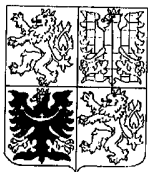


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.09.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.09.1997**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/060145**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)
(86) PCT číslo: **PCT/US98/19973**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/16438**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 990

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/4355
A 61 K 31/4365
A 61 K 31/437
A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

ASTA MEDICA AKTIENGESELLSCHAFT, Dresden,
DE;

(72) Původce:

McMahon Gerald, San Francisco, CA, US;
Weinberger Heinz, Sulzbach, DE;
Kutscher Bernhard, Maintal, DE;
App Harald, San Francisco, CA, US;

(74) Zástupce:

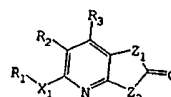
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

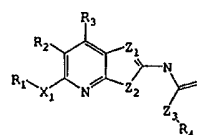
**Způsob in vitro modulace funkce serin/threonin
protein kinázy, způsob in vitro identifikace
sloučenin pro tuto modulaci, sloučeniny na bázi
azabenzimidazolu, jejich použití, způsob jejich
výroby a farmaceutické kompozice**

(57) Anotace:

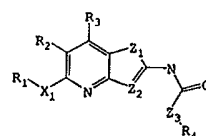
Řešením je způsob in vitro modulace funkce serin/threonin protein kinázy, který zahrnuje stupeň kontaktování buněk exprimujících tuto serin/threonin kinázu se sloučeninou na bázi azabenzimidazolu a způsob in vitro identifikace sloučenin pro tuto modulaci. Dále jsou řešením sloučeniny na bázi azabenzimidazolu obecného vzorce I, II nebo III, kde jednotlivé substituenty mají význam uvedený v nárocích, způsob jejich výroby, jejich použití pro výrobu léčiv a farmaceutické kompozice na jejich bázi. Výše uvedené sloučeniny jsou užitečné jako léčiva vhodná zejména pro léčení abnormálních stavů tvořených rakovinou a fibrotickými poruchami a stavů spojených s aberací v dráze signální transdukce charakterizované interakcí mezi serin/threonin protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.



(I)



(II)



(III)

21.08.00

2000-990

Způsob in vitro modulace funkce serin/threonin protein kinázy, způsob in vitro identifikace sloučenin pro tuto modulaci, sloučeniny na bázi azabenzimidazolu, jejich použití, způsob jejich výroby a farmaceutické kompozice

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu in vitro modulace funkce serin/threonin protein kinázy, způsob in vitro identifikace sloučenin pro tuto modulaci, sloučenin na bázi azabenzimidazolu, jejich použití pro výrobu léčiv, způsobu jejich výroby a farmaceutických kompozic na jejich bázi.

Dosavadní stav techniky

Dosavadní stav techniky, který je dále popsán není v žádném ohledu na újmu novosti a inventivnosti řešení podle vynálezu a je uveden pouze pro bližší porozumění vynálezu.

Transdukce buněčného signálu je základní mechanismus, jehož prostřednictvím jsou externí stimuly regulující rozličné buněčné procesy přenášeny do nitra buněk. Jeden z klíčových biochemických mechanismů signálové transdukce zahrnuje reverzibilní fosforylaci proteinů, která reguluje aktivitu vyzrálých bílkovin změnou jejich struktury a funkce.

Nejlépe charakterizované protein kinázy u eukaryot fosforylují bílkoviny na alkoholové skupině skupině serinových, threoninových a tyrosinových reziduí. Tyto kinázy se rozpadají do dvou skupin, do skupiny kináz specifických pro fosforylaci serinu a threoninu a do skupiny kináz specifických pro fosforylaci tyrosinu. Některé kinázy mají tzv. "duální specifitu", což znamená, že jsou schopny fosforylovat rezidua tyrosinu stejně tak jako serinu/threoninu.

Protein kinázy mohou být také charakterizovány jejich umístěním v buňce. Některé kinázy jsou transmembránové receptorové bílkoviny schopné vázat ligandy vně buněčné membrány. Navázání ligandů narušuje kinázovou katalytickou aktivitu receptorové bílkoviny. Jiné kinázy jsou ne-receptorové bílkoviny postrádající transmembránovou doménu. Ne-receptorové proteinové kinázy se nacházejí v celé řadě buněčných kompartmentů, od vnitřního povrchu buněčné membrány až k jádru.

Mnoho kináz hraje roli v regulačních kaskádách, kde jejich substráty mohou zahrnovat jiné kinázy, jejichž aktivity jsou regulovány jejich stavem fosforylace. Nakonec je efektorová

aktivita modulována fosforylací resultující z aktivace celé metabolické dráhy.

Rodina serin/threonin protein kináz zahrnuje kinázy regulující mnoho kroků v signálních kaskádách, včetně kaskád kontrolujících buněčný růst, migraci, diferenciaci, genovou expresi, kontrakci svalů, metabolismus glukózy, syntézu buněčných proteinů a regulaci buněčného cyklu.

Příkladem non-receptorové protein kinázy, která fosforyluje cílové bílkoviny na reziduích serinu a threoninu, je RAF. RAF moduluje katalytickou aktivitu dalších protein kináz, jako je například protein kináza, která fosforyluje a tím aktivuje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK). RAF sama o sobě je aktivována v membráně ukotveným proteinem RAS, který je sám aktivován ligandem aktivovanou tyrosin receptorovou protein kinázou, jako je například receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a receptor pro růstový faktor derivovaný z krevních destiček (PDGFR). Biologická významnost kinázy RAF je zdůrazněna faktem, že pozměněné formy kinázy RAF mohou způsobit rozvoj rakoviny. Důkazem poukazujícím na důležitost kinázy RAF u malignit je práce autorů Monia et al., 1996, Nature Medicine 2:668, která je tímto v celém svém rozsahu včetně všech obrázků a tabulek začleněna do předkládaného vynálezu jako reference.

Ve snaze objevit nové terapeutické postupy pro léčbu nádorových a jiných onemocnění biomedicínští chemici a výzkumní pracovníci navrhli, syntetizovali a testovali molekuly, které inhibují funkci protein kináz. Některé malé organické molekuly vytvářejí třídu sloučenin, které modulují funkci protein kináz.

Byly popsány příklady molekul, které inhibují funkci protein kináz. Jedná se o bis monocyklické, bicyklické nebo heterocyklické arylové sloučeniny (PCT WO 92/20642), deriváty vinylen-azaindolu (PCT WO 94/14808), 1-cyklopropyl-4-pyridyl-

chinolony (patent US Patent č. 5330992), styrylové sloučeniny (patent US Patent č. 5217999), styrylem substituované pyridylové sloučeniny (patent US Patent č. 5302606), určité chinazolinové deriváty (příhláška EP č. 0 566 266 A1), selenoindoly a selenidy (PCT WO 94/03427), tricyklické polyhydroxylové sloučeniny (PCT WO 92/21660) a sloučeniny na bázi benzylfosfonové kyseliny (PCT WO 91/15495).

