

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-324

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.05.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **23.11.2016**
(Věstník č. 47/2016)

(71) Přihlašovatel:
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Praha 6 - Lysolaje, CZ

(72) Původce:
Libor Havlíček, Praha 4, CZ
Antonín Štunc, Praha 4, CZ
Vladimír Kryštof, Olomouc, CZ
Radek Jorda, Olomouc, CZ
Tomáš Pospíšil, Olomouc, CZ
Stefan Zahler, 82216 Maisach, DE
Angelika Vollmar, 82049 Pullach, DE
Miroslav Strnad, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:
INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název přihlášky vynálezu:
5-Substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo [4,3-d]pyrimidiny, jejich použití jako léčiva, a farmaceutické přípravky

(57) Anotace:
5-Substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny jsou silnými inhibitory proteinkináz, a to zejména cyklin-dependentních kináz CDK2 a CDK5, a vykazují antileukemické, proapoptotické, antiangiogenní i protinádorové účinky. Vynález se dále týká způsobů jejich přípravy, farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu, a to zejména onemocnění spojených s proliferací, apoptózou, angiogenezí a záněty, jako jsou leukemie a metastázující solidní nádory.

CZ 2015 - 324 A3

5-Substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny, jejich použití jako léčiva, a farmaceutické přípravky

Oblast techniky

Tento vynález se týká 5-substitutovaných 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidinů, způsobů jejich přípravy, farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu leukemií a metastazujících solidních nádorů.

Dosavadní stav techniky

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou enzymy, které fosforylují serinová a threoninová residua v proteinech, a jsou považovány za hlavní regulatory buněčného cyklu (CDK1, 2, 4, 6) a transkripce (CDK7, 8, 9, 11, 20). V poslední době se však objevují také důkazy o zapojení těchto enzymů do dalších procesů, jako jsou angiogeneze, senescence, exocytóza, spermatogeneze a vývoj neuronů (Malumbres M. Genome Biol 2014;15:122). Aktivita CDK je závislá na asociaci s regulačními proteiny cykliny, které jsou v buňkách syntetizovány a degradovány pouze během určitých fází buněčného cyklu. K načasování aktivity CDK během cyklu slouží také negativní prvky, jako jsou přirozené proteinové inhibitory CDK (INK4, Cip/Kip) a inhibující kinázy Wee1 a Myt1, jejichž působení revertují fosfatázy cdc25 (Pavletich NP, J Mol Biol 1999;287:821-828; Boutros and Duccomun, Cell Cycle 2008;7:401-406).

Poruchy v regulaci aktivity CDK (jejich hyperaktivita) byly identifikovány jako jedna ze základních společných vlastností nádorů, přičemž k nim může vést několik zcela odlišných molekulárních mechanismů. Mezi nejběžnější mechanismy patří inaktivující mutace (delece, bodové mutace) nebo epigenetické umlčování genů kódujících přirozené inhibitory CDK nebo zvýšená exprese genů kódujících cykliny. V některých typech nádorů prsu, močového měchýře, jícnu je pozorována zvýšená produkce cyklinu D1, zvýšená produkce cyklinu E je typická pro některé nádory tlustého střeva, plic, prsu a některé leukemie, cyklin A bývá nadměrně produkován některými karcinomy plic (Hall and Peters, Adv Cancer Res 1996;68:67-108; Leach et al, Cancer Res 1993;53:1986-1989; Dobashi et al, Am J Pathol 1998;153:963-972;

Keyomarsi et al, *Oncogene* 1995;11:941-950; Iida et al, *Blood* 1997;90:3707-3713). S menší četností jsou pozorovány také změny související přímo s CDK, a to zejména CDK4 a CDK6, které mohou být hyperaktivní v důsledku amplifikace nebo zvýšené exprese těchto genů (Nagel et al, *Leukemia* 2008;22:387-392, Faussillon et al, *Cancer Lett* 2005;221:67-75, Tang et al., *Clin Cancer Res* 2012;18:4612-4620).

Pro buněčnou transformaci normální buňky v nádorovou a pro udržování nádorového fenotypu mohou být v některých případech významné také nemitotické CDK, tedy ty kinázy, které se nepodílejí přímo na regulaci buněčného cyklu. Zvláště významným příkladem je kináza CDK9, která reguluje elongační fázi transkripce mRNA a to fosforylací C-terminální domény RNA polymerázy II. Řada nádorů a leukemií se vyznačuje vysokou závislostí na produkci antiapoptotických a prosurvival genů, jako jsou například Mcl-1 a survivin (Chen et al, *Blood* 2005, 106, 2513; McMillin et al, *Br. J. Haematol.* 2011, 152, 420). Dalším důležitým příkladem je kináza CDK5, která reguluje buněčnou migraci. Její hyperaktivace byla zjištěna v některých nádorech a zřejmě souvisí s jejich schopností metastázovat (Eggers et al, *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6140-5). CDK5 je ale také vysoce aktivní v proliferujících endotelových buňkách (*J Cell Biochem.* 2004; 91(2): 398-409), v nichž podporuje schopnost migrovat a přispívat tak k nádorové angiogenezi (Liebl et al, *J Biol Chem.* 2010; 285(46):35932-43).

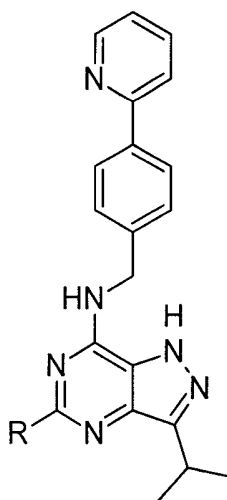
Z výše uvedených důvodů jsou považovány CDK a s nimi asociované proteiny za významné cíle pro novou generaci protinádorově aktivních sloučenin. Vývoj léčiv v této oblasti je zaměřen převážně na nízkomolekulární inhibitory. Většina známých inhibitorů CDK vykazuje schopnost inhibovat jak kinázy regulující buněčný cyklus, tedy CDK1, CDK2 a CDK4, tak i transkripční regulátory, CDK7 a CDK9, a jsou proto označovány jako panselektivní inhibitory. Mechanismus jejich účinku zahrnuje kromě zastavení buněčného dělení také indukci apoptózy, k níž jsou nejcitlivější buňky s vysokou expresí antiapoptotických proteinů s nízkou stabilitou, jako je zmiňovaný Mcl-1. Je dobře zdokumentováno, že CDK inhibitory roskovitin a flavopiridol jsou poměrně účinné proti mnohočetnému myelomu a několika dalším malignitám, které jsou závislé na kontinuální syntéze mRNA a expresi Mcl-1 (Raje et al, *Blood* 2005;106:1042-1047; Gojo et al, *Clin Cancer Res* 2002;8:3527-3538). Inhibitory transkripčních CDK ovlivňují také expresi nádorového supresoru p53. Činí tak nejspíše tlumením exprese jeho cílových genů, mezi něž patří ubiquitinligáza Mdm2, která negativně zpětnovazebně reguluje p53 (Dai and Lu, *J Biol Chem* 2004;279:44475-44482). Na základě

řady studií in vitro bylo navrženo, že pro silný protinádorový účinek je nutné inhibovat zároveň aktivitu několika CDK najednou (např. CDK1, 2 and 9) a že klinicky nejvýhodnější by měly být právě panselektivní inhibitory CDK (Cai et al, Cancer Res 2006;66:9270-9280). Dále bylo v preklinických experimentech zjištěno, že inhibice CDK5 vede k potlačení růstu nádorů pankreatu a karcinomu prsu a také ke snižování jejich metastatické progresse (Feldman et al, Cancer Res. 2010;70(11):4460-9; Feldman et al, Cancer Biol Ther. 2011;12(7):598-609; Liang et al, Sci Rep. 2013;3:2932). Na molekulární úrovni je CDK5 významná pro epiteliálně-mezenchymální přechod karcinomu prsu indukovaný TGF- β a pro jeho progresi (Liang et al, Sci Rep. 2013;3:2932). Navíc je inhibice CDK5 výhodná také pro tlumení nádorové vaskularizace, neboť blokuje migraci endotelových buněk (Liebl et al., J Biol Chem. 2010;285(46):35932-43; Liebl et al., Angiogenesis. 2011;14(3):281-91). V některých leukemických buňkách fosforyluje CDK5 antiapoptotický protein Noxa, člen rodiny Bcl-2 charakteristický přítomností domény BH3-only; inhibice CDK5 indukovala v leukemických buňkách apoptózu (Lowman et al, Mol Cell 2010;40(5):823-33).

Podstatou tohoto vynálezu jsou nové sloučeniny s vysokou aktivitou protinádorovou, antileukemickou a antiangiogenní.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou 5-substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I



I

ve kterém

R je vybráno ze skupiny zahrnující

- heterocykloalkyl, což znamená C_3 - C_{10} cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně 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;
- heterocykloalkyl alkyl znamená C_3 - C_{10} cykloalkyl skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, a která je vázána přes C_1 - C_4 alkylenový můstek, s výhodou přes C_2 - C_3 alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně 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;

- **R'-X**

kde **X** je vybráno ze skupiny-NH- a -N(C_1 - C_8 alkyl), a

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 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;
- heterocykloalkyl, což znamená C_3 - C_{10} cykloalkylovou skupinu jak je definováno výše, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkyl je popřípadě substituovaný 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;
- heterocykloalkyl alkyl, což znamená C_3 - C_{10} cykloalkylovou skupinu jak je definováno výše, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, která je vázána přes C_1 - C_4 alkylenový můstek, s výhodou přes C_2 -

C₃ alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkyl alkyl skupina je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl, a amino substituent;

- benzylová skupina, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující fluoro, chloro, hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ 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 C₂-C₁₀ lineární nebo rozvětvený alkyl vybrán ze skupiny zahrnující propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, hexyl, heptyl, oktyl, a nonyl.

Ve výhodném provedení je C₂-C₁₀ lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný 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.

Ve výhodném provedení je C₂-C₁₀ 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 C₂-C₁₀ 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 C₃-C₁₀ cykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl a cyklohexyl.

