PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

294 648

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. :[7]

C 07 D 471/04
A 61 K 31/415
A 61 P 9/00

\\(C 07 D 471/04, C 07 D 231:00, C 07 D 221:00)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2003-1435**

(22) Přihlášeno: **09.11.2001**

(30) Právo přednosti: **22.11.2000 DE 2000/10057753**
02.07.2001 DE 2001/10131987

(40) Zveřejněno: **15.10.2003**
(Věstník č. 10/2003)

(47) Uděleno: **21.12.04**

(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)

(86) PCT číslo: **PCT/EP2001/012969**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/042301**

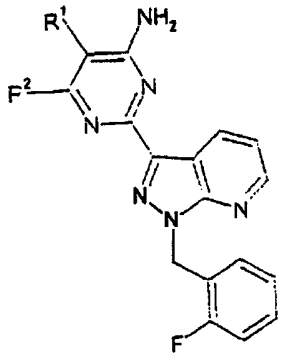
(73) Majitel patentu:
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, Leverkusen, DE

(72) Původce:
Stasch Johannes Peter, Solingen, DE
Feurer Achim, Odenthal, DE
Weigand Stefan, Wuppertal, DE
Stahl Elke, Bergisch Gladbach, DE
Flubacher Dietmar, Hilden, DE
Alonso-Alija Cristina, Haan, DE
Wunder Frank, Wuppertal, DE
Lang Dieter, Velbert, DE
Dembovsky Klaus, Boston, MA, US
Straub Alexander, Wuppertal, DE
Perzborn Elisabeth, Wuppertal, DE

(74) Zástupce:
JUDr. Miloš Všetečka, Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název vynálezu:

Pyridin-substituované deriváty pyrazolpyridinu, způsob jejich výroby, léčiva tyto látky obsahující a jejich použití



(I)

(57) Anotace:

Pyridin-substituované deriváty pyrazolpyridinu obecného vzorce I, kde R^1 je pyridinyl, R^2 je vodík, halogen nebo aminoskupina, které stimulují rozpustné guanylátcyklázy a jejich použití v léčivech, obzvláště jako léčiv pro ošetření onemocnění srdečního krevního oběhu, hypertonie, tromboembolických onemocnění a ischemií, sexuálních dysfunkcí nebo zánětů, jakož i onemocnění centrálního nervového systému.

CZ 294648 B6

Pyridin–substituované deriváty pyrazolpyridinu, způsob jejich výroby, léčiva tyto látky obsahující a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká nových chemických sloučenin, které stimulují rozpustné guanylátcyklázy, způsobu jejich výroby, léčiv tyto látky obsahujících a jejich použití v léčivech, obzvláště jako léčiv pro ošetření onemocnění srdečního krevního oběhu.

Dosavadní stav techniky

Jedním z nejdůležitějších buněčných přenosových systémů v buňkách savců je cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Společně s oxidem dusnatým (NO), který se uvolňuje z endothelu a přenáší hormonální a mechanické signály, tvoří systém NO/cGMP. Guanylátcyklázy katalyzují biosyntézu cGMP z guanosintrifosfátu (GTP). Dosud známí zástupci této třídy se dají rozdělit jak podle strukturních znaků, tak také podle druhu ligandů na dvě skupiny : partikulární, natriuretickými peptidy stimulovatelné guanylátcyklázy a rozpustné, pomocí NO stimulovatelné guanylátcyklázy. Rozpustné guanylátcyklázy sestávají ze dvou podjednotek a obsahují vysoce pravděpodobně hem pro heterodimer, který je částí regulatorického centra. Tento má centrální význam pro aktivační mechanizmus. NO se může vázat na atom železa hemu a tak se může aktivita enzymu významně zvýšit. Preparáty bez hemu se naproti tomu nedají pomocí NO stimulovat. Také oxid uhelnatý je schopen navázání na centrální atom železa hemu, přičemž stimulace pomocí CO je podstatně nižší, než stimulace pomocí NO.

Tvorbou cGMP a z toho vyplývající regulací fosfodiesteráz, iontových kanálů a proteinkináz hraje guanylátcykláza rozhodující roli při různých fyziologických procesech, obzvláště při relaxaci a proliferaci buněk hladkého svalstva, agregaci a adhezi krevních destiček a přenosu neuronálních signálů, jakož i při onemocněních, která jsou způsobena poruchami výše uvedených pochodů. Za patofyziologických podmínek může být NO/cGMP–systém suprimován, což může vést například k vysokému krevnímu tlaku, aktivaci destiček, zvýšené proliferaci buněk, endoteheliární dysfunkci, ateroskleróze, angině pectoris, srdeční insufficienci, thrombózám, případům mrtvice a infarktu myokardu.

Pro ovlivnění cGMP–signální cesty v organizmech zaměřená NO–nezávislá možnost ošetření takovýchto onemocnění je na základě očekávatelné vysoké efficience a nepatrných vedlejších účinků diskutovatelnou otázkou.

Pro terapeutickou stimulaci rozpustné guanylátcyklázy byly dosud používány výhradně sloučeniny, jako jsou organické nitráty, jejichž účinek je založen na NO. Tento se tvoří biokonverzí a aktivuje rozpustnou guanylátcyklázu napadením na centrálním atomu železa hemu. Vedle vedlejších účinků patří k rozhodujícím nevýhodám tohoto způsobu ošetření vznik tolerance.

V posledních letech byly popsané látky, které stimulují rozpustní guanylátcyklázy přímo, to znamená bez předchozího uvolňování NO, jako je například 3–(5′–hydroxymethyl–2′–furyl)–1–benzylindazol (YC–1, Wu a kol., Blood 84 (1994), 4226; Mülsch a kol., Br. J. Pharmacol. 120 (1997), 681), mastné kyseliny (Goldberg a kol., J. Biol. Chem. 252 (1997), 1279), difenyljodonium–hexafluorofosfát (Pettibone a kol., Eur. J. Pharmacol. 116 (1985), 307), izoliquiritigenin (Yu a kol., Brit. J. Pharmacol. 114 (1995), 1587), jakož i různé substituované deriváty pyrazolu (WO 98/16223).

Dále jsou ve WO 98/16507, WO 98/23619, WO 00/06567, WO/06568, WO/00/06569 a WO 00/21954 popsané deriváty pyrazolpyridinu jako stimulátory rozpustné guanylátcyklázy. V těchto patentových přihláškách jsou také popsané pyrazolopyridiny, které mají v poloze 3

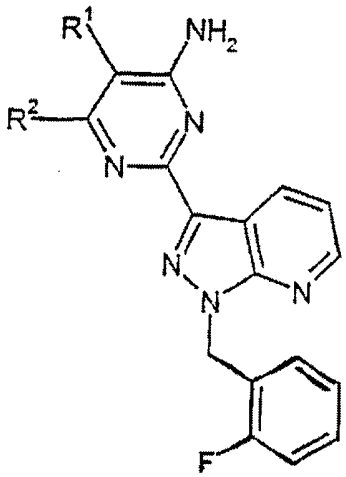
pyrimidinový zbytek. Takovéto sloučeniny mají velmi vysokou in vitro aktivitu se zřetelem na stimulaci rozpustné guanylátcyklázy. Ovšem ukázalo se, že tyto sloučeniny vykazují se zřetelem na své in vivo vlastnosti, jako například při svém chování v játrech, při svém farmakokinetickém chování, při svém vztahu dávka–účinek nebo při metabolické cestě, určité nevýhody.