Sloučeniny, které mohou překonat buněčnou membránu a jsou rezistentní vůči kyselé hydrolýze jsou potencionálně výhodnými terapeutiky pro svoji biodostupnost po perorálním podání pacientům. Avšak mnoho z těchto inhibitorů protein kináz inhibuje pouze slabě jejich funkci. Navíc mnoho z nich inhibuje celou řadu protein kináz a způsobuje proto významné vedlejší účinky při terapeutickém použití.

Popis vynálezu

Část předkládaného vynálezu je zaměřena na metody modulace funkce serin/threonin protein kináz pomocí sloučenin na bázi azabenzimidazolu. Metody zahrnují buňky, které exprimují serin/threonin protein kinázu, jako je například RAF. Vynález navíc popisuje metody prevence a léčby abnormálních stavů se vztahem k serin/threonin protein kinázám pomocí sloučeniny identifikované v předkládaném vynálezu. Vynález se dále týká farmaceutických preparátů obsahujících sloučeniny identifikované pomocí metod předkládaného vynálezu.

I. Metody detekce sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy

Metody předkládaného vynálezu představují prostředek pro modulaci funkce jak receptorových, tak i cytosolických

serin/threonin protein kináz. Tyto metody představují prostředek pro modulaci enzymů za podmínek in vitro i in vivo. Pro in vitro podání se metody předkládaného vynálezu týkají částečně metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin kináz.

Z tohoto důvodu vynález zaprvé uvádí metodu modulace funkce serin/threonin protein kinázy pomocí azabenzimidazolové sloučeniny. Azabenzimidazolová sloučenina je volitelně substituovaná organickými skupinami. Metoda je tvořena kontaktem buněk exprimujících serin/threonin protein kinázu se sloučeninou, který je předmětem předkládaného vynálezu.

Termín "funkce" se týká buněčné role serin/threonin protein kinázy. Rodina serin/threonin protein kináz zahrnuje kinázy, které regulují mnoho kroků v signálních kaskádách, včetně kaskád kontrolujících buněčný růst, migraci, diferenciaci, genovou expresi, kontrakci svalů, metabolismus glukózy, syntézu buněčných proteinů a regulaci buněčného cyklu.

Termín "moduluje" se týká schopnosti sloučeniny narušit funkci protein kinázy. Modulující látka aktivuje katalytickou aktivitu protein kinázy, nejlépe aktivuje nebo inhibuje katalytickou aktivitu protein kinázy v závislosti na koncentraci sloučeniny vystavené protein kináze a zcela nejlépe inhibuje katalytickou aktivitu protein kinázy.

Termín "katalytická aktivita" v kontextu předkládaného vynálezu definuje stupeň fosforylace substrátu protein kinázou. Katalytická aktivita může být měřena například určením množství substrátu přeměněného na produkt v čase. Fosforylace substrátu probíhá na aktivním místě protein kinázy. Aktivní místo je za normálních okolností dutina, v které je substrát navázán na protein kinázu a je fosforylován.

Zde používaný termín "substrát" se týká molekuly fosforylované serin/threonin protein kinázou. Substrátem je nejlépe peptid a zcela nejlépe protein. Ve vztahu k protein kináze RAF jsou preferovanými substráty MEK a substrát pro MEK MAPK.

Termín "aktivuje" se týká zvyšování buněčné funkce protein kinázy. Funkcí protein kinázy je nejlépe interakce s přirozeným vazebným partnerem a zcela nejlépe katalytická aktivita.

Termín "inhibuje" se týká snižování buněčné funkce protein kinázy. Funkcí protein kinázy je nejlépe interakce s přirozeným vazebným partnerem a zcela nejlépe katalytická aktivita.

Termín "moduluje" se také týká změny funkce protein kinázy zvýšením nebo snížením pravděpodobnosti tvorby komplexu mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem. Modulační látka preferovaně zvyšuje pravděpodobnost tvorby takového komplexu mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem, více preferovaně zvyšuje nebo snižuje pravděpodobnost tvorby takového komplexu mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem v závislosti na koncentraci sloučeniny vystavené protein kináze, a nejvíce preferovaně snižuje pravděpodobnost tvorby takového komplexu mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

Termín "komplex" se týká spojení alespoň dvou molekul navázaných k sobě. Komplexy signálové transdukce často obsahují alespoň dvě proteinové molekuly navázané na sebe. Například u protein tyrosinové receptorové protein kinázy se spojují složky GRB2, SOS, RAF a RAS za vzniku signálního transdukčního komplexu v závislosti na mitogenním ligandu.

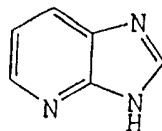
Termín "přirozený vazebný partner" se týká polypeptidů, které se váží na protein kinázu v buňkách. Přirození vazební partneři hrají roli v šíření signálu v procesu protein kinázové signální transdukce. Změna v interakci mezi protein kinázou a přirozeným

vazebním partnerem se může sama manifestovat ve zvýšení nebo snížení pravděpodobnosti tvorby interakce, nebo ve zvýšení nebo snížení pravděpodobnosti koncentrace komplexu protein kináza/přirozený vazebný partner. Přirozený vazebný partner protein kinázy se může s vysokou afinitou vázat na intracelulární oblast protein kinázy. Vysoká afinita představuje rovnovážnou vazebnou konstantu v řádu 10^{-6} M nebo méně. Navíc může přirozený vazebný partner přechodně interagovat s intracelulární oblastí protein kinázy a chemicky ji modifikovat. Přirození vazební partneři protein kinázy jsou vybrány ze skupiny, která obsahuje, ale není omezena na SRC homologní 2 (SH2) nebo 3 (SH3) domény, jiné fosforyl tyrosin vazebné (PTB) domény, guaninové nukleotidové výměnné faktory, protein fosfatázy a další kinázy. Metody určení změn interakcí mezi protein kinázami a jejich přirozenými vazebnými partnery jsou snadno dostupné v oboru.

Termín "serin/threonin protein kináza" se týká enzymu s aminokyselinovou sekvencí s alespoň 10% aminokyselinovou identitou s jinými enzymy, které fosforylují proteiny na serinových nebo threoninových reziduích. Serin/threonin protein kináza katalyzuje vazbu fosfátu na proteiny přes serinová nebo threoninová rezidua. Serin/threonin protein kinázy mohou existovat jako membránové vazebné nebo cytosolické proteiny.