Ve výhodném provedení je C₃-C₁₀ cykloalkyl substituovaný amino skupinou vybrán ze skupiny zahrnující *trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-4-aminocyklohexyl, *cis,trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-2-aminocyklohexyl, *trans*-2-aminocyklohexyl, *cis,trans*-2-aminocyklohexyl, 3-aminocyklohexyl a *cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl.

V dalším výhodném provedení je heterocykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl.

Substituovaný benzyl je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 3,5-dimethoxybenzyl, 2,6-dimethoxybenzyl, 2,4,6-trimethoxybenzyl, 3,4,5-trimethoxybenzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl a 4-chlorbenzyl.

Ve výhodném provedení je heterocykloalkyl alkyl vybrán ze skupiny zahrnující (aziridin-1-yl)ethyl, (azetidin-1-yl)ethyl, (azolidin-1-yl)ethyl, (piperidin-1-yl)ethyl, (aziridin-1-yl)propyl, (azetidin-1-yl)propyl, (azolidin-1-yl)propyl a (piperidin-1-yl)propyl.

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-substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití jako léčiva. Týká se to zejména jejich použití pro inhibici nekontrolované proliferace buněk a/nebo indukci apoptózy.

V jednom provedení 5-substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití při potlačování nádorové angiogeneze.

V dalším provedení 5-substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití pro léčbu

nádorových onemocnění. Tyto sloučeniny zejména vykazují kombinovanou antiproliferativní, antiangiogenní, protizánětlivou a proapoptotickou aktivitu. Sloučeniny s obecným vzorcem **I** jsou vhodné zejména pro použití pro léčbu lidských a zvířecích leukemií, metastatických (solidních) nádorů.

V ještě dalším provedení 5-substitutovaných 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** jsou vhodné pro použití inhibici kinázy CDK5, která je jedním z klíčových regulátorů migrace endotelových buněk, a to skrze buněčnou adhezi, aktivitu mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu a tvorbu lamelipodií, která je pro migraci nezbytná.

Proto jsou 5-substituované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** užitečné pro inhibici migrace savčích endotelových buněk a zejména pro inhibici a/nebo léčbu nádorové vaskularizace. Jsou vhodné nejen pro léčbu a/nebo inhibici vaskularizace nádorů, během embryonálního vývoje, menstruačního cyklu a hojení ran.

Dalším předmětem vynálezu je metoda léčby onemocnění spojených s aberantní buněčnou proliferací nebo apoptózou nebo migrací endotelových buněk, jako je rakovina (např. leukemie, solidní nádory, metastazující nádory), vaskularizace během rakoviny, embryonálního vývoje, menstruačního cyklu a hojení ran u savců vyžadujících takovouto léčbu podáváním terapeuticky účinných dávek alespoň jedné ze sloučenin s obecným vzorcem **I**.

Vynález také zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující 5-substituované-7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-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: N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazinyl, (R)-(2-hydroxymethylpyrrolidine-1-yl), ethylamino, propylamino, butylamino, (2-hydroxyethyl)amino, (3-hydroxypropyl)amino, 2(R)-

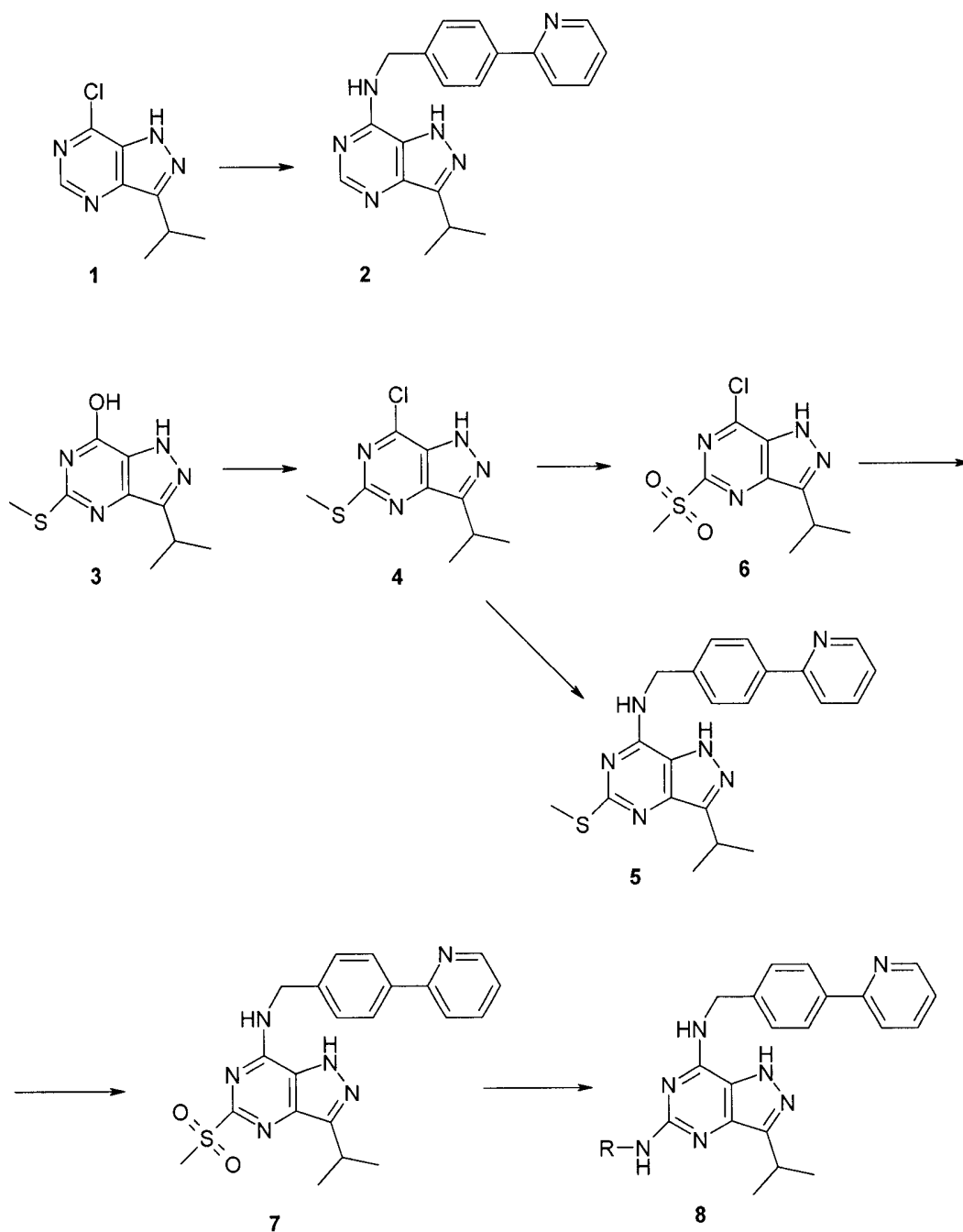
hydroxypropyl]amino, 2(S)-hydroxypropyl]amino, 4-hydroxybut-2(R)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(S)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(R,S)-yl]amino, 2-(hydroxy-2-methyl)propyl]amino, (2,3-dihydroxypropyl)amino, (1-hydroxy-3-methylbutyl)amino, [(R,S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(R)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, (R)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (S)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (2-aminoethyl)amino, (3-aminopropyl)amino, (4-aminobutyl)amino, (5-aminopentyl)amino, (6-aminoethyl)amino, [3-amino-2-hydroxypropyl]amino, [1-(dimethylamino)methyl]amino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino, [4-(dimethylamino)butyl]amino, [2-(diethylamino)ethyl]amino, [3-(diethylamino)propyl]amino, (aziridin-1-yl)ethylamino, (azolidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)ethylamino, (piperidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)propylamino, cyklopropylamino, cyklobutylamino, cyklopentylamino, cyklohexylamino, (*cis*-2-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (2-methoxybenzyl)amino, (3-methoxybenzyl)amino, (4-methoxybenzyl)amino, (3,5-dimethoxybenzyl)amino, (2,6-dimethoxybenzyl)amino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (2,4,6-trimethoxybenzyl)amino, (2-fluorbenzyl)amino, (3-fluorbenzyl)amino, (4-fluorbenzyl)amino, (2-chlorbenzyl)amino, (3-chlorbenzyl)amino, (4-chlorbenzyl)amino, (2,4-dichlorbenzyl)amino, (3,4,5-trichlorbenzyl)amino.

Způsoby přípravy sloučenin obecného vzorce I

Pyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle tohoto vynálezu, které mají různé substituenty v pozici 5 heterocyklu, mohou být připraveny za použití intermediátů podle postupu zobrazeného ve Schématu 1. Tento postup zahrnuje kroky oxidace methylsulfanyl skupiny na methylsulfonyl a následnou nukleofilní substituci atomu chloru v pozici 7 heterocyklu. Tato nukleofilní substituce v pozici 7 může probíhat za mírných podmínek s vysokým výtěžkem. Tento poslední reakční krok, kterým je nukleofilní substituce v pozici 5 (konverze sloučeniny **7** ve finální sloučeninu **8**), vyžaduje mnohem tvrdší podmínky (150 až

160 °C/ 1 až 20 h). Výsledná sloučenina je izolována pomocí kolonové chromatografie.

Schéma 1.



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, intrathekální 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, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulose, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8-22, s výhodou pak 12-22 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 přísadkou 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 polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké 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, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoscé, 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, sesamový 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 přidavkem dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktosa, sacharosa, mannitol nebo sorbitol, celulosové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosy 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 hořečnatý 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 celulosových preparátů jako acetylcelulosafталát nebo hydroxypropylmethylcelulosafталát. 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 stearat hořečnatý, 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 karboxymethylcelulosy, 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. Rostoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla 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 fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelina, parafínový olej nebo tvrdé parafíny, 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, vazelinu nebo parafinový 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 staryl 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 parafinový 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 estery 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, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen

glykolů, 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.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1 ukazuje účinek některých nových sloučenin na buněčný cyklus nádorové buněčné linie MCF7.

