



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78314** (13) **C2**

(51) МПК (2006)
A61K 31/506
A61K 45/06 (2007.01)
A61P 9/00
A61P 9/02 (2007.01)
A61P 9/10 (2007.01)
A61P 9/12 (2007.01)
A61P 13/00
A61P 15/00
A61P 15/10 (2007.01)
A61P 19/10 (2007.01)
A61P 25/00
A61P 25/16 (2007.01)
A61P 25/24 (2007.01)
A61P 25/28 (2007.01)
A61P 27/06 (2007.01)
C07D 471/04 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

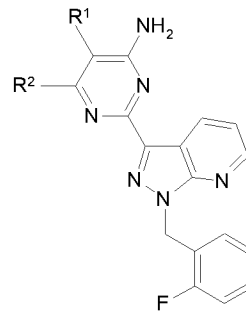
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КАРБАМАТЗАМІЩЕНІ ПІРАЗОЛОПІРИДИНИ

1

2

(21) 20041210078
(22) 25.04.2003
(24) 15.03.2007
(86) PCT/EP03/04304, 25.04.2003
(31) 102 20 570.1
(32) 08.05.2002
(33) DE
(46) 15.03.2007, Бюл. № 3, 2007 р.
(72) Алонсо-Алія Крістіна, ES, Бішофф Ервін, DE,
Мюнтер Клаус, DE, Шташ Йоханнес-Петер, DE,
Шталь Ельке, DE, Вайганд Штефан, DE, Фойрер
Ахім, DE
(73) БАЄР ХЕЛСКЕР АГ, DE
(56) WO 02 42299 A 30.05.2002
WO 03 004503 A 16.01.2003
WO 02 42302 A 30.05.2002
WO 02092596 A 21.11.2002
WO 02 42300 A 30.05.2002
WO 02 42301 A 30.05.2002
DE 198 46 514 A 20.04.2000
DE 198 34 044 A 03.02.2000
WO 00 06567 A 10.02.2000
(57) 1. Сполуки формули (I)



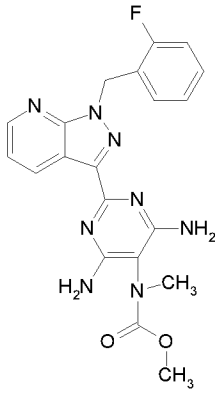
(I)

в якій
R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,
R² означає водень або NH₂,
R³ означає водень або (C₁-C₄)-алкіл,
R⁴ означає (C₁-C₆)-алкіл,
а також їх солі, ізомери та гідрати.
2. Сполуки за п. 1, в яких
R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,
R² означає водень або NH₂,
R³ означає (C₁-C₄)-алкіл,
R⁴ означає (C₁-C₄)-алкіл,
а також їх солі, ізомери та гідрати.
3. Сполуки за п. 1, в яких
R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,
R² означає NH₂,
R³ означає метил або етил,
R⁴ означає метил, етил або ізопропіл,

(19) **UA** (11) **78314** (13) **C2**

а також їх солі, ізомери та гідрати.

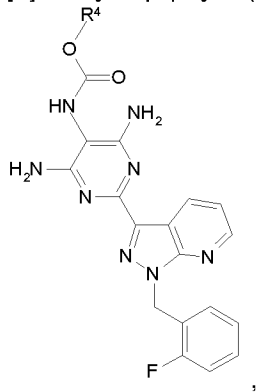
4. Сполука за п. 1, яка має таку структуру: метиловий естер 4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-5-примідиніл(метил)карбамінової кислоти формули



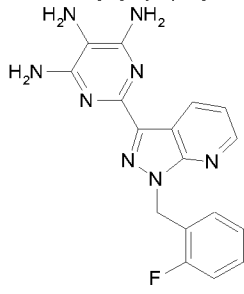
а також її солі, ізомери та гідрати.

5. Сполука формули (I) за п. 1 для лікування захворювань.

6. Спосіб одержання сполук формули (I) за п. 1, який відрізняється тим, що [A] сполука формули (Ia)

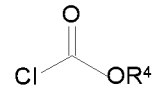


в якій R⁴ має вказане в п. 1 значення, піддають взаємодії зі сполуками формули (II) R³-X¹ (II), в якій R³ має вказане в п. 1 значення та X¹ означає галоген, переважно йод, [B] або сполуку формули (III)



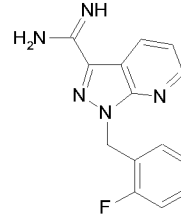
піддають взаємодії зі сполуками формули (IV)

(III)



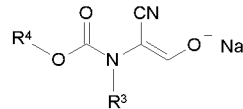
(IV)

в якій R⁴ має вказане в п. 1 значення, [C] або сполуку формули (V)



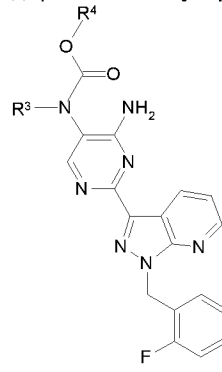
(V)

піддають взаємодії зі сполуками формули (VI)



(VI)

в якій R³ та R⁴ мають вказані в п. 1 значення, до одержання сполук формули (Ib)



(Ib)

в якій R³ та R⁴ мають вказані в п. 1 значення.

7. Лікарський засіб, що містить щонайменше одну сполуку формули (I) за п. 1 та щонайменше одну допоміжну речовину.

8. Лікарський засіб за п. 7, що додатково містить щонайменше один органічний нітрат або донор монооксиду азоту.

9. Лікарський засіб за п. 7 або 8, що додатково містить щонайменше одну сполуку, що інгібує перетворення циклічного гуанозинмонофосфату.

10. Застосування сполук формули (I) за п. 1 для одержання лікарських засобів для лікування серцево-судинних захворювань, гіпертонії, тромбоемболічних захворювань, ішемій або сексуальних розладів, зокрема порушення ерекції та жіночих сексуальних розладів.

11. Застосування за п. 10 в комбінації з щонайменше одним органічним нітратом або донором монооксиду азоту або однією сполукою, що інгібує перетворення циклічного гуанозинмонофосфату.

Даний винахід стосується сполук, що стимулюють розчинну гуанілатциклазу, способу їх одер-

жання та їх застосування як лікарські засоби, зокрема, як лікарські засоби для лікування серцево-

судинних захворювань та/або сексуальних розладів.

Однією з найважливіших клітинних медіаторних систем у клітинах ссавців є циклічний гуанозинмонофосфат (сGMP). Разом із монооксидом азоту (NO), який вивільняється із ендотелію та переносить гормональні та механічні сигнали, вони утворюють NO/сGMP-систему. Гуанілатциклази каталізують біосинтез сGMP із гуанозинтрифосфату (GTP). Відомі до цього часу представники цього сімейства як за структурними ознаками, так і за природою лігандів можуть бути розділені на дві групи: специфічні гуанілатциклази, які стимулюються натрійуретичними пептидами, та розчинні гуанілатциклази, які стимулюються NO. Розчинні гуанілатциклази складаються з двох підодиниць та скоріше за все містять один гем на гетеродимер, який є частиною регуляторного центру. Він відіграє ключову роль у механізмі активації. NO може бути приєднаний до атому заліза гема і таким чином значно підвищувати активність ферменту. На відміну від цього форми ферменту, які не містять гем, не можуть бути стимульовані NO. Центральний атом заліза гема може також утворювати зв'язок із СО, причому стимуляція СО значно слабша, ніж стимуляція NO.

Завдяки утворенню сGMP та регулюванню фосфодіестераз, іонних каналів та протеїнкіназ гуанілатциклаза відіграє вирішальну роль у різних фізіологічних процесах, зокрема, у розслабленні та проліферації клітин гладкої мускулатури, в агрегації та адгезії тромбоцитів та в нейрональній передачі сигналів, а також у захворюваннях, які засновані на порушенні вказаних вище процесів. У патофізіологічних умовах NO/сGMP-система може бути заблокована, що може призвести, наприклад, до підвищення тиску крові, активації тромбоцитів, посилення проліферації клітин, порушення функціонування ендотелію, атеросклерозу, стенокардії, серцевої недостатності, тромбозів, нападів, до сексуальних розладів та інфаркту міокарда.

Незалежна від NO можливість лікувального впливу на такі захворювання, яка впливає на проходження сигналу сGMP в організмі, є багатообіцяючою на основі її очікуваної високої ефективності та незначних побічних дій.