Zde užívaný termín "kontakt" se týká smíšení roztoku tvořeného azabenzimidazolovou sloučeninou, která je předmětem předkládaného vynálezu, s tekutým médiem pro inkubaci buněk. Roztok obsahující sloučeninu může být také tvořen další komponentou, jako je například dimetylsulfoxid (DMSO), která usnadňuje vychytání azabenzimidazolové sloučeniny nebo sloučenin do buněk, které jsou předmětem předkládaných metod. Roztok obsahující azabenzimidazolovou sloučeninu může být přidán k buněčnému inkubačnímu médiu za použití transportního zařízení, jako je například zařízení s použitím pipety či injekční stříkačky.

Termín "azabenzimidazolová sloučenina" se týká azabenzimidazolové organické sloučeniny substituované chemickými substituenty. Azabenzimidazolové sloučeniny mají obecný vzorec:



Termín "substituovaný" mající vztah k předkládaného vynálezu se týká azabenzimidazolové sloučeniny, která je derivatizována jakýmkoli množstvím chemických substituentů.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody modulace funkce serin/threonin protein kinázy, kde protein kinázou je RAF.

RAF protein kináza fosforyluje cílové proteiny na serinových nebo threoninových reziduích. Jedním takovým cílovým proteinem je protein kináza (MEK), která fosforyluje a následně aktivuje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK). RAF sama o sobě je aktivována membránově vázaným guanin trifosfát hydrolyzujícím enzymem RAS v odpovědi na mitogenem stimulované receptorové protein tyrosin kinázy, jako jsou například receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) a receptor pro z krevních destiček derivovaný růstový faktor (PDGFR).

Pomocí metod, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, lze detekovat sloučeniny, které modulují funkci protein kinázy RAF v buňkách. RAF fosforyluje protein kinázu (MEK), která dále fosforyluje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK). Analýzy, které monitorují pouze fosforylaci MEK prostřednictvím

RAF nejsou citlivé, protože stupeň fosforylace MEK není významný. Aby se překonal tento problém senzitivity, je v předkládaném vynálezu sledována fosforylace MEK i MAPK. MAPK fosforylační signál násobí MEK fosforylační signál a umožňuje sledovat RAF dependentní fosforylaci, například pomocí enzymově vázané imunosorpční analýzy (ELISA). Analýza, která je předmětem předkládaného vynálezu je navíc prováděna vysokokapacitně, což umožňuje rychlou monitoraci mnoha sloučenin v krátkém časovém úseku.

V dalším aspektu popisuje vynález metodu identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kináz. Tato metoda je tvořena kroky kontaktu buněk exprimujících serin/threonin protein kinázu se sloučeninou a monitoraci efektu na buňkách.

Termín "monitorace" se týká pozorování účinku po přidání sloučeniny k buňkám, které jsou předmětem předkládané metody. Účinek se může manifestovat změnou buněčného fenotypu, buněčné proliferace, katalytické aktivity protein kinázy, nebo změnou interakce mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

Termín "efekt" popisuje změnu nebo chybění změny v buněčném fenotypu nebo buněčné proliferaci. "Efekt" může také popisovat změnu nebo chybění změny katalytické aktivity protein kinázy. "Efekt" může také popisovat změnu nebo chybění změny interakce mezi protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

Preferovaná forma předkládaného vynálezu se týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy, kde efektem je změna nebo absence změny v buněčném fenotypu.

Termín "buněčný fenotyp" se týká vnějšího vzhledu buňky nebo tkáně, nebo funkce buňky nebo tkáně. Příkladem buněčného fenotypu jsou velikost buňky (zmenšení nebo zvětšení), buněčná

proliferace (zvýšení nebo snížení počtu buněk), buněčná diferenciaci (změna nebo absence změny ve tvaru buňky), přežití buňky, apoptóza (buněčná smrt), nebo utilizace metabolických živin (např. vychytávání glukózy). Změny nebo absence změn v buněčném fenotypu jsou snadno měřitelné pomocí technik známých v oboru.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy, kde efektem je změna nebo absence změn v buněčné proliferaci.

Termín "buněčná proliferace" se týká stupně buněčného dělení skupiny buněk. Počet buněk rostoucích v nádobce může být kvantifikován osobou znalou oboru, kdy tato osoba vizuálně odečítá počet buněk v definovaném objemu za použití běžného světelného mikroskopu. Alternativně může být stupeň buněčné proliferace kvantifikován laboratorním zařízením, které opticky nebo kondukčně měří denzitu buněk v příslušném médiu.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy, kde efektem je změna nebo absence změny interakce mezi serin/threonin protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

Termín "interakce" v kontextu předkládaného vynálezu, popisuje komplex vytvořený mezi intracelulární oblastí protein kinázy a přirozeným vazebným partnerem nebo sloučeninou. Termín "interakce" může být také rozšířen na komplex vytvořený mezi sloučeninou, která je předmětem předkládaného vynálezu, a intracelulárními a extracelulárními oblastmi studované protein kinázy. Ačkoli cytosolická protein kináza nemá extracelurní oblast, receptorová protein kináza obsahuje oblast extracelulární i intracelulární.

Zde používaný termín "intracelulární oblast" se týká části protein kinázy, která existuje uvnitř buňky. Zde používaný termín "extracelulární oblast" se týká části protein kinázy, která existuje vně buňky.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy. Tato metoda se dále skládá z následujících kroků: a) lýzy buněk za účelem získání lyzátu obsahujícího serin/threonin protein kinázu; b) adsorpce serin/threonin protein kinázy na protilátku; c) inkubace adsorbované serin/threonin protein kinázy se substrátem nebo substráty; a d) adsorpce substrátu nebo substrátů na pevnou matici nebo protilátku. Krok monitorace efektu na buňky se skládá z měření koncentrace fosfátu v substrátu nebo substrátech.

Zde používaný termín "lýza" se týká metody disrupce integrity buňky, čímž dochází k uvolnění vnitřního prostředí. Buněčné lýzy je možno dosáhnout mnoha způsoby známými osobám zkušeným v oboru. Jedná se nejlépe o sonikaci nebo o jiné techniky určené k rozbíjení buněk a zcela nejlépe o detergentní techniky.

Zde používaný termín "protilátka" se týká bílkovinné molekuly, která se specificky váže na protein kinázu. Prottilátka se preferovaně váže na jednu třídu protein kinázy a zcela preferovaně se váže k RAF protein kináze.

Zde používaný termín "specificky se váže" se týká prottilátky, která se váže na protein kinázu s vyšší afinitou než jiná protein kináza nebo buněčná bílkovina. Prottilátka, která se specificky váže na protein kinázu, váže větší množství specifické protein kinázy než jakákoli jiná protein kináza nebo buněčná bílkovina.

