



(19) REPUBLIKA HRVATSKA  
DRŽAVNI ZAVOD ZA  
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(10) Identifikator  
dokumenta:

HR P20040618 A2

HR P20040618 A2

## (12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. cl.<sup>7</sup>: A 61 K 31/4418  
C 07 D 213/85  
C 07 D 417/12  
C 07 D 417/14  
A 61 P 25/00  
A 61 P 9/00  
A 61 P 29/00  
A 61 P 11/06

(21) Broj prijave u HR: P20040618A  
(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 07.07.2004.  
(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2005.  
(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP02/13432  
Datum podnošenja međunarodne prijave 28.11.2002.  
(87) Broj međunarodne objave: WO 03/053441  
Datum međunarodne objave 03.07.2003.

(31) Broj prve prijave: 101 60 661.3  
102 38 113.5

(32) Datum podnošenja prve prijave: 11.12.2001.  
21.08.2002.

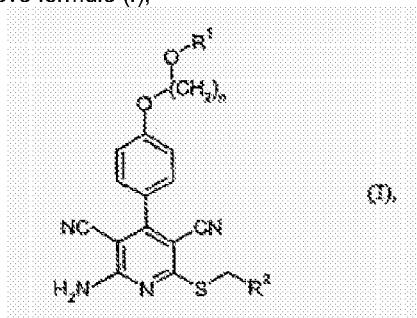
(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: DE  
DE

(71) Podnositelj prijave:  
(72) Izumitelji:

Bayer Healthcare AG, 51368 Leverkusen, DE  
Ulrich Rosentreter, Obere Rutenbeck 6, 42349 Wuppertal, DE  
Thomas Krämer, Schneewittchenweg 37, 42111 Wuppertal, DE  
Mitsuyuki Shimada, 4-7-905, Kyobata, Jikata, Higashigawa, Nara 630-8323, JP  
Walter Hübsch, Wildsteig 22, 42113 Wuppertal, DE  
Nicole Diedrichs, Laurentiusstrasse 12, 42103 Wuppertal, DE  
Thomas Krahn, Wiener Strasse 29, 58135 Hagen, DE  
Kerstin Henninger, Claudiusweg 7, 42115 Wuppertal, DE  
Johannes-Peter Stasch, Alfred-Nobel-Strasse 109, 42651 Solingen, DE  
Ralf Wischnat, Baumberger Strasse 20, 51371 Leverkusen, DE  
(74) Punomoćnik: CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma: SUPSTITUIRANI 2-TIO-3,5-DICIJANO-4-FENIL-6-AMINOPIRIDINI I NJIHOVA UPOTREBA

(57) Sažetak: Izum se odnosi na spojeve formule (I),



na postupak za njihovu proizvodnju i na njihovu upotrebu kao selektivnih liganada koji se vežu na adenozin A1 receptore.

HR P20040618 A2

## OPIS IZUMA

Predloženi izum odnosi se na supstituirane 2-tio-3,5-dicijano-4-fenil-6-aminopiridine, na postupak za njihovu pripravu i na njihovu upotrebu kao lijeka.

5

Adenozin, nukleozid iz adenina i D-riboze, je endogeni faktor koji djeluje u smislu zaštite stanica, posebno pod uvjetima koji su štetni za stanicu zbog ograničenog dovodenja kisika i supstrata, kao npr. kod ishemije u različitim organima (npr. srce i mozak).

Adenozin nastaje intracelarno kod razgradnje adenozin-5'-monofosfata (AMP) i S-adenozilhomocisteina kao među-proizvod, međutim on se može osloboditi iz stanice i tada preko vezanja na specifične receptore pokazuje funkcije kao tvar slična hormonima ili neurotransmiterima.

Pod normoksičnim uvjetima je koncentracija slobodnog adenozina u ekstracelularnom prostoru vrlo niska.

15

Međutim, ekstracelularna koncentracija adenozina dramatično se povisuje u pogođenim organima pod uvjetima ishemije, odnosno hipoksije. Tako je poznato, na primjer, da se adenozin inhibira agregacijom trombocita i da se povisuje prokrvljenost žila srčanog vijenca. Nadalje, on djeluje na srčanu frekvenciju, na oslobađanje neuro-transmitera i na diferencijaciju limfocita.

20

Cilj tih učinaka adenozina je povisiti dotok kisika pogođenim organima, odnosno prigušiti izmjenu tvari u tim organima, da bi se time metabolizam u tim organima prilagodio s njihovom prokrvljuenošću pod uvjetima ishemije ili hipoksije.

25

Djelovanje adenozina posredovano je preko specifičnih receptora. Do sada su poznati podtipovi A1, A2a, A2b i A3. Djelovanja tih adenozin receptora posredovano je s hormonom cAMP. U slučaju vezanja adenozina na A2a ili na A2b receptore, preko aktivacije adenilatciklaze vezane membranom, dolazi do porasta intracelularnog cAMP, dok vezanje adenozina na A1 ili na A3 receptore uzrokuje opadanje intracelularnog sadržaja cAMP zbog inhibicije adenilatciklaze.

30

Kao "adenozin receptor selektivni ligandi" prema izumu se označavaju takove tvari koje se vežu selektivno na jedan ili na više podtipova adenozin receptora i pri tome mogu potisnuti djelovanje adenozina (adenozin agonisti) ili mogu blokirati njegovo djelovanje (adenozin antagonisti).

35

U okviru predloženog izuma kao "selektivni" smatraju se takovi adenozin receptor ligandi koji s jedne strane imaju jasan učinak na jedan ili na više podtipova adenozin receptora, a s druge strane nemaju nikakvog učinka ili imaju jasno umanjen učinak (za faktor 10 ili manji) na jedan ili na više drugih podtipova adenozin receptora, pri čemu se kao metoda za ispitivanje selektivnog djelovanja uzima u obzir postupak opisan u odlomku A. II.

40

Selektivni ligandi na adenozin receptor mogu se podijeliti u različite razrede prema njihovoj selektivnosti receptora. Tako se oni dijele npr. na ligande koji se vežu selektivno na A1 ili na A2 receptore adenozina, a oni se dalje dijele također, na primjer, na takove koji se vežu selektivno na A2a ili na A2b receptore adenozina. Također su mogući i ligandi adenozin receptora koji se vežu selektivno na više podtipova adenozin receptora, kao npr. ligandi koji se vežu selektivno na A1 i na A2, ali ne na A3 receptore adenozina.

45

Ranije spomenuta selektivnost receptora može se utvrditi djelovanjem tvari na stanične linije koje, nakon stabilne transfekcije s odgovarajućom cDNA, ekspimiraju dotični podtip receptora (uz to vidi publikaciju M.E. Olah, H. Ren, J. Ostrowski, K.A. Jacobson, G.L. Stiles, "Cloning, expression, and characterization of the unique bovine A1 adenosine receptor, Studies on the ligand binding site by site-directed mutagenesis, u *J. Biol. Chem.* 267 (1992), stranice 10764-10770, koja publikacije je ovdje uvrštena u cijelosti kao literatura).

50

Učinak tvari na takove linije stanica može se utvrditi biokemijskim mjerenjem intracelularnog hormona cAMP (za to vidi publikaciju K.N. Klotz, J. Hessling, J. Hegler, C. Owman, B. Kull, B.B. Fredholm, M.J. Lohse, "Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes characterization of stably transfected receptors in CHO cells" u *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357 (1998), stranice 1-9, koja publikacija je ovdje u cijelom opsegu uvrštena kao literatura).

55

U slučaju A1 agonista (povezivanje ponajprije preko G<sub>i</sub>-proteina) opaža se opadanje intracelularnog sadržaja cAMP-a (ponajprije nakon izravne prethodne stimulacije adenilatciklaze s forskolinom), a u slučaju A1 antagonista opaža se porast intracelularnog sadržaja cAMP-a (ponajprije nakon prethodne stimulacije s adenozinom ili s tvarima koje su slične adenozinu i s izravnom prethodnom stimulacijom adenilatciklaze s forskolinom). A2a i A2b agonisti (povezivanje ponajprije preko G<sub>s</sub>-proteina) dovode odgovarajuće do porasta, a A2a i A2b antagonisti do opadanja sadržaja cAMP-a u stanicama. U slučaju A2 receptora nema pomoći od izravne prethodne stimulacije adenilatciklaze s forskolinom.

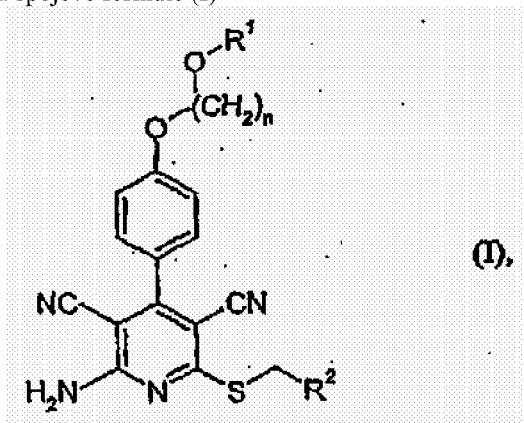
60

Kod liganada koji su iz stanja tehnike poznati kao "adenozin receptor specifični" radi se pretežno o derivatima na osnovi prirodnog adenzina (S.-A. Poulsen i R. J. Quinn, "Adenosine receptors: new opportunities for future drugs" u *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 6 (1998), stranice 619 do 641). Međutim, ti adenzin ligandi, poznati iz stanja tehnike, imaju najčešće nedostatak da oni stvarno ne djeluju receptor specifično, njihovo djelovanje je slabije od prirodnog adenzina ili nakon oralne aplikacije imaju samo vrlo slabo djelovanje. Zbog toga se oni upotrebljavaju pretežno samo za eksperimentalne svrhe.

Nadalje, iz WO 00/125210 su poznati 2-tio-3,5-dicijano-4-aril-6-aminopiridini, koji su strukturno slični spojevima izuma. Tamo opisani spojevi imaju u svakom slučaju slabija farmakokinetička svojstva, naročito tek neznatnu biološku raspoloživost nakon oralnog davanja.

Zadatak predloženog izum je sada pronaći, odnosno pripremiti spojeve koji nemaju nedostataka poznatih iz stanja tehnike, odnosno koji imaju poboljšanu biološku raspoloživost.

Predloženi izum odnosi se stoga na spojeve formule (I)



u kojoj

n je broj 2, 3 ili 4,

R<sup>1</sup> je vodik ili (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkil i

R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstituentima iz niza koji čine (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkil, halogen, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, piridilamino, tienil, furil, imidazolil, piridil, morfolinil, tiomorfolinil, piperidinil, piperazinil, N-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilpiperazinil, pirolidinil, oksazolil, izoksazolil, pirimidinil, pirazinil, prema potrebi sa (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilom supstituirani tiazolil ili prema potrebi do trostruko s halogenim, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilom ili sa (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkoksi supstituirani fenil, i na njihove soli, hidrate, hidratne soli i solvate.

Ovisno o načinu supstitucije, spojevi formule (I) mogu postojati u stereoisomernim oblicima koji se odnose kao slika i zrcalna slika (enantiomeri) ili kao spojevi koji se ne odnose kao slika i zrcalna slika (diastereomeri). Izum se odnosi kako na enantiomere ili diastereomere, tako također i na njihove proizvoljne smjese. Racemični oblici mogu se, kao i diastereomeri, na poznat način rastaviti na stereoisomere. Predloženi izum odnosi se također i na preostale tautomere spojeva formule (I) i na njihove soli.

Soli spojeva formule (I) mogu biti fiziološki nedvojbene soli tvari prema izumu s mineralnim kiselinama, karbonskim kiselinama ili sa sulfonskim kiselinama. Posebno su povoljne npr. soli s klorovodičnom kiselinom, bromo-vodičnom kiselinom, sumpornom kiselinom, fosfornom kiselinom, metansulfonskom kiselinom, etansulfonskom kiselinom, toluolsulfonskom kiselinom, benzolsulfonskom kiselinom, naftalindisulfonskom kiselinom, trifluorocetnom kiselinom, octenom kiselinom, propionskom kiselinom, mliječnom kiselinom, vinskom kiselinom, limunskom kiselinom, fumarnom kiselinom, maleinskom kiselinom ili s benzojevom kiselinom.

Kao soli također se mogu navesti i soli s uobičajenim bazama, kao na primjer soli alkalijskih metala (npr. natrijeve ili kalijeve soli), zemno alkalijske soli (npr. kalcijeve ili magnezijeve soli) ili amonijeve soli, dobivene od amonijaka ili organskih amina kao što su, na primjer, dietilamin, trietilamin, etildiizopropilamin, prokain, dibenzilamin, N-metilmorfolin, dihidroabietilamin, 1-efenamin ili metilpiperidin.

Kao hidrati, odnosno solvati nazivaju se takovi oblici spojeva formule (I) prema izumu koji u krutom ili tekućem stanju, zbog hidratacije s vodom ili koordinacije s molekulama otapala, tvore molekulu-spoj, odnosno kompleks. Primjeri hidrata su seskvihidrati, monohidrati, dihidrati ili trihidrati. Na isti način u obzir dolaze također i hidrati, odnosno solvati soli spojeva prema izumu.

Osim toga izum također obuhvaća i predlijeckove spojeva prema izumu. Kao predlijeckovi podrazumijevaju se takovi oblici spojeva formule (I), koji sami ne moraju biti biološki aktivni ili su inaktivni, međutim pod fiziološkim uvjetima se mogu prevesti u odgovarajući biološki aktivan oblik (na primjer metabolički ili solvolitički).

- 5 U okviru predloženog izuma, ukoliko nije navedeno drugačije, supstituenti imaju slijedeća značenja:  
Halogen je općenito fluor, klor, brom ili jod. Prednost imaju fluor, klor ili brom. Posve posebnu prednost imaju fluor ili klor.