Obrázek 2 ukazuje účinek některých nových sloučenin na aktivitu kaspáz 3 a 7 v nádorové buněčné linii K562. Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena v lyzátech buněk ovlivněných některými novými sloučeninami v jedné dávce po dobu 24 hodin (A) a různými dávkami sloučeniny 33 (B).

Obrázek 3 ukazuje účinek sloučeniny 45 na apoptózu v nádorové buněčné linii HCT116. Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena v lyzátech buněk ovlivněných různými dávkami sloučeniny 45.

Obrázek 4 ukazuje změny proteinů zapojených do regulace apoptózy v nádorové buněčné linii HCT116 ovlivněné sloučeninou 45 po dobu 24 hodin.

Příklady provedení vynálezu

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

Body tání byly stanoveny na Kofflerově bloku a nebyly korigovány. Všechny reagenty byly ze standardních komerčních zdrojů a analytické čistoty. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na hliníkových destičkách se silikagelem F₂₅₄ od fy Merck. 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 Bruker Avance AV 300 při teplotě 300 K a frekvenci 300,13 MHz (¹H), respektive 75,48 MHz (¹³C). Merck silikagel Kieselgel 60 (zrnitost 230-400) byl použit na sloupcovou chromatografii. Všechny sloučeniny vykázaly uspokojivé elementární analýzy (± 0,4 %).

Příklad 1

3-Isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (2).

Roztok 7-chlor-3-isopropyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (**1**) (0,248 g, 1,17 mmol), 1-[4-(pyridin-2-yl)fenyl]methanaminu (0,31 g, 1,58 mmol) a ethyldiisopropylaminu (0,4 mL, 2,3 mmol) v CHCl₃ / *t*-BuOH (6 mL / 1 mL) byl zahříván po dobu 1 hodiny při 60 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs zakoncentrována pod vakuem a obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přechištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 1%, 2%, a 4% MeOH v CHCl₃. Byla získána amorfni bezbarvá látka. Výtěžek 81 % (0.442 g).

ESI+ *m/z* 345.1 [M+H]⁺, ESI- *m/z* 343.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.33 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.29 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.78 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.27-7.29 (m, 1H, ArH); 7.46 (d, *J* = 7.03 Hz, 2H, ArH); 7.80-7.83 (m, 1H); 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, -NH-); 8.03 (d, *J* = 7.03 Hz, 2H, ArH); 8.21 (bs, 1H, ArH); 8.60 (d, *J* = 4.28 Hz, 1H, ArH); 12.26 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 22.2, 26.8, 43.6, 120.6, 122.4, 123.0, 126.9, 127.1, 128.5, 128.8, 137.7, 138.1, 139.4, 140.3, 149.6, 150.0, 150.7, 151.2, 156.3.

Příklad 2

3-Isopropyl-5-methylsulfanyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (5).

7-Chlor-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**4**) (0,56 g, 2,3 mmol), 1-[4-(pyridin-2-yl)fenyl]methanamin (0,48 g, 2,6 mmol) a ethyldiisopropylamin (0,86 mL, 5 mmol) ve 12 mL *t*-BuOH byly zahřívány za stálého míchání při 70 °C po dobu 2 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs zakoncentrována pod vakuem a obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Krystalizace ze směsi CHCl₃/Et₂O poskytla bezbarvý produkt o bodu tání 170-173 °C. Výtěžek 87 % (0,79 g).

ESI+ *m/z* 391.1 [M+H]⁺, ESI- *m/z* 389.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.36 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.43 (s, 3H, -CH₃); 3.31 - 3.35 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.75 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.32 (ddd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, *J* = 7.03 Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.92 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.05 (bd, *J* = 7.03 Hz, 2H, ArH); 8.63 (bd, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH).

Příklad 3

7-Chlor-3-isopropyl-5-methylsulfonyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**6**).

Roztok Oxonu^R (monopersulfát fy. Aldrich Kat.č.: 22,803-6, 36 g) ve vodě (180 mL) byl přidán po kapkách do roztoku 7-chlor-3-isopropyl-5-methylsulfanyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (**4**) (10 g, 41,3 mmol) v EtOH (180 mL) při teplotě 55 °C v průběhu jedné hodiny. Reakční směs byla poté míchána další hodinu při teplotě 60 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl EtOH odpařen a reakční koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (100 mL) a CHCl₃ (100 mL). Vodná fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 50 mL) a spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Krystalizace ze směsi EtOAc/Et₂O poskytla produkt s bodem tání 111-114 °C. Výtěžek 81 %, (9,17g).

ESI- *m/z* 273.1 [M-H]⁻. ¹H NMR (CDCl₃): 1.49 (d, *J* = 6.96 Hz, 6H, CH₃); 3.49 (s, 3H, CH₃), 3.58 (sept., *J* = 6.96 Hz, 1H, CH).

Příklad 4

3-Isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**8**).

7-Chlor-3-isopropyl-5-methylsulfonyl-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (**6**) (4,89 g, 17,8 mmol) a ethyldiisopropylamin (4 mL, 22,5 mmol) v *t*-BuOH (80 mL) byly za stálého míchání zahřáty

na teplotu 60 °C. Poté byl přidán roztok 1-[4-(pyridin-2-yl)fenyl]methanaminu (3,84 g, 20,9 mmol) v *t*-BuOH (30 mL), který byl předeřhát na 50 °C, a reakční směs byla zahřívána na 60 °C po dobu jedné hodiny. Po 10 minutách začal vykrystalovávat produkt. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl produkt odfiltrován, promyt MeOH a usušen pod vakuem. B.t. 213-216 °C, výtěžek 85 %, (6,4 g).

ESI+ m/z 423.3 $[M+H]^+$, ESI- m/z 421.3 $[M-H]^-$. 1H (500 MHz; DMSO- d_6): 1.36 (d, $J = 7.03$ Hz, 6H, $-CH-(CH_3)_2$); 2.43 (s, 3H, $-CH_3$); 3.31 - 3.35 (m, 1H, $-CH-(CH_3)_2$); 4.75 (bs, 2H, $-NH-CH_2-$); 7.32 (ddd, $J = 7.34$ Hz, $J = 4.89$ Hz, $J = 0.92$ Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, $J = 7.03$ Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt, $J = 7.64$ Hz, $J = 1.53$ Hz, 1H, ArH); 7.92 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H, ArH); 8.05 (bd, $J = 7.03$ Hz, 2H, ArH); 8.63 (bd, $J = 4.58$ Hz, 1H, ArH).

Příklad 5

3-Isopropyl-5-(*N*-morpholinyl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (9).

Směs 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (7) (0,36 g, 0,85 mmol) a morfolinu (3 mL, 27 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 8 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 4%, 5% MeOH v CHCl₃. Byla získána amorfnní bezbarvá látka. Výtěžek 41 % (0,15 g).

ESI + m/z 430.1 $[M+H]^+$, ES- m/z 428.1 $[M-H]^-$. 1H (500 MHz; DMSO- d_6): 1.32 (d, $J = 7.03$ Hz, 6H, $-CH-(CH_3)_2$); 3.18 (bs, 1H, $-CH-(CH_3)_2$); 3.58 – 3.60 (bs, 8H, 4x $-CH_2-$); 4.74 (bs, 2H, $-NH-CH_2-$); 7.31 (dd, $J = 6.72$ Hz, $J = 5.50$ Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H, ArH); 7.78 (bs, 1H, $-NH-$); 7.84 (dt, $J = 7.64$ Hz, $J = 1.53$ Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H, ArH); 8.04 (d, $J = 5.81$ Hz, 2H, ArH); 8.63 (d, $J = 3.97$ Hz, 1H, ArH); 11.84 (bs, 1H, $-NH-$).

Příklad 6

3-Isopropyl-5-(piperazin-1-yl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (13).

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-

-d]pyrimidinu (7) (0,32 g, 0,76 mmol) v piperazinu (3 mL, 27 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 6 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 4%, 5% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána amorfnní bezbarvá látka. Výtěžek 55% (0,18 g).

ESI + m/z 429.1 [M+H]⁺, ES- m/z 427.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.31 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.73 – 2.75 (m, 4H, 2x -CH₂-), 3.17 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.58 – 3.60 (m, 4H, 2x -CH₂-); 4.71 (d, *J* = 5.20 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 7.29 (ddd, *J* = 7.34 Hz, *J* = 4.89 Hz, *J* = 0.92 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt, *J* = 7.49 Hz, *J* = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H, ArH); 8.04 (d, *J* = 7.64 Hz, 2H, ArH); 8.63 (d, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH).

Příklad 7

3-Isopropyl-5-(*N*-thiomorpholinyl)-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (15).

Směs 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (7) (0,2 g, 0,47 mmol) a thiomorfolinu (3 mL, 29 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 5 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 3%, 4% MeOH in CHCl₃. Byla získána amorfnní žlutá látka. Výtěžek 24 % (0,05 g).

ESI + m/z 446.1 [M+H]⁺, ES- m/z 444.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.33 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.55 – 2.57 (m, 4H, 2x -CH₂-); 3.30 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.07 – 4.09 (m, 4H, 2x -CH₂-); 4.64 (bd, *J* = 5.20 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 7.17 -7.20 (m, 1H, ArH); 7.28 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.60 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.69 (dt, *J* = 7.95 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.79 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.60 – 8.62 (m, 1H, ArH).

Příklad 8**3-Isopropyl-5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (17).**

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (7) (0,21 g, 0,5 mmol) a 2-piperazin-1-ylethanolu (3 mL, 23 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 5 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti byla reakční směs rozpuštěna ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 3%, 4% MeOH v CHCl₃. Byl získán produkt, který byl poté rekrystalován v CHCl₃. Výtěžek 15% (0,035 g), b.t. 135-140 °C.