Для терапевтичної стимуляції розчинної гуанілатциклази до цього часу були застосовані виключно такі сполуки, як органічні нітрати, дія яких базується на NO. Він утворюється в результаті біотрансформації та активує розчинну гуанілатциклазу шляхом впливу на центральний атом заліза гема. Поряд з побічними ефектами до значних недоліків такого способу лікування належить також виникнення звикання.

В останні роки були описані деякі речовини, які активують розчинну гуанілатциклазу безпосередньо, тобто без попереднього вивільнення NO; до них належать, наприклад, 3-(5'-гідроксиметил-2'-фурил)-1-бензиліндазол [YC-1, Wu та ін., Blood 84 (1994), 4226; Mulsch та ін., Brit. J. Pharmacol. 120 (1997), 681], жирні кислоти [Goldberg та ін., J. Biol. Chem. 252 (1977), 1279], гексафторфосфат дифенілідонію [Pettibone та ін., Eur. J. Pharmacol. 116 (1985), 307], ізоліквіритигенін [Yu та ін., Brit. J.

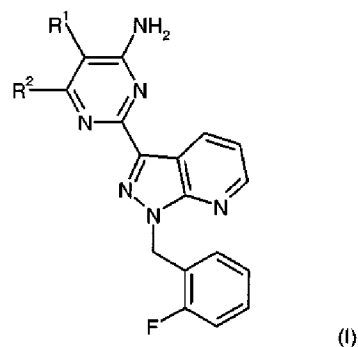
Pharmacol. 114 (1995), 1587], а також різні заміщені похідні піразолу [WO 98/16223].

Крім того, як стимулятори розчинної гуанілатциклази в заявках [WO 98/16507, WO98/23619, WO 00/06567, WO 00/06568, WO 00/06569, WO 00/21954, WO 02/42299, WO 02/42300, WO 02/42301, WO 02/42302, WO 02/092596 та WO 03/004503] описані похідні піразолопіридину. У цих матеріалах поряд з іншими описані також піразолопіридини з піримідиновим залишком у положенні 3. Такі сполуки проявляють дуже високу активність in vitro щодо стимуляції розчинної гуанілатциклази. Хоча виявилось, що властивості in vivo цих сполук мають певні недоліки, наприклад, щодо їх впливу на печінку, фармакокінетичних властивостей, співвідношень між дозою та дією або їх метаболізму.

Тому задача даного винаходу полягає в одержанні інших похідних піразолопіридину, які діють як стимулятори розчинної гуанілатциклази, але в той же час не проявляють наведених вище недоліків сполук з рівня техніки.

Ця задача вирішується за допомогою сполук за п. 1 формули винаходу. Цей новий клас похідних піразолопіридинів відрізняється наявністю піримідинового залишку в положенні 3, який має визначений склад замісників, а саме карбаматний залишок у положенні 5 піримідинового циклу, а також аміногрупу в положенні 4 піримідинового циклу.

Зокрема даний винахід стосується сполук формули (I)



в якій

R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,

R² означає водень або NH₂,

R³ означає водень або (C₁-C₄)-алкіл,

R⁴ означає (C₁-C₆)-алкіл,

а також їх солей, ізомерів та гідратів.

Перевагу надають сполукам формули (I), в яких

R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,

R² означає водень або NH₂,

R³ означає (C₁-C₄)-алкіл,

R⁴ означає (C₁-C₄)-алкіл,

а також їх солям, ізомерам та гідратам.

Особливу перевагу надають сполукам формули (I), в яких

R¹ означає -NR³C(=O)OR⁴,

R² означає NH₂,

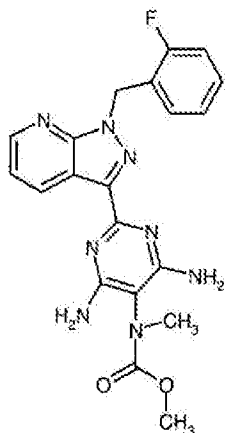
R³ означає метил або етил,

R⁴ означає метил, етил або ізопропіл,

а також їх солям, ізомерам та гідратам.

Найбільшу перевагу надають сполуці метил-

4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(метил)карбамату з прикладу 8:



Згідно з винаходом сполуки формули (I) можуть також існувати у формі їх солей. Загалом до них належать солі з органічними або неорганічними основами або кислотами.

В рамках даного винаходу перевагу надають фізіологічно прийнятним солям. Фізіологічно прийнятними солями сполуки згідно з винаходом можуть бути солі речовин згідно з винаходом та мінеральних, карбонових або сульфонових кислот. Особливу перевагу надають, наприклад, солям хлорводневої, бромводневої, сірчаної, фосфорної, метансульфонової, етансульфонової, п-толуолсульфонової, бензолсульфонової, нафтілдісульфонової, оцтової, пропіонової, молочної, винної, лимонної, фумарової, малеїнової або бензойної кислоти.

Фізіологічно прийнятними солями можуть бути також солі металів або амонію та сполуки згідно з винаходом, які мають вільну карбоксильну групу. Особливу перевагу надають, наприклад, солям натрію, калію, магнію або кальцію, а також солям амонію, одержаним від аміаку, або органічних амінів, таких як, наприклад, етиламін, ді- або триетиламін, ді- або триетаноламін, дициклогексиламін, диметиламіноетанол, аргінін, лізин або етилендіамін.

Сполуки згідно з винаходом можуть бути представлені у таутомерних формах. Ці форми відомі фахівцю, вони також охоплені даним винаходом.

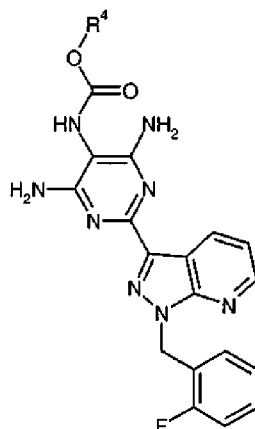
Крім того сполуки згідно з винаходом можуть бути представлені у формі їх можливих гідратів.

Алкіл означає нерозгалужений або розгалужений алкільний залишок, який, як правило, містить від 1 до 6, переважно від 1 до 4, особливо переважно від 1 до 3, атомів вуглецю, та переважно означає метил, етил, н-пропіл, ізопропіл, трет.-бутил, н-пентил та н-гексил.

Галоген в рамках даного винаходу означає фтор, хлор, бром та йод.

Сполуки формули (I) згідно з винаходом можуть бути одержані:

[A] шляхом взаємодії сполук формули (Ia)



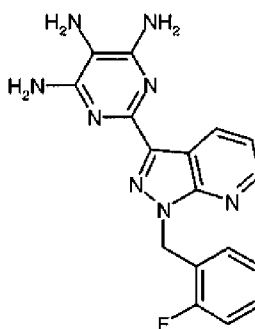
(Ia),

в якій
R⁴ має вказане вище значення,
зі сполуками формули (I)

R³-X¹ (II),

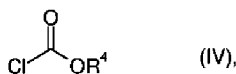
в якій
R³ має вказане вище значення та
X¹ означає галоген, переважно йод,
в разі необхідності, в органічному розчиннику
при охолодженні до одержання сполук формули
(I),

або
[B] шляхом взаємодії сполуки формули (III)



(III),

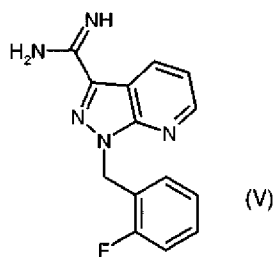
зі сполуками формули (IV)



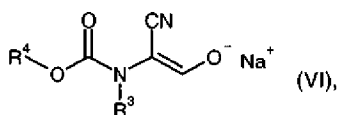
(IV),

в якій
R⁴ має вказане вище значення,
в разі необхідності, в органічному розчиннику
до одержання сполук формули (Ia),

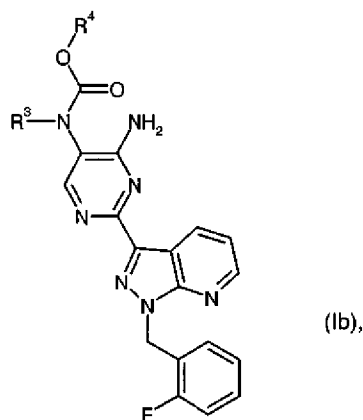
або
[C] шляхом взаємодії сполуки формули (V)



зі сполуками формули (VI)



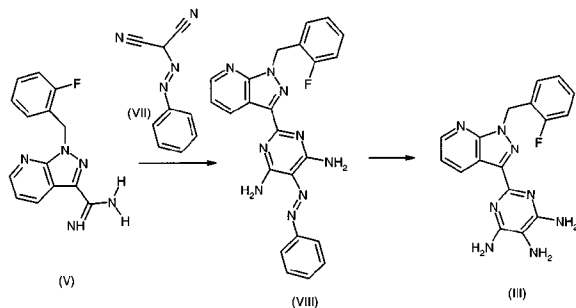
в якій
R³ та R⁴ мають вказані вище значення,
в разі необхідності, в органічному розчиннику
при нагріванні до одержання сполук формули (Ib)



в якій
R³ та R⁴ мають вказані вище значення.