10 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkil je općenito ravan ili razgranati alkilni ostatak koji ima 1 do 4 ugljikova atoma. Kao primjeri se mogu navesti metil, etil, n-propil, izopropil, n-butil, sek-butil, izobutil i terc-butil.

(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkoksi je općenito ravan ili razgranati alkoksi ostatak koji ima 1 do 4 ugljikova atoma. Kao primjeri se mogu navesti: metoksi, etoksi, n-propoksi, izopropoksi, n-butoksi, sek-butoksi, izobutoksi i terc-butoksi.

15 Prednost se daje spojevima formule (I) u kojoj

n je broj 2,

R<sup>1</sup> je vodik, metil ili etil i

20 R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstuentom iz niza koji čine metil, etil, fluor, klor, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, 2-piridilamino, 4-piridilamino, tienil, piridil, morfolinil, piperidinil, prema potrebi s metilom supstituirani tiazolil ili prema potrebi do trostruko s klorom ili metoksi supstituirani fenil, i njihovim solima, hidratima, hidratima soli i solvatima.

Posebnu prednost se daje spojevima formule (I) u kojoj R<sup>1</sup> je vodik ili metil.

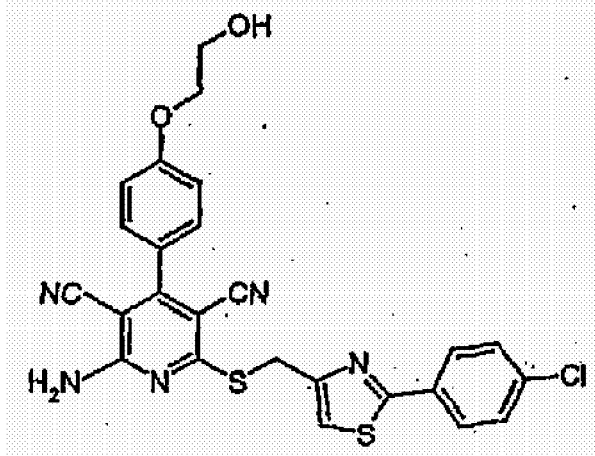
25 Posebnu prednost se daje također spojevima formule (I) u kojoj

n je broj 2,

R<sup>1</sup> je vodik ili metil i

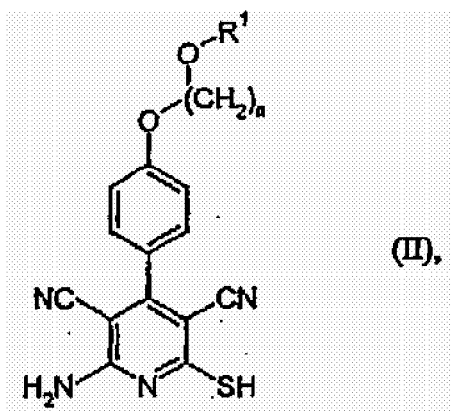
30 R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstuentom iz niza koji čine metil, klor, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, 2-piridilamino, 4-piridilamino, tienil, piridil, morfolinil, 2-metil-tiazol-5-il, fenil, 4-klorfenil ili 3,4,5-tri-metoksifenil, i njihovim solima, hidratima, hidratima soli i solvatima.

Posve posebnu prednost daje se spoju iz primjera 6 slijedeće strukture



i njegovim solima, hidratima, hidratima soli i solvatima.

35 Predmet predloženog izuma je također i postupak za proizvodnju spojeva formule(I), koji je karakteriziran time da spojevi formule (II)

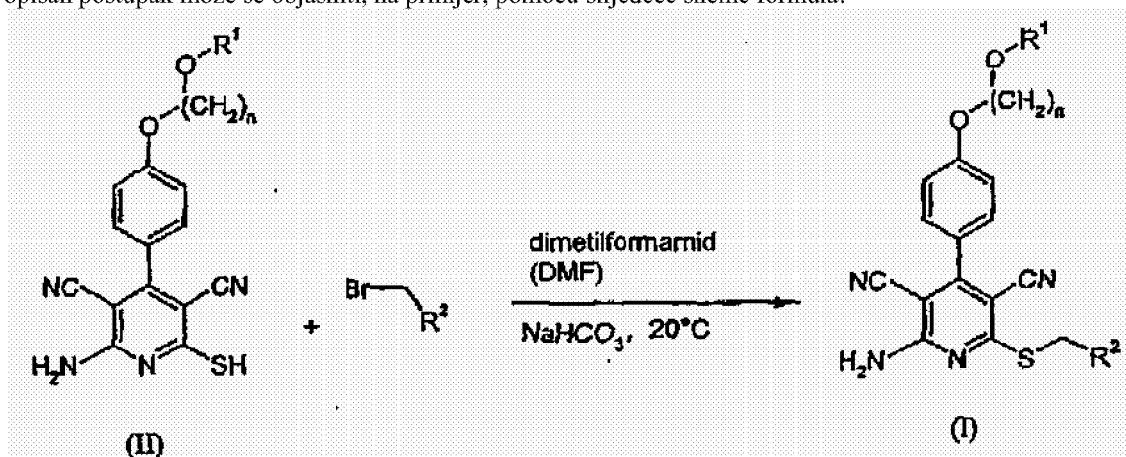


u kojoj  
n i R<sup>1</sup> imaju ranije navedeno značenje, reagiraju sa spojevima formule (III)



u kojoj  
R<sup>2</sup> ima ranije navedeno značenje i  
X je izlazna skupine, na primjer i ponajprije halogen, naročito klor, brom ili jod, ili mesilat, tosilat, triflat ili 1-imidazolil, prema potrebi u prisutnosti baze.

Gore opisan postupak može se objasniti, na primjer, pomoću slijedeće sheme formula:



Kao otapala za postupak prema izumu prikladna su sva organska otapala koja su inertna pod uvjetima reakcije. Tu spadaju alkoholi kao metanol, etanol i izopropanol, ketoni kao aceton i metiletil keton, aciklički i ciklički eteri, kao dietil eter i tetrahidrofuran, esteri kao etil ester octene kiseline ili butil ester octene kiseline, ugljikovodici kao benzol, ksilol, toluol, heksan ili cikloheksan, klorirani ugljikovodici kao diklormetan, klor-benzol ili dikloreten ili druga otapala kao dimetilformamid, acetonitril, piridin ili dimetilsulfoksid (DMSO). Voda je kao otapalo također prikladna. Prednost ima dimetilformamid. Također se može upotrijebiti i mješavinu gore navedenih otapala.

Kao baze prikladne su uobičajene anorganske ili organske baze. Tu spadaju ponajprije alkalijski hidroksidi kao na primjer natrijev ili kalijev hidroksid ili alkalijski karbonati kao natrijev ili kalijev karbonat ili alkalijski hidrogen karbonati- kao natrijev ili kalijev hidrogen karbonat ili alkalijski alkoholati, kao natrijev ili kalijev metanolat, natrijev ili kalijev metanolat ili kalijev terc-butilat ili amidi kao natrijev amid, litijev bis-(trimetilsilil)amid ili litijev diizopropilamid ili organski spojevi metala kao butil-litij ili fenil-litij ili 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) ili 1,5-diaza-biciklo[4.3.0]non-5-en (DBN) ili ali također i amini kao trietilamin i piridin. Prednost imaju alkalijski karbonati i hidrogen karbonati.

Ovdje se bazu može upotrijebiti količinom od 1 do 10 molova, ponajprije od 1 do 5 molova, naročito 1 do 4 mola na 1 mol spojeva formule (II).

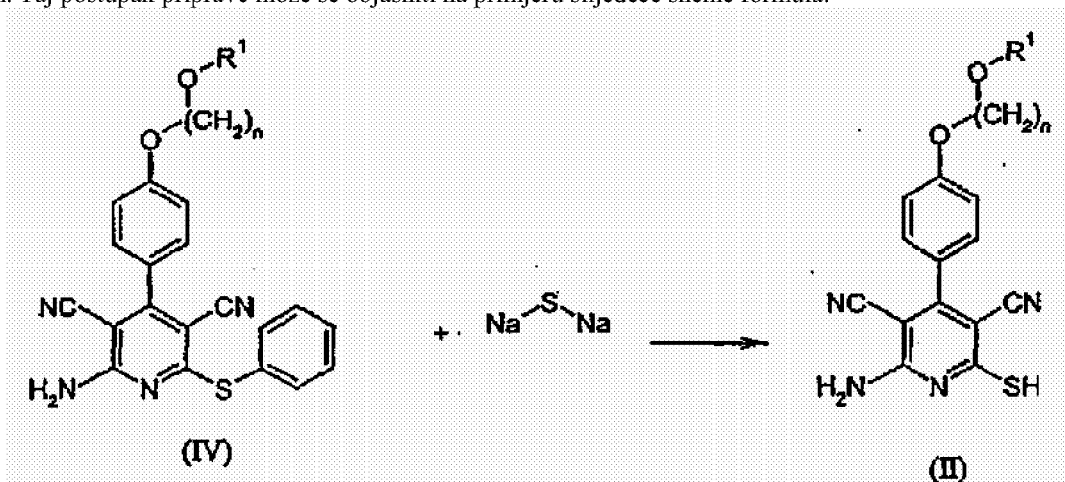
Reakcija se odvija općenito u temperaturnom području od -78°C do +140°C, ponajprije u području od -78°C do +40°C, naročito pri sobnoj temperaturi.

Pretvorba se može provesti pod normalnim, povišenim ili pod smanjenim tlakom (npr. u području od 0,5 do 5 bara). Općenito se radi pod normalnim tlakom.

Spojevi formule (II) su stručnjaku poznati ili se oni mogu proizvesti uobičajenim postupcima poznatim iz literature, na primjer pretvorbom odgovarajućih benz-aldehida sa cijantioacetamidom. Može se naročito ukazati na slijedeće publikacije, čiji sadržaji su u svakom slučaju ovdje uvršteni kao literatura:

- *Dyachenko et al.*, Russian Journal of Chemistry, svezak 33, br. 7, 1997, stranice 1014 do 1017 i svezak 34, br. 4, 1998, stranice 557 do 563;
- *Dyachenko et al.*, Chemistry of Heterocyclic Compounds, svezak 34, br. 2, 1998, stranice 188 do 194;
- *Qintela et al.*, European Journal of Medicinal Chemistry, svezak 33, 1998, stranice 887 do 897;
- *Kandeel et al.*, Zeitschrift für Naturforschung 42b, 107 do 111 (1987).

Tako se spojevi formule (II) mogu proizvesti, na primjer, također iz spojeva formule (IV) pretvorbom s alkalijskim sulfidom. Taj postupak pripreme može se objasniti na primjeru slijedeće sheme formula:



Kao alkalijski sulfid upotrebljava se ponajprije natrijev sulfid količinom od 1 do 10 molova, ponajprije 1 do 5 molova, naročito 1 do 4 mola na 1 mol spojeva formule (IV).

Kao otapala prikladna su sva organska otapala, koja su inertna pod uvjetima reakcije. Tu spadaju na primjer N,N-dimetilformamid, N-metilpirolidinon, piridin i acetonitril. Povoljan je N,N-dimetilformamid. Također se može upotrijebiti i mješavinu gore navedenih otapala.

Reakcija se odvija općenito u temperaturnom području od  $-20^{\circ}\text{C}$  do  $+140^{\circ}\text{C}$ , ponajprije u područje od  $+20^{\circ}\text{C}$  do  $+120^{\circ}\text{C}$ , naročito pri  $+60^{\circ}\text{C}$  do  $+100^{\circ}\text{C}$ .

Pretvorba se može provesti pod normalnim, povišenim ili pod smanjenim tlakom (npr. u području od 0,5 do 5 bara). Općenito se radi pod normalnim tlakom.

Spojevi formule (III) su komercijalno dostupni, stručnjaku su poznati ili se mogu proizvesti uobičajenim metodama.

Spojevi formule (IV) su komercijalno dostupni, stručnjaku su poznati ili se mogu proizvesti uobičajenim metodama. Može se posebno ukazati na slijedeće publikacije, čiji sadržaj je ovdje uvršten izričito kao literatura:

- Kambe et al., *Synthesis*, 531 do 533 (1981);
- Elnagdi et al., *Z. Naturforsch.* 47b, 572 do 578 (1991).

Farmaceutsko djelovanje spojeva formule (I) može se objasniti s njihovim učinkom kao selektivnog liganda na adozin A1 receptore. Pri tome oni djeluju kao A1 agonisti.

Spojevi formule (I) pokazuju iznenađujući i nepredvidljiv, dragocjeni spektar farmakološkog djelovanja i oni su stoga posebno prikladni za profilaksu i/ili za liječenje bolesti.

U usporedbi sa stanjem tehnike, spojevi formule (I) imaju poboljšana farmakokinetička svojstva, naročito poboljšanu biološku raspoloživost nakon oralnog davanja.

Spojevi formule (I) su prikladni sami ili u kombinaciji s jednom ili više drugih aktivnih tvari za profilaksu i/ili za liječenje različitih bolesti, naročito na primjer kod bolesti sistema srčanog optoka (kardiovaskularne bolesti). Prikladne aktivne tvari za kombinacije su naročito aktivne tvari za liječenje koronarnih srčanih bolesti, kao na primjer naročito nitrati, betablokeri, antagonisti kalcija ili diuretici.

U smislu predloženog izuma kao bolesti sistema srčanog optoka, odnosno kao kardiovaskularne bolesti podrazumijevaju se, na primjer, naročito slijedeće bolesti: koronarna restenoza, kao npr. restenoza nakon dilatacije balona perifernih krvnih žila, tahikardije, aritmije; bolesti perifernih i kardijalnih krvnih žila, stabilna i nestabilna angina pektoris i treperenje pretkljetke.