ESI + m/z 473.1 [M+H]⁺, ES- m/z 471.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; CDCl₃ + DMSO-*d*₆): 1.23 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.45 – 2.46 (m, 6H, 3x -CH₂-); 3.14 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.50 – 3.52 (m, 2H, -CH₂-); 3.67 (m, 4H, 2x -CH₂-); 4.60 – 4.61 (m, 2H, -NH-CH₂-); 7.05 -7.09 (m, 1H, ArH); 7.18 (bs, 1H, -NH-); 7.31 – 7.32 (m, 2H, ArH); 7.54 – 7.59 (m, 2H, ArH); 7.78 – 7.79 (m, 2H, ArH); 8.47 – 8.48 (m, 1H, ArH); 11.3 (bs, 1H, -NH-). ¹³C (125 MHz; CDCl₃ + DMSO-*d*₆): 21.6, 26.5, 44.0, 44.6, 52.9, 57.7, 59.8, 120.3, 122.2, 126.9, 128.4, 136.8, 138.3, 140.0, 149.6, 156.7, 157.9.

Příklad 9**3-Isopropyl-5-(*R*)-(2-hydroxypropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (27).**

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (7) (1,25 g, 2,96 mmol) v *R*-(-)-1-amino-2-propanolu (10 mL, 110 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 3 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 50 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 2%, 4%, 5% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 52%, (0,65 g).

ESI+ m/z 418.1 (100%) $[M+H]^+$, 209.6 (20%) $[M+2H]^{2+}$, ESI- m/z 416.1 $[M-H]^-$. 1H (500 MHz; DMSO- d_6 + $CDCl_3$): 0.99 (d, J = 6.42 Hz, 3H, -CH₃); 1.27 (d, J = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.06-3.11 (m, 2H, -CH₂-); 3.20-3.23 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.72-3.75 (m, 1H, -CH-); 4.69 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.02 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.27-7.30 (m, 1H, ArH); 7.45 (d, J = 7.34 Hz, 2H, ArH); 7.63 (bs, 1H, -NH-); 7.82 (dt, J = 7.64 Hz, J = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.88-7.89 (m, 1H, ArH); 8.01 (s, 2H, ArH); 8.60 (d, J = 3.97 Hz, 1H, ArH); 11.76 (bs, 1H, -NH-). ^{13}C (125 MHz; DMSO- d_6 + $CDCl_3$): 21.9, 22.2, 26.6, 43.4, 49.9, 66.7, 120.5, 122.8, 127.2, 128.4, 137.7, 149.8, 156.3. α_{D23} = +2.6° (MeOH, c = 0.499 g/dl)

Příklad 10

3-Isopropyl-5-(2-hydroxy-2-methylpropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (33).

Směs 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (7) (0,6 g, 1,42 mmol) a 1-amino-2-methyl-2-propanolu (1,25 g, 14 mmol) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 155 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení na teplotu místnosti byla reakční směs rozpuštěna ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 3%, 5%, 7% MeOH v CHCl₃. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 33 % (0,2 g).

ESI+ m/z 432.1 $[M+H]^+$, ES- m/z 430.1 $[M-H]^-$. 1H (500 MHz; DMSO- d_6): 1.06 (s, 6H, -C-(CH₃)₂); 1.29 (d, J = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.14 (sept., J = 7.03 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.20 (d, J = 5.81 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 4.73 (d, J = 4.89 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 6.12 (bs, 1H, -NH-CH₂-); 7.31 (dd, J = 7.03 Hz, J = 5.50 Hz, 1H, ArH); 7.48 (d, J = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.84 (dt, J = 7.64 Hz, J = 1.53 Hz, 1H, ArH); 7.91 (d, J = 7.95 Hz, 1H, ArH); 8.04 (d, J = 7.64 Hz, 2H, ArH); 8.63 (d, J = 4.28 Hz, 1H, ArH).

Příklad 11

3-Isopropyl-5-(3-amino-2-hydroxypropyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (45).

Směs 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzylamino]-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (7) (0,69 g, 1,64 mmol), 1,3-diamino-2-propanolu (10 mL, 95 mmol) a 1-

methyln-2-pyrrolidonu (2 mL) byla zahřívána v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 6 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 5%, 8%, 11%, 14% MeOH v CDCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 24% (0,17 g).

ESI+ m/z 433.1 (100%) [M+H]⁺, 217.6 (90%) [M+2H]²⁺, ESI- m/z 431.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.27 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.40 - 2.50 (m, 2H, -CH₂-); 3.10-3.20 (m, 2H, -CH₂-); 2.28-2.33 (m, 1H, -CH-); 3.45-3.49 (m, 1H, -CH-(CH₃)₂); 4.69 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.06 (app. bt, 1H, -NH-CH₂-); 7.26-7.29 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.81 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.87-7.89 (m, 2H, ArH, -NH-); 8.01 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, ArH); 8.59 – 8.60 (m, 1H). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 22.1, 22.2, 26.2, 43.1, 45.7, 46.0, 72.8, 120.6, 123.0, 126.7, 127.0, 127.8, 128.4, 137.7, 137.9, 140.9, 150.0, 156.3, 158.9.

Příklad 12

3-Isopropyl-5-[2-(dimethylamino)ethyl]amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (47).

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (7) (0,3 g, 0,71 mmol) v 2-(dimethylamino)ethylaminu (3 mL, 27 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 1 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 50 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 5%, 10%, 14% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 20% (0,06 g).

ESI+ m/z m/z 431.2 (100%) [M+H]⁺, 216.1 (30%) [M+2H]²⁺, ESI- m/z 429.2 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.31 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 2.23 (s, 6H, 2x -CH₃); 2.65 (t, *J* = 7.64 Hz, 2H, -CH₂-); 3.20 (t, *J* = 7.34, 2H, -CH₂-); 3.27 (kvint.; *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH-

(CH₃)₂); 4.61 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.97 (bs, 1H, -NH-CH-); 7.14 – 7.18 (m, 3H, ArH); 7.55 (d, $J = 8.25$ Hz, 1H, ArH); 7.66 (dd, $J = 7.64$ Hz, $J = 1.83$ Hz, 1H, ArH); 7.69 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H, ArH); 8.55 (d, $J = 3.97$ Hz, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.8; 26.4; 28.1; 44.0; 45.1; 59.1; 120.9; 122.3; 127.1; 128.0; 137.2; 138.2; 139.1; 149.4; 150.7; 157.0; 161.7.

Příklad 13

3-Isopropyl-5-(trans-2-aminocyclohexyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine (64).

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidinu (7) (1,4 g, 3,32 mmol) v 1,2-*trans*-diaminocyklohexanu (30 mL, 68 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 155 °C po dobu 20 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 4%, 8%, 11%, 14% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 13% (0,20 g).

ESI+ m/z 457.3 (100%) [M+H]⁺, 229.1 (50%) [M+2H]²⁺, ESI- m/z 455.3 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.13 – 1.20 (m, 4H, -CH₂-); 1.25 (bs, 6H, -CH-(CH₃)₂); 1.57 – 1.59 (m, 2H, -CH₂-); 1.86 (bs, 2H, -CH₂-); 2.47 (bs, 1H, -CH-); 3.15 (sept., $J = 6.42$ Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.56 (bs, 1H, -CH-); 4.57 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 7.13 (dd, $J = 7.34$ Hz, $J = 4.89$ Hz, 1H, ArH); 7.28 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H, Ar); 7.53 (d, $J = 7.95$ Hz, 1H, ArH); 7.63 (d, $J = 7.64$ Hz, 1H, ArH); 7.73 (d, $J = 7.95$ Hz, 2H, ArH); 8.58 (d, $J = 4.58$ Hz, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 18.3; 21.7; 21.8; 24.7; 25.0; 25.9; 32.5; 34.0; 43.7; 46.0; 56.3; 57.2; 57.9; 120.4; 121.9; 126.8; 127.0; 127.4; 127.7; 136.7; 137.9; 139.6; 149.3; 149.6; 151.8; 156.9; 158.0.

Příklad 14

3-Isopropyl-5-(trans-4-aminocyclohexyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (67).

3-Isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin (7) (0,3 g, 0,71 mmol) v roztaveném 1,4-*trans*-diaminocyklohexanu (5 g, 44 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 150 °C po dobu 20 hodin. Přebytek aminu byl vakuově

oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 4%, 8%, 11%, 14% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 19% (0,06 g).

ESI+ m/z 457.3 (100%) [M+H]⁺, 229.1 (50%) [M+2H]²⁺, ESI- m/z 455.3 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 1.08 – 1.18 (m, 4H, 2x -CH₂-); 1.27 (d, *J* = 7.03 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 1.71 – 1.72 (m, 2H, -CH₂-); 1.85 – 1.87 (m, 2H, -CH₂-); 2.50 – 2.52 (m, 1H, -CH-NH-); 3.11 (sept., *J* = 7.03 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.54 – 3.56 (m, 1H, -CH-NH-); 4.68 (bd, *J* = 4.58 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 5.69 (bd, *J* = 7.34 Hz, 1H, -NH-CH-); 7.26 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.79 – 7.82 (m, 2H, ArH, -NH-); 7.86 – 7.88 (m, 1H, ArH); 8.00 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.59 – 8.60 (m, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; DMSO-*d*₆): 22.1; 26.4, 31.8, 34.9, 43.2, 50.0, 50.4, 120.6, 122.9, 127.0, 128.3, 137.7, 137.8, 141.2, 150.0, 156.3, 157.8.

Příklad 15

3-Isopropyl-5-(4-methoxybenzyl)amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (73).

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (7) (0,5 g, 1,18 mmol) v 4-methoxybenzylaminu (10 mL, 58 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 155 °C po dobu 5 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 3%, 5%, 7% MeOH v CHCl₃. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 26 % (0,15 g).

ESI+ m/z 480.3 [M+H]⁺, ES- m/z 478.3 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; CDCl₃): 1.29 (d, *J* = 6.72 Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂); 3.21 (sept., *J* = 6.72 Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂); 3.67 (s, 3H, -CH₃); 4.50 (bd, *J* = 3.97 Hz, 2H, -NH-CH₂-); 4.69 (bs, 2H, -NH-CH₂-); 6.72 (d, *J* = 8.56 Hz, 2H, ArH); 7.17 – 7.22 (m, 3H, ArH, -NH-); 7.29 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 7.59 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.69 (dt, *J* = 7.64 Hz, *J* = 1.83 Hz, 1H, ArH); 7.78 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.60 – 8.61 (m, 1H, ArH). ¹³C (125 MHz; CDCl₃): 21.8, 26.1, 44.2, 45.4, 55.3, 113.8, 120.7, 122.3, 127.1,

128.1, 128.4, 128.9, 129.0, 137.4, 138.4, 149.6, 157.0, 158.7.