Сполуки формули (II) та (IV) є комерційно доступними або можуть бути відомими фахівцю способами.

Сполука формули (III) може бути одержана за такої реакційною схемою:

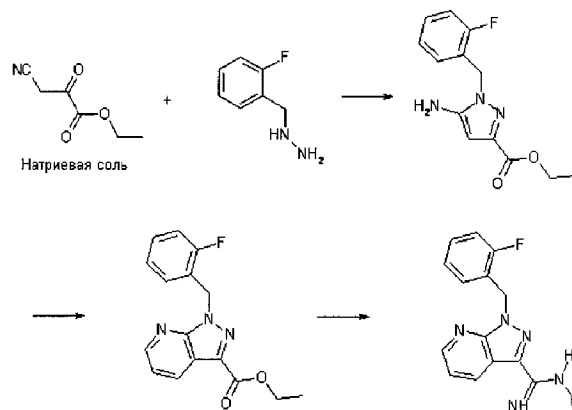


Сполуку формули (III) одержують способом двоетапного синтезу шляхом взаємодії сполуки формули (V) та формули (VII) до одержання сполуки формули (VIII) згідно зі способом [C] та шляхом подальшого гідратування сполуки формули (VIII) та водного розчину нікелю Ренея. Гідратування може бути здійснене в органічному розчиннику, на-

приклад, диметилформаміді, переважно при підвищеному тиску, наприклад, від 50 до 70 бар, переважно 65 бар, та шляхом перемішування реакційного розчину протягом тривалого часу, наприклад, 22 годин, при підвищеній температурі, наприклад, від 40 до 80°C, переважно від 60°C до 65°C.

Сполуку формули (VII) можна одержувати згідно з [L. F. Cavalieri, J. F. Tanker, A. Bendich, J. Am. Chem. Soc, 1949, 71, 533].

Сполука формули (VI) може бути одержана за такої реакційною схемою:



Сполуку формули (V) одержують способом двоетапного синтезу із відомої з літературних джерел натрієвої солі етилового естеру ціанопіроиноградної кислоти [Borsche та Manteuffel, Liebigs. Ann. Chem. 1934, 512, 97]. Шляхом її взаємодії з 2-фторбензилгідрaziном при нагріванні в атмосфері захисного газу в інертному розчиннику, такому як діоксан, одержують етиловий естер 5-аміно-1-(2-фторбензил)піразол-3-карбонової кислоти, який циклізують шляхом взаємодії з диметиламіноакролеїном у кислому середовищі в атмосфері захисного газу при нагріванні до одержання відповідної похідної піридину. Цю похідну піридину, етиловий естер 1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-карбонової кислоти, шляхом багатоетапної послідовності реакцій, таких як перетворення естеру за допомогою аміаку у відповідний амід, дегідратування водовідштовхувальним засобом, таким як ангідрид трифтороцтової кислоти, до одержання відповідної похідної нітрилу, взаємодія похідної нітрилу та метилату натрію та подальшої реакції із хлоридом амонію, перетворюють на сполуку формули (V).

Сполуки формули (VI) можуть бути синтезовані відомими фахівцю методами із відповідних карбаматів шляхом реагування з етиловим естером мурашиної кислоти. Карбамати можуть бути одержані згідно з [Q. Li. Chu, T. W. Daniel, A. Claiborne, C S. Cooper, C M. Lee, J. Med. Chem. 1996, 39, 3070-3088].

Взаємодія сполук формули (Ia) та (II) до одержання сполук формули (I) може бути здійснена при застосуванні реагентів у еквімолярних кількостях в органічному розчиннику, такому як, наприклад, диметилформамід, переважно в присутності 1-2 еквівалентів, переважно 1,5 еквівалентів основи, такої як, наприклад, гідрид натрію, переважно при

нормальному тиску та при перемішуванні реакційного розчину протягом кількох годин, наприклад, 1 години, при охолодженні, наприклад від -10°C до кімнатної температури, переважно при 0°C .

Взаємодія сполук формул (III) та (IV) до одержання сполук формули (Ia) може бути здійснена при застосуванні реагентів у еквімолярних кількостях в органічному розчиннику, такому як, наприклад, органічна основа, переважно піридин, переважно при нормальному тиску та при перемішуванні реакційного розчину протягом багатьох годин, наприклад, протягом 12 годин, при температурі від 0°C до кімнатної температури, переважно при кімнатній температурі.

Взаємодія сполук формул (V) та (VI) до одержання сполук формули (Ib) або сполук формул (V) та (VII) до одержання сполук формули (VIII) може бути здійснена при застосуванні реагентів у еквімолярних кількостях або при застосуванні сполуки формули (VI) у незначній надлишковій кількості в органічному розчиннику, такому як, наприклад, вуглеводень, переважно ароматичний вуглеводень, зокрема толуол або ксилол, переважно в присутності 2-3 еквівалентів, переважно 2 еквівалентів основи, такої як, наприклад, триетиламін або метанолат натрію, переважно при нормальному тиску та при перемішуванні реакційного розчину протягом багатьох годин, наприклад, 9 годин, при підвищеній температурі, наприклад, від 80 до 160°C , переважно від 100 до 150°C , зокрема при 110°C .

Сполуки формули (I) згідно з винаходом проявляють не передбачуваний цінний фармакологічний спектр дії.

Сполуки формули (I) згідно з винаходом викликають релаксацію судин та блокують агрегацію тромбоцитів, вони приводять до зниження тиску крові та покращення коронарного кровообігу. В основі цих ефектів лежить безпосередня стимуляція розчинної гуанілатциклази та підвищення вмісту cGMP всередині клітини. Крім того, сполуки формули (I) згідно з винаходом посилюють дію речовин, які підвищують рівень cGMP, наприклад, EDRF (фактору релаксації із ендотелію), NO-донорів, протопорфірину IX, арахідонової кислоти або похідних фенілгідрозину.

Тому вони можуть бути застосовані у медикаментах для лікування серцево-судинних захворювань, наприклад, для лікування гіпертонії та серцевої недостатності, хронічної та гострої стенокардії, захворювань периферійних та коронарних судин, аритмії, для лікування таких тромбоемболічних захворювань та ішемії, як інфаркт міокарда, інсульт, перемишування та ішемічні напади, порушення периферійного кровообігу, для запобігання рестенозів, наприклад, після тромболітичних терапій, перкутанної транслюмінальної ангіопластичної операції (PTA), перкутанної транслюмінальної пластичної операції на коронарних судинах (PTCA), після шунтування, а також для лікування артеріосклерозу, астматичних захворювань та захворювань сечостатевої системи, наприклад, гіпертрофії передміхурової залози, порушення ерекції, жіночих сексуальних розладах, остеопорозу, глаукоми, легеневої гіпертонії, парезу шлунку та нетримання.

Сполуки формули (I) згідно з винаходом можуть бути використані і для лікування захворювань центральної нервової системи, що відзначені порушеннями NO/cGMP-системи. Зокрема, вони є придатними для покращення сприйняття, підвищення концентрації уваги, покращення здатності до вивчення або пом'яті після розладів пізнавальних функцій, які виникають зокрема при таких обумовлених ситуацією та хворобою синдромах, як легке погіршення функцій, пов'язаних зі сприйняттям ("mild cognitive impairment"), пов'язані з віком порушення здатності до вивчення та пам'яті, пов'язані з віком провали в пам'яті, судинне слабоумство, травми черепа та мозку, інсульт, слабоумство як наслідок інсульту ("post stroke dementia"), посттравматичний стан, пов'язаний із травмою черепа та мозку, загальні порушення концентрації уваги, порушення концентрації уваги у дітей, що мають проблеми з навчанням і запам'ятовуванням, хвороба Альцгеймера, слабоумство, обумовлене тільцями Леві, слабоумство з дегенерацією лобової частини, включаючи синдром Піка, хворобу Паркінсона, прогресуючий ядерний параліч, слабоумство з кортикобазальною дегенерацією, аміолатеральний склероз (ALS), хворобу Хантінгтона, розсіяний склероз, таламічну дегенерацію, слабоумство Кройтцфельда-Якоба, слабоумство при Віл-інфекціях, шизофренію із слабоумством або психоз Корсакова. Вони також можуть бути застосовані для лікування таких захворювань центральної нервової системи, як стан страху, напруги та депресії, пов'язані з центральною нервовою системою сексуальні розлади та порушення сну, а також для регуляції відхилень при вживанні жарчових продуктів, виробів смакової промисловості та наркотичних речовин.