5

Spojevi formule (I) prikladni su, nadalje, na primjer, naročito također za smanjenje područja miokarda pogođenog infarktom.

10

Spojevi formule (I) prikladni su, nadalje, na primjer, za profilaksu i/ili za liječenje tromboembolijskih bolesti i ishemija, kao što su infarkt miokarda, moždani udar i kratkotrajni ishemijski napadi.

15

Daljnja područja indikacija za koja su prikladni spojevi formule (I) jesu, na primjer, naročito profilaksa i/ili liječenje bolesti urogenitalnog područja, kao npr. nadražen mjehur, erektilna disfunkcija i ženska spolna disfunkcija, ali osim toga također i profilaksa i/ili liječenje upalnih bolesti, kao npr., astme i upalnih dermatoza, nervnih upalnih bolesti središnjeg nervnog sistema, kao što su, na primjer, stanja nakon moždanog udara, Alzheimerova bolest, nadalje također neuro-degenerativne bolesti, kao i stanja boli i rak.

20

Daljnje područje indikacija jesu, na primjer, naročito profilaksa i/ili liječenje bolesti dišnih puteva kao, na primjer, astma, kronični bronhitis, plućni emfizem, bronho-ektazije, cistična fibroza (mukoviscidoza) i plućna hipertoniya.

Konačno, spojevi formule (I) dolaze u obzir, na primjer, naročito također za profilaksu i/ili za liječenje dijabetesa, naročito dijabetesa melitusa.

25

Predloženi izum odnosi se također i na upotrebu spojeva formule (I) za proizvodnju lijekova za profilaksu i/ili za liječenje gore navedenih slika bolesti.

Predloženi izum odnosi se, nadalje, na postupak za profilaksu i/ili liječenje gore navedenih slika bolesti sa spojevima formule (I).

30

Daljnji predmet predloženog izuma su lijekovi koji sadrže najmanje jedan spoj formule (I), ponajprije zajedno s jednom ili više farmakološki nedvojbenih pomoćnih ili nosećih tvari, kao i njihova upotreba za gore navedene svrhe.

35

Za aplikaciju spojeva formule (I) u obzir dolaze svi uobičajeni oblici, tj. dakle oralni, parenteralni, inhalacijski, nazalni, suplingvalni, rektalni, lokalni kao npr. i implantati ili stentovi, ili vanjski, kao npr. transdermalni. Kod parenteralne aplikacije treba naročito spomenuti intravensku, intramuskularnu i supkutanu aplikaciju, kao npr. supkutani depot. Prednost se daje oralnoj ili parenteralnoj aplikaciji. Posebno je povoljna oralna aplikacija.

40

Pri tome, aktivne tvari se mogu dati same ili u obliku pripravaka. Za oralnu aplikaciju prikladni su pripravci, između ostalih, tablete, kapsule, kuglice, dražeje, pilule, granulati, kruti i tekući aerosoli, sirupi, emulzije, suspenzije i otopine. Pri tome, aktivna tvar mora biti prisutna takovom količinom da se postigne terapijski učinak. Općenito, aktivna tvar može biti prisutna koncentracijom od 0,1 do 100 mas. %, naročito 0,5 do 90 mas. %, ponajprije 5 do 80 mas. %. Koncentracija aktivne tvari treba iznositi naročito od 0,5 do 90 mas. %, tj. količine aktivne tvari moraju biti dovoljne da se dosegne navedeni količinski raspon doziranja.

45

U tu svrhu aktivne tvari se mogu na poznat način preraditi u uobičajene pripravke. To se vrši upotrebom inertnih netoksičnih, farmaceutski prikladnih nosača, pomoćnih tvari, otapala, vehikla, emulgatora i/ili disperganata.

50

Kao pomoćne tvari mogu se navesti na primjer: voda, netoksična organska otapala kao npr. parafini, biljna ulja (npr. sezamovo ulje), alkoholi (npr. etanol, glicerol), glikoli (npr. polietilenglikol), kruti nosači kao prirodno ili sintetičko kameno brašno (npr. talk ili silikati), šećer (npr. mliječni šećer), emulgatori, dispergansi, (npr. polivinilpirolidon) i klizna sredstva (npr. magnezijev sulfat).

55

U slučaju oralne aplikacije tablete mogu, naravno, sadržavati također i dodatke, kao što je natrijev citrat, zajedno s dodacima kao što su škrob, želatina i slično. Vodeni pripravci za oralnu aplikaciju mogu se pomiješati, nadalje, sa sredstvima za poboljšavanje okusa ili s bojilima.

60

Kod parenteralne aplikacije, da bi se postigao učinkovit rezultat, općenito se je pokazalo korisnim dati količinu od pribl. 0,1 do pribl. 10.000 µg/kg, ponajprije pribl. 1 do pribl. 1.000 µg/kg, naročito pribl. 1 µg/kg do pribl. 100 µg/kg tjelesne težine. Kod oralne aplikacije, ta količina iznosi pribl. 0,05 do pribl. 5 mg/kg, ponajprije pribl. 0,1 do pribl. 5 mg/kg, naročito pribl. 0,1 do pribl. 1 mg/kg tjelesne težine.

Unatoč tome, prema potrebi može biti potrebno odstupiti od navedenih količina i to ovisno o tjelesnoj težini, načinu aplikacije, pojedinačnoj reakciji na aktivnu tvar, o vrsti priprema i o vremenu davanja, odnosno o intervalu u kojem se vrši aplikaciju.

- 5 Predloženi izum objasniti će se potanje u slijedećim prednosnim primjerima, koji ni na koji način ne ograničavaju izum.

Navodi postotaka u slijedećim primjerima odnose se na masene postotke, u svakom slučaju, ako nije navedeno drugačije; udjeli su maseni.

## 10 **A. Ocjenjivanje fiziološke učinkovitosti**

### **I. Dokazivanje kardiovaskularnog djelovanja**

15 Narkotiziranim štakorima je nakon otvaranja prsnog koša brzo izvađeno srce i stavljeno je u konvencionalan Langendorffov aparat. Koronarne arterije su perfundirane pri konstantnom volumenu (10 ml/min) i preko odgovarajuće tlačne sonde je zabilježen perfuzijski tlak koji je nastao pri tome. Pad perfuzijskog tlaka u tom postavu odgovarao je relaksaciji koronarnih arterija. Istovremeno, tlak koji je srce razvijalo tijekom svake kontrakcije mjereno je preko balona uvedenog u lijevu ventrikulu i pomoću druge tlačne sonde. Frekvencija srca, koje je kucalo u izolaciji, je izračunata iz broja kontrakcija u jedinici vremena.

20

U tako postavljenom pokusu dobivene su slijedeće vrijednosti smanjenja srčane frekvencije (vrijednosti navedene u postocima odnose se na postotke smanjenja srčane frekvencije pri dotičnoj koncentraciji):

Spoj iz primjera	Postotak smanjenja srčane frekvencije pri koncentraciji od	
	$10^{-7}$ g/ml	$10^{-6}$ g/ml
1	15,0%	17,5%
6	15,5%	20,0%

### 25 **II. Određivanje adenzin-A1, -A2a, -A2b i -A3 agonizma**

#### a) Posredno određivanje adenzin agonizma preko ekspresije gena

30 Stanice permanentne linije CHO (Chinese Hamster Ovary) su stabilno transfektirane sa cDNA za podtipove A1, A2a, A2b adenzin-receptora. Na adenilatciklazu su adenzin A1 receptori povezani preko  $G_i$ -proteina, a adenzin A2a i A2b receptori preko  $G_s$ -proteina. U stanicama je odgovarajuće inhibirano, odnosno stimulirano stvaranje cAMP. Zatim je preko promotora ovisnog o cAMP modulirana ekspresija luciferaze. Zbog više osjetljivosti i reproducibilnosti, manje varijance i dobre prikladnosti za provedbu na robotiziranom sistemu, pokus za luciferazu je optimiran promjenom više parametara pokusa, kao npr. gustoće stanica, trajanja faze rasta i inkubacije, koncentracije forskolina, sastava medija. Za farmakološku karakterizaciju stanica i za pretraživanja pokusnih tvari primijenjen je slijedeći protokol pokusa potpomognutih s robotom.

40 Kulture za zalihu uzgajane su u mediju DMEM/F12 s 10% FCS-a (fetalni goveđi serum) pri 37°C pod 5%  $CO_2$  i u svakom slučaju su dijeljene nakon 2-3 dana na 1:10. Za pokusne kulture u pločice s 384 jamica posadeno je po 1000 do 3000 stanica po jamici i rasle su pribl. 48 sati pri 37°C. Zatim je medij zamijenjen s fiziološkom otopinom natrijevog klorida (130 mM natrijev klorid, 5 mM kalijev klorid, 2 mM kalcijev klorid, 20 mM HEPES, 1 mM magnezijev klorid- $6H_2O$ , 5 mM  $NaHCO_3$ , pH 7,4). Tvari otopljene u DMSO su razrijeđene s tom fiziološkom otopinom natrijevog klorida tri puta na 1:10 i pipetirane su u pokusne kulture (maksimalna DMSO krajnja koncentracija u pokusnoj smjesi: 0,5 %). Tako su dobivene krajnje koncentracije pokusnih tvari od, na primjer, 5  $\mu$ M do 5 nM. 10 minuta kasnije k A1 stanicama je dodan forskolin i zatim su sve kulture inkubirane četiri sata pri 37°C. Nakon toga je u pokusne kulture dodano 35  $\mu$ g otopine koja se sastojala od 50% reagenta za ližu (30 mM di-natrijev hidrogen fosfat, 10% glicerol, 3% triton X100, 25 mM TrisHCl, 2 mM ditiotreit (DTT), pH 7,8) i do 50% iz otopine podloge luciferaze (2,5 mM ATP, 0,5 mM luciferin, 0,1 mM koenzim A, 10 mM tricin, 1,35 mM magnezijev sulfat, 15 mM DTT, pH 7,8), mućkano je pribl. 1 minutu i izmjerena je aktivnost luciferaze. Kao usporedbeni spoj u ovim je pokusima poslužio adenzinu analogan spoj NECA (5-N-etil-karboksamido-adenozin), koji se s visokim afinitetom veže na sve podtipove adenzin receptora i ima agonističko djelovanje (Klotz, K.N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kull, B., Fredholm, B.B., Lohse, M.J., Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes characterization of stably transfected receptors u CHO cells, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 357 (1998), 1-9).

55 U slijedećoj tablici 1 navedene su vrijednosti koje su dobivene za stimulaciju različitih podtipova adenzin receptora s različitim koncentracijama spojevima iz primjera 1 i 6.



Tablica 1: Stimulacija adenozin receptora s različitim koncentracijama spojeva iz primjer 1 i 6.

Podtip receptora	Primjeri			Primjer 6		
	10 nmolova	1 nmol	0,3 nmola	10 nmolova	1 nmol	0,3 nmola
A1	4%	11%	56%	1%	25%	45%
A2a	-2%	2%	-1%	2%	4%	0%
A2b	8%	6%	2%	29%	3%	0

5 Navedeni su % vrijednosti kao % odgovarajućeg usporedbenog stimulanta. Mjerne vrijednosti za A2a i A2b receptore su date u postocima od maksimalne stimulacije s NECA; mjerne vrijednosti za A1 receptor su date u postocima nakon izravne prethodne stimulacije adenilatciklaze s 1  $\mu$ molarnim forskolinom (što odgovara 100%-tnoj vrijednosti). A1 agonisti pokazuju odgovarajuće smanjenje aktivnosti luciferaze (mjerna vrijednost manja od 100 %).

#### 10 b) Izravno određivanje adenozin-agonizma dokazom cAMP

Stanica trajne linije CHO (Chinese Hamster Ovary) stabilno su transfektirane s cDNA za podtipove adenozin receptora A1, A2a, A2b i A3. Vežanje tvari na podtipove A2a ili A2b receptora određeno je mjerenjem intracelularnog cAMP u tim stanicama konvencionalnim radioimunološkim pokusom (cAMP-RIA, IBL GmbH, Hamburg, Njemačka).

15 U slučaju djelovanja tvari kao agonista, vežanje tvari se vidi po porastu intracelularnog cAMP-a. Kao usporedbeni spoj u tim pokusima poslužio je adenzinu analogan spoj NECA (5-N-etilkarboksamido-adenozin), koji nije selektivan, ali se s visokim afinitetom veže na sve podtipove adenozin receptora i ima agonističko djelovanje (Klotz, K.N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kuli, B., Fredholm, B.B., Lohse, M.J., Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 357 (1998), 1-9).

25 Adenozin receptori A1 i A3 se vežu na  $G_i$ -protein, tj. stimulacija tih receptora dovodi do inhibicije adenilat-ciklaze i time do smanjenja intracelularne količine cAMP-a. Za identifikaciju A1/A3 receptor agonista stimulira se adenilatciklazu s forskolinom. Međutim, dodatnu stimulaciju A1/A3 receptora inhibira adenilatciklaza, tako da se A1/A3 receptor agonisti mogu dokazati preko relativno malog sadržaja cAMP u stanicama.

30 Za dokaz antagonističkog djelovanja adenozin receptora rekombinantne stanice, koje su transfektirane s odgovarajućim receptorom, su prethodno stimulirane s NECA i učinak tvari na smanjenje intracelularnog sadržaja cAMP-a je istraženo s tom prethodnom stimulacijom. Kao usporedbeni spoj u tim je pokusima upotrijebljen XAC (xantine amine congener), koji se veže na sve podtipove adenozin receptora i ima antagonistički učinak (Miller, C.E., Stein, B., Adenosine receptor antagonist: Structures and potential therapeutic applications, Current Pharmaceutical Design, 2 (1996), 501-530).