Příklad 16

3-Isopropyl-5-(*R*)-[1-(hydroxymethyl)propyl]amino-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin (83).

Roztok 3-isopropyl-5-methylsulfonyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidinu (7) (0,5 g, 1,19 mmol) v *R*-(-)-2-amino-1-butanolu (5 mL, 50 mmol) byl zahříván v zatavené ampuli na teplotu 154 °C po dobu 8 hodin. Přebytek aminu byl vakuově oddestilován při teplotě pod 70 °C. Obdržený koncentrát byl rozpuštěn ve směsi H₂O (20 mL) a CHCl₃ (20 mL). Vodná fáze byla vyextrahována pomocí CHCl₃ (3 x 15 mL), spojené organické fáze byly vysušeny nad síranem hořečnatým a odpařeny. Surový produkt byl přečištěn na silikagelové chromatografické koloně za použití skokového gradientu ve složení: 3%, 5%, 7% MeOH v CHCl₃ s malým přídavkem koncentrovaného vodného amoniaku. Byla získána bezbarvá amorfnní látka. Výtěžek 27 % (0,14 g).

ESI+ *m/z* 432.1 [M+H]⁺, ESI- *m/z* 430.1 [M-H]⁻. ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆): 0.81 (t, *J* = 6.72 Hz, 3H, -CH₂-CH₃); 1.39 - 1.45 (m, 7H, -CH(CH₃)₂, -CH α -CH₃); 1.55 - 1.59 (m, 1H, -CH β -CH₃); 3.43 - 3.47 (m, 1H, -CH(CH₃)₂); 3.77 - 3.80 (m, 1H, -CH-NH-); 4.49 - 4.67 (m, 4H, -CH₂-OH, -NH-CH₂-); 5.82 (d, *J* = 7.64 Hz, 1H, -NH-CH₂-); 7.29 - 7.31 (m, 1H, ArH); 7.44 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H, ArH); 7.78 (s, 1H); 7.83 (t, *J* = 8.01 Hz, 1H, ArH); 7.89 (d, *J* = 7.95 Hz, 1H, ArH); 7.99 (d, *J* = 8.25 Hz, 2H, ArH); 8.62 (bd, *J* = 4.58 Hz, 1H, ArH).

$\alpha_{D23} = +45.5^\circ$ (MeOH, *c* = 0.191 g/dl).

Tabulka 1: Látky připravené podle metod ukázaných v příkladech 1-16.

Č.	SUBSTITUENT R	CHN ANALÝZA [%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
			[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
9	N-morfolinyl	C = 64,11; H = 6,34; N = 22,83	428,2	430,2
10	N-pyrrolidinyl	C = 69,70; H = 6,59; N = 23,70	412,2	414,2
11	N-pyrazolidinyl	C = 66,64; H = 6,31; N = 27,02	413,2	415,2
12	N-imidazolidinyl	C = 66,63; H = 6,32; N = 27,03	413,2	415,1
13	N-piperazinyl	C = 67,27; H = 6,59; N = 26,15	427,2	429,2
14	N-piperidinyl	C = 70,23; H = 6,84; N = 22,93	426,3	428,2
15	N-thiomorfolinyl	C = 64,69; H = 6,11; N = 22,00	444,2	446,2
16	4-methylpiperazin-1-yl	C = 67,85; H = 6,82; N = 25,32	441,3	443,2

Č.	SUBSTITUENT <u>R</u>	CHN ANALÝZA [%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
			[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
17	4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl	C = 66,08; H = 6,83; N = 23,71	471,3	473,2
18	ethylamino	C = 68,19; H = 6,50; N = 25,30	386,2	388,2
19	propylamino	C = 68,80; H = 6,77; N = 24,41	400,2	402,2
20	butylamino	C = 69,38; H = 7,03; N = 23,60	414,2	416,2
21	pentylamino	C = 69,90; H = 7,27; N = 22,82	428,2	430,2
22	hexylamino	C = 70,41; H = 7,50; N = 22,10	442,3	444,2
23	heptylamino	C = 70,87; H = 7,71; N = 21,42	456,3	458,3
24	oktylamino	C = 71,30; H = 7,90; N = 20,79	470,3	472,3
25	(2-hydroxyethyl)amino	C = 65,49; H = 6,25; N = 24,30	402,2	404,2
26	(R/S)-(2-hydroxypropyl)amino	C = 66,17; H = 6,52; N = 23,48	416,2	418,2
27	(R)-(2-hydroxypropyl)amino	C = 66,18; H = 6,52; N = 23,48	416,2	418,2
28	(S)-(2-hydroxypropyl)amino	C = 66,17; H = 6,53; N = 23,48	416,2	418,2
29	(3-hydroxypropyl)amino	C = 66,17; H = 6,52; N = 23,47	416,2	418,2
30	(R/S)-(4-hydroxybut-2-yl)amino	C = 66,80; H = 6,77; N = 22,72	430,2	432,2
31	(R)-(4-hydroxybut-2-yl)amino	C = 66,80; H = 6,78; N = 22,72	430,2	432,2
32	(S)-(4-hydroxybut-2-yl)amino	C = 66,81; H = 6,77; N = 22,72	430,2	432,2
33	(2-hydroxy-2-methylpropyl)amino	C = 66,80; H = 6,77; N = 22,72	430,2	432,2
34	(3-hydroxy-3-methylbutyl)amino	C = 67,39; H = 7,01; N = 22,01	444,3	446,2
35	(2,3-dihydroxypropyl)amino	C = 63,72; H = 6,28; N = 22,62	432,2	434,2
36	(1-hydroxy-3-methylbut-2-yl)amino	C = 67,39; H = 7,01; N = 22,01	444,3	446,2
37	(R/S)-(2-hydroxypent-3-yl)amino	C = 67,39; H = 7,01; N = 22,01	444,2	446,2
38	(R)-(2-hydroxypent-3-yl)amino	C = 67,39; H = 7,02; N = 22,01	444,2	446,2
39	(S)-(2-hydroxypent-3-yl)amino	C = 67,39; H = 7,01; N = 22,02	444,2	446,2
40	(2-aminoethyl)amino	C = 65,65; H = 6,51; N = 27,84	401,2	403,2
41	(3-aminopropyl)amino	C = 66,32; H = 6,78; N = 26,90	415,2	417,2
42	(4-aminobutyl)amino	C = 66,95; H = 7,02; N = 26,03	429,3	431,2
43	(5-aminopentyl)amino	C = 67,54; H = 7,26; N = 25,20	443,3	445,2
44	(6-aminohexyl)amino	C = 68,10; H = 7,47; N = 24,43	457,3	459,3
45	(3-amino-2-hydroxypropyl)amino	C = 63,87; H = 6,53; N = 25,91	431,2	433,2
46	[1-(dimethylamino)methyl]amino	C = 66,32; H = 6,78; N = 26,90	415,2	417,2
47	[2-(dimethylamino)ethyl]amino	C = 66,95; H = 7,02; N = 26,03	429,2	431,2
48	[3-(dimethylamino)propyl]amino	C = 67,54; H = 7,26; N = 25,20	443,3	445,3
49	[4-(dimethylamino)butyl]amino	C = 68,09; H = 7,47; N = 24,43	457,3	459,3
50	[2-(diethylamino)ethyl]amino	C = 68,09; H = 7,47; N = 24,43	457,3	459,3
51	[3-(diethylamino)propyl]amino	C = 68,61; H = 7,68; N = 23,71	471,3	473,3
52	[3-(diethylamino)butyl]amino	C = 69,10; H = 7,87; N = 23,03	485,3	487,3
53	2-(aziridin-1-yl)ethylamino	C = 67,27; H = 6,59; N = 26,15	427,2	429,2
54	2-(azetidin-1-yl)ethylamino	C = 67,85; H = 6,83; N = 25,32	441,3	443,3

Č.	SUBSTITUENT <u>R</u>	CHN ANALÝZA [%]	MS (ZMD)- ANALÝZY	
			[M-H] ⁻ a)	[M+H] ⁺ b)
55	2-(azolidin-1-yl)ethylamino	C = 68,39; H = 7,06; N = 24,54	455,3	457,3
56	2-(piperidin-1-yl)ethylamino	C = 68,91; H = 7,28; N = 23,81	469,3	471,3
57	2-(aziridin-1-yl)propylamino	C = 67,85; H = 6,83; N = 25,32	441,2	443,2
58	2-(azetidin-1-yl)propylamino	C = 68,39; H = 7,06; N = 24,54	455,3	457,3
59	cyklopropylamino	C = 69,15; H = 6,31; N = 24,54	398,2	400,2
60	cyklobutylamino	C = 69,71; H = 6,58; N = 23,71	412,2	414,2
61	cyklopentylamino	C = 70,23; H = 6,84; N = 22,93	426,2	428,2
62	cyklohexylamino	C = 70,72; H = 7,08; N = 22,20	440,3	442,3
63	<i>cis</i> -(2-aminocyklohexyl)amino	C = 68,39; H = 7,06; N = 24,54	455,3	457,2
64	<i>trans</i> -(2-aminocyklohexyl)amino	C = 68,39; H = 7,05; N = 24,54	455,3	457,2
65	<i>cis,trans</i> -(2-aminocyklohexyl)amino	C = 68,39; H = 7,06; N = 24,53	455,3	457,2
66	<i>cis,trans</i> -(3-aminocyklohexyl)amino	C = 68,40; H = 7,06; N = 24,54	455,3	457,2
67	<i>trans</i> -(4-aminocyklohexyl)amino	C = 68,39; H = 7,06; N = 24,54	455,3	457,2
68	<i>trans</i> -(2-hydroxycyklohexyl)amino	C = 68,25; H = 6,83; N = 21,43	456,2	458,2
69	<i>trans</i> -(3-hydroxycyklohexyl)amino	C = 68,25; H = 6,83; N = 21,44	456,2	458,2
70	<i>trans</i> -(4-hydroxycyklohexyl)amino	C = 68,24; H = 6,83; N = 21,43	456,2	458,2
71	(2-methoxybenzyl)amino	C = 70,12; H = 6,10; N = 20,44	478,2	480,2
72	(3-methoxybenzyl)amino	C = 70,13; H = 6,09; N = 20,44	478,2	480,2
73	(4-methoxybenzyl)amino	C = 70,12; H = 6,10; N = 20,45	478,2	480,2
74	3,5-dimethoxybenzylamino	C = 68,35; H = 6,13; N = 19,24	508,2	510,2
75	2,6-dimethoxybenzylamino	C = 68,35; H = 6,13; N = 19,24	508,2	510,2
76	2,4,6-trimethoxybenzylamino	C = 66,77; H = 6,16; N = 18,17	538,2	540,2
77	3,4,5-trimethoxybenzylamino	C = 66,77; H = 6,16; N = 18,17	538,2	540,2
78	2-fluorobenzylamino	C = 69,36; H = 5,61; N = 20,97	466,2	468,2
79	3-fluorobenzylamino	C = 69,36; H = 5,61; N = 20,97	466,2	468,2
80	4-fluorobenzylamino	C = 69,36; H = 5,61; N = 20,97	466,2	468,2
81	2-chlorobenzylamino	C = 67,00; H = 5,41; N = 20,26	482,2	484,2
82	3-chlorobenzylamino	C = 67,00; H = 5,41; N = 20,26	482,2	484,2
82	4-chlorobenzylamino	C = 67,00; H = 5,41; N = 20,26	482,2	484,2
83	(R)-[1-(hydroxymethyl)propyl]amino	C = 66,80; H = 6,77; N = 22,72	430,2	432,2
84	(S)-[1-(hydroxymethyl)propyl]amino	C = 66,80 H = 6,77; N = 22,71	430,2	432,2