Zde používaný termín "adsorpce" se týká vazby molekuly k povrchu protilátky nebo pevné matrice. Příkladem pevných matric je chemicky modifikovaná celulóza, jako je například fosfocelulóza a nylon. Protilátky mohou být navázány na pevné matrice za použití technik dobře známým osobám znalým oboru. Viz např. Harlo a Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratories.

Zde používaný termín "měření koncentrace fosfátu" se týká technik běžně známým osobám znalým oboru. Tyto techniky zahrnují kvantifikaci koncentrace fosfátu v substrátu nebo určení relativních množství fosfátu v substrátu. Tyto techniky mohou zahrnovat adsorpci substrátu na membránu a detekci množství fosfátu v substrátu pomocí měření radioaktivity.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy. Tato metoda se dále skládá z následujících kroků: a) lýzy buněk za účelem získání lyzátu obsahujícího RAF; b) adsorpce RAF na protilátku; c) inkubace adsorbované RAF s MEK a MAPK; a d) adsorpce MEK a MAPK na pevnou matrici nebo protilátku. Krok měření efektu na buňky se skládá z monitorace koncentrace fosfátu v MEK a MAPK.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy. V této metodě má azabenzimidazolová sloučenina strukturu definovanou v předkládaném vynálezu vzorci I, II nebo III, nebo v jakékoli podskupině sloučenin definovaných vzorci I, II nebo III.

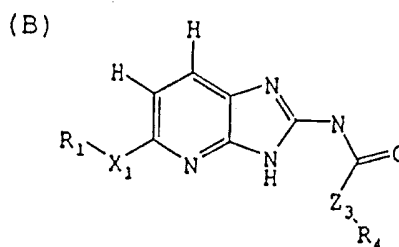
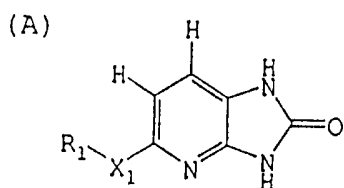
Termín "sloučenina" se týká sloučeniny nebo její farmaceuticky přijatelné soli, esteru, amidu, proléku, izomeru nebo metabolitu.

Termín "farmaceuticky přijatelná sůl" se týká formulace sloučeniny, která nenarušuje biologickou aktivitu a vlastnosti výchozí sloučeniny. Farmaceutické soli mohou být získány reakcí sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu s anorganickými nebo organickými kyselinami, jako je například kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, dusičná, fosforečná, metansulfonová, etansulfonová, *p*-toluensulfonová, salicylová a podobně.

Termín "prolék" se týká látky, která je přeměněna na vlastní účinný lék za podmínek *in vivo*. Proléky mohou být v některých situacích aplikovány snadněji než vlastní účinné léky. Prolék může být například biodostupný po perorálním podání, zatímco vlastní účinný lék biodostupný není, nebo může lék ve formě proléku být lépe rozpustný a může být tak aplikován intravenózní cestou.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy a kde azabenzimidazolová sloučenina má strukturu definovanou v předkládaném vynálezu vzorci I, II nebo III, kde azabenzimidazolová sloučenina je vybrána ze skupiny tvořené SABI sloučeninami.

Termín "SABI sloučeniny" se týká skupiny azabenzimidazolových sloučenin majících strukturu definovanou v předkládaném vynálezu vzorci A nebo B, a číslování A-1 až A-198 podle následující tabulky:



Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-1	Fenyl	O	-	-
A-2	Fenyl	S	-	-
A-3	Fenyl	O	Metyl	O
A-4	Fenyl	O	Etyl	O
A-5	2-nitrofenyl	O	-	-
A-6	3-nitrofenyl	O	-	-
A-7	4-nitrofenyl	O	-	-
A-8	2-chlorofenyl	O	-	-
A-9	3-chlorofenyl	O	-	-
A-10	4-chlorofenyl	O	-	-
A-11	2-metylfenyl	O	-	-
A-12	3-metylfenyl	O	-	-
A-13	4-metylfenyl	O	-	-
A-14	2-fluorofenyl	O	-	-
A-15	3-fluorofenyl	O	-	-
A-16	4-fluorofenyl	O	-	-
A-17	2-(trifluorometyl)fenyl	O	-	-
A-18	3-(trifluorometyl)fenyl	O	-	-
A-19	4-(trifluorometyl)fenyl	O	-	-
A-20	2-metoxifyfenyl	O	-	-
A-21	3-metoxifyfenyl	O	-	-
A-22	4-metoxifyfenyl	O	-	-
A-23	2-karboxyfenyl	O	-	-
A-24	3-karboxyfenyl	O	-	-
A-25	4-karboxyfenyl	O	-	-
A-26	2-nitrofenyl	S	-	-
A-27	3-nitrofenyl	S	-	-
A-28	4-nitrofenyl	S	-	-
A-29	2-chlorofenyl	S	-	-
A-30	3-chlorofenyl	S	-	-
A-31	4-chlorofenyl	S	-	-
A-32	2-metylfenyl	S	-	-
A-33	3-metylfenyl	S	-	-
A-34	4-metylfenyl	S	-	-
A-35	2-fluorofenyl	S	-	-

Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-36	3-fluorofenyl	S	-	-
A-37	4-fluorofenyl	S	-	-
A-38	2-(trifluorometyl)fenyl	S	-	-
A-39	3-(trifluorometyl)fenyl	S	-	-
A-40	4-(trifluorometyl)fenyl	S	-	-
A-41	2-metoxifyfenyl	S	-	-
A-42	3-metoxifyfenyl	S	-	-
A-43	4-metoxifyfenyl	S	-	-
A-44	2-karboxyfenyl	S	-	-
A-45	3-karboxyfenyl	S	-	-
A-46	4-karboxyfenyl	S	-	-
A-47	Fenyl	NH	-	-
A-48	2-nitrofenyl	NH	-	-
A-49	3-nitrofenyl	NH	-	-
A-50	4-nitrofenyl	NH	-	-
A-51	2-chlorofenyl	NH	-	-
A-52	3-chlorofenyl	NH	-	-
A-53	4-chlorofenyl	NH	-	-
A-54	2-metylfenyl	NH	-	-
A-55	3-metylfenyl	NH	-	-
A-56	4-metylfenyl	NH	-	-
A-57	2-fluorofenyl	NH	-	-
A-58	3-fluorofenyl	NH	-	-
A-59	4-fluorofenyl	NH	-	-
A-60	2-(trifluorometyl)fenyl	NH	-	-
A-61	3-(trifluorometyl)fenyl	NH	-	-
A-62	4-(trifluorometyl)fenyl	NH	-	-
A-63	2-metoxifyfenyl	NH	-	-
A-64	3-metoxifyfenyl	NH	-	-
A-65	4-metoxifyfenyl	NH	-	-
A-66	2-karboxyfenyl	NH	-	-
A-67	3-karboxyfenyl	NH	-	-
A-68	4-karboxyfenyl	NH	-	-
A-69	2-nitrofenyl	O	Metyl	O
A-70	3-nitrofenyl	O	Metyl	O

Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-71	4-nitrofenyl	O	Metyl	O
A-72	2-chlorofenyl	O	Metyl	O
A-73	3-chlorofenyl	O	Metyl	O
A-74	4-chlorofenyl	O	Metyl	O
A-75	2-metylfenyl	O	Metyl	O
A-76	3-metylfenyl	O	Metyl	O
A-77	4-metylfenyl	O	Metyl	O
A-78	2-fluorofenyl	O	Metyl	O
A-79	3-fluorofenyl	O	Metyl	O
A-80	4-fluorofenyl	O	Metyl	O
A-81	2-(trifluorometyl)fenyl	O	Metyl	O
A-82	3-(trifluorometyl)fenyl	O	Metyl	O
A-83	4-(trifluorometyl)fenyl	O	Metyl	O
A-84	2-metoxymetyl	O	Metyl	O
A-85	3-metoxymetyl	O	Metyl	O
A-86	4-metoxymetyl	O	Metyl	O
A-87	2-karboxymetyl	O	Metyl	O
A-88	3-karboxymetyl	O	Metyl	O
A-89	4-karboxymetyl	O	Metyl	O
A-90	Fenyl	S	Metyl	O
A-91	2-nitrofenyl	S	Metyl	O
A-92	3-nitrofenyl	S	Metyl	O
A-93	4-nitrofenyl	S	Metyl	O
A-94	2-chlorofenyl	S	Metyl	O
A-95	3-chlorofenyl	S	Metyl	O
A-96	4-chlorofenyl	S	Metyl	O
A-97	2-metylfenyl	S	Metyl	O
A-98	3-metylfenyl	S	Metyl	O
A-99	4-metylfenyl	S	Metyl	O
A-100	2-fluorofenyl	S	Metyl	O
A-101	3-fluorofenyl	S	Metyl	O
A-102	4-fluorofenyl	S	Metyl	O
A-103	2-(trifluorometyl)fenyl	S	Metyl	O
A-104	3-(trifluorometyl)fenyl	S	Metyl	O
A-105	4-(trifluorometyl)fenyl	S	Metyl	O

Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-106	2-metoxifyfenyl	S	Metyl	O
A-107	3-metoxifyfenyl	S	Metyl	O
A-108	4-metoxifyfenyl	S	Metyl	O
A-109	2-karboxifyfenyl	S	Metyl	O
A-110	3-karboxifyfenyl	S	Metyl	O
A-111	4-karboxifyfenyl	S	Metyl	O
A-112	Fenyl	NH	Metyl	O
A-113	2-nitrofenyl	NH	Metyl	O
A-114	3-nitrofenyl	NH	Metyl	O
A-115	4-nitrofenyl	NH	Metyl	O
A-116	2-chlorofenyl	NH	Metyl	O
A-117	3-chlorofenyl	NH	Metyl	O
A-118	4-chlorofenyl	NH	Metyl	O
A-119	2-metylfenyl	NH	Metyl	O
A-120	3-metylfenyl	NH	Metyl	O
A-121	4-metylfenyl	NH	Metyl	O
A-122	2-fluorofenyl	NH	Metyl	O
A-123	3-fluorofenyl	NH	Metyl	O
A-124	4-fluorofenyl	NH	Metyl	O
A-125	2-(trifluorometyl) fenyl	NH	Metyl	O
A-126	3-(trifluorometyl) fenyl	NH	Metyl	O
A-127	4-(trifluorometyl) fenyl	NH	Metyl	O
A-128	2-metoxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-129	3-metoxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-130	4-metoxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-131	2-karboxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-132	3-karboxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-133	4-karboxifyfenyl	NH	Metyl	O
A-134	2-nitrofenyl	O	Etyl	O
A-135	3-nitrofenyl	O	Etyl	O
A-136	4-nitrofenyl	O	Etyl	O
A-137	2-chlorofenyl	O	Etyl	O
A-138	3-chlorofenyl	O	Etyl	O
A-139	4-chlorofenyl	O	Etyl	O
A-140	2-metylfenyl	O	Etyl	O

Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-141	3-metylfenyl	O	Etyl	O
A-142	4-metylfenyl	O	Etyl	O
A-143	2-fluorofenyl	O	Etyl	O
A-144	3-fluorofenyl	O	Etyl	O
A-145	4-fluorofenyl	O	Etyl	O
A-146	2-(trifluorometyl)fenyl	O	Etyl	O
A-147	3-(trifluorometyl)fenyl	O	Etyl	O
A-148	4-(trifluorometyl)fenyl	O	Etyl	O
A-149	2-metoxifyfenyl	O	Etyl	O
A-150	3-metoxifyfenyl	O	Etyl	O
A-151	4-metoxifyfenyl	O	Etyl	O
A-152	2-karboxyfenyl	O	Etyl	O
A-153	3-karboxyfenyl	O	Etyl	O
A-154	4-karboxyfenyl	O	Etyl	O
A-155	Fenyl	S	Etyl	O
A-156	2-nitrofenyl	S	Etyl	O
A-157	3-nitrofenyl	S	Etyl	O
A-158	4-nitrofenyl	S	Etyl	O
A-159	2-chlorofenyl	S	Etyl	O
A-160	3-chlorofenyl	S	Etyl	O
A-161	4-chlorofenyl	S	Etyl	O
A-162	2-metylfenyl	S	Etyl	O
A-163	3-metylfenyl	S	Etyl	O
A-164	4-metylfenyl	S	Etyl	O
A-165	2-fluorofenyl	S	Etyl	O
A-166	3-fluorofenyl	S	Etyl	O
A-167	4-fluorofenyl	S	Etyl	O
A-168	2-(trifluorometyl)fenyl	S	Etyl	O
A-169	3-(trifluorometyl)fenyl	S	Etyl	O
A-170	4-(trifluorometyl)fenyl	S	Etyl	O
A-171	2-metoxifyfenyl	S	Etyl	O
A-172	3-metoxifyfenyl	S	Etyl	O
A-173	4-metoxifyfenyl	S	Etyl	O
A-174	2-karboxyfenyl	S	Etyl	O
A-175	3-karboxyfenyl	S	Etyl	O