Крім того сполуки формули (I) згідно з винаходом придатні також для регуляції церебрального кровообігу та є ефективні засоби для боротьби з мігренню.

Сполуки формули (I) згідно з винаходом підходять також для профілактики та лікування таких наслідків церебрального інфарктного процесу (Aroplexia cerebri), як інсульт, церебральні ішемії та травми черепа та мозку. Вони також можуть бути використані для боротьби з больовими синдромами.

До того ж сполуки формули (I) згідно з винаходом проявляють протизапальну дію і тому вони можуть бути використані як протизапальні засоби.

Крім того даний винахід охоплює також комбінації щонайменше однієї сполуки формули (I) згідно з винаходом та одного або кількох органічних нітратів або NO-донорів.

В рамках даного винаходу органічні нітрати та NO-донори загалом є речовинами, терапевтична активність яких виявляється через вивільнення NO або видів NO. Прикладами таких речовин є нітроприсид натрію, нітрогліцерин, динітрат ізосорбїду, мононітрат ізосорбїду, молсидомін та SIN-1.

Крім того даний винахід охоплює комбінації однієї або декількох сполук, які інгібують розпад циклічного гуанозинмонофосфату (cGMP). Переважно вони є інгібіторами фосфодіестераз 1, 2 та 5; за номенклатурою [Beavo та Reifsnnyder (1990) TIPS 11, стор.150-155]. Особливу перевагу при

цьому надають інгібіторам фосфодіестерази 5 (V-інгібітори PDE), зокрема, однією із сполук є силденафіл [Viagra™, EP-A 0463756, WO 94/28902], варденафіл [WO 99/24433] або тадалафіл [WO 95/19978]. Ці інгібітори підсилюють дію сполук згідно з винаходом та покращують бажаний фармакологічний ефект.

Біологічні дослідження

Дія релаксації судин in vitro

Кроликів оглушають ударом у потилицю та знекровлюють. Витягають аорту, вивільняють її від зв'язаних з нею тканин, розділяють на кільця шириною 1,5мм та кожне окремо переносять з попереднім натягом у ванну об'ємом 5мл, які містять нагрітий до 37°C насичений карбогеном розчин Кребса-Гензелейта такого складу (mM): NaCl: 119; KCl: 4,8; CaCl₂×2H₂O: 1; MgSO₄×7H₂O: 1,4; KH₂PO₄: 1,2; NaHCO₃: 25; глюкоза: 10. Силу скорочення визначають за допомогою Statham UC-2-клітин, підсилюють та оцифровують його A/D-перетворювачем (DAS-1802 HC, Keithley, Instruments, Мюнхен), а також паралельно з цим реєструють його за допомогою самописа. Скорочення викликають кумулятивним додаванням у ванну фенілефрину при збільшенні концентрації. Після декількох контрольних циклів досліджувану речовину оцінюють, підвищуючи при цьому її дозу на кожнім наступному етапі оцінювання, та порівнюють показник скорочення з отриманим на попередньому етапі значенням. Виходячи з цього, визначають концентрацію, необхідну для зниження отриманого в контрольному дослідженні значення на 50% (IC₅₀)- Стандартний об'єм нанесення складає 5мкл, вміст DMSO у розчині у ванні відповідає значенню 0,1%.

Значення IC₅₀ для сполуки із прикладу 1 дорівнює 670нМ, відповідне значення для сполуки із прикладу 8 дорівнює 500нМ.

Зразок дослідження на кроликах

Дорослі самці кроликів шиншила вагою 3-5кг після надходження кілька днів адаптуються в однакових умовах. Вони мають вільний доступ до води та два рази на день можуть приймати корм. Тварин тримають в режимі 10/14 діб (світло включають з 8.00 години), температура приміщення становить 22-24°C.

Кожна піддослідна група складається із 3-6 тварин, яких зважують безпосередньо перед початком дослідження. Для внутрішньовенного введення речовини розчиняють у транскутолі (GATTEFOSSE GmbH) та розводять у співвідношенні 3/7 20%-ним розчином кремофору (Cremophor (BASF), у воді). Речовину із розрахунку 0,5мл/кг вводять у вушну вену. Для ін'єкції розчинних у воді речовин використовують 0,9%-ний розчин хлористого натрію.

Для перорального введення досліджувані речовини розчиняють у суміші гліцерину, води та поліетиленгліколю в співвідношенні 6:10:9,69 та вводять через глотковий зонд у кількості 1мл/кг.

У стані спокою статевий орган кролика не видно, він повністю покритий шкірою статевого органа. Ерекцію оцінюють, визначаючи довжину виступаючого статевого органа за допомогою штангенциркуля. Вимірювання проводять через 5, 10, 15, 30, 45, 60 та 120 хвилин після введення

речовини, а при пероральному введенні на додатково ще через 3, 4, 5 та 6 годин. Для цього тварин щораз витягають із клітки, тримають їх за шерсть на зашийку та задні лапи, повертають на спину та здійснюють вимірювання. Проводять відповідні контрольні дослідження з одним розчинником [див.: E.Bischoff, K.Schneider, Int. J. of Impotence Res. 2001, 13, 230-235; E.Bischoff, U.Niewoehner, H.Haning, M.Es Sayed, T.Schenke, K.H.Schlemmer, The Journal of Urology, 2001, 165, 1316-1318; E.Bischoff, Int. J. Impotence Res. 2001, 13, 146-148].

Мінімальна ефективна доза сполуки із прикладу 8 при пероральному введенні становить 0,03мг/кг (при одночасному внутрішньовенному введенні нітропрусида натрію SNP у дозі 0,2мг/кг).

Визначення фармакокінетичних показників після внутрішньовенного та перорального введення

Досліджувану речовину вводять тваринам (наприклад, мишам, пацюкам, собакам) внутрішньовенно у вигляді розчину, пероральне введення здійснюють у вигляді розчину або суспензії через глотковий зонд. Після введення речовини у визначені інтервали часу у тварин беруть кров, обробляють її гепарином та після цього центрифугуванням одержують з неї плазму. Кількісне визначення речовини в плазмі проводять за допомогою рідинної хроматомас-спектрометрії. На основі отриманих таким чином співвідношень концентрації в плазмі та часу розраховують фармакокінетичні показники за допомогою сертифікованої фармакокінетичної обчислювальної програми.

Після перорального введення 0,3 та 1,0мг/кг (у вигляді розчину в суміші солутолу, етанолу та води в співвідношенні 1:1:8) пацюкам сполука із прикладу 8 має наведені далі концентрації в плазмі (AUC):

AUC_{norm} (0,3мг/кг)=0,326[кг*год/л]

AUC_{norm} (1,0мг/кг)=0,548[кг*год/л]

Інгібування Ферментів иитохром-p450

Потенціал інгібування P-450 ізоферментів, що мають велике значення для метаболізму, досліджують в автоматичному режимі у 96-ямковому форматі. При цьому використовують два різних зразки проведення дослідження.

У дослідженні, заснованому на утворенні флуоресціюючих метаболітів, використовують рекомбінантні ферменти (наприклад, CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 або 3A4) та в загальному випадку субстрати, які включають флуоресційні або кумаринні структури. У кожнім окремому випадку використовують одну концентрацію субстрату та 8 концентрації потенційного інгібітору. Після інкубування відповідним рекомбінантним CYP ферментом за допомогою флуоресцентного аналізатора визначають кількість флуоресціюючих метаболітів, порівнюють з контрольною групою (без інгібітору) та розраховують значення IC₅₀ [Anal. Biochem. 248, 188 (1997)].

В другому дослідженні як джерело ферментів використовують мікросоми печінки людини, а як субстрати, селективні по відношенню до CYP-ізоформ, використовують фенацетин (CYP1A2), диклофенак (CYP2C9), декстрометорфан (CYP2D6) та мідазолам (CYP3A4). Утворення відповідних метаболітів визначають за допомогою рідинної хроматомас-спектрометрії. Припустивши,

що інгібування має конкурентний характер, в результаті зменшення утворення метаболітів розраховують K_1 -значення у порівнянні з контрольними групами (1 концентрація субстрату та 3 концентрації інгібітору).