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Příklad 17**Antileukemická aktivita nových sloučenin *in vitro***

Jednou ze schopností sloučeniny s antileukemickou aktivitou je cytotoxicita. Testování cytotoxicity bývá nejčastěji založeno na sledování metabolické aktivity živých buněk. Nejčastěji používané metody pro kvantifikaci buněčné proliferace a cytotoxicity využívají (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) nebo Calcein AM. Tyto metody jsou využívány pro screening nových sloučenin nebo při testování chemosensitivity. Tyto metody detekují pouze živé buňky, neboť jen tyto jsou schopné redukovat MTT na odpovídající formazan. Množství redukovaného MTT a vzniklého formazanu pak odpovídá počtu živých buněk v kultuře.

Sloučeniny byly testovány s následujícími buněčnými liniemi: K562 (lidská chronická myelogenní leukemie), HL60 (lidská promyelocytická leukemie), CEM (lidská lymfoblastická leukemie), THP1 (lidská monocytická leukemie), MV4;11 (lidská akutní myelocytická leukemie). Tyto linie byly kultivovány v kultivačním médiu RPMI obsahujícím 10 % fetálního séra, penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 µg/ml) při 37 °C v atmosféře doplněné 5% CO₂. Pro testování cytotoxicity byly buňky vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 2000-5000 buněk na jamku a po 8 hodinách byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích od 100 to 0,01 µM vždy v triplicátu. Po třech dnech byl k buňkám přidán roztok MTT (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA) a po 5 hodinách bylo médium nahrazeno DMSO. Absorbance byla měřena destičkovým readerem při 620 nm. Měření cytotoxicity pomocí MTT bylo zopakováno třikrát a jako negativní kontrola byly použity neovlivněné buňky. Hodnoty IC₅₀ stanovující koncentraci látky, která je letální pro 50 % nádorových buněk, byly odečteny z křivek závislosti buněčné viability na koncentraci testované látky.

Signifikantní cytotoxické aktivity byly u všech pěti použitých buněčných linií odvozených od pacientů s různými formami leukemií (příklady výsledků uvádí Tabulka 2). Získané výsledky jasně ukazují, že nové sloučeniny jsou účinné vůči poměrně širokému spektru různých leukemií a nijak výrazně nezávisí na genetickém pozadí.

Tabulka 2. Antileukemická aktivita některých nových sloučenin *in vitro*.

sloučenina	IC ₅₀ (µM)				
	K562	HL60	CEM	THP1	MV4;11
2	1,00	0,92	0,80	0,56	0,47

5	0,78	0,86	0,94	0,32	0,60
7	0,64	0,52	0,93	1,64	1,69
9	0,11	0,10	0,07	0,18	0,36
13	0,02	0,02	0,01	0,03	0,04
15	0,59	0,60	0,23	0,31	0,87
17	0,15	0,26	0,11	0,30	0,37
27	0,06	0,02	0,01	0,03	0,06
29	0,10	0,18	0,09	0,14	0,27
31	0,39	0,24	0,21	0,26	0,31
33	0,03	0,02	0,01	0,01	0,07
35	0,24	0,17	0,18	0,26	0,20
40	0,34	0,22	0,14	0,11	0,25
41	0,47	0,56	0,43	0,27	0,35
45	0,70	0,62	0,54	0,49	0,51
47	0,13	0,09	0,07	0,06	0,12
50	0,18	0,14	0,11	0,08	0,17
54	0,36	0,29	0,24	0,37	0,24
57	0,44	0,32	0,27	0,29	0,53
64	0,10	0,09	0,05	0,04	0,09
65	0,30	0,22	0,14	0,11	0,38
67	0,59	0,24	0,23	0,30	0,19
73	3,95	0,78	0,89	0,67	0,97
83	0,07	0,02	0,06	0,01	0,07

Příklad 18

Aktivita vůči buněčným liniím odvozeným od solidních nádorů

V experimentech byly použity následující buněčné linie: G361 (maligní melanom), MCF7 (adenokarcinom prsu), PLC/PRF/5 (jaterní karcinom), PANC-1 (karcinom pankreatu) a HCT116 (karcinom tlustého střeva). Buněčné linie byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM obsahujícím 10 % fetálního séra, glutamin, penicilin a streptomycin při 37 °C v atmosféře doplněné 5% CO₂. Pro testování cytotoxicity byly buňky vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 4000-10000 buněk na jamku. Po 16 hod byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích od 100 do 0.01 μM vždy v triplicátu. Po třech dnech byl k buňkám přidán roztok MTT (5 mg/ml; Sigma, St. Louis, USA) a po 5 hodinách bylo médium nahrazeno DMSO. Absorbance byla měřena destičkovým readerem při 620 nm. Měření cytotoxicity pomocí MTT bylo zopakováno třikrát a jako negativní kontrola byly použity neovlivněné buňky. Hodnoty IC₅₀ stanovující koncentraci látky, která je letální pro 50 % nádorových buněk, byly odečteny z křivek závislosti buněčné

viability na koncentraci testované látky.

Všechny testované sloučeniny vykázaly významné cytotoxické aktivity ve všech pěti buněčných liniích odvozených od nádorů s různým histopatologickým původem a s různými molekulárním alteracemi. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3. Aktivita nových sloučenin vůči buněčným liniím odvozeným od solidních nádorů.

sloučenina	IC ₅₀ (μM)				
	G361	MCF7	PLC/PRF/5	PANC-1	HCT116
2	0,78	1,19	0,97	0,46	1,20
5	0,24	0,81	0,70	0,65	1,30
7	0,43	0,46	0,21	1,56	1,97
9	0,25	0,16	0,21	0,30	0,42
13	0,02	0,02	0,05	0,06	0,03
15	0,42	0,53	0,20	0,34	0,69
17	0,24	0,19	0,73	0,34	0,40
27	0,08	0,03	0,04	0,07	0,10
33	0,03	0,02	0,05	0,01	0,04
45	0,22	0,31	0,20	0,32	0,37
47	0,47	0,23	0,24	0,20	0,34
64	0,15	0,22	0,14	0,08	0,34
65	0,04	0,06	0,05	0,02	0,08
67	0,36	0,47	0,29	0,50	0,37
73	2,62	5,30	3,94	0,44	0,99
83	0,04	0,05	0,02	0,02	0,03

Příklad 19

Inhibice CDK

Kináza CDK2/cyklin E byla připravena pomocí bakulovirové infekce v hmyzích buňkách Sf9 a purifikována na koloně NiNTA (Qiagen). Reakce probíhala za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 a 15 μM ATP, 0,05 μCi [γ -³³P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 μl v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μM Na-orthovanadát, 1,2 mM DTT, 2,5 μg / 50 μl PEG_{20.000}).

CDK5/p35 byla zakoupena od společnosti ProQinase GmbH. Reakce probíhala za přítomnosti 1 mg/ml histonu H1 a 0,15 μM ATP, 0,05 μCi [γ -³³P]ATP a testované sloučeniny v celkovém objemu 10 μl v reakčním pufru (60 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 3 μM Na-orthovanadát, 1,2 mM DTT, 2,5 μg / 50 μl PEG_{20.000}).

Reakce byly zastaveny přidáním 5 μl 3% vodného roztoku H₃PO₄. Vzorky byly nanášeny na

P-81 fosfoceluloseovou membránu (Whatman), která byla následně 3x promyta 0,5% vodným roztokem H_3PO_4 a usušena na vzduchu. Kinázová inhibice byla stanovena za pomoci digitálního analyzátoru obrazu FLA-7000 (GE Healthcare Life Sciences) a byla vyjádřena jako reziduální kinázová aktivita nebo jako hodnota IC_{50} udávající koncentraci testované látky způsobující snížení aktivity CDK na 50 %.

Tabulka 4 ukazuje výsledky měření a dokládá, že všechny testované látky velmi účinně inhibovaly CDK2 i CDK5 v nanomolárních koncentracích. Inhibice CDK2 vede k zastavení buněčného cyklu na předchodu G1/s a v S fázi, kdy dochází k replikaci DNA. Důsledkem toho je pak inhibice proliferace nádorových buněk.