### 35 **III. Farmokokinetička ispitivanja**

40 Farmakokinetički podaci određeni su nakon i.v. kao i nakon p.o. davanja različitih tvari kao otopine miševima, štakorima i psima. Za tu svrhu uzeti su uzorci krvi do 24 h nakon aplikacije. U uzorcima plazme dobivenim iz te krvi bioanalitičkim metodama (HPLC ili HPLC-MS) utvrđene su nepromijenjene koncentracije. Zatim su iz tako dobivenih koncentracija u plazmi izračunati farmakokinetički parametri u ovisnosti o vremenu. U slijedećoj tablici 2 date su biološke raspoloživosti kod različitih vrsta.

Tablica 2: Biološke raspoloživosti nakon oralnog davanja

	Miš	Štakor	Pas
primjer 22 u WO 00/1 25210	ne može se utvrditi* (kod 3 mg/kg p.o)	ne može se utvrditi* (kod 10 mg/kg p.o)	1,47% (kod 1 mg/kg p.o)
spoj iz primjera 1	31,5% (kod 1 mg/kg p.o)	5,0 % (kod 3 mg/kg p.o)	32,6% (kod 3 mg/kg p.o)
spoj iz primjera 6	41,3% (kod 3 mg/kg p.o)	42,3 % (kod 3 mg/kg p.o)	28,5% (kod 1 mg/kg p.o)

45 \*Količina u plazmi u svim vremenima mjerenja je ispod granice dokazivosti (<1  $\mu$ g/l).

#### **B. Izvedbeni primjeri**

Upotrijebljene kratice

50 DBU 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en  
DMF dimetilformamid

ESI	ionizacija s elektrosprejem (za MS)
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazino]etansulfonska kiselina
HPLC	viskotlačna visokoučinska tekućinska kromatografija
Kp.	vrelište
5 MS	masena spektroskopija
NMR	spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
p.A.	pro analisi
RT	sobna temperatura
i.V.	u vakuumu
10 d.Th.	od teorijskog (kod iskorištenja)
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

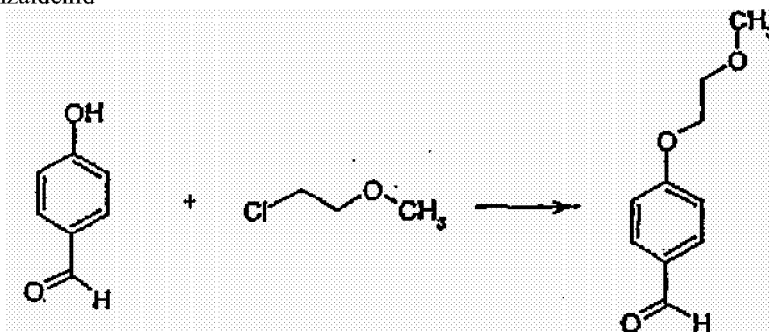
### Primjeri priprave

#### 15 **Primjer 1**

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(3-piridinilmetil)-sulfanil]-3,5-piridindikarbonitril

1. Stupanj:

4-(2-metoksietoksi)benzaldehyd



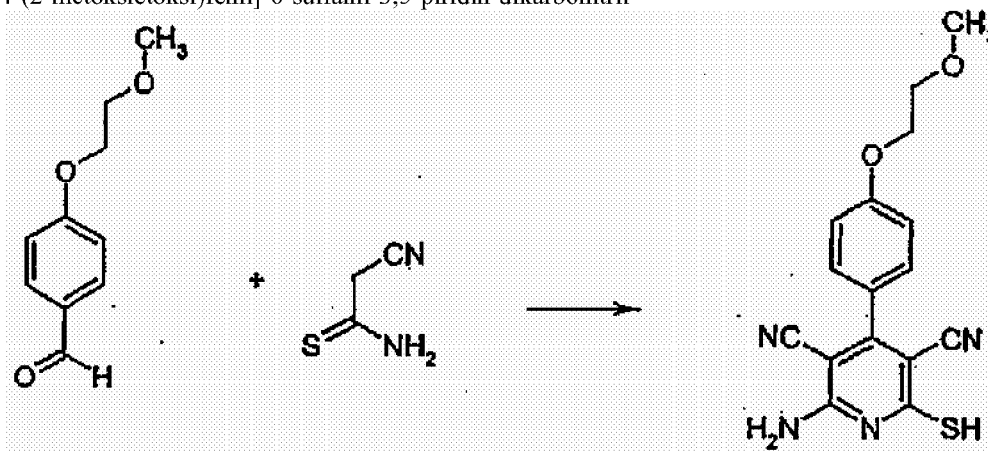
20 146,5 g (1,2 mola) 4-hidroksibenaldehida se otopi u DMF-u i pomiješa se s 20 g (0,12 mola) kalijevo jodida, 134,6 g (1,2 mola) kalijevo terc-butilata i 170,2 g (1,8 mola) (2-kloretil)metil etera. Reakcijsku smjesu se miješa 16 h pri 80°C. Za obradu se reakcijsku smjesu koncentrira u vakuumu. Ostatak se preuzme uli etil acetata i ekstrahira se s 0,51 1N natrijevom lužinom. Faz u etil acetatu se osuši s magnezijevim sulfatom i ispari pod vakuumom. Ostatak nakon isparavanja se destilira u visokom vakuumu (vrelište: 100°C pod 0,45 mbara). Dobije se 184,2 g (85% od teorijskog) proizvoda.

MS (ESIpos): m/z = 181 (M+H)<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3, 5 (s, 3H); 3,8 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 7,0 (d, 2H); 7,8 (d, 1H); 9,9 (s, 1H).

#### 30 2. Stupanj

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-sulfanil-3,5-piridin-dikarbonitril

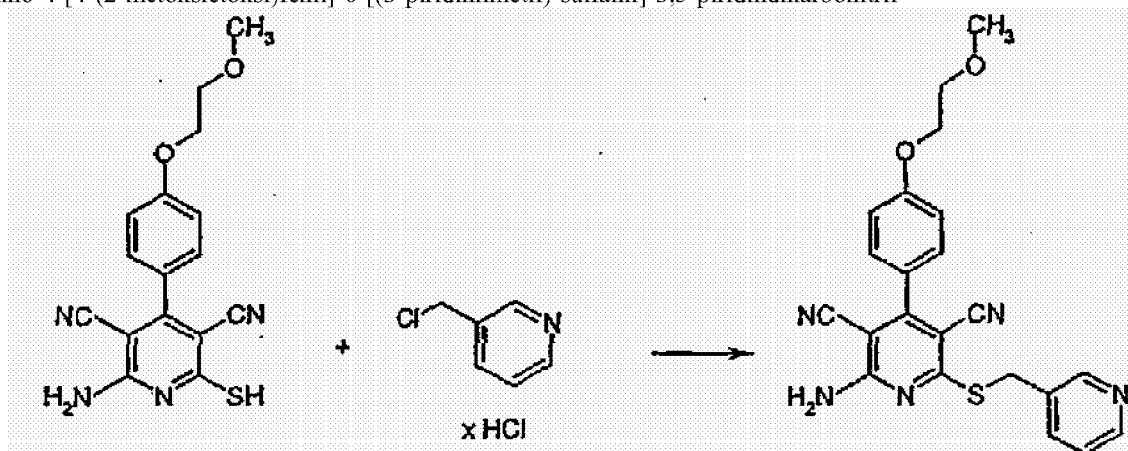


35 18 g (100 mmolova) 4-(2-metoksietoksi)benaldehida, 10 g (200 mmolova) cijanotioacetamida i 20,2 g (200 mmolova) N-metilmorfolina grije se u 100 ml etanola 3 h pod reflusom. Kad se ohladi, izlučeni kristali se odsisaju, isperu se s malo etanola i osuše se u vakuumu. Dobije se 12 g (31% od teorijskog) proizvoda, koji sadrži 0,5 mol-ekvivalenta N-metilmorfolina. MS (ESIpos): m/z = 327 (M+H)<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) :  $\delta$  = 2,8 (tr, 4H, N-metil-morfolinski signal); 3,3 (s, 3H); 3,7 (m, 2H, + 4H N-metil-morfolinski signal); 4,2 (tr, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,4 (d, 2H); 7,6 (s, široki, 2H).

### 3. Stupanj

5 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(3-piridinilmetil)-sulfanil]-3,5-piridindikarbonitril

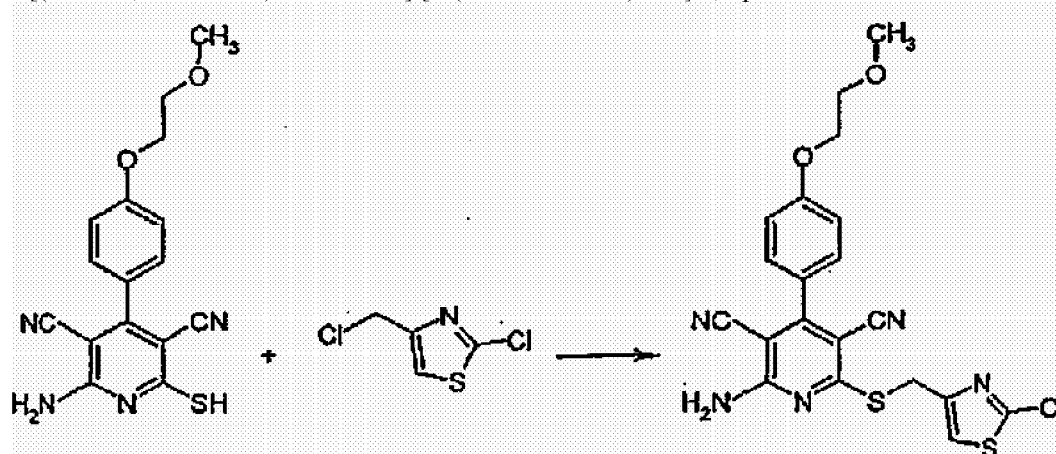


4,28 g (11,36 mmolova; edukt je sadržavao 0,5 molekvivalenta N-metilmorfolina, i stoga je imao čistoću 86,6%) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 40 ml DMF-a p.a. Zatim se doda 3,34 g (39,75 mmolova) natrijevog hidrogen karbonata i 2,48 g (15,1 mmolova) 3-pikolil klorid hidroklorida. Suspenziju se miješa preko noći pri sobnoj temperaturi, pomiješa se sa 40 ml etanola i zagrije se na pribl. 40°C. Zatim se dokaplje 19 ml vode. Talog se odsisa i osuši u vakuumu. Dobije se 3,70 g (78% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos) :  $m/z$  = 418 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )<sup>-</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) :  $\delta$  = 3,3 (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,5 (s, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,35 (dd, 1H); 7,45 (d, 2H); 7,9 (d tr, 1H); 8,1 (s, široki, 2H); 8,45 (dd, 1H); 8,75 (d, 1H).

### Primjer 2

2-amino-6-[(2-klor-1,3-tiazol-4-il)metilsulfanil]-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-3,5-piridindikarbonitril

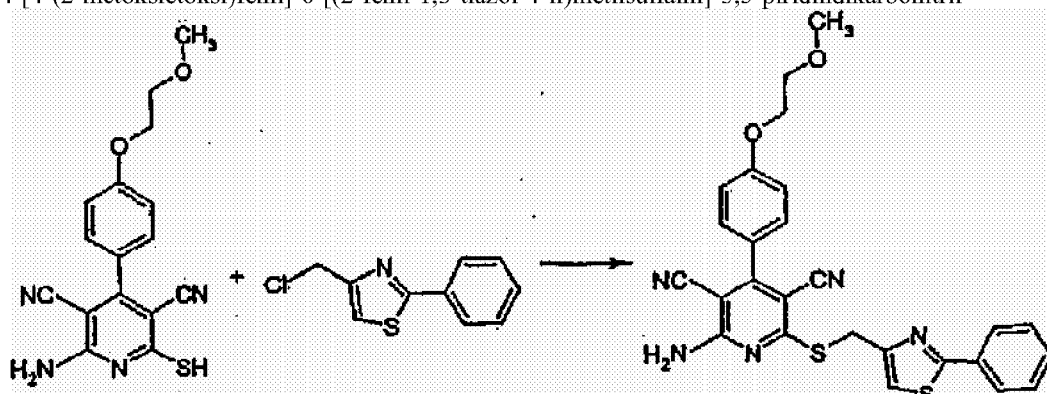


100 mg (0,31 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 77,2 mg (0,46 mmola) 4-klormetil-2-klor-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa i ispere s etanolom i dietil eterom i osuši se pri 40°C u vakuumu. Dobije se 123 mg (88% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos):  $m/z$  = 458 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )<sup>+</sup>

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 3,3 (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,5 (s, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,45 (d, 2H); 7,8 (s, IH); 8,05 (s, široki, 2H).

**Primjer 3**

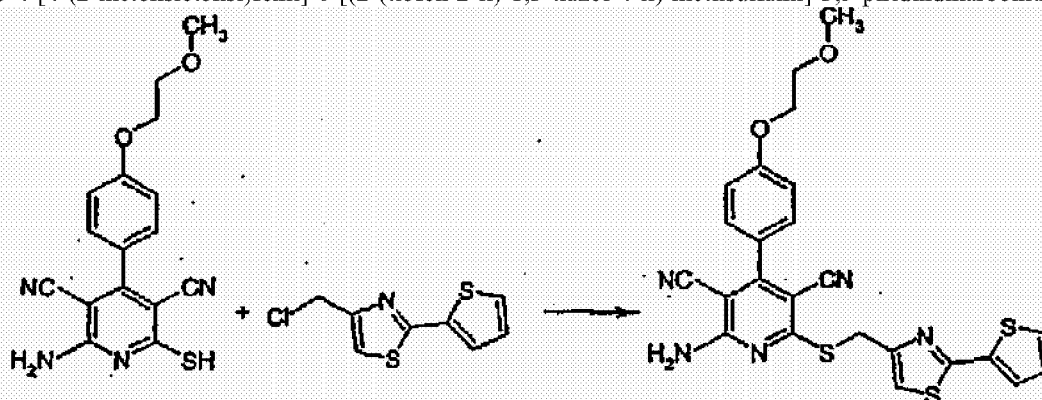
2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-fenil-1,3-tiazol-4-il)metilsulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



- 100 mg (0,31 mmol) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 96,4 mg (0,46 mmola) 4-klormetil-2-fenil-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa i ispere s etanolom i dietil eterom i osuši se pri 40°C u vakuumu. Dobije se 149 mg (97% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos):  $m/z = 500(M+H)^+$   
 $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,3$  (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,5 (s, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,5 (m, 5H); 7,8 (s, 1H); 7,9 (m, 2H); 8,05 (s, široki, 2H).