Úkolem předloženého vynálezu tedy je připravit další deriváty pyrazolpyridinu, které by působily jako stimulátory rozpustné guanylátcyklázy, ale které by nevykazovaly výše uváděné nevýhody sloučenin ze stavu techniky.

Podstata vynálezu

Uvedený úkol byl vyřešen novými deriváty pyrazolpyridinů, které se vyznačují pyrimidinovým zbytkem v poloze 3, který vykazuje určitý substituční vzor, totiž pyridinový zbytek v poloze 5 pyrimidinového kruhu, jakož i aminoskupinu v poloze 4 pyrimidinového kruhu.

Předmětem předloženého vynálezu tedy jsou pyridin–substituované deriváty pyrazolopyridinu obecného vzorce I



(I),

ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom, aminoskupinu nebo atom halogenu,

jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

Podle alternativní formy provedení jsou předmětem předloženého vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom, aminoskupinu nebo atom chloru,

jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

Podle další alternativní formy provedení jsou předmětem předloženého vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom,

jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I se mohou vyskytovat také ve formě svých solí. Všeobecně je možno uvést soli s organickými nebo anorganickými bázemi nebo kyselinami.

V rámci předloženého vynálezu jsou výhodné fyziologicky neškodné soli. Fyziologicky neškodné soli sloučenin podle předloženého vynálezu mohou být soli látek podle předloženého vynálezu s minerálními kyselinami, karboxylovými kyselinami nebo sulfonovými kyselinami. Obzvláště výhodné jsou například soli s kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou fosforečnou, kyselinou methansulfonovou, kyselinou ethansulfonovou, kyselinou p–toluensulfonovou, kyselinou benzensulfonovou, kyselinou naftalendisulfonovou, kyselinou octovou, kyselinou propionovou, kyselinou mléčnou, kyselinou vinnou, kyselinou citronovou, kyselinou fumarovou, kyselinou maleinovou a kyselinou benzoovou.

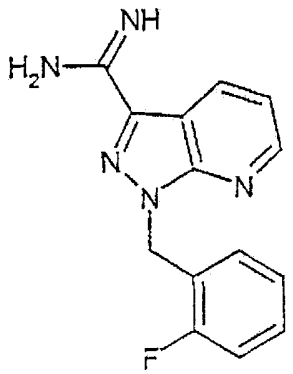
Fyziologicky neškodné soli mohou být rovněž kovové nebo amoniové soli sloučenin podle předloženého vynálezu, které mají volnou karboxylovou skupinu. Obzvláště výhodné jsou například soli sodné, draselné, hořečnaté nebo vápenaté, jakož i amoniové soli, které jsou odvozené od amoniaku nebo organických aminů, jako je například ethylamin, diethylamin, triethylamin, diethanolamin, triethanolamin, dicyklohexylamin, dimethylaminoethanol, arginin, lysin nebo ethylendiamin.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou existovat v tautomerních formách. Toto je pro odborníky známé a takovéto formy jsou rovněž předmětem předloženého vynálezu.

Dále se mohou sloučeniny podle předloženého vynálezu vyskytovat ve formě svých možných hydrátů.

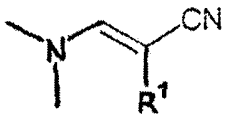
Atom halogenu značí v rámci předloženého vynálezu atom fluoru, chloru, bromu a jodu.

Předmětem předloženého vynálezu je dále způsob výroby sloučenin obecného vzorce I, jehož podstata spočívá v tom, že se nechá reagovat sloučenina vzorce II



(II),

A) se sloučeninou obecného vzorce III



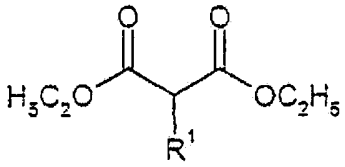
(III),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

popřípadě v organickém rozpouštědle za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C na sloučeninu obecného vzorce I,

nebo

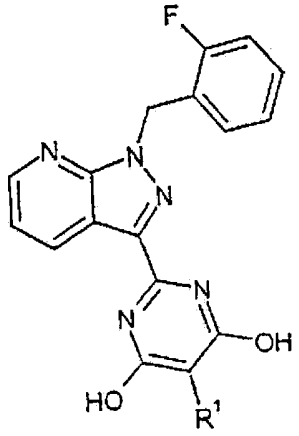
B) se sloučeninou obecného vzorce IV



(IV),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

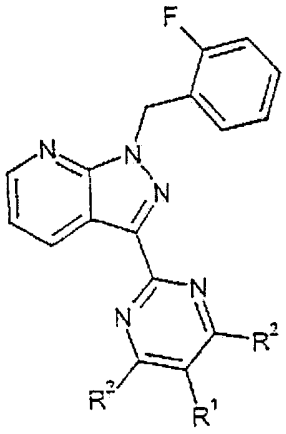
v organickém rozpouštědle za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C na sloučeninu obecného vzorce V



(V),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

a potom s halogenačním činidlem na sloučeninu obecného vzorce VI



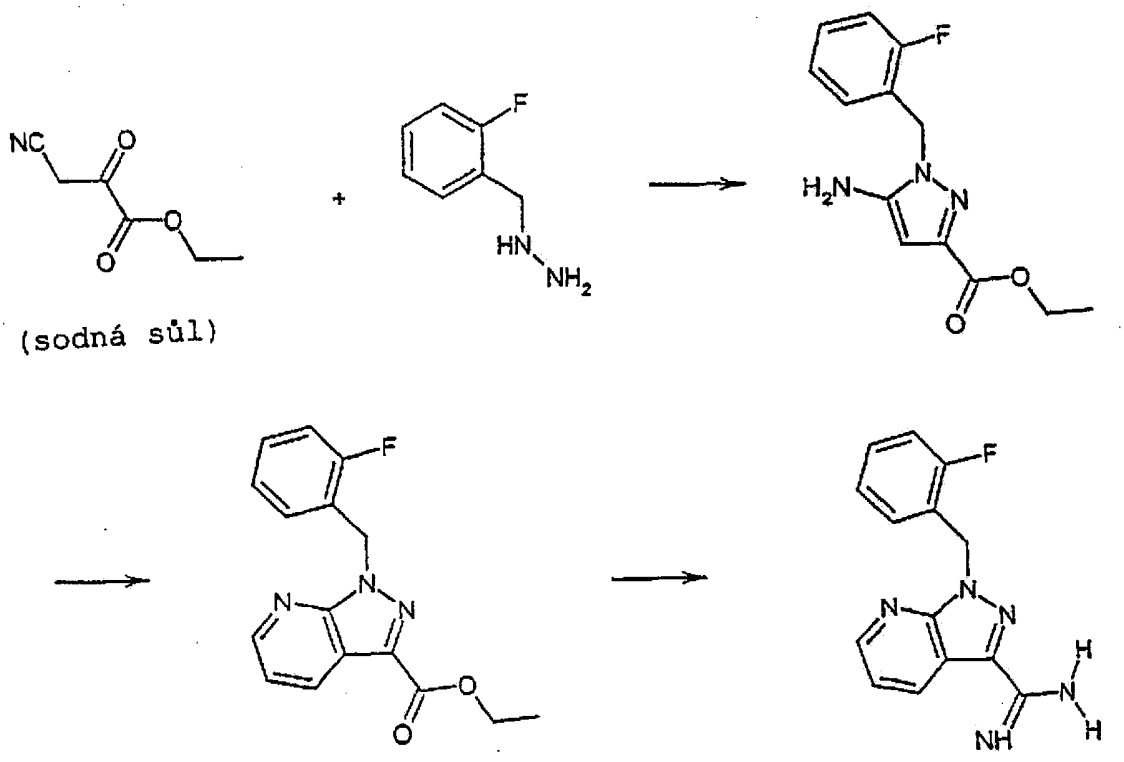
(VI)