Tabulka 4: Inhibice kináz některými nově připravenými sloučeninami.

sloučenina	IC_{50} (μM)	
	CDK2	CDK5
2	0,197	0,183
5	0,048	0,229
7	0,070	0,165
9	0,018	0,005
13	0,050	0,119
14	0,042	0,180
15	0,061	0,114
17	0,132	0,422
27	0,021	0,005
29	0,039	0,0149
33	0,009	0,001
35	0,012	0,017
40	0,027	0,038
45	0,051	0,017
47	0,467	2,136
54	0,322	0,204
55	0,640	0,182
64	0,046	0,088
65	0,023	0,048
67	0,096	0,179
73	1,483	4,415
83	0,054	0,009
84	0,098	0,021

Příklad 20

Nové sloučeniny ovlivňují buněčný cyklus nádorových buněk

Subkonfluentní buňky byly ovlivněny různými koncentracemi nových sloučenin po dobu 24 hod. 30 min před ukončením inkubace byly buňky naznačeny pulsem 10 mM 5-brom-20-

-deoxyuridinu. Buňky byly poté opláchnuty PBS, fixovány 70% ethanolem a denaturovány 2 M HCl. Po neutralizaci byla provedena inkubace s fluorescenčně značenou protilátkou proti anti-BrdU, buňky byly opět promyty, nabarveny propidiumjodidem a analyzovány průtokovým citometrem s 488 nm laserem.

Antiproliferativní aktivita sloučenin **15**, **45**, **47** a **84** byla sledována v asynchronně rostoucí kultuře buněčné linie adenokarcinomu prsu MCF7. Jak ukazuje obrázek 1, nové sloučeniny velmi účinně blokovaly buněčný cyklus v S, G2 a M fázích.

Příklad 21

Nové sloučeniny aktivují v nádorových buňkách kaspázy 3 a 7

Stanovení proapoptotických vlastností nových sloučenin bylo založeno na kvantifikaci enzymatické aktivity kaspasy-3/7. Aktivita buněčné kaspasy-3/7 byla měřena podle protokolu Carrasco et al., 2003, BioTechniques, 34(5): 1064-67. Buňky linie Hep3B a PLC/PRF/5 byly vysazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v počtu 10000 buněk na jamku. Druhý den byly k buňkám přidány testované látky v různých koncentracích a buňky byly inkubovány 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byl do jamek přidán reakční pufr (150 mM HEPES pH 7,4, 450 mM NaCl, 150 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 1,2 mM EGTA, 1,5% Nonidet P40, 0,3% CHAPS, 30% sacharosa, 30 mM DTT, 3 mM PMSF) obsahující 150 μM substrát Ac-DEVD-AMC (Sigma-Aldrich) a destičky byly inkubovány při 37 °C. Aktivita kaspas-3/7 byla změřena po 6 hodinách za pomoci přístroje Fluoroskan Ascent (Labsystems) při 346 nm/442 nm (ex/em).

Fluorimetrické měření aktivity kaspas-3/7 v buňkách K562 odhalilo silnou proapoptotickou aktivitu nových sloučenin ve srovnání s neovlivněnými buňkami (obrázek 2A).

V dalším experimentu byla sloučenina **33** studována detailněji. Fluorimetrická detekce aktivity kaspas-3/7 v buňkách odhalila jasnou a silnou koncentračně-závislou aktivaci kaspáz již nanomolárními koncentracemi sloučeniny **33** (obrázek 2B).

V dalším experimentu byl sledován vliv sloučeniny **45** na aktivaci kaspáz v buněčné linii HCT116 odvozené od karcinomu tlustého střeva. Fluorimetrická detekce aktivity kaspas-3/7 v buňkách odhalila jasnou a silnou koncentračně-závislou aktivaci kaspáz již nanomolárními koncentracemi sloučeniny **45** (obrázek 3).

Příklad 22

Vliv nových látek na antiapoptotické proteiny v nádorových buňkách

Vliv nových látek na aktivaci apoptózy byl dále ověřen studiem exprese vybraných apoptotických proteinů pomocí metody imunoblottingu. Buňky byly sklizeny, třikrát promyty vychlazeným PBS a zlyzovány v extrakčním pufru (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1% Nonidet P40) obsahujícím směs inhibitorů proteas a fosfatas (Sigma-Aldrich, USA). 20 μg celkových proteinů bylo separováno pomocí elektroforézy v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a následně přeneseno na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly blokovány v roztoku PBS s 0,1% Tweenem 20 obsahujícím 5 % sušeného mléka a inkubovány přes noc se specifickými protilátkami: anti- α -tubulin (klon DM1A), anti-Mcl-1 (klon S-19), anti-PARP (klon F-2), anti-Mdm-2 (SMP14), anti-PUMA, anti-p53 (klon DO-1). Všechny primární protilátky byly naředěny do blokovacího roztoku. Jako sekundární byly použity protilátky konjugované s peroxidasou (králičí protilátka proti myším imunoglobulinům a prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům; DAKO, Denmark), které byly vizualizovány pomocí reagensí ECL (GE-Healthcare Life Sciences).

Výsledky analýzy několika proteinů souvisejících s apoptózou jsou ilustrovány obrázkem 4. Za jednoznačný důkaz indukce apoptózy sloučeninou **45** v buňkách HCT116 lze považovat nárůst fragmentu proteinu PARP-1 o velikosti 89 kDa; tento nárůst koreloval s postupným poklesem hladiny proteinu PARP-1, neboť tento je známým substrátem kaspázy 3. Aktivaci mitochondriální apoptózy dokládá také postupný pokles antiapoptotického proteinu Mcl-1, a to opět koncentrančně-závislým způsobem. Sloučenina **45** také rychle stabilizovala nádorové supresorický protein p53, který je významným regulátorem apoptózy. Tento nárůst byl provázen paralelním poklesem hladiny ligázy Mdm-2, která je negativním regulátorem p53.

Příklad 23

Antivaskularizační účinky nových sloučenin

Pro ověření antivaskularizačních schopností nových sloučenin byly provedeny proliferační a migrační experimenty s buněčným modelem HUVEC (lidské pupečnickové endotelové buňky). Buňky byly získány od společnosti Promocell (Heidelberg, Germany) a kultivovány v médiu ECGM (Promocell, Heidelberg, Germany) doplněném 10% fetálního telecího séra (Biochrom, Berlin, Germany). Experimenty byly provedeny s buňkami v pasáži 3.

Pro měření proliferace bylo použito vždy $1,5 \times 10^3$ buněk HUVEC. 24 hod po vysazení byly buňky ošetřeny novými sloučeninami na 72 hod. Měření proliferace bylo provedeno krystalovou violetí, která barví živé buňky, podle popsaného postupu (Koltermann et al. 2007, Cell Mol. Life Sci. 64:1715-1722).

Pro měření vlivu na migraci byla v konfluentní vrstvě buněk HUVEC vytvořena rýha škrábnutím plastikovou špičkou mikropipety a kultura pak byla ihned převedena buď do média M199 (serum-free, negativní kontrola; PAN Biotech) nebo do plného média ECGM (pozitivní kontrola). Po 16 hod byly buňky zafixovány 3% formaldehydem a fotografovány systémem TILLvisON (Lochham, Germany) připojeným k mikroskopu Axiovert 200 (Zeiss, Germany). Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno společností S.CO LifeScience (Garching, Germany). Migrace byla kvantifikována jako poměr plochy pokryté buňkami a plochy bez buněk (původní rýha).

Tabulka 5: Anti-vaskularizační účinky nových látek.

sloučenina	inhibice proliferace (EC50)	inhibice migrace (EC50)
5	234 nM	
7	648 nM	550 nM
8	569 nM	
9	136 nM	
13	9 nM	26 nM
15	153 nM	
17	95 nM	
27	33 nM	35 nM
33	14 nM	22 nM
45	176 nM	500 nM
47	181 nM	
65	5 nM	77 nM
67	69 nM	
73	2,278 μ M	
81	1,331 μ M	
83	34 nM	39 nM

Příklady výsledků jsou uvedeny v tabulce 5. Nové sloučeniny signifikantně inhibovaly proliferaci buněk HUVEC v nanomolárních koncentracích. Důležitým poznatkem je, že se jedná o čistě antiproliferativní účinek s minimální cytotoxicitou. Řada nových sloučenin byla schopná inhibovat migraci buněk HUVEC stimulovaných faktorem VEGF. Inhibice migrace HUVEC na volnou plochu (rýhu) novými sloučeninami popisovanými v tomto vynálezu byla jednoznačně koncentračně-závislá a byla pozorovatelná již při nanomolárních koncentracích nových sloučenin.

Příklad 24

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
Magnesium stearát	80 g
Laktosa	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 25

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, Gattefoscé 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 26**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:

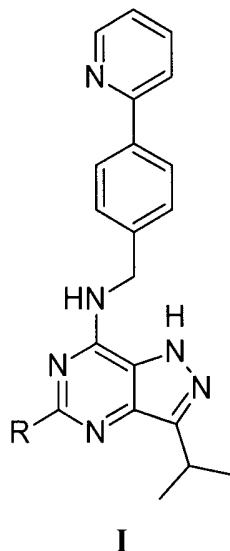
Složení

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-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce I



ve kterém

R je vybráno ze skupiny zahrnující

- heterocykloalkyl, což znamená C₃-C₁₀ cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl, a amino substituent;

- heterocykloalkyl alkyl znamená C₃-C₁₀ cykloalkyl skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, a která je vázána přes C₁-C₄ alkylenový můstek, s výhodou přes C₂-C₃ alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl, a amino substituent;

- **R'-X**

kde **X** je vybráno ze skupiny-NH- a -N(C₁-C₈ alkyl), a

R' je vybráno ze skupiny zahrnující

- C₂-C₁₀ 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 alkyl je vybrán nezávisle ze skupiny zahrnující C₁-C₁₀ lineární nebo rozvětvený alkyl;
- C₃-C₁₀ 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, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl a amino substituent;
- heterocykloalkyl, což znamená C₃-C₁₀ cykloalkylovou skupinu jak je definováno výše, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkyl je popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl, a amino substituent;
- heterocykloalkyl alkyl, což znamená C₃-C₁₀ cykloalkylovou skupinu jak je definováno výše, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, která je vázána přes C₁-C₄ alkylenový můstek, s výhodou přes C₂-C₃ alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkyl alkyl skupina je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ hydroxyalkyl, a amino substituent;
- benzylová skupina, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující fluoro, chloro, hydroxy, C₁-C₄ alkyl, C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ 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-(2-pyridyl)phenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle nároku 1, které nesou substituent R vybraný ze skupiny zahrnující N N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazinyl, (R)-(2-hydroxymethylpyrrolidine-1-yl), ethylamino, propylamino, butylamino, (2-hydroxyethyl)amino, (3-hydroxypropyl)amino, 2(R)-hydroxypropyl]amino, 2(S)-