Індукція ферментів цитохром-р450 в культурах клітин печінки людини

Для дослідження потенціалу побічної дії речовин згідно з винаходом по відношенні до індукції ферментів цитохром-р450 протягом 8 днів між двома шарами колагену в 24-ямковому планшеті для мікротитрування при 37°C у 5% CO₂ культивують первинні гепатоцити людини із щільністю клітини $2,5 \times 10^5$ клітин. Середовище для культивування клітин змінюють щодня.

Через 48 годин культивування гепатоцити протягом 5 днів двічі обробляють різними концентраціями досліджуваних речовин та порівнюють їх з

такими індукторами, як рифампіцин (RIF, 50мкМ), омепразол (ОМЕ, 100мкМ) та фенобарбітал (РВ, 2мМ). Кінцеві концентрації досліджуваних речовин становлять від 0,01 до 10мкг/мл.

На 8 день у клітинних культурах визначають індуктивний ефект досліджуваних речовин на утворення ферментів цитохром (СYP)-P450 1A2, 2B6, 2C19 і 3A4 шляхом додавання як субстратів 7-етоксирезорифуну (СYP1A2), [¹⁴C]-S-мефенітоїну (СYP2B6 та 2C19) та [¹⁴C]-тестостерону (СYP3A4). На підставі визначених активностей ферментів СYP1A2, 2B6, 2C19 та 3A4 в оброблених клітинах у порівнянні із необробленими клітинами визначають індуктивний потенціал досліджуваних речовин. У наведеній нижче таблиці вказані результати для сполуки з прикладу 8 у порівнянні з індукторами RIF, РВ та ОМЕ:

Таблиця

Індуктивний вплив на активності ферментів печінки в культурах гепатоцитів людини через 8 днів інкубування (нормоване)

	Концентрація	СYP1A2	СYP2B6	СYP2C19	СYP3A4
Контроль	0	1,0	1,0	1,0	1,0
RIF	50мкмоль/л	н.в.	5,15	15,21	9,15
РВ	2000мкмоль/л	н.в.	14,69	4,00	6,70
ОМЕ	100мкмоль/л	28,57	1,54	1,61	1,45
Приклад 8	0,01мкг/мл	0,76	1,92	1,30	1,37
	0,1мкг/мл	0,70	1,62	1,30	1,60
	1,0мкг/мл	0,90	1,85	1,12	1,51
	10мкг/мл	1,38	2,54	1,97	3,47

н.в. означає не визначено

Іншим об'єктом даного винаходу є лікарські засоби, що містять щонайменше одну сполуку згідно з винаходом, переважно разом із одним або кількома фармакологічно прийнятними допоміжними речовинами або носіями, а також їх використання для вказаних вище цілей.

Активна речовина може проявляти систематичну та/або місцеву дія. З цією метою його застосовують відповідним способом, наприклад, перорально, парентерально, через легені, назально, сублінгвально, лінгвально, букально, ректально, вводять через шкіру, через кон'юнктиву, використовують локально або у виді імплантанту.

Для цих способів введення активна речовина може бути використана у відповідних лікарських формах.

Для перорального прийому придатними є відомі лікарські форми, які швидко та/або в модифікованому режимі вивільняють активну речовину, наприклад, такі як таблетки (без покриття, а також таблетки з покриттям, наприклад, таблетки, покриті стійким по відношенню до шлункового соку шаром, або таблетки у целофановій упаковці), капсули, драже, грануляти, пігулки, порошки, емульсії, суспензії, розчини та аерозолі.

Парентеральне введення можна здійснювати при виключенні процесу резорбції (внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, інтракардіальним, інтраспінальним або інтралюмбальним способом)

або включаючи процес резорбції (внутрішньом'язовим, підшкірним способом, у шкіру, через шкіру або внутрішньочеревним способом). Для парентерального введення поряд з іншими можуть бути застосовані такі лікарські форми, як композиції для ін'єкцій та вливань у вигляді розчинів, суспензій, емульсій, ліофілізатів та стерильних порошоків.

Для інших способів введення придатними є, наприклад, лікарські форми для інгаляцій (в тому числі порошоків інгаляторів, аерозольні інгалятори), краплі або розчини в ніс, аерозолі; таблетки або капсули на язик, під язик або за щоку, супозиторії, лікарські форми для введення у вуха або очі, вагінальні капсули, водні суспензії (цілющі бальзами, мікстури, які треба струшувати), ліпофільні суспензії, мазі, креми, молочко, паста, присипки або імплантати, наприклад, стенти.

Активні речовини відомими способами можуть бути перетворені у відповідні форми застосування. З цією метою використовують інертні нетоксичні фармацевтично прийнятні допоміжні речовини. До них належать носії (наприклад, мікрокристалічна целюлоза), розчинники (наприклад, рідкі поліетиленгліколи), емульгатори (наприклад, додецилсульфат натрію), диспергатори (наприклад, полівінілпіролідон), синтетичні та натуральні біополімери (наприклад, альбумін), стабілізатори (наприклад, такі антиоксиданти, як аскорбінова кислота), барвники (наприклад, такі неорганічні пігменти, як ок-

сиди заліза) або добавки для коригування смаку та/або запаху. В разі необхідності, активна речовина одного або декількох вказаних вище носії може також бути представлена у мікрокапсульованій формі.

Терапевтично ефективна сполука формули (I) повинна входити до складу названих вище фармацевтичних композицій у концентрації від приблизно 0,1 до 99,5 ваг.%, переважно від приблизно 0,5 до 95 ваг.% від усієї суміші.

Приведені вище фармацевтичні композиції поряд зі сполукою формули (I) згідно з винаходом можуть містити також інші фармацевтичні активні речовини.

У загальному випадку для досягнення бажаних результатів як при лікуванні людей, так і у ветеринарній медицині ефективним виявилось введення активної речовини згідно з винаходом у загальній кількості від приблизно 0,001 до приблизно 50, переважно від 0,001 до 10 мг на кілограм ваги тіла, кожні 24 години, в разі необхідності, у формі кількох окремих доз. Окрема доза містить від приблизно 0,001 до приблизно 30, зокрема від 0,001 до 3 мг активної речовини згідно з винаходом на кілограм ваги тіла.

Нижче наведені переважні приклади, які більш детально ілюструють даний винахід, але в жодному разі не обмежують обсяг його охорони. Якщо не зазначено нічого іншого, всі кількісні дані стосуються ваг.%. Співвідношення розчинників, пропорції розведення та дані щодо концентрацій розчинів рідина/рідина в кожному окремому випадку стосуються об'єму.

Скорочення

ACN	ацетонітрил,
BABA	н-бутилацетат/н-бутанол/льодяна оцтова кислота/фосфатний буфер рН 6 (50 : 9 : 25.15; орг. фаза),
DC	тонкошарова хроматографія,
DCI	пряма хімічна іонізація (при MS)
DCM	дихлорметан,
DIEA	N,N-діізопропілетиламін,
DMSO	диметилсульфоксид,
DMF	N,N-диметилформамід,
від. теор.	від теоретичного,
EE	етилацетат (етиловий естер оцтової кислоти),
EI	іонізація при електронному ударі (при MS),
ESI	іонізація електророзпилюванням (при MS),
Т.пл.	температура плавлення,
нас.	насичений,
год.	години,
HPLC	високоєфективна рідинна хроматографія (при високому тиску),
конц.	концентрований,
LC-MS	рідинна хроматомаспектроскопія,
LDA	літій-діізопропіламід,
MCPBA	м-хлорпероксибензойна кислота,
MS	маспектроскопія,
NMR	спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР),
ВІДСОТ.	відсотковий,
Rf	індекс утримування (при тонкошаровій хроматографії),

RP-HPLC HPLC зі зворотними фазами,
RT кімнатна температура,
Rt час утримування (при HPLC),
THF тетрагідрофуран.

Розчинники для тонкошарової хроматографії
T1 E1: толуол - етиловий естер оцтової кислоти (1:1)

T1 EtOH1: толуол - етанол (1:1)

C1 E1: циклогексан - етиловий естер оцтової кислоти (1:1)

C1 E2: циклогексан - етиловий естер оцтової кислоти (1:2)

LCMS- та HPLC-методи

Метод 1 (LCMS)

Інструмент: Micromass Platform LCZ, HP1100;
колонна: Symmetry C18, 50мм×2,1мм, 3,5мкм;
елюент А: ацетонітрил + 0,1% мурашиної кислоти,
елюент В: вода + 0,1% мурашиної кислоти; градієнт: 0,0хв. 10%А→4,0хв. 90%А→6,0хв. 90%А; піч: 40°C; потік: 0,5мл/хв.; УФ-детектор: 208-400нм.