přičemž R^1 má výše uvedený význam a

R^2 značí atom halogenu,

a nakonec s vodným roztokem amoniaku za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C, popřípadě za zvýšeného tlaku průběhem reakce v autoklávu.

Sloučenina vzorce II se dá vyrobit pomocí následujícího reakčního schéma:



Sloučeninu vzorce II je možno získat vícestupňovou syntézou z literatury známé sodné soli ethylesteru kyseliny kyanobenzhroznové (Borsche a Manteuffel, Liebigs. Ann. Chem. 1934, 512, 97). Její reakcí s 2–fluorbenzylhydrazinem za zahřátí pod ochrannou atmosférou v inertním rozpouštědle, jako je dioxan, se získá ethylester kyseliny 5–amino–1–(2–fluorbenzyl)–pyrazol–3–karboxylové, který se cyklizuje reakcí s dimethylaminoakroleinem v kyselém médiu pod atmosférou ochranného plynu a za zahřátí na odpovídající derivát pyridinu. Tento derivát

pyridinu ethylester kyseliny 1–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxylové se vícenásobnou sekvencí, sestávající z převedení esteru s amoniakem na odpovídající amid, dehydratace s vodu odnímajícím činidlem, jako je anhydrid kyseliny trifluoroctové, na odpovídající nitrilový derivát, reakce nitrilového derivátu s methylátem sodným a následující reakce s chloridem amonným, převede na sloučeninu vzorce II.

Sloučeniny obecného vzorce III se mohou vyrobit z komerčně dostupných sloučenin (například u firmy Aldrich) terc–butoxy–bis(dimethylamino)methanu a 4–pyridylacetonitrilu, popřípadě 3–pyridylacetonitrilu reakcí těchto reaktantů výhodně v ekvimolárním množství a výhodně za normálního tlaku a za míchání reakčního roztoku po dobu více hodin, například dvou hodin, při zvýšené teplotě, například v rozmezí 60 až 130 °C, výhodně 80 až 120 °C, obzvláště 100 °C.

Reakce sloučenin vzorce II a sloučenin obecného vzorce III na sloučeniny obecného vzorce I se může provádět za použití reaktantů v ekvimolárních množstvích, popřípadě za použití sloučeniny obecného vzorce III v lehkém přebytku, v organickém rozpouštědle, například uhlovodíku, výhodně aromatickém uhlovodíku a obzvláště xylenu, výhodně za přítomnosti 0,1 až 1 ekvivalentu, obzvláště 0,3 ekvivalentů, Lewisovy kyseliny, jako je například BF_3Et_2O nebo trimethylsilyltrifluorsulfonát (TMSOTf), výhodně za normálního tlaku a míchání reakčního roztoku, po dobu více hodin, například 12 hodin, za zvýšené teploty, například v rozmezí 80 až 160 °C, výhodně 100 až 150 °C, obzvláště 140 °C.

Sloučeniny obecného vzorce IV jsou komerčně dostupné (například u firmy Mercachem) nebo se mohou získat způsoby pro odborníky známými.

Reakce sloučeniny vzorce II a obecného vzorce IV na sloučeniny obecného vzorce V se může provádět za použití reaktantů v ekvimolárním množství, výhodně za použití sloučeniny obecného vzorce IV v lehkém přebytku, v organickém rozpouštědle, například uhlovodíku, výhodně aromatickém uhlovodíku a obzvláště v toluenu, výhodně za normálního tlaku a míchání reakčního roztoku po dobu více hodin, například 12 hodin, za zvýšené teploty, například v rozmezí 80 až 160 °C, výhodně 100 až 150 °C, obzvláště 140 °C.

Reakce sloučenin obecného vzorce V na sloučeniny obecného vzorce VI se může provádět reakcí sloučenin obecného vzorce V s halogenačním činidlem, popřípadě v organickém rozpouštědle, používaném obvykle pro takovéto reakce, jako je například dimethylformamid (DMF), výhodně za normálního tlaku a míchání reakční směsi po dobu více hodin, například 3 hodin, za zvýšené teploty, například v rozmezí 80 až 160 °C, výhodně 100 až 120 °C. Podle předloženého vynálezu se může jako halogenační činidlo použít $POCl_3$.

Reakce sloučenin obecného vzorce VI na sloučeniny obecného vzorce I podle předloženého vynálezu se může provádět reakcí sloučenin obecného vzorce VI ve vodném roztoku amoniaku, výhodně za zvýšeného tlaku, například provedením reakce v autoklávu tak, že reakce probíhá za vlastního tlaku reakční směsi, a za míchání reakční směsi po dobu více hodin, například 12 hodin, při zvýšené teplotě, například v rozmezí 80 až 160 °C, výhodně 100 až 150 °C, obzvláště 140 °C.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I, vykazují nepředpokládatelné, cenné farmakologické spektrum účinku.

Sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I, vedou k relaxaci cév, inhibici agregace trombocytů a ke snížení krevního tlaku, jakož i ke zvýšení koronárního průtoku krve. Tyto účinky jsou zprostředkovány přes přímou stimulaci rozpustné guanylátcyklázy a intracelulární zvýšení cGMP. Kromě toho zesilují sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I účinek substancí, které zvyšují hladinu cGMP, jako jsou například EDRF (endothelium derived relaxing factor), NO–donátory, protoporfyrin IX, kyselina arachidonová nebo deriváty fenylhydrazinu.