Sloučenina č.	R ₁	X ₁	R ₄	Z ₃
A-176	4-karboxyfenyl	S	Etyl	O
A-177	Fenyl	NH	Etyl	O
A-178	2-nitrofenyl	NH	Etyl	O
A-179	3-nitrofenyl	NH	Etyl	O
A-180	4-nitrofenyl	NH	Etyl	O
A-181	2-chlorofenyl	NH	Etyl	O
A-182	3-chlorofenyl	NH	Etyl	O
A-183	4-chlorofenyl	NH	Etyl	O
A-184	2-metylfenyl	NH	Etyl	O
A-185	3-metylfenyl	NH	Etyl	O
A-186	4-metylfenyl	NH	Etyl	O
A-187	2-fluorofenyl	NH	Etyl	O
A-188	3-fluorofenyl	NH	Etyl	O
A-189	4-fluorofenyl	NH	Etyl	O
A-190	2-(trifluorometyl)fenyl	NH	Etyl	O
A-191	3-(trifluorometyl)fenyl	NH	Etyl	O
A-192	4-(trifluorometyl)fenyl	NH	Etyl	O
A-193	2-metoxifyfenyl	NH	Etyl	O
A-194	3-metoxifyfenyl	NH	Etyl	O
A-195	4-metoxifyfenyl	NH	Etyl	O
A-196	2-karboxyfenyl	NH	Etyl	O
A-197	3-karboxyfenyl	NH	Etyl	O
A-198	4-karboxyfenyl	NH	Etyl	O

II. Metody prevence nebo léčby abnormálních stavů

V dalším aspektu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismů. Tato metoda je tvořena podáním sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu a která je zde specifikována vzorci I, II a III, těmto organismům za dodržení omezení zde popsaných.

Termín "organismus" se týká jakékoli entity tvořené alespoň jednou buňkou. Organismus může být jednoduchá eukaryotická buňka nebo komplexní organismus jako je například savec. V preferovaných formách předkládaného vynálezu se organismus vztahuje na člověka nebo savce.

Termín "prevence" se týká metody, která je předmětem předkládaného vynálezu, a která vede ke snížení pravděpodobnosti nebo k eliminaci možnosti rozvoje abnormálního stavu u organismu.

Termín "léčba" se týká metody, která je předmětem předkládaného vynálezu, a která má terapeutický účinek a alespoň částečně zmírňuje abnormální stavy organismu.

Termín "terapeutický efekt" se týká inhibice buněčného růstu způsobujícího nebo spolu podílicího se na abnormálním stavu. Termín "terapeutický efekt" se také týká inhibice růstových faktorů způsobujících nebo spolu podílicích se na abnormálním stavu (např. na nádorovém onemocnění). Terapeutický efekt zmírňuje do určité míry jeden nebo více symptomů abnormálního stavu. S ohledem na terapii nádorových onemocnění se terapeutický efekt týká jednoho nebo více bodů z následujících: a) zmenšení velikosti nádoru; b) inhibice (tj. zpomalení nebo zastavení) metastáz nádorového onemocnění; c) inhibice nádorového růstu; a d) určitého zmírnění jednoho nebo více příznaků spojených s abnormálním stavem. V předkládaném vynálezu jsou identifikovány sloučeniny vykazující účinnost proti leukémiím, které zpomalují nebo snižují buněčnou proliferaci nebo buněčný růst, ačkoli neinhibují metastázování.

Termín "abnormální stav" se týká funkce buněk nebo tkání organismu, která se odchyluje od jejich normální funkce v organismu. Abnormální stav se týká buněčné proliferace, buněčné diferenciace nebo přežívání buněk.

Aberantní stavy buněčné proliferace zahrnují nádory, jako například nádory fibrotického a mezangiálního původu, abnormální angiogenezi a vaskulogenezi, hojení ran, psoriázu, diabetes mellitus a záněty.

Aberantní stavy buněčné diferenciaci zahrnují, ale nejsou omezeny na neurodegenerativní onemocnění, pomalé hojení ran a techniky transplantace tkání.

Aberantní stavy přežívání buněk zahrnují stavy, u kterých je aktivována nebo odstraněna metabolická cesta programované buněčné smrti (apoptóza). S apoptózou je spojena celá řada protein kináz. Aberace funkce jakékoli protein kinázy může vést k nesmrtelnosti buňky nebo k jejímu předčasnému odúmrtí.

Buněčná proliferace, diferenciaci a přežívání jsou fenomény, které mohou být jednoduše měřeny pomocí metod známých v oboru. Tyto metody mohou zahrnovat pozorování počtu buněk nebo jejich vzhledu pod mikroskopem v daném čase (například dny).

Termín "podání" se obecně týká aplikace sloučeniny do organismu a specifitěji metody inkorporace sloučeniny do buněk nebo tkání organismu. Rozvoji abnormálního stavu může být zabráněno, nebo může být léčen za podmínky existence buněk nebo tkání v organismu i mimo něj. Buňky existující mimo organismus mohou být udržovány nebo kultivovány v miskách pro buněčné kultury. Pro buňky existující v organismu existuje mnoho technik podání sloučenin včetně (ale neomezující se na) perorální, parenterální, dermální a injekční podání, nebo aplikaci ve formě aerosolu. Pro buňky existující vně organismu existuje mnoho technik pro podání sloučenin včetně (ale neomezující se na) techniky buněčné mikroinjikace, transformační a nosičové techniky.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde

azabenzimidazolová sloučenina má strukturu definovanou v předkládaném vynálezu vzorci I, II nebo III, nebo jakoukoli jejich podskupinou.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde azabenzimidazolová sloučenina je vybrána ze skupiny tvořené SABI sloučeninami.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde organismem je savec.

Termín "savec" se týká preferovaně organismů jako jsou myši, krysy, morčata, a kozy, lépe však opic, a zcela nejlépe člověka.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde abnormálním stavem je nádorové nebo fibrotické onemocnění.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismů, kde nádorové onemocnění patří do skupiny tvořené nádory plic, ovárií, prsu, mozku, intraaxiálními mozkovými nádory, nádory střeva, prostaty, sarkomy, Kaposiho sarkomy, melanomy a gliomy.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde je metoda použita u abnormálních stavů spojených s poruchou signálové transdukce charakterizované interakcí mezi serin/threonin protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

Termín "signálová transdukce" se týká šíření signálu. Obecně se jedná o přenesení extracelulárního signálu přes buněčnou membránu tak, že se z něj stane signál intracelulární. Tento

signál může poté stimulovat buněčnou odpověď. Tento termín také zahrnuje signály, které jsou šířeny přímo v buňce. Peptidové molekuly, které účinkují v procesech signálové transdukce jsou typicky receptorové nebo non-receptorové protein kinázy, receptorové nebo non-receptorové protein fosfatázy, nukleotidové výměnné faktory a transkripční faktory.