Метод 2 (LCMS)

Інструмент: Micromass Quattro LCZ, HP1100;
колонна: Symmetry C18, 50мм×2,1мм, 3,5мкм;
елюент А: ацетонітрил + 0,1% мурашиної кислоти,
елюент В: вода + 0,1% мурашиної кислоти; градієнт: 0,0хв. 10%А→4,0хв. 90%А→6,0хв. 90%А; піч: 40°C; потік: 0,5мл/хв.; УФ-детектор: 208-400нм.

Метод 3 (LCMS)

Інструмент: Waters Alliance 2790 LC; колонна: Symmetry C18, 50мм×2,1мм, 3,5мкм; елюент А: вода + 0,1% мурашиної кислоти, елюент В: ацетонітрил + 0,1% мурашиної кислоти; градієнт: 0,0хв. 5%В→5,0хв. 10%В→6,0хв. 10%В; температура: 50°C; потік: 1,0мл/хв.; УФ-детектор: 210нм.

Метод 4 (HPLC)

Інструмент: HP 1100 з цифровим діод-матричним детектором (DAD); колонна: Kromasil RP-18, 60мм×2мм, 3,5мкм; елюєнти: А=5мл HClO₄/л H₂O, В=ACN; градієнт: 0хв. 2%В, 0,5хв. 2%В, 4,5хв. 90%В, 6,5хв. 90%В; потік: 0,75мл/хв.; температура: 30°C; УФ-детектор: 210нм.

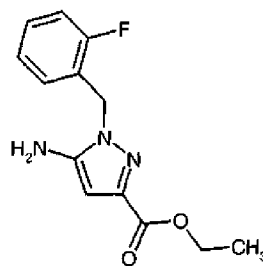
Препаративний метод RP-HPLC

Колонна: YMC-Gel; елюент: ацетонітрил/вода (градієнт); потік: 50мл/хв.; температура: 25°C; УФ-детектор: 210нм.

Вихідні сполуки:

Приклад 1А

Етиловий естер 5-аміно-1-(2-фторбензил)піразол-3-карбонової кислоти

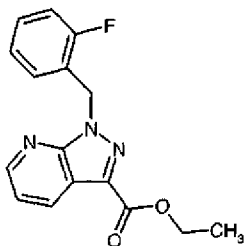


100г (0,613моль) натрієвої солі етилового естеру ціанопіровиноградної кислоти [за аналогією з Borsche та Manteuffel, Liebigs Ann. 1934, 512, 97] при ретельному перемішуванні в атмосфері аргону при кімнатній температурі поміщають у 2,5л

діоксану, додають 111,75г (75мл, 0,98моль) трифтороцтової кислоти та перемішують протягом 10 хвилин, причому більша частина едикту переходить у розчин. Після цього додають 85,93г (0,613моль) 2-фторбензилгідразину та кип'ятять протягом ночі. Після охолодження відсмоктують кристали трифторацетату натрію, що випали в осад, промивають діоксаном та розчин без очищення піддають подальшій взаємодії.

Приклад 2А

Етиловий естер 1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-карбонової кислоти



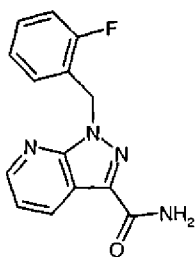
В одержаний з прикладу 1А розчин додають 61,25мл (60,77г, 0,613моль) диметиламіноакролеїну та 56,28мл (83,88г, 0,736моль) трифтороцтової кислоти та в атмосфері аргону кип'ятять протягом 3 днів. Після цього розчинник випаровують у вакуумі, залишок поміщають у 2л води та тричі екстрагують відповідно 1л етилового естеру оцтової кислоти. Об'єднані органічні фази висушують сульфатом магнію та випарюють на роторному випарнику. Хроматографують на 2,5кг силікагелю та вимивають градієнтом толуол/толуол-етиловий естер оцтової кислоти = 4:1. Вихід: 91,6г (49,9% від теор. на двох стадіях).

Температура плавлення 85°C

$R_f(\text{SiO}_2, \text{T1 E1})$: 0,83

Приклад 3А

1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-карбоксамід

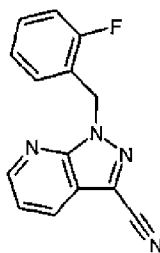


10,18г (34ммоль) одержаного в прикладі 2А естеру поміщають в 150мл метанолу насиченого аміаком при 0-10°C. Два дні перемішують при кімнатній температурі та концентрують у вакуумі.

$R_f(\text{SiO}_2, \text{T1 E1})$: 0,33

Приклад 4А

3-ціано-1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин



36,1г (133ммоль) 1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-карбоксаміду з прикладу 3А розчиняють в 330мл THF та додають 27г (341ммоль) піридину. Після цього протягом 10 хвилин додають 47,76мл (71,66г, 341ммоль) ангідриду трифтороцтової кислоти, причому температуру збільшують до 40°C. Протягом ночі перемішують при кімнатній температурі. Потім реакційну суміш поміщають у 1л води та тричі екстрагують відповідно 0,5л етилового естеру оцтової кислоти. Органічну фазу промивають насиченим розчином гідрокарбонату натрію та 1N соляною кислотою, висушують сульфатом магнію та випарюють на роторному випарнику.

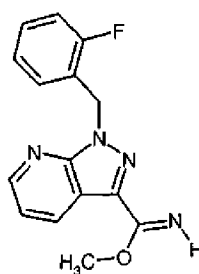
Вихід: 33,7г (100% від теор.)

Температура плавлення: 81°C

$R_f(\text{SiO}_2, \text{T1 E1})$: 0,74

Приклад 5А

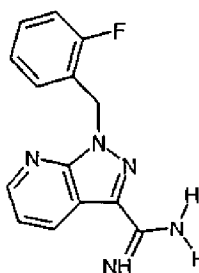
Метилловий естер (2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-карбоксамідної кислоти



30,37г (562ммоль) метилату натрію розчиняють в 1,5л метанолу та додають 36,45г (144,5ммоль) 3-ціано-1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридину (з прикладу 4А). Протягом 2 годин перемішують при кімнатній температурі та одержаний розчин в такому вигляді використовують на наступній стадії.

Приклад 6А

1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-карбоксамідину



До одержаного з прикладу 5А розчину метилового естеру (2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-

b) піридин-3-карбоксімідної кислоти в метанолі додають в 33,76г (32,19мл, 562ммоль) крижаної оцтової кислоти та 9,28г (173ммоль) хлориду амонію та протягом ночі перемішують та кип'ятять зі зворотним холодильником. Розчинник випаровують у вакуумі, залишок ретельно розтирають з ацетоном, тверду речовину, яка випала в осад, відсмоктують, поміщають в 2л води, при перемішуванні додають 31,8г карбонату натрію та тричі екстрагують 1л етилового естеру оцтової кислоти, органічну фазу висушують сульфатом магнію та випаровують у вакуумі.

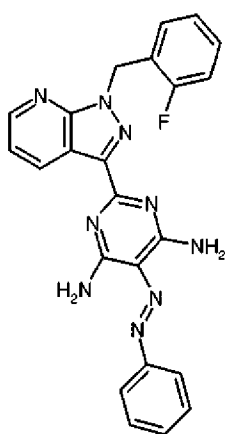
Вихід: 27,5г (76,4% від теор. на двох стадіях)

Температура плавлення: 86°C

$R_f(\text{SiO}_2, \text{T1 EtOH1})$: 0,08

Приклад 7A

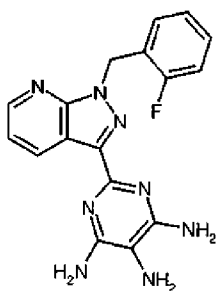
2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-5-[(E)фенілдіазеніл]-4,6-піримідиндіамін



До розчину 21,92г (71,7ммоль) 1-(2-фторбензил)1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-карбоксамідину з прикладу 6A в N,N-диметилформаміді при перемішуванні додають 3,87г метанолату натрію та після цього 12,2г (71,7ммоль) фенілазомалонітрилу [L. F. Cavalieri, J. F. Tanker, A. Bendich, J. Am. Chem. Soc, 1949, 71, 533]. Протягом ночі перемішують при температурі 110°C та дають розчину охолонути. Тверду речовину, яка випала в осад, відсмоктують та промивають етанолом після висушування одержують 23г (73% від теор.) цільової сполуки.