Tyto sloučeniny se mohou tedy použít v léčivech pro ošetření kardiovaskulárních onemocnění, jako například pro ošetření vysokého krevního tlaku a srdeční insuficience, stabilní a instabilní anginy pectoris, periferních a kardiálních cévních onemocnění, arytmií, pro ošetření tromboembolických onemocnění a ischemií, jako je infarkt myokardu, mozkové mrtvice, transistorických a ischemických ataků, poruch periferního prokrvení, potlačení restenos, jako po trombolysních terapiích, percutání transluminální angioplastii (PTA), percutání transluminální koronárangioplastii (PTCA) a bypassu, jakož i pro ošetření arteriosklerózy, astmatických onemocnění a nemocí urogenitálního systému, jako je například hypertrofie prostaty, erektilní dysfunkce, ženské sexuální dysfunkce, osteoporosy, gastroparese a inkontinence.

Sloučeniny, popsané v předloženém vynálezu obecného vzorce I, představují také účinné látky pro ošetření onemocnění v centrálním nervovém systému, která se vyznačují poruchami NO/cGMP–systému. Obzvláště jsou vhodné pro zlepšení vnímání, výkonu koncentrace, výkonu učení nebo výkonu paměti po kongitivních poruchách, jaké se vyskytují obzvláště při syndromech stimulace/nemoc, jako je „Mild cognitive impairment“, stářím asociované poruchy učení a paměti, stářím asociované ztráty paměti, vaskulární demence, lebeční–mozkové trauma, případy mrtvice, demence, která nastává po případech mrtvice („post stroke dementia“), post–traumatické lebeční mozkové trauma, všeobecné poruchy koncentrace, poruchy koncentrace u dětí s problémy učení a pamatování, Alzheimerova choroba, vaskulární demence, demence s Lewyho tělísky, demence s degenerací frontálního lalohu za zahrnují Pickova syndromu, Parkinsonova choroba, progresivní nukleární ochrnutí, demence s kortikobasální degenerací, amyolaterální skleróza (ALS), Huntingtonschova choroba, skleróza multiplex, Thalmiova degenerace, Creutzfeld–Jakobova demence, HIV–demence, schizofrenie s demencí nebo Korsakoffova psychóza. Jsou vhodné také pro ošetření onemocnění centrálního nervového systému, jako jsou stavy strachu, napětí a deprese, centrálním nervovým systémem způsobených sexuálních dysfunkcí a poruch spánku, jakož i pro regulaci poruch přijímání potravy, poživatin a návykových látek.

Dále jsou účinné látky vhodné také pro regulaci cerebrálního prokrvení a představují tedy účinný prostředek pro ošetření migrén.

Také jsou vhodné pro profylaxi a ošetření následků případů mozkových infarktů (Apoplexia cerebri), cerebrálních ischemií a lebečního mozkového trauma. Rovněž se mohou sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I použít pro ošetření bolestivých stavů.

K tomu mají sloučeniny podle předloženého vynálezu antiinflamatorický účinek a mohou se tedy použít jako záněty potlačující prostředek.

Kromě toho zahrnuje předložený vynález kombinaci sloučenin podle předloženého vynálezu obecného vzorce I s organickými nitráty a NO–donátory.

Organické nitráty a NO–donátory v rámci předloženého vynálezu jsou všeobecně látky, které svůj terapeutický účinek odvozují přes uvolňování oxidu dusnatého, popřípadě NO–species. Výhodný je nitroprusid sodný, nitroglycerin, izosorbididdinitrát, izosorbididmononitrát, molsidomin a SIN–1.

Kromě toho zahrnuje předložený vynález kombinaci se sloučeninami, které inhibují odbourávání cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). To jsou obzvláště inhibitory fosfodiesteráz 1, 2 a 5 (nomenklatura podle Beava a Reifsyndera (1990) TiPS 11, str. 150 až 155). Touto inhibicí se potencuje účinek sloučenin podle předloženého vynálezu a zvyšuje se požadovaný farmakologický efekt.

Biologické zkoušky

Cévy relaxující účinek in vitro

Králíci se usmrtí ranou do týlu a odkrví se. Aorta se vyjme, zbaví se přilnuté tkáně a rozdělí se na 1,5 mm široké kroužky jednotlivě se dají při teplotě 37 °C za předpětí do 5 ml orgánové lázně s oxidem uhličitým zaplynovaným Krebs–Heseleitovým roztokem o složení (mM) : NaCl: 119; KCl: 4,8; $CaCl_2$ x 2 H_2O: 1; $MgSO_4$ x 7 H_2O: 1,4; KH_2PO_4: 1,2; $NaHCO_3$: 25; glukóza: 10. Kontrakční síla se zjišťuje pomocí Staham UC2–Zellen, zesiluje se a pomocí A/D–Wandler (DAS–1802 HC, Keithley Instruments München) se digitalizuje a paralelně se registruje na čárovém zapisovači. Pro dosažení kontrakce se do lázně přidává kumulativně ve vzestupné koncentraci fenylheparin. Po několika kontrolních cyklech se při každém dalším provedení přidává zkoumaná látka ve vzrůstající dávce a dosažená kontrakce se srovnává s výškou kontrakce, dosažené při posledním provedení. Z toho se vypočte koncentrace, která je zapotřebí k tomu, aby se kontrakce, dosažená v předchozí kontrole, redukovala na 50 % (IC_{50}). Standardní aplikační objem činí 5 µl, podíl DMSO v roztoku lázně odpovídá 0,1 %.

Výsledky jsou uvedené v následující tabulce 1.

Tabulka 1

Cévy relaxující účinek in vitro

Příklad č.	IC_{50} [µM]
1	0,66
4	1,21

Stanovení clearance jater in vitro

Krysy se anestetizují, heparinizují a játra se perfundují in situ přes pfortader. Ex vivo se potom z jater získají pomocí roztoku kolagenázy primární krysí hepatocyty. 2.10^6 hepatocytů pro ml se stejnou koncentrací zkoušené sloučeniny se inkubuje při teplotě 37 °C. Úbytek zkoušeného substrátu během doby se zjišťuje bioanalyticky (HPLC/UV, HPLC/fluorescenčně nebo LC/MSMS) ve vždy 5 časových úsecích 0 až 15 minut po startu inkubace. Z toho se vypočte přes počet buněk a hmotnost jater clearance.

Stanovení clearance plazmy in vivo

Zkoušená substance se aplikuje krysám přes ocasí cévu intravenózně jako roztok. Ve stanoveném časovém okamžiku se krysám odebere krev, tato se heparinizuje a pomocí obvyklé metody sez ní získá plazma. Substance se v plazmě bioanalyticky kvantifikuje. Ze zjištěného průběhu koncentrace plazmy–čas se pomocí obvyklých zde používaných nekompartimentálních metod vypočtou farmakokinetické parametry.

Předmětem předloženého vynálezu jsou dále farmaceutické prostředky, které vedle netoxických, inertních, farmaceuticky vhodných nosných látek, obsahují sloučeniny obecného vzorce I podle předloženého vynálezu, jakož i způsob výroby těchto přípravků.

Účinné látky se mohou popřípadě vyskytovat v jedné nebo více výše uvedených nosných látek také v mikroekapsulované formě.

Terapeuticky účinné sloučeniny obecného vzorce I, by se měly ve výše uvedených farmaceutických prostředcích vyskytovat v koncentraci asi 0,1 až 99,5 % hmotnostních, výhodně asi 0,5 až 95 % hmotnostních, vztaženo na celkovou směs.