**Primjer 4**

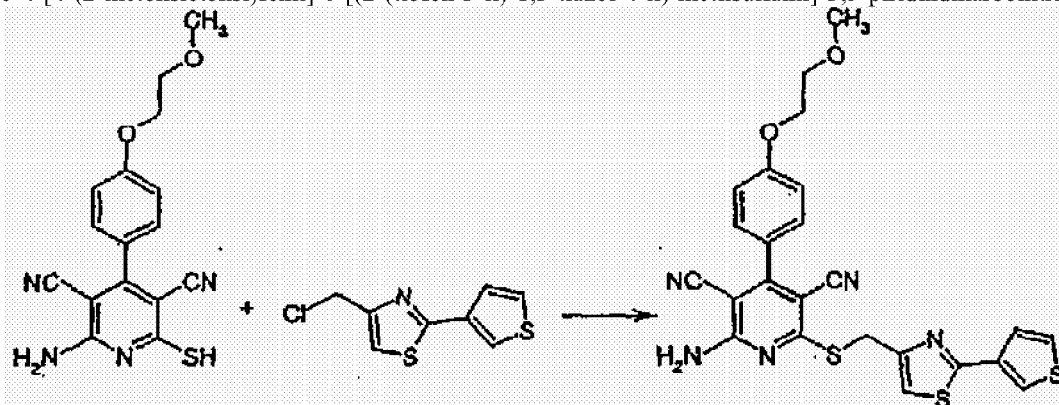
2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-(tiofen-2-il)-1,3-tiazol-4-il)-metilsulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



- 100 mg (0,31 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 96,4 mg (0,46 mmol) 4-klormetil-2-(tiofen-2-il)-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa i ispere s etanolom i dietil eterom i osuši se pri 40°C u vakuumu. Dobije se 146 mg (84% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos):  $m/z = 506(M+H)^+$   
 $^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,3$  (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,6 (s, 2H); 7,15 (m, 3H); 7,5 (d, 2H); 7,65 (d, 1H); 7,75 (d, 1H); 7,8 (s, 1H); 8,1 (s, široki, 2H).

**Primjer 5**

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-(tiofen-3-il)-1,3-tiazol-4-il)-metilsulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



100 mg (0,31 mmol) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 96,4 mg (0,46 mmola) 4-klormetil-2-(tiofen-3-il)-1,3-tiazola. Suspenziju se mućka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa i ispere s etanolom i dietil eterom i osuši se pri 40°C u vakuumu. Dobije se 141 mg (82% od teorijskog) proizvoda.

MS (ESIpos) :  $m/z = 506 (M+H)^+$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,3$  (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,6 (s, 2H); 7,15 (d, 2H); 7,5 (d, 2H); 7,55 (d, 1H); 7,7 (dd, 1H); 7,8 (s, 1H); 8,1 (s, široki, 2H); 8,15 (d, 1H).

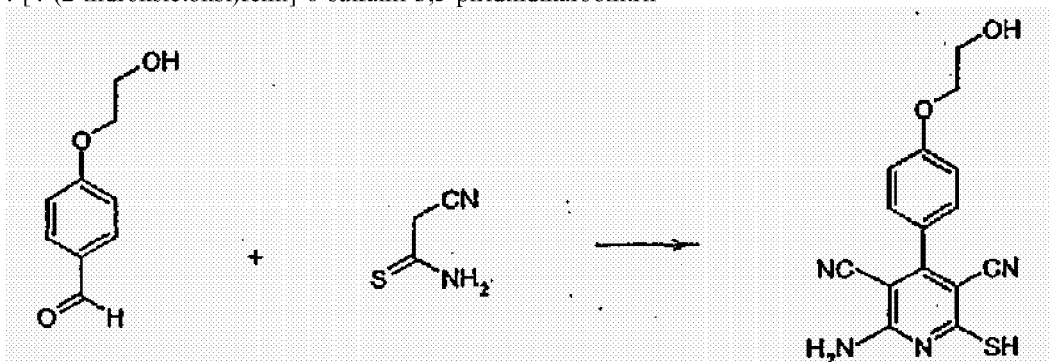
### Primjer 6

2-amino-6-({[2-(4-klorfenil)-1,3-tiazol-4-il]metil-sulfanil}-4-[4-(2-hidroksi-etoksi)fenil]-3,5-piridindi-karbonitril

1. način:

1. stupanj:

2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitril



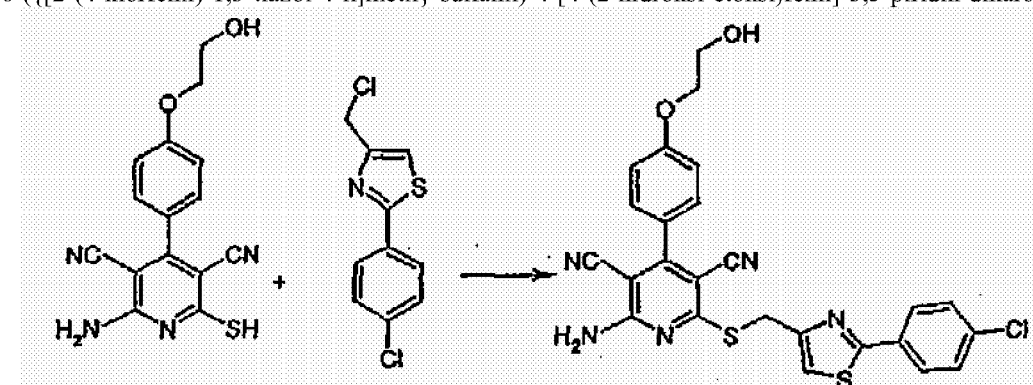
12,46 g (75 mmolova) 4-(2-hidroksietoksi)benzaldehyda, 15,02 g (150 mmolova) cijanotioacetamida i 15,15 g (150 mmolova) N-metilmorfolina se stavi u 75 ml etanola i miješa se 3 h pod reflusom. Reakcijsku otopinu se ohladi i ispari pod vakuumom. Ostatak se otopi u 1N natrijevoj lužini i ispere se dva puta s etil esterom octene kiseline. Faz u natrijevoj lužini se zakiseli s 1N solnom kiselinom, izlučeni kristali se odsisaju i osuše pod vakuumom pri 45°C. Dobije se 12,05 g (51% od teorijskog) proizvoda.

MS (ESIpos):  $m/z = 313 (M+H)^+$ , 330  $(M+NH_4)^+$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,7$  (t, 2H); 4,1 (t, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,4 (d, 2H); 8,0 (br s, 2H).

2. stupanj:

2-amino-6-({[2-(4-klorfenil)-1,3-tiazol-4-il]metil}-sulfanil)-4-[4-(2-hidroksi-etoksi)fenil]-3,5-piridin-dikarbonitril



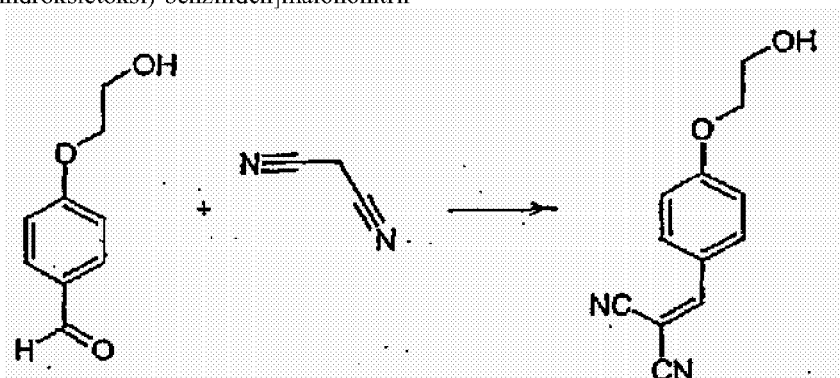
6,91 g (22,12 mmola) 2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 150 ml DMF-a. Zatim se doda 7,44 g (66,35 mmolova) 1,8-diaza-biciklo[5.4.0]undec-7-ena i 10,8 g (44,24 mmola) 4-klormetil-2-(4-klorfenil)-1,3-tiazola. Suspenziju se miješa preko noći pri sobnoj temperaturi, pomiješa se s 50 g silika gela i ispari se pod vakuumom. Mješavinu tvari uhvaćenu na silika gelu se očisti kromatografijom na silika gelu (sredstvo za ispiranje: toluol do toluol/etil ester octene kiseline = mješavina 1:1). Dobije se 5,5 g (47% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos) :  $m/z = 521 (M+H)^+$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 3,7$  (dt, 2H) ; 4,1 (t, 2H) ; 4,6 (s, 2H) ; 4,9 (t, 1H) ; 7,1 (d, 2H) ; 7,4 (d, 2H) ; 7,5 (d, 2H) ; 7,9 (m, 3H) ; 8,1 (br s, 2H).

2. način

Alternativno, pripremu se također može provesti bez izolacije 2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila pretvorbom 2-[4-(2-hidroksietoksi)-benziliden]malononitrila s 2-cijanotioacetamidom i 4-klormetil-2-(4-klorfenil)-1,3-tiazolom,

## 1. stupanj: 2-[4-(2-hidroksietoksi)-benziliden]malononitril

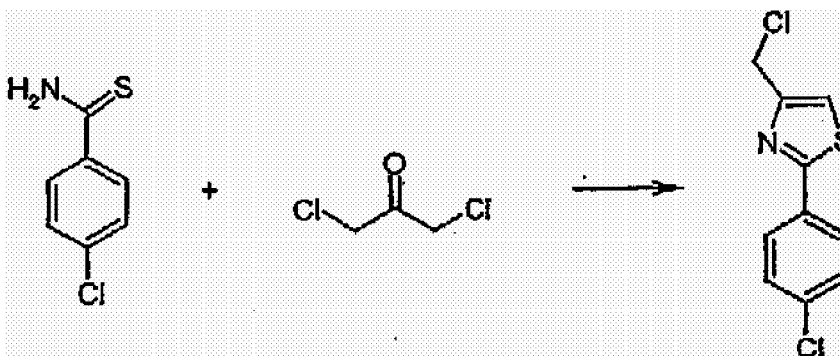


1000 g (5,85 molova) 4-(2-hidroksietoksi)benzaldehida i 425 g (6,43 molova) malondinitrila se otopi u 5000 ml izopropilalkohola i pomiješa se s 5 g (0,059 mola) piperidina. Smjesu se grije 16 sati pri 80°C i za izolaciju proizvoda ohladi se zatim na 3°C. Proizvod se odfiltrira i ispere sa 400 ml ledeno hladnog izopropilalkohola. Zatim se suši 45 sati u vakuum (40 mbara) pri 50°C.

Iskorištenje: 1206 g (94,6% od teorijskog) svjetlo žutih kristala.

<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 3,95-4,32 m (4 H), 6,95-7,15 (m, 2H) , 7,61 (s, 1H), 7,85-7,95 (m, 1H).

## 2. stupanj:



## 4-klormetil-2-(4-klorfenil)-1,3-tiazol

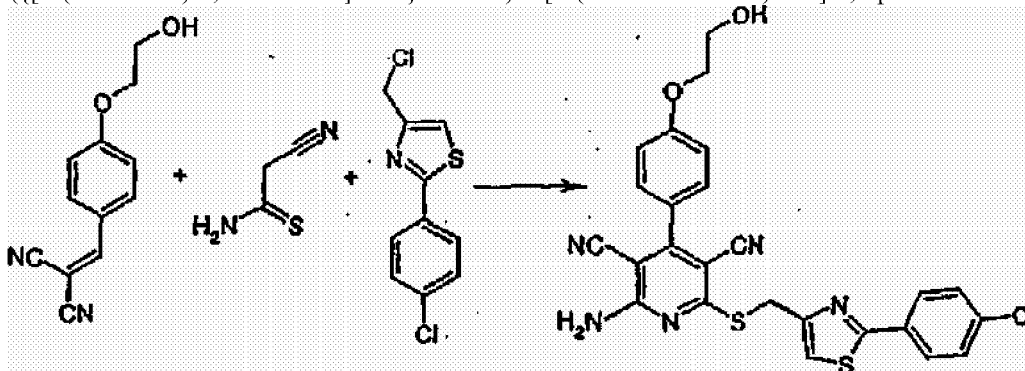
171,65 g (1,0 mol) 4-klortioacetamida se otopi u 550 ml izopropilalkohola i tijekom perioda od 3 sata pomiješa se pri maksimalno 30°C sa 133,3 g (1,05 mola) 1,3-diklor-acetona. Miješa se još 5,5 sati pri 40°C i 10 sati pri 20°C. Za dovršenje reakcije sada se grije samo 7,5 sati pri 55°C. Za izolaciju proizvoda ohladi se na 10°C i pomiješa se s 950 ml vode. Pri tome se pH vrijednost namjesti s natrijevom lužinom na 4 do 5 i proizvod se odsisa.