Приклад 8A

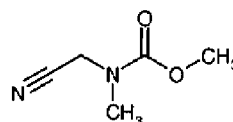
Тригідрохлорид 2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-4,5,6-піримідинтриаміну



У 60мл DMF протягом 22 годин при тиску водню 65бар та температурі 62°C гідрують 5г (11,38ммоль) 2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-5-[(E)-фенілдіазеніл]-4,6-піримідиндіаміну з прикладу 7A з 800мг 50%-ного нікелю Ренея у воді. Відсмоктують каталізатором через кізельгур, розчин випарюють у вакуумі та перемішують з 5N соляною кислотою. Речовину жовто-коричневого кольору, що випала в осад, відсмоктують та висушують. Одержують 3,1г (59,3% від теор.) цільової сполуки. Вільну основу одержують струшуванням з розведеним розчином гідрокарбонату натрію та екстрагують етиловим естером оцтової кислоти. Нерозчинну в обох фазах тверду речовину відсмоктують. Фаза етилового естеру оцтової кислоти також містить незначну кількість вільної основи.

Приклад 9A

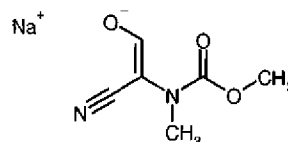
Метилціанометил(метил)карбамат



Одержання аналогічно до: [Q. Li, Chu, T. W. Daniel, A. Claiborne, C S. Cooper, C. M. Lee, J. Med. Chem. 1996, 39, 3070-3088].

Приклад 10A

Натрій-(E)-2-ціано-2-[(метоксикарбоніл)(метил)аміно]етанолат



В атмосфері аргону до тетрагідрофурану додають 0,46г (0,01ммоль) метилату натрію (розчин А). Після цього в 1,73г (0,02ммоль) етилового естеру мурашиної кислоти додають 1,00г (0,01ммоль) метилціанометил(метил)карбамату з прикладу 9A. До цієї суміші повільно та обережно по краплях додають розчин А. Протягом ночі перемішують при кімнатній температурі. Розчинник відганяють на роторному випарнику у вакуумі, а до залишку додають діетиловий етер. Кристали, що випадають в осад, відсмоктують та висушують у високому вакуумі.

Вихід: 1,05г (76% від теор.)

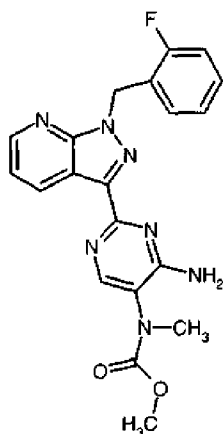
HPLC (метод 4): $R_t=1,35\text{хв}$.

$^1\text{H-NMR}$ (200Мгц, DMSO-d_6): $\delta = 2,90$ (д, 1H), 3,35 (с, 3H), 3,47 (с, 3H).

Приклади

Приклад 1

Етил-4-аміно-2-[1-(2-фторбензил)-1H-піразоло[3,4-b]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(метил)карбамат



В атмосфері аргону до 0,80г (2,61ммоль) 1-(2-фторбензил)1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-карбоксамідину з прикладу 6А додають 0,51г (2,86ммоль) натрій-(*E*)-2-ціано-2-[(метоксикарбоніл)(метил)аміно]етанолат з прикладу 10А та 0,53г 0,73мл (5,23ммоль) триетиламіну в 50мл толуолу. Протягом 9 годин кип'яють зі зворотним холодильником. Після цього знову охолоджують до кімнатної температури, додають дихлорметан та воду та екстрагують. Органічну фазу висушують над сульфатом магнію, відфільтровують та випарують у вакуумі на роторному випарнику. До залишку додають 5 мл діетилового етеру та кристалізують. Кристали відсмоктують, висушують та очищають за допомогою препаративним методом RP-HPLC.

Вихід: 20,2мг (2% від теор.)

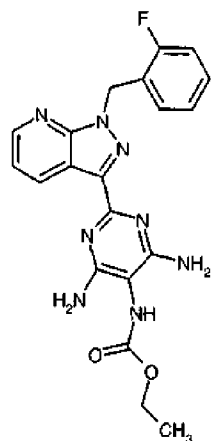
LC/MS (метод 2): $R_t=3,01$ хв.

MS (EI): $m/z=408$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (300МГц, DMSO-*d*₆): $\delta = 3,09$ (с, 3H), 3,29 (с, 3H), 5,83 (с, 2H), 7,09-7,42 (м, 5H), 8,20 (с, 1H), 8,64 (дд, 1H), 8,94 (дд, 1H), 9,27 (ш. с, 2H).

Приклад 2

Етил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамат



До 5мл піридину додають 107,35мг (0,31ммоль) тригідрохлориду 2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-іл]-4,5,6-піримідинтриаміну з прикладу 8А та суміш охолоджують до 0°C. Потім додають 33,25мг (0,31ммоль) етилового естеру хлормурашиної кислоти та протягом ночі перемішують при кімнатній температурі. Піридин відганяють у вакуумі на роторному випарнику, а залишок очищають препаративним методом RP-HPLC.

Вихід: 56,2мг (43% від теор.)

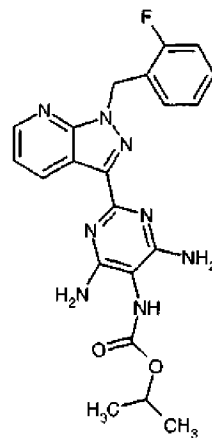
LC/MS (метод 1): $R_t=2,66$ хв.

MS (EI): $m/z=423$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (300МГц, DMSO-*d*₆): $\delta = 1,17$ -1,33 (м, 3H), 3,97-4,14 (м, 2H), 5,80 (с, 2H), 6,14 (ш. с, 4H), 7,07-7,17 (м, 2H), 7,22 (т, 1H), 7,29-7,40 (м, 2H), 7,97 (ш. с, 1H), 8,60 (д, 1H), 9,07 (д, 1H).

Приклад 3

Ізопропіл-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамат



Одержання аналогічно до прикладу 2 із додаванням 150мг трихлориду (0,43ммоль) 2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-іл]-4,5,6-піримідинтриаміну з прикладу 8А, 7,5мл піридину та 52,47мг (0,43ммоль) ізопропілхлороформату. Залишок поміщають у суміш з дихлорметану та метанолу, відфільтровують та висушують.

Вихід: 165мг (88% від теор.)

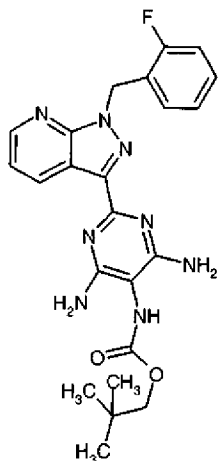
LC/MS (метод 1): $R_t=2,84$ хв.

MS (EI): $m/z=437$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (300МГц, DMSO-*d*₆): $\delta = 1,26$ (д, 6H), 4,82 (квін., 1H), 5,92 (с, 2H), 7,07-7,20 (м, 2H), 7,25 (т, 1H), 7,31-7,43 (м, 2H), 7,47-7,57 (м, 1H), 8,16 (ш. с, 1H), 8,74 (дд, 1H), 8,98 (дд, 1H).

Приклад 4

Неопентил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-*b*]-піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамат



Одержання аналогічно до прикладу 2 із додаванням 100мг (0,29ммоль) трихлориду 2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-4,5,6-піримідинтриаміну з прикладу 8А, 5мл піридину та 43мг (0,29ммоль) неопентилхлоридокарбонату.

Вихід: 54мг (41% від теор.)

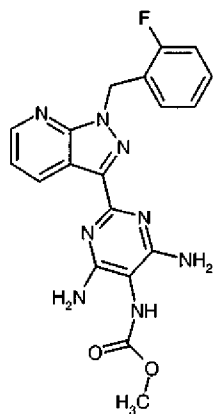
LC/MS (метод 1): $R_t=3,10$ хв.

MS (EI): $m/z=465$ (M+H)⁺

¹Н-ЯМР (400МГц, DMSO-d₆): $\delta = 0,95$ (ш. с, 9Н), 3,74 (с, 2Н), 5,79 (с, 2Н), 6,10 (ш. с, 4Н), 7,08-7,17 (м, 2Н), 7,22 (т, 1Н), 7,29-7,39 (м, 2Н), 8,00 (ш. с, 1Н), 8,60 (дд, 1Н), 9,06 (дд, 1Н).