Výše uvedené farmaceuticky prostředky mohou kromě sloučenin podle předloženého vynálezu obecného vzorce I obsahovat také další farmaceuticky účinné látky.

Všeobecně se ukázalo jak v humánní, tak také ve veterinární medicíně jako výhodné, aplikovat pro dosažení požadovaných výsledků účinnou látku nebo účinné látky podle předloženého vynálezu v celkovém množství asi 0,1 až asi 700 mg/kg tělesné hmotnosti za 24 hodin, výhodně 0,01 až 100 mg/kg tělesné hmotnosti, popřípadě ve formě více jednotlivých dávek. Jednotlivá dávka obsahuje účinnou látku nebo účinné látky podle předloženého vynálezu výhodně v množství asi 0,1 až asi 80 mg/kg tělesné hmotnosti, obzvláště 0,1 až 30 mg/kg tělesné hmotnosti.

Předložený vynález je v následujícím blíže objasněn pomocí nijak neomezujících výhodných příkladů provedení. Pokud není uvedeno jinak, týkají se všechny údaje o množství hmotnostních procent.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech provedení se používají tyto zkratky:

RT	= teplota místnosti
EE	= ethylester kyseliny octové
MCPBA	= kyselina m–chlorperoxybenzoová
BABA	= n–butylacetát/n–butanol/ledová kyselina octová/fosfátový pufr pH 6 (50:9:25:15; org. fáze)
DMF	= N,N–dimethylformamid

Pohyblivé fáze pro chromatografii na tenké vrstvě:

T1 E1 : toluen – ethylacetát (1 : 1)
T1 EtOH1 : toluen – ethylalkohol (1 : 1)
C1 E1 : cyklohexan – ethylacetát (1 : 1)
C1 E2 : cyklohexan – ethylacetát (1 : 2).

Metody pro zjištění HPLC–retenčních časů, popřípadě preparativní dělicí metody

Metoda A = LC–MS

Eluent: A = acetonitril + 0,1 % kyseliny mravenčí
B = voda + 0,1 % kyseliny mravenčí
tok: 25 ml/min
teplota: 40 °C
těsnicí materiál: Symetry C 18, 50x2,1 mm, 3,5 µm.

Doba (min)	A	B
0	10	90
4,0	90	10
6,0	90	10
6,1	10	90
7,5	10	90

Metoda B = preparativní HPLC

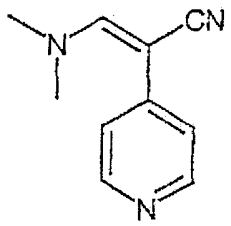
Eluent: A = milli–Q–voda + 0,6 g koncentrované kyseliny chlorovodíkové na 1 l H_2O
B = acetonitril

tok: 50 ml/min
teplota: teplota místnosti
těsnicí materiál: YMC–Gel ODS–AQS 11 μm 250x30 mm

Doba (min)	A	B
0	90	10
3	90	10
27	2	98
34	2	98
34,01	90	10
38	90	10

Výchozí sloučeniny

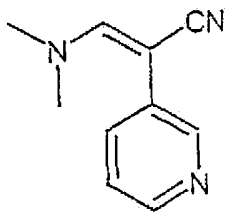
I. Syntéza 4–[(dimethylamino)methylen]–pyridinacetonitrilu (E/Z–směs)



4–pyridylacetonitril 7,52 g (63,7 mmol) a terc–butoxy–bis(dimethylamino)methan 11,09 g (63,7 mmol) se míchá při teplotě 100 °C po dobu 2 hodin. Při tom se uvolněný dimethylamin a terc–butanol odvádí pomocí vakuového čerpadla za lehkého podtlaku do atmosféry. Pomocí mžikové chromatografie (dichlormethan/ethylacetát 50 : 1 → 20 : 1) se získá v názvu uvedená sloučenina.

Výtěžek: 10,2 g (93 %)
R_f–hodnota: 0,29 (CH_2Cl_2/EE 20/1)
^{1}H–NMR: (300 MHz, D_6–DMSO), δ = 3,25 (s, 6H, 2 x CH_3), 7,25 (d, 2H, Ar–H), 7,80 (s, 1H, Ar–H), 8,33 (d, 2H, Ar–H).
MS: (ESI pos.), m/z = 174 ($[M+H]^+$)

II. Syntéza 3–[(dimethylamino)methylen]–pyridylacetonitrilu (E/Z–směs)



3–pyridylacetonitril 3,00 g (25,4 mmol) a terc–butoxy–bis(dimethylamino)methan 4,23 g (25,4 mmol) se míchá při teplotě 100 °C po dobu 2 hodin. Při tom se uvolněný dimethylamin a terc–butanol odvádí pomocí vakuového čerpadla za lehkého podtlaku do atmosféry. Po ochlazení se filtruje od vysrážené pevné látky, promyje se malým množstvím vody a získá se takto v názvu uvedená sloučenina.

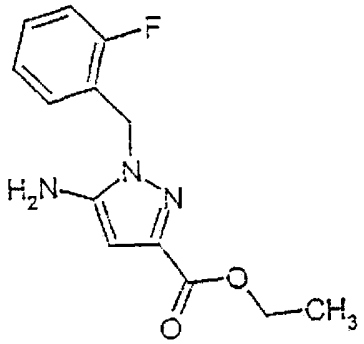
Výtěžek: 4,23 g (96 %) R_f–hodnota: 0,27 (CH_2Cl_2/MeOH 40/1)
^{1}H–NMR: (300 MHz, D_6–DMSO), δ = 3,08 (s, 3H, CH_3), 3,25 (s, 3H, CH_3), 7,29 (dd, 1H, Ar–H), 7,57 (s, 1H, =C–H), 7,66 (dt, 1H, Ar–H), 8,26 (d, 1H, Ar–H), 8,54 (d, 1H, Ar–H).

LCMS: Retenční doba: 0,33 min (sloupec: Symetry, C–18, 3,5 μm, 50x2,1 mm, tok: 0,5 ml/min, 40 °C, gradient: voda (+0,1 % kyseliny mravenčí): acetonitril (+ 0,1 % kyseliny mravenčí při 0 min: 90:10, při 7,5 min 10 : 90;

MS: (ESI pos.), m/z = 174 ([M+H$^+$]).

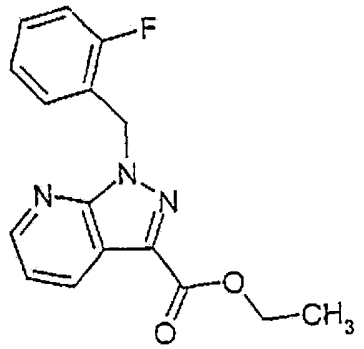
III. Syntéza 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxamidinu

IIIA) Ethylester kyseliny 5–amino–1–(2–fluorbenzyl)–pyrazol–3–karboxylové



100 g (0,613 mol) sodné soli ethylesteru kyseliny kyanopyrohroznové (příprava podle Borsche a Manteuffela Liebigs Ann. 1934, 512, 97) se smísí za dobrého míchání pod argonovou atmosférou ve 2,5 l dioxanu při teplotě místnosti se 111,75 g (75 ml, 0,98 mol) kyseliny trifluoroctové a reakční směs se míchá po dobu 10 minut, přičemž větší část eduktů přejde do roztoku. Potom se přidá 85,93 g (0,613 mol) 2–fluorbenzylhydrazinu a reakční směs se vaří přes noc. Po ochlazení se vysrážené krystaly natriumfluoracetátu odsají, promyjí se dioxanem a surový roztok se nechá dále reagovat.

