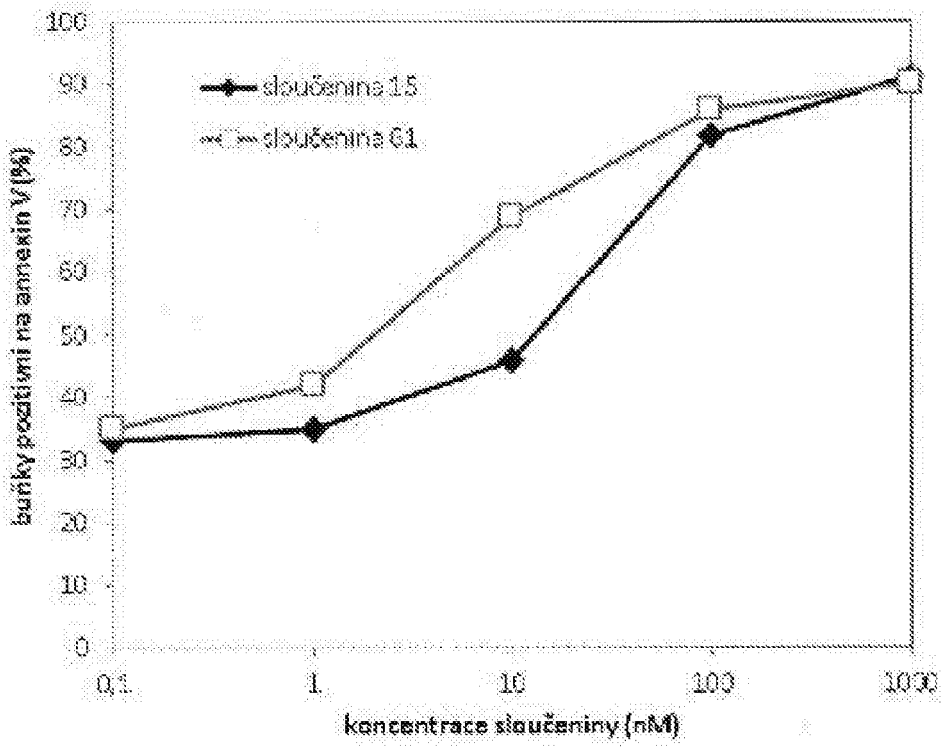
5. 5–Substituované –7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu zánětlivých onemocnění.

6. 5–Substitutované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]pyrimidin obecného vzorce I pro použití jako léčiva pro léčbu revmatoidní artritidy.

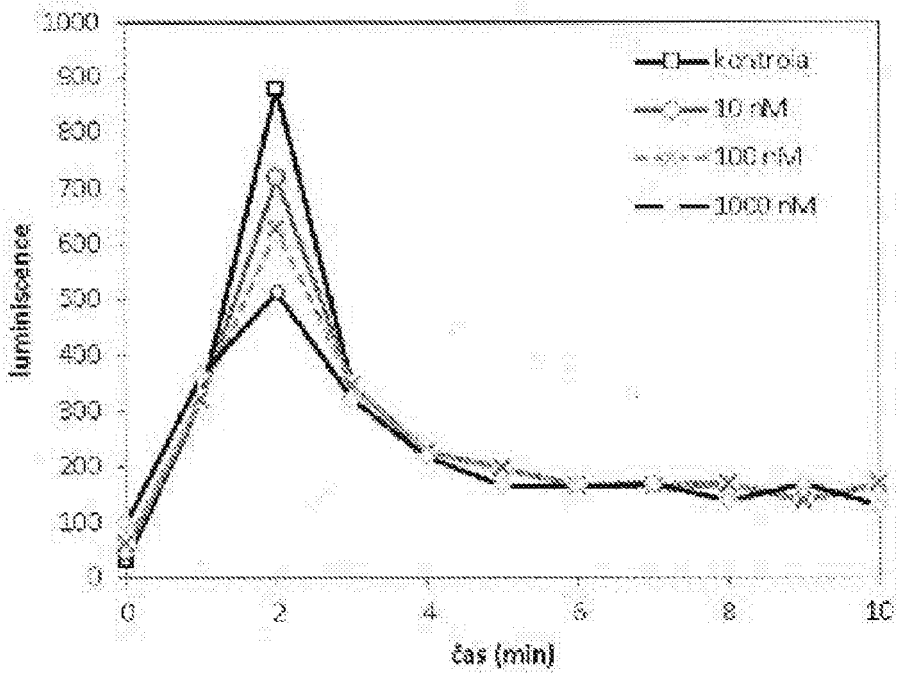
7. 5–Substitutované–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]-pyrimidiny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití pro inhibici kináz CDK5/7/9, zejména v neutrofilech a fibroblastech.

8. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jeden 5–substituovaný–7–[4–(substituované)benzyl]amino–3–isopropylpyrazolo[4,3–d]pyrimidin obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 a farmaceuticky přijatelný nosič.

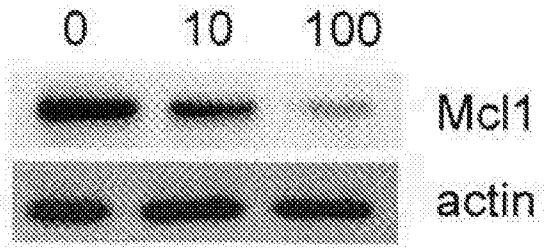
2 výkresy


sloučenina 15
sloučenina 61
buňky pozitivní na anexin V (%)
koncentrace sloučeniny (nM)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
0,1
1
10
100
1000

Obr. 1


kontrola
10 nM
100 nM
1000 nM
luminiscence
čas (min)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
0
2
4
6
8
10

Obr. 2



Obr. 3