Iskorištenje: 220,9 g (91% od teorijskog) bijelih do svjetlo žutih kristala.

<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 4,90 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7,5-7,55 (m, 2H), 7,85 (s, 1H, tiazol), 7,9-7,95 (m, 2H)

## 3. stupanj:

## 2-amino-6-([2-(4-klorfenil)-1,3-tiazol-4-il]metil)-sulfanil-4-[4-(2-hidroksi-etoksi)fenil]-3,5-piridin-dikarbonitril



428,4 g (2,0 mola) 2-[4-(2-hidroksietoksi)-benziliden]-malononitrila, 108,4 g (1,05 mola) 2-cijano-tioacetamida i 244,1 g (1,0 mol) 4-klormetil-2-(4-klor-fenil)-1,3-tiazola suspendira se u 3,4 litre metanola i tijekom perioda od 60 minuta pomiješa se s 556,1 g (3,0 mola) tributilamina. Miješa se još 20 sati pri sobnoj temperaturi i proizvod se odfiltrira. Nakon sušenja u vakuumu sirov proizvod se (360,8 g, sirovo iskorištenje 70% od teorijskog) suspendira u 3 litre

diklormetana i miješa se 2 sata pri 35°C. Proizvod se odfiltrira i osuši se u visokom vakuumu. Zbog daljnjeg čišćenja, kristali, koji su sada bijeli, mogu se prekrystalizirati iz tetrahidrofurana/vode (1:1).

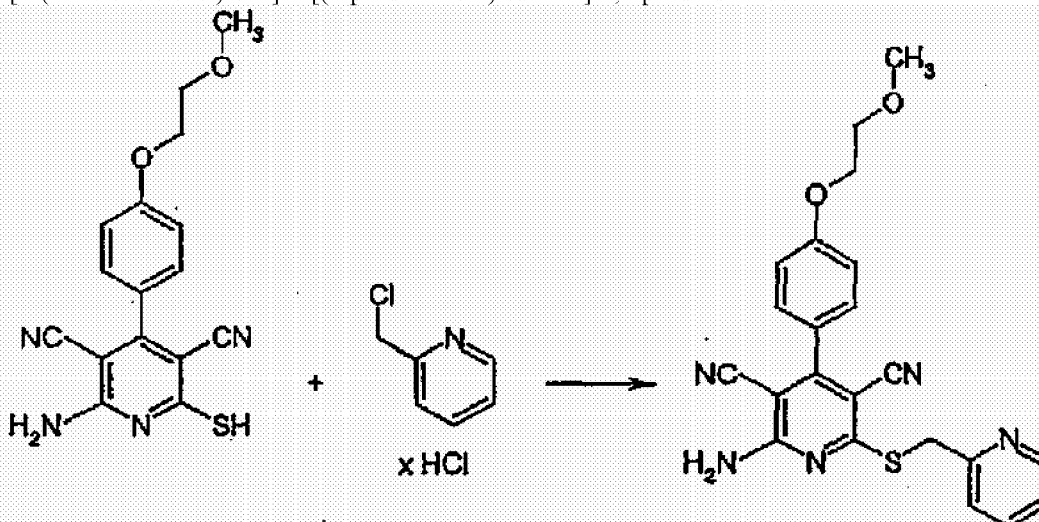
Iskorištenje: 353,5 g (68% od teorijskog) bijelih kristala.

MS (EI):  $m/z = 520,00$

5

### Primjer 7

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-piridinilmetil)-sulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



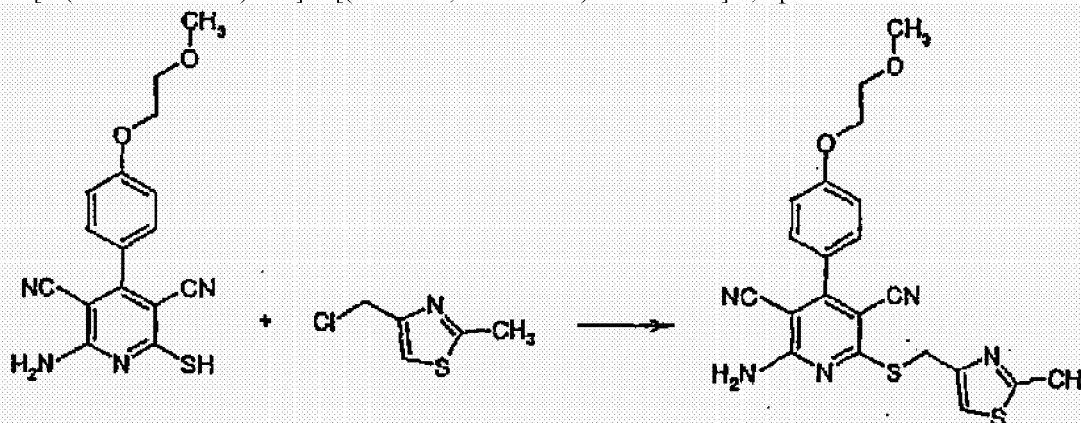
100 mg (0,31 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 75,4 mg (0,46 mmola) 2-pikolil klorid-hidroklorida. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i ispere se s vodom. Talog se odsisa, ispere s etanolom i s dietil eterom i osuši se pri 40°C pod vakuumom. Dobije se 104 mg (81% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos):  $m/z - 418 (M+H)^+$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  - 3,3 (s, 3H); 3,7 (tr, 2H); 4,2 (tr, 2H); 4,6 (s, 2H); 7,1 (d, 2H); 7,4 (dd, 1H); 7,45 (d, 2H); 7,65 (d, 1H); 7,75 (tr, 1H); 8,0 (s, široki, 2H); 8,5 (d, 1H).

15

### Primjer 8

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)metilsulfanil]-3,5-piridindikarbonitril

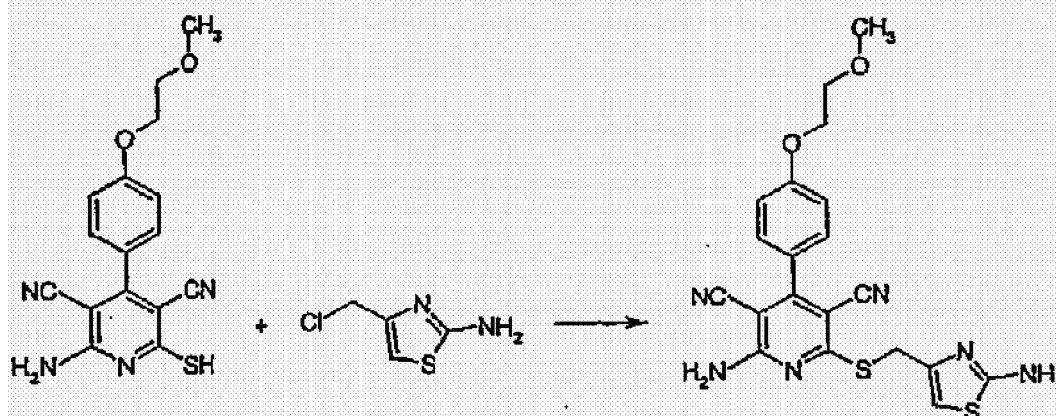


100 mg (0,31 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 90,5 mg (0,61 mmola) 4-klormetil-2-metil-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa i osuši pri 40°C pod vakuumom. Dobije se 88,8 mg (66,2% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos):  $m/z = 438 (M+H)^+$ .

25

**Primjer 9**

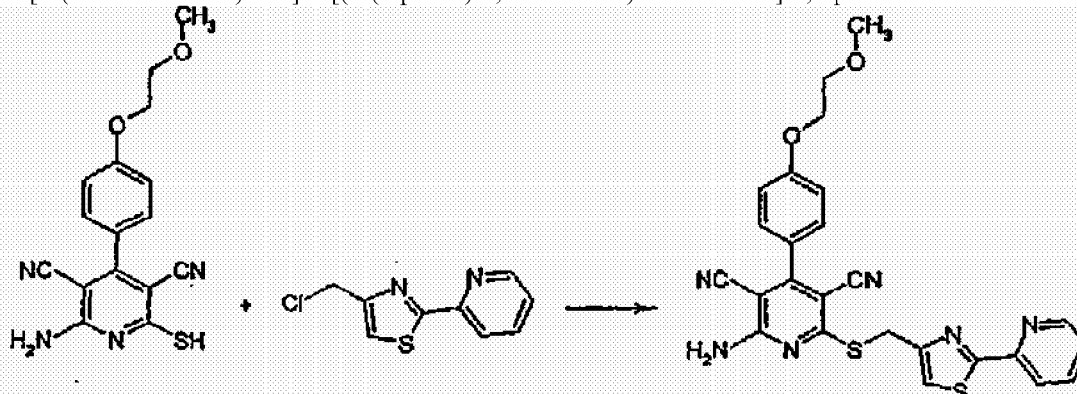
2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-amino-1,3-tiazol-4-il)metilsulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



- 5 100 mg (0,31 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 103 mg (1,23 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 68,3 mg (0,46 mmola) 4-klormetil-2-amino-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa, ispere se s etanolom i s dietil eterom i osuši pri 40°C pod vakuumom. Dobije se 115,9 mg (86,2% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z = 439 (M+H)<sup>+</sup>

**Primjer 10**

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-[(2-(2-piridil)-1,3-tiazol-4-il)metil-sulfanil]-3,5-piridindikarbonitril

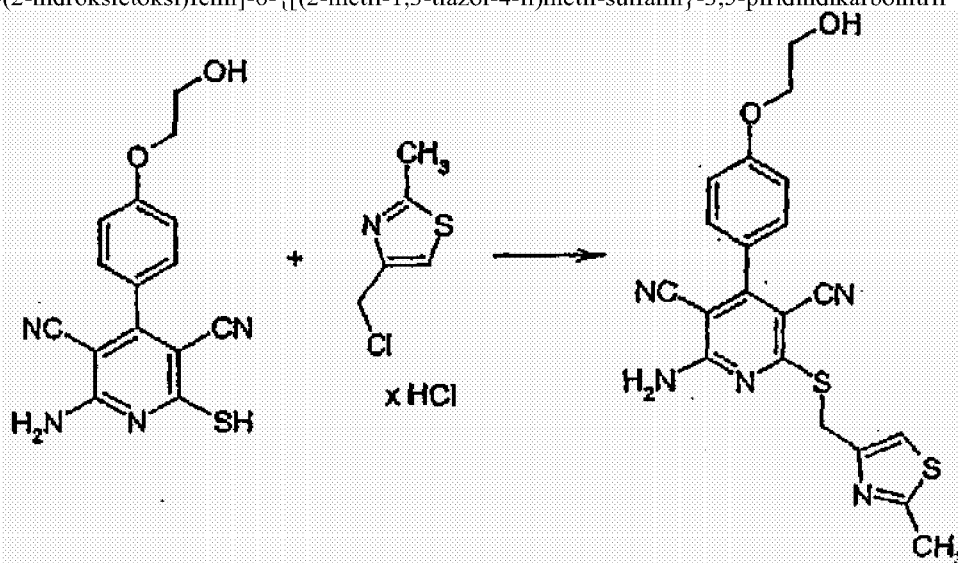


- 15 50 mg (0,15 mmola) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridin-dikarbonitrila se otopi u 1 ml DMF-a. Zatim se doda 51,5 mg (0,61 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 58,6 mg (0,23 mmola) 4-klormetil-2-(2-piridil)-1,3-tiazola. Suspenziju se mučka preko noći pri sobnoj temperaturi i pomiješa se s vodom. Talog se odsisa, ispere se s etanolom i s dietil eterom i osuši pri 40°C pod vakuumom. Dobije se 67,4 mg (87,9 % od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z = 501 (M+H)<sup>+</sup>.