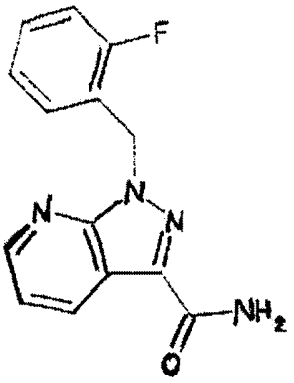
IIIB) Ethylester kyseliny 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxylové



Roztok, získaný ve stupni IIIA), se smísí se 61,25 ml (60,77 g, 0,613 mol) dimethylaminoakroleinu a 56,28 ml (83,8 g, 0,736 mol) kyseliny trifluoroctové a pod argonovou atmosférou se vaří po dobu 3 dnů. Potom se rozpouštědlo ve vakuu odpaří, získaný zbytek se dá do 2 l vody a třikrát se extrahuje vždy 1 l ethylesteru kyseliny octové. Organické fáze se spojí, vysuší se pomocí bezvodého síranu hořečnatého a odpaří se na rotační odparce. Získaný zbytek se chromatografuje na 2,5 kg silikagelu a eluuje se gradientem toluen/toluen–ethylacetát = 4:1.

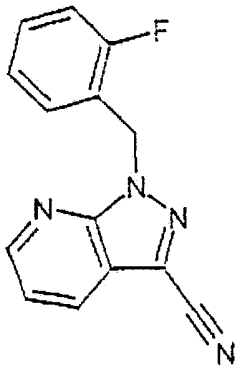
Výtěžek: 91,6 g (49,9 % teorie přes dva stupně)
T.t.: 85 °C
R_f (SiO_2, T1E1): 0,83.

IIIC) 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxamid



10,18 g (34 mmol) esteru, získaného ve stupni IIIB), se předloží do 150 ml methylalkoholu, nasyceného při teplotě 0 až 10 °C amoniakem, načež se reakční směs míchá po dobu dvou dnů při teplotě místnosti a potom se ve vakuu zahustí. R_f (SiO, T1E1): 0,33

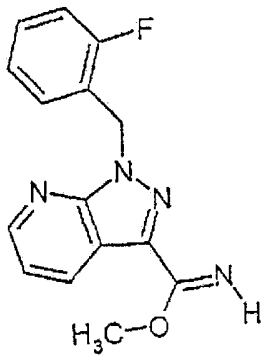
IIID) 3–kyano–1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin



36,1 g (133 mmol) 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxamidu ze stupně IIIC) se rozpustí ve 330 ml tetrahydrofuranu a smísí se s 27 g (341 mmol) pyridinu. Potom se přidá v průběhu 10 minut 47,76 ml (71,66 g, 341 mmol) anhydridu kyseliny trifluoroctové, přičemž teplota stoupne na 40 °C. Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, načež se vsázka dá do 1 l vody a třikrát se extrahuje vždy 0,5 l ethylesteru kyseliny octové. Organická fáze se promyje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a 1 N kyselinou chlorovodíkovou, vysuší se pomocí bezvodého síranu hořečnatého a odpaří se na rotační odparce.

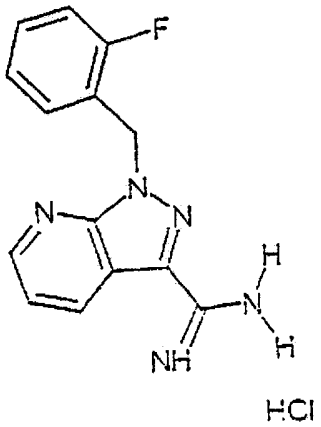
Výtěžek: 33,7 g (100 %)
T.t.: 81 °C
R_f (SiO_2, T1E1): 0,74

IIIE) Methylester kyseliny (2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboximidové



V 1,5 l methylalkoholu se rozpustí 30,37 g (562 mmol) methylátu sodného a přidá se 36,45 g (144,5 mmol) 3–kyano–1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridinu (ze stupně IIID), načež se reakční směs míchá po dobu 2 hodin při teplotě místnosti a získaný roztok se přímo použije v následujícím stupni.

IIIF) 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxamidin

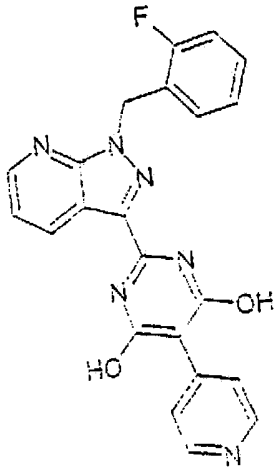


Roztok methylesteru kyseliny (2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboxamidové v methylalkoholu, získaný ve stupni IIIE), se smísí se 33,76 g (32,19 ml, 562 mmol) ledové kyseliny octové a 9,28 g (173 mmol) chloridu amonného a reakční směs se míchá pře noc za varu pod zpětným chladičem. Rozpouštědlo se potom ve vakuu odpaří, získaný zbytek se potom dobře rozetře s acetonem a vysrážená pevná látka se odsaje.

^{1}H–NMR: (d_6–DMSO, 200 MHz): δ = 5,93 (s, 2H), 7,1 – 7,5 (m, 4H), 7,55 (dd, 1H), 8,12 (dd, 1H), 8,30 (dd, 1H), 9,5 (bs, 4H–vyměnitelný) ppm.

MS (EI): m/z = 270,2 (M–HCl)

IV. Syntéza 2–[1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4,6–pyrimidindiolu

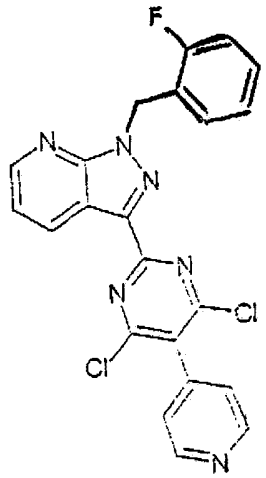


3,27 g (12,1 mmol) 1–(2–fluorobenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboximidamidu z příkladu III se suspenduje ve 40 ml toluenu, smísí se se 2,88 g (12,1 mmol) diethyl–2–(4–pyridinyl)malonátu (komerčně dostupný u firmy Mercachem) a reakční směs se míchá přes noc při teplotě 140 °C. Pro zpracování se odsaje vysrážená pevná látka a za vysokého vakua se usuší.