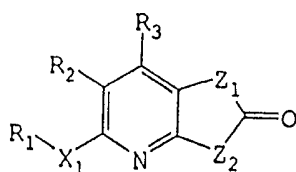
Termín "aberrace" ve spojení s procesem signálové transdukce se týká protein kinázy, která je zvýšeně, nebo snížně exprimována v organismu, zmutována tak, že její katalytická aktivita je nižší nebo vyšší než aktivita přirozené protein kinázy, nebo zmutována tak, že nemůže dojít k interakci s přirozeným vazebným partnerem, nebo nemůže být modifikována jinou protein kinázou nebo protein fosfatázou.

Termín "podpora nebo narušení abnormální interakce" se týká metody tvořené podáním sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu buňkám nebo do tkání organismu. Sloučenina může podporovat interakci mezi protein kinázou a přirozenými vazebnými partnery pomocí interakcí s mnoha atomy na rozhraní komplexu. Sloučenina může alternativně inhibovat interakci mezi protein kinázou a přirozenými vazebnými partnery vytvořením vhodných interakcí mezi atomy na rozhraní komplexu. V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody prevence nebo léčby abnormálních stavů u organismu, kde serin/threonin kinázou je RAF.

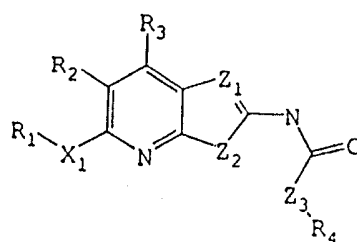
III. Sloučeniny a farmaceutické preparáty, které jsou předmětem předkládaného vynálezu

V dalším aspektu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu definovanou vzorci I, II nebo III:

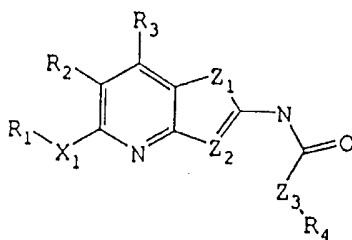
(I)



(II)



(III)



kde

a) R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené

- (i) vodíkem;
- (ii) nasyceným nebo nenasyceným alkylem;
- (iii) NX_2X_3 , kde X_2 a X_3 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem;
- (iv) Halogenem nebo trihalometylovou skupinou;
- (v) Ketonem charakterizovaným vzorcem $-CO-X_4$, kde X_4 je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem;
- (vi) Karboxylovou kyselinou charakterizovanou vzorcem $-(X_5)_n-COOH$, nebo esterem charakterizovaným vzorcem $-(X_6)_n-COO-X_7$, kde X_5 , X_6 a X_7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, a kde n je 0 nebo 1;
- (vii) Alkoholem charakterizovaným vzorcem $-(X_8)_n-OH$, nebo $-(X_8)_n-O-X_9$, kde X_8 a X_9 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo

nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, a kde kruh je volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxy, halogen, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou, a kde n je 0 nebo 1;

- (viii) Amidem charakterizovaným vzorcem -NHCOX_{10} , kde X_{10} je vybrán ze skupiny tvořené alkylem, hydroxylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, a kde kruh je volitelně substituovaný jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxy, halogen, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou;
 - (ix) $\text{-SO}_2\text{NX}_{11}\text{X}_{12}$, kde X_{11} a X_{12} jsou vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem;
 - (x) homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem volitelně substituovaným jedním, dvěma, nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxy, halogen, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou;
 - (xi) aldehydem charakterizovaným vzorcem -CO-H ; a
 - (xii) sulfonem charakterizovaným vzorcem $\text{-SO}_2\text{X}_{13}$, kde X_{13} je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem;
- b) Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou, kyslíkem, NH , NR_4 za předpokladu že jeden ze Z_1 a Z_2 je dusík, NH , nebo NR_4 , potom druhý Z_1 a Z_2 je dusík, síra, kyslík, NH , nebo NR_4 ; a
- c) Z_3 a X_1 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou a kyslíkem.

Termín "nasycený alkyl" se týká alkylové skupiny, která neobsahuje alkenovou ani alkynovou skupinu. Alkylová skupina může být větvená nebo nevětvená.

Termín "nenasycený alkyl" se týká alkylové skupiny, která obsahuje alespoň jednu alkenovou nebo alkynovou skupinu. Alkylová skupina může být větvená nebo nevětvená.

Termín "amin" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem NR_1R_2 , kde R_1 a R_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde kruh je volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, halogenem, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou;

Termín "aryl" se týká aromatické skupiny, která má alespoň jeden kruh s π elektronovým systémem a zahrnuje karbocyklické (např. fenyl) i heterocyklické arylové skupiny (např. pyridin). Termín karbocyklický se týká sloučeniny, která obsahuje jednu nebo více kovalentně uzavřených kruhových struktur, a kde atomy tvořící páteř kruhu jsou vždy uhlíkové atomy. Termín tímto rozlišuje karbocyklické kruhy od heterocyklických, v kterých páteř kruhu obsahuje alespoň jeden atom, který není uhlíkem. Termín "heteroaryl" se týká arylové skupiny, která obsahuje alespoň jeden heterocyklický kruh.

Termín "halogen" se týká atomu vybraného ze skupiny tvořené fluorem, chlorem, bromem a jodem.

Termín "keton" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem $-(R)n-CO-R'$, kde R a R' jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde n je 0 nebo 1.

Termín "karboxylová kyselina" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem $-(R)_n\text{-COOH}$, kde R je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde n je 0 nebo 1.

Termín "ester" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem $-(R)_n\text{-COOR}'$, kde R a R' jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde n je 0 nebo 1.

Termín "alkohol" se týká chemického substituentu charakterizovaného vzorcem -ROH , kde R je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde kruh je volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, halogenem, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou.

Termín "amid" se týká chemického substituentu charakterizovaného vzorcem -NHCOR , kde R je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem, hydroxylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde kruh je volitelně substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, halogenem, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou.

Termín "alkoxy skupina" se týká chemického substituentu charakterizovaného vzorcem -OR , kde R je vodík nebo nasycený či nenasycený alkyl.

Termín "aldehyd" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem $-(R)_n\text{-CHO}$, kde R je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, a kde n je 0 nebo 1.