-hydroxypropyl]amino, 4-hydroxybut-2(R)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(S)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(R,S)-yl]amino, 2-(hydroxy-2-methyl)propyl]amino, (2,3-dihydroxypropyl)amino, (1-hydroxy-3-methylbutyl)amino, [(R,S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(R)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, (R)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (S)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (2-aminoethyl)amino, (3-aminopropyl)amino, (4-aminobutyl)amino, (5-aminopentyl)amino, (6-aminohexyl)amino, [3-amino-2-hydroxypropyl]amino, [1-(dimethylamino)methyl]amino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino, [4-(dimethylamino)butyl]amino, [2-(diethylamino)ethyl]amino, [3-(diethylamino)propyl]amino, (aziridin-1-yl)ethylamino, (azolidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)ethylamino, (piperidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)ethylamino, (azetidin-1-yl)propylamino, cyklopropylamino, cyklobutylamino, cyklopentylamino, cyklohexylamino, (*cis*-2-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (2-methoxybenzyl)amino, (3-methoxybenzyl)amino, (4-methoxybenzyl)amino, (3,5-dimethoxybenzyl)amino, (2,6-dimethoxybenzyl)amino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (2,4,6-trimethoxybenzyl)amino, (2-fluorbenzyl)amino, (3-fluorbenzyl)amino, (4-fluorbenzyl)amino, (2-chlorbenzyl)amino, (3-chlorbenzyl)amino, (4-chlorbenzyl)amino, (2,4-dichlorbenzyl)amino, (3,4,5-trichlorbenzyl)amino.

3. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro použití jako léčiva.

4. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití při léčbě onemocnění spojených s aberantní buněčnou proliferací a/nebo apoptózou.

5. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny

obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití pro inhibici migrace endotelových buněk, zejména pro inhibici a/nebo léčbu vaskularizace nádorů.

6. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití pro inhibici CDK5.

7. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití při léčbě nádorových onemocnění.

8. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití při léčbě leukemií a/nebo solidních nádorů.

9. 5-Substitutované 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidiny obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 pro použití pro inhibici a/nebo léčbu vaskularizace při nádorech, embryonálním vývoji, menstruačním cyklu a hojení ran.

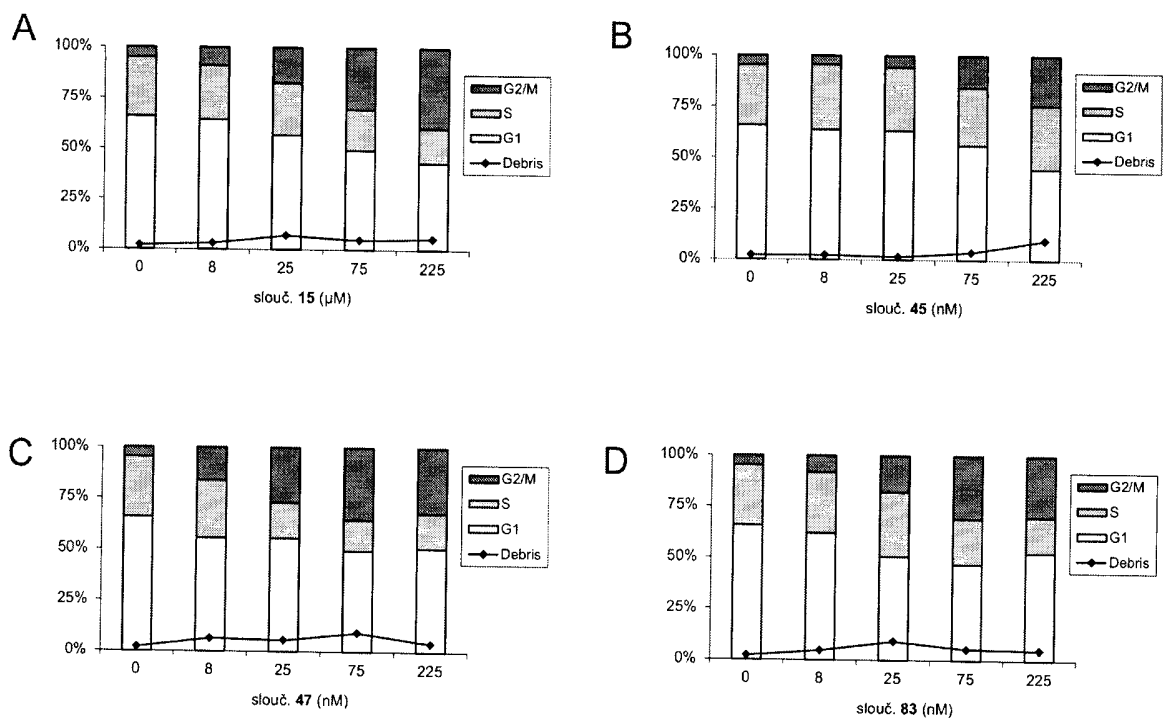
10. Farmaceutický přípravek, vyznačující se tím, že obsahuje alespoň jeden 5-substitutovaný 7-[4-(2-pyridyl)fenylmethylamino]-3-isopropylpyrazolo[4,3-d]pyrimidin obecného vzorce **I** podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 a farmaceuticky přijatelný nosič.

113
41

PV 2015-324

14.05.15

Obrázek 1.

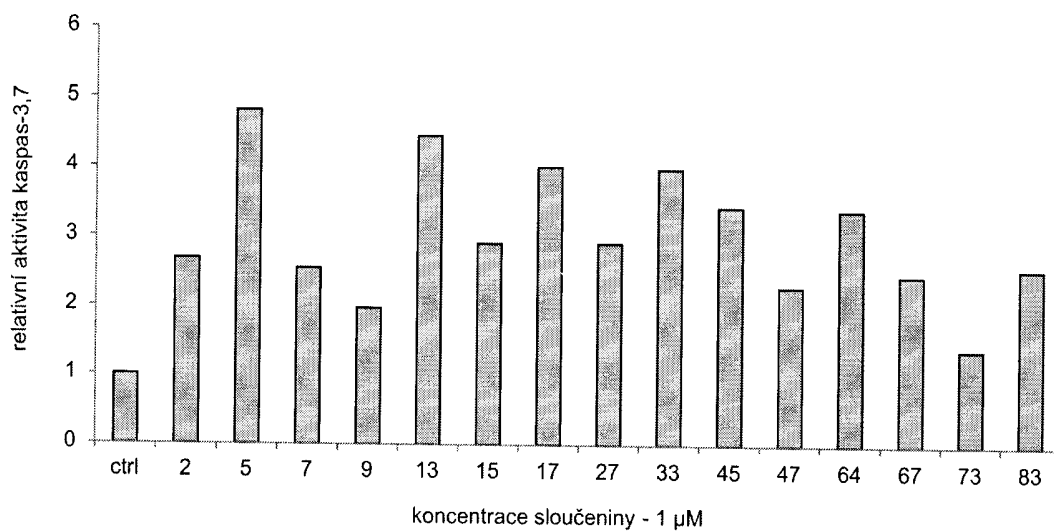


213
42

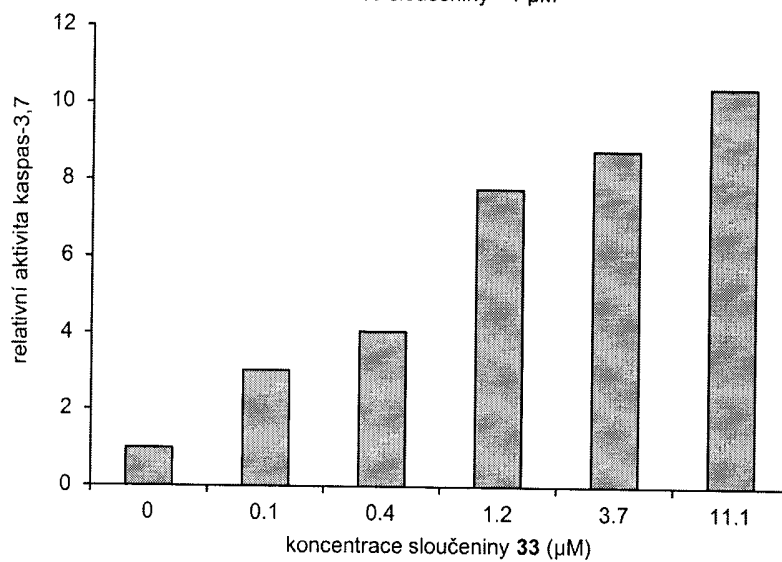
PV 2015-324
14.05.15

Obrázek 2.

A



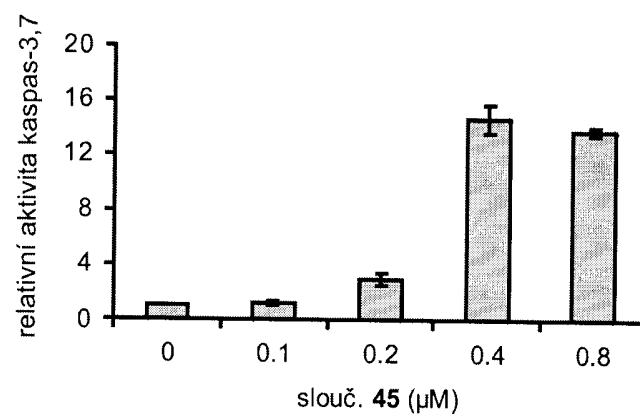
B



3/3
43

PV 2015-324
14.05.15

Obrázek 3.



Obrázek 4.