**Primjer 11**

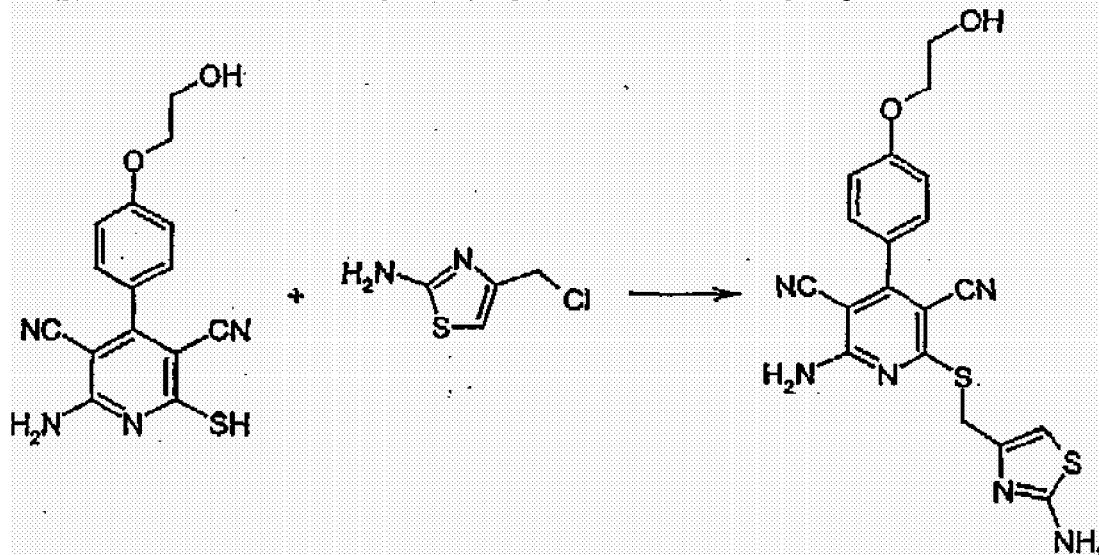
2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)fenil]-6-[[[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)metil-sulfanil]-3,5-piridindikarbonitril



- 31,2 mg (0,1 mmola) 2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 0,3 ml DMF-a. Zatim se doda 33,6 mg (0,4 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 27,6 mg (0,15 mmola) 4-metil-2-klor-1,3-tiazol-hidroklorida. Suspenziju se mućka preko noći pri sobnoj temperaturi, profiltrira i očisti pomoću preparativne HPLC [stupac: Macherey-Nagel VP 50/21 Nucleosil 100-5 C18 Nautilus, 20 × 50 mm; brzina protoka: 25 ml/min; gradijent (A = acetonitril, B = voda + 0,3% trifluoroctene kiseline): 0 min 10% A; 2,0 min 10% A; 6,0 min 90% A; 7,0 min 90% A; 7,1 min 10% A; 8,0 min 10% A; detekcija: 220 nm). Nakon isparavanja odgovarajuće frakcije dobije se 20,2 mg (47,7% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z = 424 (M+H)<sup>+</sup>

**Primjer 12**

2-amino-6-[[[(2-amino-1,3-tiazol-4-il)metil]sulfanil]-4-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-3,5-piridindikarbonitril



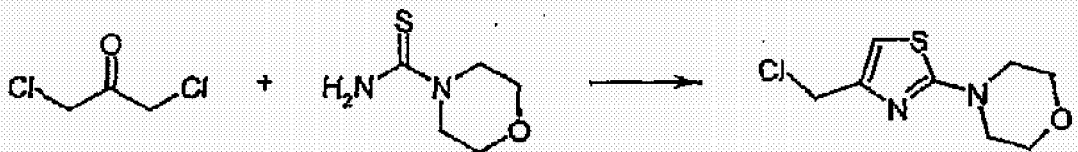
- 31,2 mg (0,1 mmola) 2-amino-4-[4-(2-hidroksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila se otopi u 0,3 ml DMF-a. Zatim se doda 33,6 mg (0,4 mmola) natrijevog hidrogen karbonata i 22,3 mg (0,15 mmola) 4-amino-2-klor-1,3-tiazola. Suspenziju se mućka preko noći pri sobnoj temperaturi, profiltrira i očisti pomoću preparativne HPLC [stupac: Macherey-Nagel VP 50/21 Nucleosil 100-5 C18 Nautilus, 20 × 50 mm; brzina protoka: 25 ml/min; gradijent (A = acetonitril, B = voda + 0,3% trifluoroctene kiseline): 0 min 10% A; 2,0 min 10% A; 6,0 min 90% A; 7,0 min 90% A; 7,1 min 10% A; 8,0 min 10% A; detekcija: 220 nm]. Nakon isparavanja odgovarajuće frakcije dobije se 35,7 mg (84,1% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z = 425 (M+H)<sup>+</sup>

**Primjer 13**

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-([2-(4-morfolinil)-1,3-tiazol-4-il]metil)sulfanil)-3,5-piridindikarbonitril

1. stupanj:

5 4-[4-(klormetil)-1,3-tiazol-2-il]morfolin

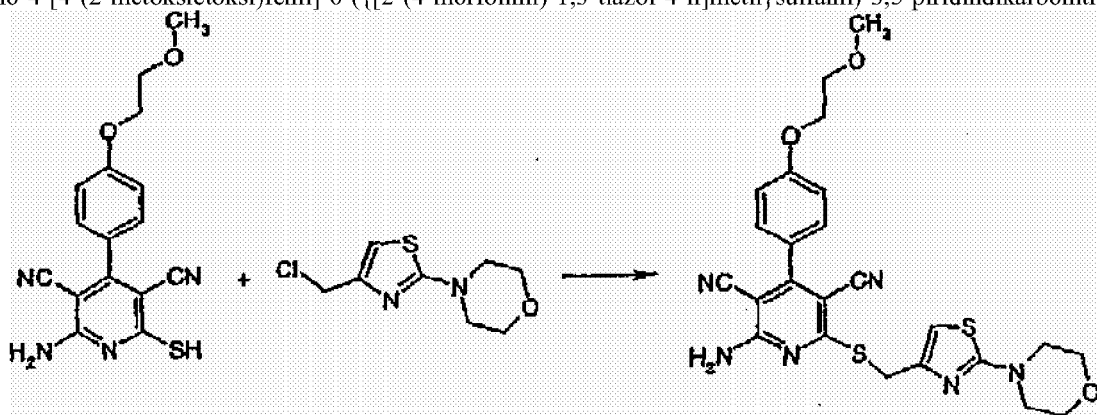


11,51 g (78,76 mmolova) 4-morfolinkarbotoamida i 10,00 g (78,76 mmolova) dikloroacetona grije se u 100 ml etanola jedan sat pod refluksom. Kad se ohladi, bezbojnu krutu tvar, koja se izluči iz ružičasto obojenc otopine, se odsisa i ispere dva puta s etanolom. Dobije se 12,96 g (75% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z - 219 (M+H)<sup>+</sup>

10

2. stupanj:

2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)fenil]-6-([2-(4-morfolinil)-1,3-tiazol-4-il]metil)sulfanil)-3,5-piridindikarbonitril



2 g (6,13 mmolova) 2-amino-4-[4-(2-metoksietoksi)-fenil]-6-sulfanil-3,5-piridindikarbonitrila i 2,68 g (12,26 mmolova) 4-[4-(klormetil)-1,3-tiazol-2-il]morfolina se otopi u suhom DMF-u (50 ml) i pomiješa se s 1,83 ml (12,26 mmolova) DBU. Nakon 3 sata miješanja pri sobnoj temperaturi, otapalo se odstrani na rotacijskom uređaju za isparavanje i ostatak se očisti pomoću preparativne HPLC (stupac: Kromasil 100 C18 250 × 20 mm, 10 μm; gradijent acetonitril-vode: 3 minute 10% acetonitrila, zatim tijekom 30 minuta 80% acetonitrila; brzina protoka: 25 ml/min). Dobije se 1,70 g (55% od teorijskog) proizvoda. MS (ESIpos): m/z = 509(M+H)<sup>+</sup>

20

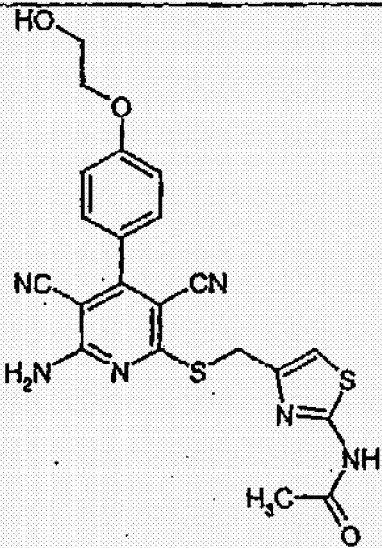
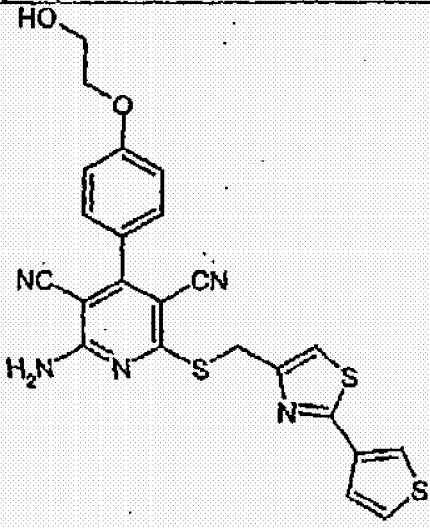
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 3,3 (m, 7H) ; 3,7 (m, 6H) ; 4,2 (tr, 2H) ; 4,4 (s, 2H) ; 6,95 (s, 1H) ; 7,15 (d, 2H) ; 7,45 (d, 2H) ; 8,0 (s, široki, 2H).

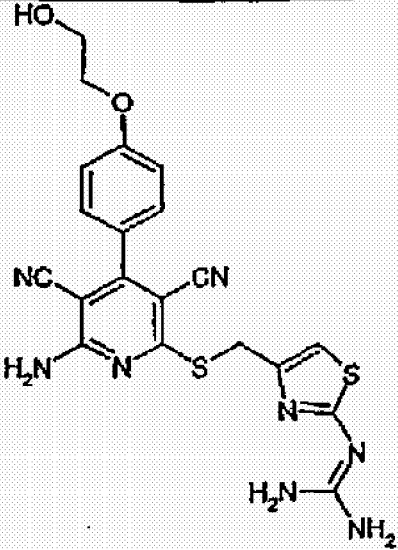
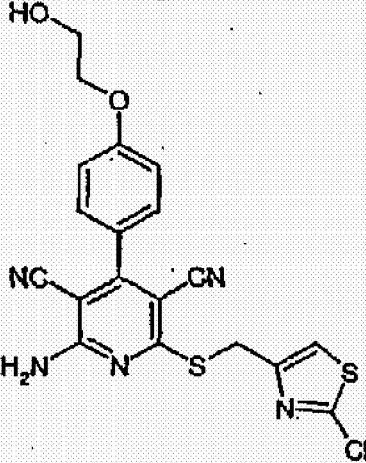
Analogno primjeru 13 proizvedeni su primjeri navedeni u tablici 3.

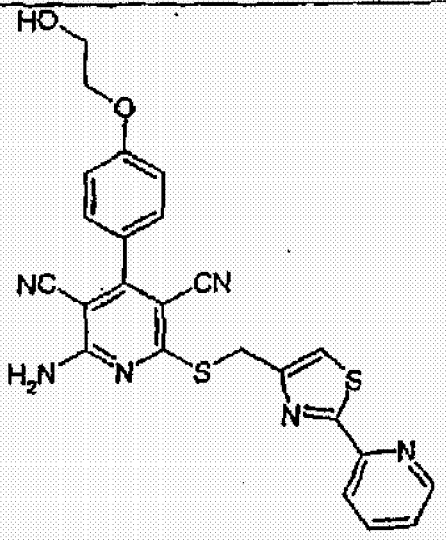
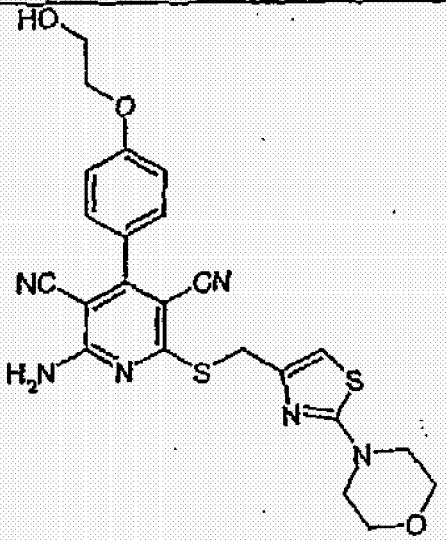
25

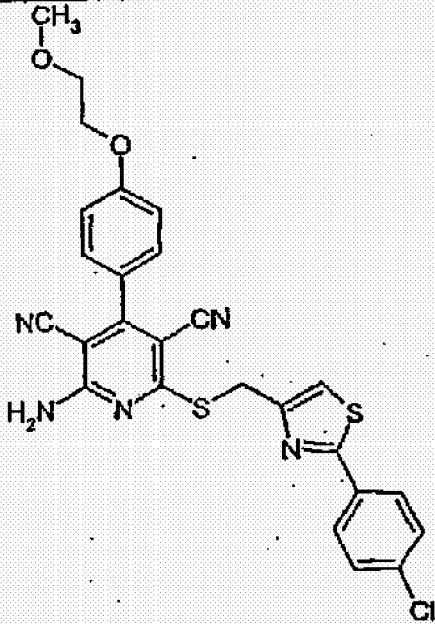
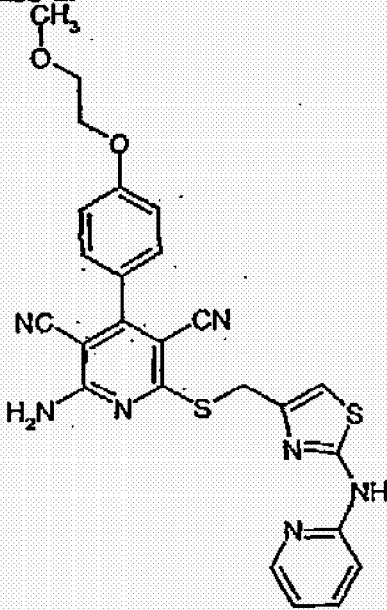
Klormetiltiazoli koji su upotrijebljeni kao zamjenske tvari su komercijalno dostupni ili se mogu proizvesti analogno stupnju 1 iz primjera 13.