Výtěžek: 2,43 g (43 %)

LC–MS: R_t = 2,69 min (metoda A).
MS (ESI pos.), m/z = 415 ($[M+H]^+$).

V. Syntéza 3–[4,6–dichlor–5–(4–pyridinyl)–2–pyrimidinyl]–1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo–[3,4–b]pyridinu

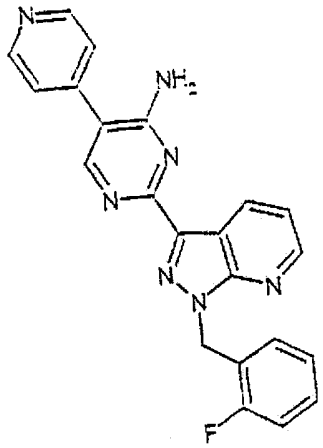


2,39 g (5,77 mmol) 2–[1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4,6–pyrimidindiolu z příkladu IV se rozpustí v 10 ml fosforylchloridu, přidají se 3 kapky dimethylformamidu a reakční směs se míchá po dobu 3 hodin za varu pod zpětným chladičem. Pro zpracování se reakční roztok zahustí a za vysokého vakua se usuší.

Výtěžek: 0,67 g (24 %) LC–MS: R_t = 4,34 min (metoda A).
MS (ESI pos.), m/z = 451 ($[M+H]^+$, Cl_4).

Příklad 1

2–[1–[(2–fluorfenyl)methyl]–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4–pyrimidinamin



0,50 g (1,9 mmol) 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboximidamidu z příkladu III a 0,32 g (1,9 mmol) [(dimethylamino)methylen]–pyridinacetonitrilu z příkladu I se suspenduje v xylenu a smísí se s BF_3*OEt_2 (71 µl, 79 mg, 0,56 mmol, 0,3 ekvivalentu). Po 19 hodinách při teplotě 140 °C se nechá reakční směs ochladit na teplotu místnosti a ve vakuu se zahustí. V názvu uvedená sloučenina se může čistit pomocí mžikové chromatografie na silikagelu (dichlormethan/methylalkohol 20:1) a následujícím rozmícháním v acetonitrilu.

Výtěžek: 0,24 g (33 %) R_f–hodnota: 0,17 (EE/MeOH 20:1)
T.t.: 254 °C

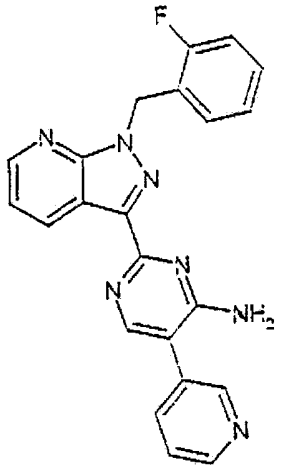
Retenční doba: 2,7 min (sloupec: Symetry, C–18, 3,5 µm, 50x2,1 mm, tok: 0,5 ml/min, 40 °C, gradient: voda (+0,1 % kyseliny mravenčí): acetonitril (+ 0,1 % kyseliny mravenčí při 0 min: 90:10, při 7,5 min 10 : 90;

^{1}H–NMR: (300 MHz, D_6–DMSO), δ = 5,81 (s, 2H, CH_2), 7,0 – 7,6 (m, 9H, Ar–H, NH_2), 8,64 (m_c, 3H, Ar–H), 9,05 (d, 1H, Ar–H).

MS: (ESI pos.), m/z = 309 ($[M+H]^+$),
(ESI neg.), m/z = 396 ($[M+H]^+$)

Příklad 2

2–[1–[(2–fluorfenyl)methyl]–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4–pyrimidinamin



4,00 g (14,9 mmol) 1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–karboximidamidu z příkladu III a, 57 g (14,9 mmol) 3–[(dimethylamino)methylen]–pyridinacetonitrilu z příkladu II se suspenduje v xylenu a po 12 hodinách při teplotě 120 °C se nechá směs ochladit na teplotu místnosti a odfiltruje se vytvořená sraženina. Matečný roztok se čistí pomocí preparativní HPLC (sloupec: Cromsil 120 ODS, C–18, 10 µm, 250x30 mm, tok 50 ml/min, teplota místnosti, gradient: voda/acetonitril při 0 min: 90:10, při 28 min: 5:95). Proces čištění se musí opakovat.

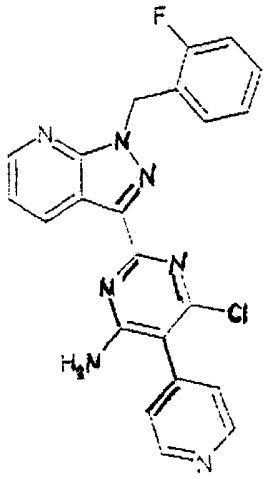
Výtěžek: 0,024 g (0,4 %)
R_f–hodnota: 0,17 (EE/MeOH 20:1)
^{1}H–NMR: (200 MHz, D_6–DMSO), δ = 5,81 (s, 2H, OCH_2), 6,95 – 7,6 (m, 8H, Ar–H, NH_2), 7,92 (dt, 1H, Ar–H), 8,21 (s, 1H, Ar–H), 8,6 – 8,75 (m, 2H, Ar–H), 9,03 (dd, 1H, Ar–H).

LCMS: Retenční doba: 2,66 min (sloupec: Symetry, C–18, 3,5 µm, 50x2,1 mm, tok: 0,5 ml/min, 40 °C, gradient: voda (+ 0,1 % kyseliny mravenčí): acetonitril (+ 0,1 % kyseliny mravenčí při 0 min: 90:10, při 7,5 min 10 : 90;

MS: (ESI pos.), m/z = 398 ($[M+H]^+$), (ESI neg.), m/z = 396 ($[M–H]^+$).

Příklad 3

6–chlor–2–[1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4–pyrimidinylamin



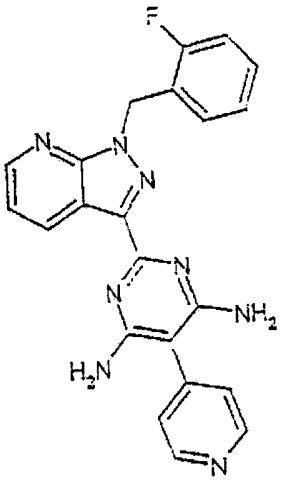
200 mg (0,443 mmol) 3–[4,6–dichlor–5–(4–pyridinyl)–2–pyrimidinyl]–1–(2–fluorobenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridinu z příkladu V se suspenduje v 5 ml 25% vodného roztoku amoniaku a míchá se přes noc v autoklávu při teplotě 140 °C za vlastního tlaku. Reakční směs se třikrát extrahuje dichlormethanem, extrakty se spojí, vysuší se pomocí bezvodého síranu hořečnatého a zahustí se do sucha, načež se získaný zbytek chromatografuje na silikagelu pomocí směsi dichlormethanu a methylalkoholu 30:1. Pro další zpracování se surový produkt čistí pomocí preparativní HPLC (metoda B).