Приклад 5

Метил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамат



У 30мл піридину розчиняють 30,5г (87,0ммоль) тригідрохлориду 2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-4,5,6-піримідинтриаміну з прикладу 8А. Одержаний розчин охолоджують до 0°C. Додають 8,22г (87,0ммоль) метилового ефіру хлормурашиної кислоти та перемішують ще 2 години при 0°C. Після цього дають нагрітися до кімнатної температури та перемішують ще 12 годин. Після розпарювання у вакуумі промивають залишок водою та висушують. Для подальшого очищення перемішують

ють з 300мл киплячого діетилового етеру. Продукт, що випадає, відсмоккують та висушують у вакуумі.

Вихід: 32,6г (92% від теор.)

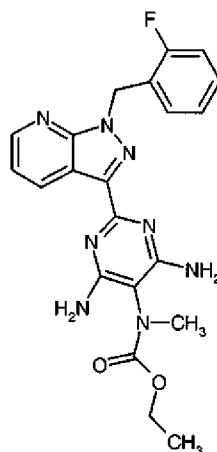
LC/MS (метод 1): $R_t=2,61$ хв.

MS (EI): $m/z=409$ (M+H)⁺

¹Н-ЯМР (400МГц, DMSO-d₆): $\delta = 3,61$ (с, 3Н), 5,80 (с, 2Н), 6,19 (ш. с, 4Н), 7,08-7,16 (м, 2Н), 7,22 (т, 1Н), 7,28-7,39 (м, 2Н), 7,99 (ш. с, 1Н), 8,60 (дд, 1Н), 9,05 (дд, 1Н).

Приклад 6

Етил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(метил)карбамат



54мг (0,13ммоль) етил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамату з прикладу 3 поміщають в 5мл DMF, суміш охолоджують до 0°C та додають 7,67мг (0,19ммоль) гідриду натрію. Після цього по краплях додають 18,14мг (0,13ммоль) йод метану та протягом години перемішують. У суміш додають воду та екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні фази висушують сульфатом магнію та випарюють на роторному випарнику. Залишок спочатку очищують колонковим хроматогуванням (розчинник: дихлорметан/метанол = 10:1) та після цього методом препаративної RP-HPLC.

Вихід: 32мг (58% від теор.)

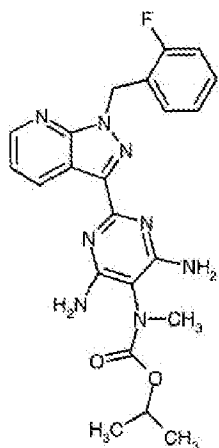
LC/MS (метод 2): $R_t=2,91$ хв.

MS (EI): $m/z=437$ (M+H)⁺

¹Н-ЯМР (200МГц, DMSO-d₆): $\delta = 1,08$ (т, 3Н), 2,99 (с, 3Н), 2,93-4,11 (м, 2Н), 5,79 (с, 2Н), 6,35 (ш. с, 4Н), 7,06-7,14 (м, 2Н), 7,16-7,28 (м, 1Н), 7,28-7,32 (м, 2Н), 8,59 (дд, 1Н), 9,06 (дд, 1Н).

Приклад 7

Ізопропіл-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-в]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(метил)карбамат



Одержання аналогічно до прикладу 6 із додаванням 75мг (0,17ммоль) ізопропіл-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамату з прикладу 3, 10,31мг (0,26ммоль) гідриду натрію та 24,4мг (0,17ммоль) йодметану. Залишок очищують методом препаративної RP-HPLC.

Вихід: 32мг (41% від теор.)

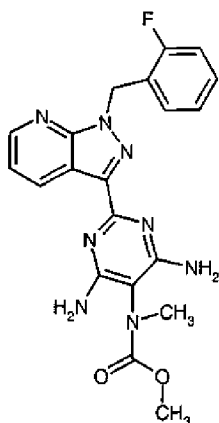
LC/MS (метод 1): $R_t=2,97$ хв.

MS (EI): $m/z=451$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (300МГц, DMSO-d₆): $\delta = 1,09$ (д, 6H), 2,98 (с, 3H), 4,80 (квін., 1H), 5,79 (с, 2H), 6,31 (ш. с, 4H), 7,05-7,16 (м, 2H), 7,22 (т, 1H), 7,28-7,40 (м, 2H), 8,59 (дд, 1H), 9,07 (дд, 1H).

Приклад 8

Метил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(метил)карбамат



Одержання аналогічно до прикладу 6 із додаванням 310мг (0,76ммоль) метил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамату з прикладу 5, 27,32мг (1,14ммоль) гідриду натрію та 215,5мг (1,52ммоль) йодметану. Для обробки у суміш додають воду, 2М розчин гідроксиду калію та екстрагують дихлорметаном. Об'єднані органічні фази висушують сульфатом магнію та випарюють на роторному випарнику. Залишок очищують методом препаративної RP-HPLC.

Вихід: 93мг (29% від теор.)

Більші кількості сполуки з прикладу 8 можуть

бути одержані відповідно до вказаного нижче способу синтезу:

У 275мл тетрагідрофурану розчиняють 20,0г (49,0ммоль) метил-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамату з прикладу 5 та охолоджують до 0°C. Протягом 15 хвилин по краплях додають 53,9мл (49,0ммоль 1М розчину у тетрагідрофурані) біс-(триметил)силіламіду літію. Перемішують 20 хвилин при 0°C та після цього додають 6,95г (53,9ммоль) йодметану. Через 1 годину дають розчину нагрітися до кімнатної температури та зупиняють реакцію шляхом додавання насиченого водного розчину хлориду амонію. Фази розділяють. Водяну фазу кілька разів екстрагують етилацетатом та дихлорметаном. Об'єднані органічні фази випарюють у вакуумі. Одержаний таким чином залишок суспендують у суміші дихлорметану та тетрагідрофурану (1:1). Нерозчинні кристали відсмоктують та поміщають у метанол. Протягом однієї години нагрівають зі зворотним холодильником. Після охолодження осад, що випав, відфільтровують. Одержану при цьому тверду речовину червоного кольору суспендують у 100мл суміші діоксану та дихлорметану (1:1) та при температурі кипіння додають 20мл метанолу до утворення прозорого розчину. Додають активоване вугілля, недовго нагрівають до кипіння та фільтрують гарячий розчин через кізельгур. Одержаний таким чином розчин випарюють до суха. Додають метанол та протягом однієї години перемішують суспензію при кімнатній температурі. Кристали білого кольору відфільтровують.

Вихід: 14,9г (72 % від теор.)

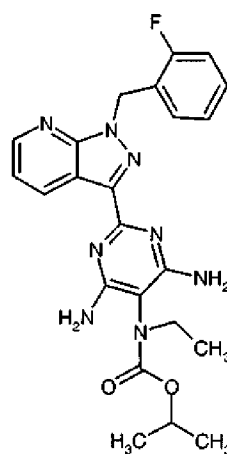
LC/MS (метод 3): $R_t=1,85$ хв.

MS (EI): $m/z=423$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (200МГц, DMSO-d₆): $\delta = 3,01$ (с, 3H), 3,57 (с, 3H), 5,92 (с, 2H), 7,05-7,17 (м, 2H), 7,18-7,46 (м, 3H), 7,47-7,61 (м, 2H), 7,59-7,97 (м, 2H), 8,71-8,81 (м, 1H), 8,97 (дд, 1H).

Приклад 9

Ізопропіл-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідиніл(етил)карбамат



Одержання аналогічно до прикладу 6 із додаванням 60мг (0,14ммоль) ізопропіл-4,6-діаміно-2-[1-(2-фторбензил)-1Н-піразоло[3,4-б]піридин-3-іл]-5-піримідинілкарбамату з прикладу 3, 4,95мг

29

(0,21ммоль) гідриду натрію та 21,4мг (0,17ммоль) йодетан. Для повного перетворення ще раз додають ту саму кількість гідриду натрію та йодетану. Залишок очищають за допомогою препаративної RP-HPLC.

Вихід: 43мг (67% від теор.)

LC/MS (метод 1): $R_t=2,97$ хв.

78314

30

MS (EI): $m/z=465$ (M+H)⁺

¹H-ЯМР (200МГц, DMSO-d₆): $\delta = 0,96-1,06$ (м, 3H), 1,09 (д, 6H), 2,79-2,93 (м, 2H), 4,82 (квін., 1H), 5,80 (с, 2H), 6,25 (ш. с, 4H), 7,01-7,14 (м, 2H), 7,15-7,50 (м, 3H), 8,60 (дд, 1H), 9,09(дд, 1H).