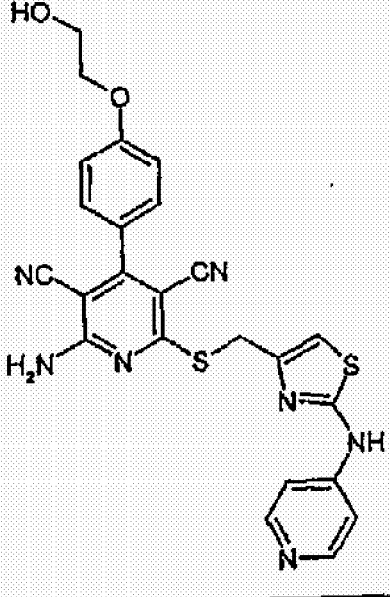
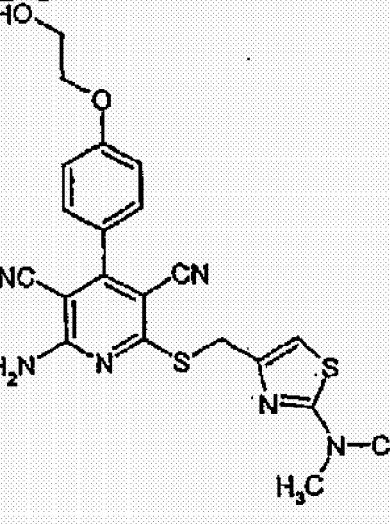
Tablica 3

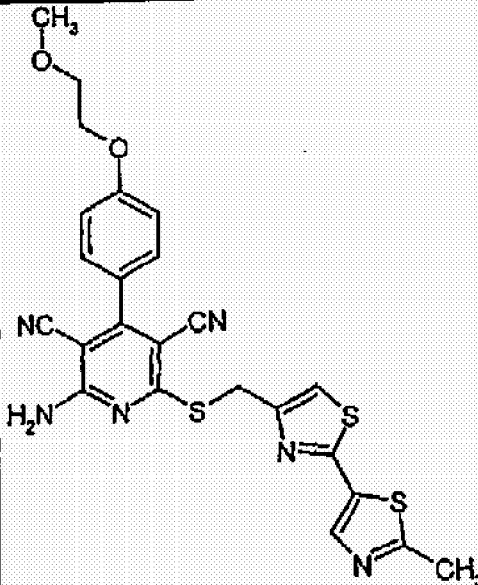
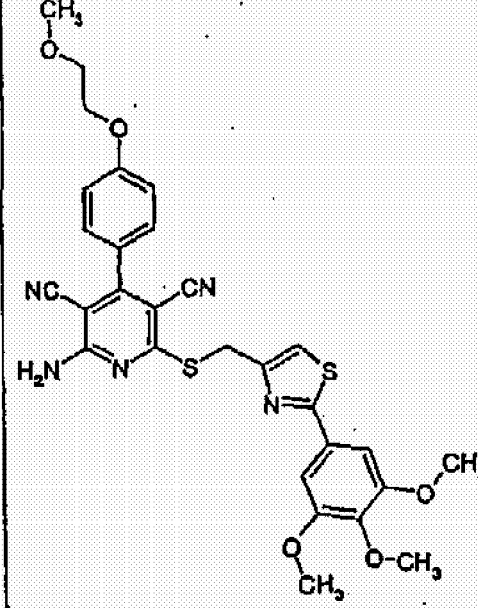
Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
14	 <chem>CC(=O)Nc1ncsc1CCSc2nc(C#N)c(C#N)c(N)c2COCCO</chem>	467	468
15	 <chem>C1=CC=C(S1)C2=CN=C(C2)SCCOCCO</chem>	492	493

Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
16	 <p>Chemical structure of compound 16: A pyrimidine ring substituted with a 2-hydroxyethoxy group, two cyano groups, an amino group, and a 2-aminothiazole-5-ylmethyl group.</p>	467	468
17	 <p>Chemical structure of compound 17: A pyrimidine ring substituted with a 2-hydroxyethoxy group, two cyano groups, an amino group, and a 2-chlorothiazole-5-ylmethyl group.</p>	444	445

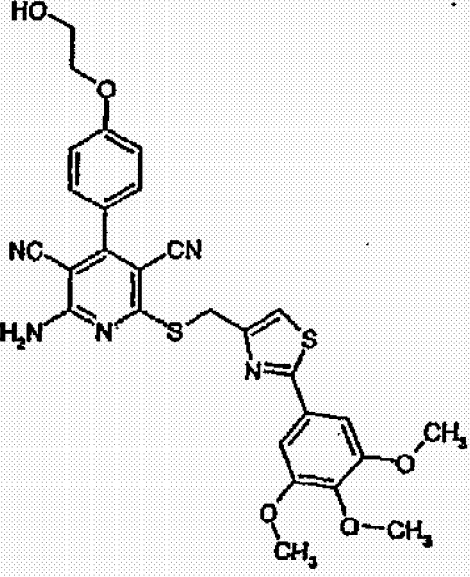
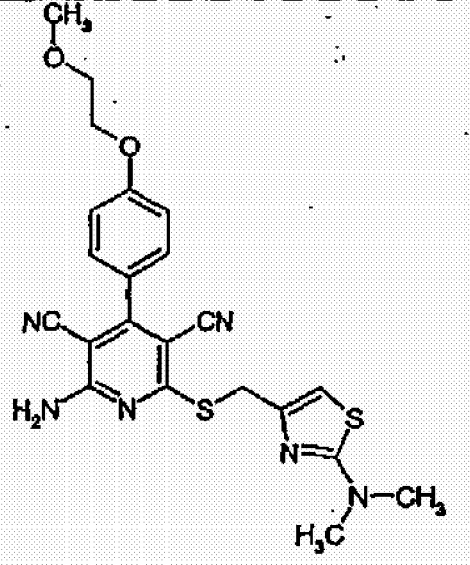
Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
18	 <chem>OCCOC1=CC=C(C=C1)c2c(C#N)c(N)c(SCC3=CN=C(S3)c4cncn4)c2</chem>	487	488
19	 <chem>OCCOC1=CC=C(C=C1)c2c(C#N)c(N)c(SCC3=CN=C(S3)N4CCOCC4)c2</chem>	495	496

Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
20	 <p>Chemical structure of compound 20: A pyridine ring substituted with a methyl 2-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl)phenylamino group at position 4, a cyano group at position 3, a cyano group at position 5, and an amino group at position 6. The pyridine ring is connected via a methylene bridge to a 1,3,4-thiazole ring, which is further substituted with a 4-chlorophenyl group at position 5.</p>	534	535
21	 <p>Chemical structure of compound 21: A pyridine ring substituted with a methyl 2-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl)phenylamino group at position 4, a cyano group at position 3, a cyano group at position 5, and an amino group at position 6. The pyridine ring is connected via a methylene bridge to a 1,3,4-thiazole ring, which is further substituted with a 2-pyridylamino group at position 5.</p>	516	517

Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
22	 <chem>CCOC(O)C1=CC=C(C=C1)C2=C(C#N)N(C#N)C(N)=N2SC3=CN=C(NC4=CC=CC=N4)S3</chem>	502	503
23	 <chem>CCOC(O)C1=CC=C(C=C1)C2=C(C#N)N(C#N)C(N)=N2SC3=CN=C(N(C)C)S3</chem>	453	454

Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
24	 <p>Chemical structure of compound 24: A pyridine ring substituted with a 2-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl) group, two cyano groups (NC), an amino group (H<sub>2</sub>N), and a 2-(2-methyl-1,3,4-thiazol-5-yl)ethylthio group (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-thiazole-CH<sub>3</sub>).</p>	521	522
25	 <p>Chemical structure of compound 25: A pyridine ring substituted with a 2-(4-(2-methoxyethoxy)phenyl) group, two cyano groups (NC), an amino group (H<sub>2</sub>N), and a 2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)ethylthio group (S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-phenyl-3,4,5-OCH<sub>3</sub>).</p>	590	591

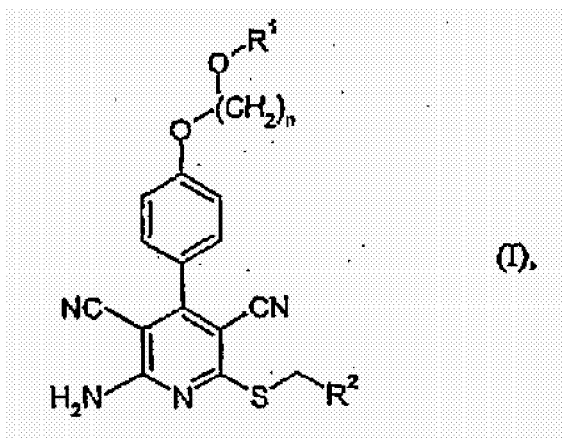


Primjer br.	Struktura	Tražena mol masa	Nađeno [M+H] <sup>+</sup>
26		576	577
27		467	468

## PATENTNI ZAHTJEVI

5

1. Spojevi formule (I)



**naznačeni time**, da

n je broj 2, 3 ili 4,

R<sup>1</sup> je vodik ili (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkil i

R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstituentom iz niza koji čine (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkil, halogen, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, piridilamino, tienil, furil, imidazolil, piridil, morfolinil, tioraorfolinil, piperidinil, piperazinil, N-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilpiperazinil, pirolidinil, oksazolil, izoksazolil, pirimidinil, pirazinil, prema potrebi sa (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilom supstituirani tiazolil ili prema potrebi do trostruko s halogenim, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkilom ili sa (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkoksi supstituirani fenil, i njihove soli, hidrati, hidrati soli i solvati.

2. Spojevi formule(I) prema zahtjevu 1, **naznačeni time**, da

n je broj 2,

R<sup>1</sup> je vodik, metil ili etil i

R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstituentom iz niza koji čine metil, etil, fluor, klor, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, 2-piridilamino, 4-piridilamino, tienil, piridil, morfolinil, piperidinil, prema potrebi s metilom supstituirani tiazolil ili prema potrebi do trostruko s klorom ili metoksi supstituirani fenil, i njihove soli, hidrati, hidrati soli i solvati.

3. Spojevi formule(I) prema zahtjevu 1, **naznačeni time**, da

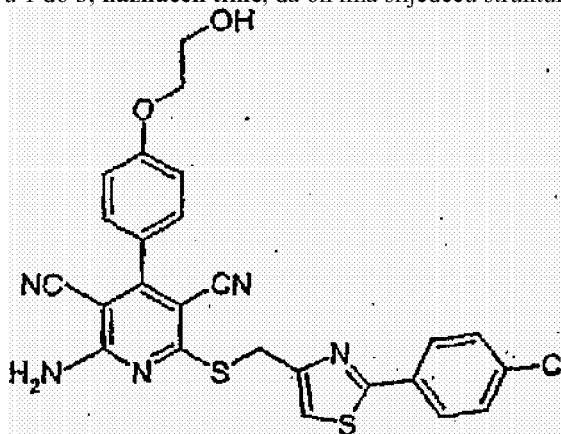
n je broj 2,

R<sup>1</sup> je vodik ili metil i

R<sup>2</sup> je piridil ili tiazolil, koji sa svoje strane može biti supstituiran sa supstituentom iz niza koji čine metil, klor, amino, dimetilamino, acetilamino, gvanidino, 2-piridilamino, 4-piridilamino, tienil, piridil, morfolinil, 2-metil-tiazol-5-il, fenil, 4-klorfenil ili 3,4,5-trimetoksifenil,

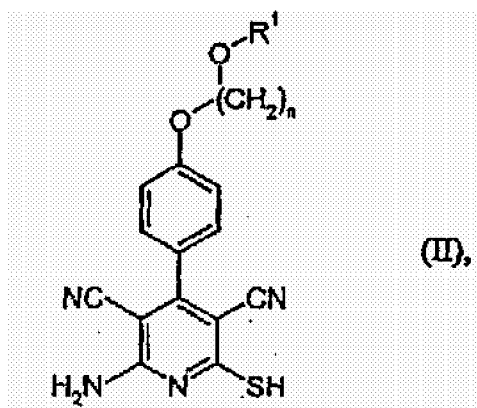
i njihove soli, hidrati, hidrati soli i solvati.

4. Spoj prema bilo kojem zahtjevu 1 do 3, **naznačen time**, da on ima slijedeću strukturu



i njegove soli, hidrati, hidrati soli i solvati.

5. Postupak za pripravu spojeva formule (I), definiranih kao u zahtjevu 1, **naznačen time**, da spojevi formule (II)



u kojoj  
n i R<sup>1</sup> imaju značenje dato u zahtjevu 1, reagiraju sa spojevima formule (III)

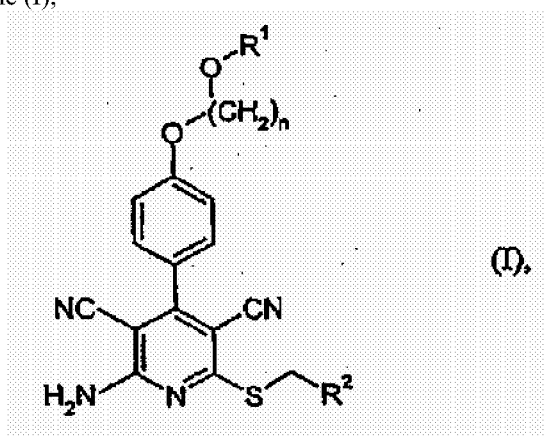


u kojoj  
R<sup>2</sup> ima značenje dato u zahtjevu i  
X je izlazna skupine.

6. Spojevi formule (I), definirani kao u zahtjevu 1, **naznačeni time**, da se oni upotrebljavaju za profilaksu i/ili liječenje bolesti.
7. Lijek, **naznačen time**, da on sadrži najmanje jedan spoj formule (I), definiran kao u zahtjevu 1, i najmanje jednu pomoćnu tvar.
8. Lijek, **naznačen time**, da on sadrži najmanje jedan spoj formule (I), definiran kao u zahtjevu 1, i najmanje jednu daljnju aktivnu tvar.
9. Upotreba spojeva formule (I), definiranih kao u zahtjevu 1, **naznačena time**, da se oni koriste za proizvodnju lijeka za profilaksu i/ili liječenje bolesti sistema srčanog optoka.
10. Upotreba spojeva formule (I), definiranih kao u zahtjevu 1, **naznačena time**, da se oni koriste za proizvodnju lijeka za profilaksu i/ili liječenje bolesti urogenitalnog područja i raka.
11. Upotreba spojeva formule (I), definiranih kao u zahtjevu 1, **naznačena time**, da se oni koriste za proizvodnju lijeka za profilaksu i/ili liječenje upalnih i neuroupalnih bolesti, neurodegenerativnih bolesti i stanja bola.

## SAŽETAK

Izum se odnosi na spojeve formule (I),



na postupak za njihovu proizvodnju i na njihovu upotrebu kao selektivnih liganada koji se vežu na adenzin A1 receptore.