Výtěžek: 34 mg (15 %) R_f–hodnota: 0,45 (CH_2Cl_2/MeOH 20:1)
^{1}H–NMR: (300 MHz, D_6–DMSO), δ = 5,85 (s, 2H, CH_2), 7,10 – 7,48 (m, 9H, 7Ar–H a NH_2), 8,61 – 8,75 (m, 3H, Ar–H), 8,99 (dd, 1H, Ar–H).

LC–MS: R_t = 3,55 min (metoda A(.
MS (ESI pos.) m/z = 432,3 ($[M+H]^+$),
885,2 ($[2M+Na]^+$).

Příklad 4

2–[1–(2–fluorbenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridin–3–yl]–5–(4–pyridinyl)–4,6–pyrimidindiamin



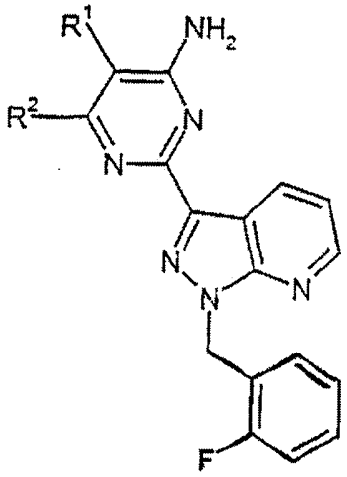
200 mg (0,443 mmol) 3–[4,6–dichlor–5–(4–pyridinyl)–2–pyrimidinyl]–1–(2–fluorobenzyl)–1H–pyrazolo[3,4–b]pyridinu z příkladu V se suspenduje v 5 ml 25% vodného roztoku amoniaku a míchá se přes noc v autoklávu při teplotě 140 °C za vlastního tlaku. Reakční směs se třikrát extrahuje dichlormethanem, extrakty se spojí, vysuší se pomocí bezvodého síranu hořečnatého a zahustí se do sucha, načež se získaný zbytek chromatografuje na silikagelu pomocí směsi dichlormethanu a methylalkoholu 30:1. Pro další zpracování se surový produkt čistí pomocí preparativní HPLC (metoda B).

Výtěžek: 45 mg (20 %) R_f–hodnota: 0,30 (CH_2Cl_2/MeOH 20:1)
^{1}H–NMR: (300 MHz, D_6–DMSO), δ = 5,82 (s, 2H, CH_2), 6,02 (br.s, 4H, NH_2), 7,08 – 7,48 (m, 7H, Ar–H), 8,57 – 8,68 (m, 3H, Ar–H), 9,13 (dd, 1H, Ar–H).

LC–MS: R_t = 2,55 min (metoda A).
MS (ESI pos.) m/z = 413,3 ($[M+H]^+$),
847,8 ($[2M+Na]^+$).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Pyridin–substituované deriváty pyrazolpyridinu obecného vzorce I



(I),

ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom, aminoskupinu nebo atom halogenu,

jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

2. Pyridin–substituované deriváty pyrazolpyridinu podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom, aminoskupinu nebo atom chloru,

jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

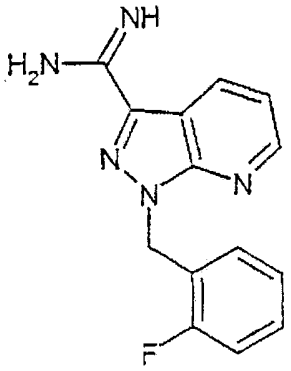
3. Pyridin–substituované deriváty pyrazolpyridinu podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém

R^1 značí 4–pyridinylovou skupinu nebo 3–pyridinylovou skupinu a

R^2 značí vodíkový atom,

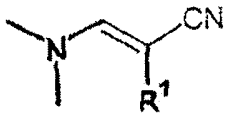
jakož i jejich soli, izomery a hydráty.

4. Způsob výroby pyridin–substituovaných derivátů pyrazolpyridinu obecného vzorce I podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se nechá reagovat sloučenina vzorce II



(II),

A) se sloučeninou obecného vzorce III



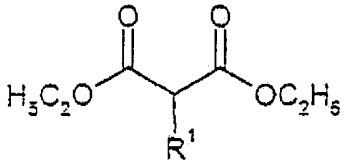
(III),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

popřípadě v organickém rozpouštědle za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C na sloučeninu obecného vzorce I,

nebo

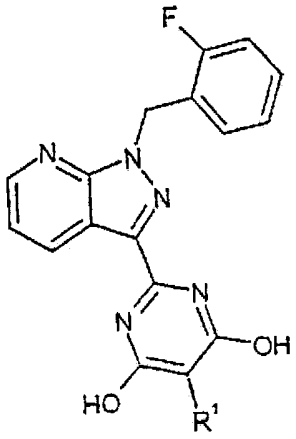
B) se sloučeninou obecného vzorce IV



(IV),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

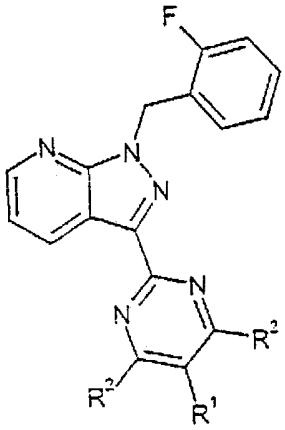
v organickém rozpouštědle za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C na sloučeninu obecného vzorce V



(V),

přičemž R^1 má výše uvedený význam,

a potom s halogenačním činidlem na sloučeninu obecného vzorce VI



(VI),

přičemž R^1 má výše uvedený význam, a

R^2 značí atom halogenu,

a nakonec s vodným roztokem amoniaku za zahřátí na teplotu 80 až 160 °C, popřípadě za zvýšeného tlaku průběhem reakce v autoklávu.

5. Sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 pro ošetření nemocí.

6. Léčivo, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I podle nároku 1.

7. Způsob výroby léčiv, **vyznačující se tím**, že se sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 převede, popřípadě s obvyklými pomocnými látkami a přísadami na vhodnou aplikační formu.

8. Léčivo, **vyznačující se tím**, že obsahuje sloučeninu obecného vzorce I podle nároku 1 v kombinaci s organickými nitráty nebo NO–donátory.

9. Léčivo, **vyznačující se tím**, že obsahuje sloučeninu obecného vzorce I podle nároku 1 v kombinaci se sloučeninami, které inhibují odbourávání cyklických guanosinmonofosfátů cGMP.

10. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření onemocnění srdečního oběhového systému.

11. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření hypertonie.

12. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření tromboembolických onemocnění a ischemií.

13. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření sexuálních dysfunkcí.

14. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv s protizánětlivými vlastnostmi.

15. Použití sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu léčiv pro ošetření onemocnění centrálního nervového systému.

16. Použití podle některého z nároků 8 až 13, přičemž se sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 použije v kombinaci s organickými nitráty nebo NO–donátory nebo v kombinaci se sloučeninami, které inhibují odbourávání cyklických guanosinmonofosfátů cGMP.

Konec dokumentu