Termín "sulfon" se týká chemické skupiny charakterizované vzorcem $\text{-SO}_2\text{-R}$, kde R je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny obsahující vodík a NH.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem volitelně substituovaným homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem, kde kruh je volitelně substituovaný jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxy, halogenem, trihalometyl, hydroxy, alkoxy, karboxylát, nitro a esterovou skupinou a homocyklickým nebo heterocyklickým kruhem volitelně substituovaným jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxy, halogenem, trihalometyl, hydroxy, alkoxy, karboxylát, nitro a esterovou skupinou.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde R_2 a R_3 jsou vodík.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde R_1 je fenyl volitelně substituovaný jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené

alkylem, alkoxy, halogenem, trihalometyl, karboxylát, nitro a esterovou skupinou.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde R_1 je vybrán ze skupiny tvořené SABI substituenty.

Termín "SABI substituenty" se týká skupiny substituentů obsahující fenyl, 2-nitrofenyl, 3-nitrofenyl, 4-nitrofenyl, 2-chlorofenyl, 3-chlorofenyl, 4-chlorofenyl, 2-metylfenyl, 3-metylfenyl, 4-metylfenyl, 2-fluorofenyl, 3-fluorofenyl, 4-fluorofenyl, 2-(trifluorometyl)fenyl, 3-(trifluorometyl)fenyl, 4-(trifluorometyl)fenyl, 2-metoxyfenyl, 3-metoxyfenyl, 4-metoxyfenyl, 2-karboxyfenyl, 3-karboxyfenyl a 4-karboxyfenyl.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde X_1 je síra.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde X_1 je kyslík.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde Z_3 je kyslík.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde R_4 je vybrán ze skupiny obsahující metyl a etyl.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká azabenzimidazolových sloučenin, které mají strukturu charakterizovanou v předkládaném vynálezu vzorcem I, II, nebo III, kde azabenzimidazolová sloučenina je vybrána ze skupiny tvořené SABI substituenty.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického preparátu tvořeného sloučeninou, která je specifikována v předkládaném vynálezu, nebo její soli a fyziologicky přijatelným nosičem či diluentem.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického preparátu tvořeného sloučeninou, která má v předkládaném vynálezu strukturu definovanou vzorcem I, II nebo III, nebo jakoukoli z jejích podskupin.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického preparátu, kde azabenzimidazolová sloučenina je vybrána ze skupiny tvořené SABI sloučeninami.

Termín "farmaceutický preparát" se týká směsi azabenzimidazolové sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, s jinými chemickými komponentami, jako jsou například diluenty nebo nosiče. Farmaceutický preparát usnadňuje podání sloučeniny do organismu. Existuje mnoho způsobů podání sloučeniny, včetně podání perorálního, injekčního, ve formě aerosolu, podání parenterálního a topického. Farmaceutické preparáty mohou být také získány reakcí sloučenin s anorganickými kyselinami jako jsou například kyselina chlorovodíková, kyselina bromovodíková, kyselina sírová, kyselina dusičná, kyselina fosforečná, kyselina metansulfonová, kyselina etansulfonová, kyselina p-toluensulfonová, kyselina salicylová a podobně.

Termín "fyziologicky přijatelný" definuje nosič nebo diluent, který nenarušuje biologickou aktivitu a vlastnosti sloučeniny.

Termín "nosič" definuje chemickou sloučeninu, která usnadňuje inkorporaci sloučeniny do buněk nebo tkání. Běžně používaným nosičem je například dimetylsulfoxid (DMSO), protože usnadňuje vychytávání mnoha organických sloučenin do buněk nebo tkání organismu.

Termín "diluent" definuje chemické sloučeniny rozředěné ve vodě, které rozpouštějí sloučeninu, která je předmětem zájmu, a současně stabilizují biologicky aktivní formu sloučeniny. V oboru jsou používány sole rozpouštěné v roztocích pufru. Jedním z běžně používaných roztoků pufrů je fosfátový pufr, protože napodobuje iontové podmínky v lidské krvi. Protože pufrы kontrolují pH roztoku při nízkých koncentracích, dochází jen zřídka ke změně biologické aktivity sloučeniny vlivem pufru.

IV. Syntetické metody, které jsou předmětem předkládaného vynálezu

V dalším aspektu se vynález týká metody syntézy azabenzimidazolové sloučeniny definované vzorcem I, II nebo III. Tato metoda je tvořena kroky: a) reakce 2-amino-6-chloro-3-nitropyridinu s druhým reaktantem v solventu, což vede k získání prvního meziprojektu, a kde druhý reaktant je substituovaný arylový kruh; b) redukce prvního meziprojektu za přítomnosti katalyzátoru a redukující látky, což vede k získání druhého meziprojektu; c) reakce druhého meziprojektu s třetím reaktantem; a d) purifikace sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného

vynálezu, kde substituovaným arylovým kruhem je substituovaný fenol, substituovaný thiofenol a substituovaný anilin.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde substituovaný fenol, substituovaný thiofenol a substituovaný anilin jsou vybrány ze skupiny tvořené SABI reaktanty.

Termín "SABI reaktanty" se týká skupiny reaktantů obsahující sodné soli fenolu, 2-nitrofenolu, 3-nitrofenolu, 4-nitrofenolu, 2-chlorofenolu, 3-chlorofenolu, 4-chlorofenolu, 2-kresolu, 3-kresolu, 4-kresolu, 2-fluorofenolu, 3-fluorofenolu, 4-fluorofenolu, 2-(trifluorometyl)fenolu, 3-(trifluorometyl)fenolu, 4-(trifluorometyl)fenolu, 2-metoxyfenolu, 3-metoxyfenolu, 4-metoxyfenolu, 2-hydroxybenzoové kyseliny, 3-hydroxybenzoové kyseliny, 4-hydroxybenzoové kyseliny, thiofenolu, 2-nitrothiofenolu, 3-nitrothiofenolu, 4-nitrothiofenolu, 2-chlorothiofenolu, 3-chlorothiofenolu, 4-chlorothiofenolu, 2-thiokresolu, 3-thiokresolu, 4-thiokresolu, 2-fluorothiofenolu, 3-fluorothiofenolu, 4-fluorothiofenolu, 2-(trifluorometyl) thiofenolu, 3-(trifluorometyl) thiofenolu, 4-(trifluorometyl) thiofenolu, 2-metoxybenzenthionu, 3-metoxybenzenthionu, 4-metoxybenzenthionu, 2-merkaptobenzoové kyseliny, 3-merkaptobenzoové kyseliny, 4-merkaptobenzoové kyseliny, anilinu, 2-nitroanilinu, 3-nitroanilinu, 4-nitroanilinu, 2-chloranilinu, 3-chloranilinu, 4-chloranilinu, 2-toluidinu, 3-toluidinu, 4-toluidinu, 2-fluoranilinu, 3-fluoranilinu, 4-fluoranilinu, 2-(trifluorometyl) anilinu, 3-(trifluorometyl) anilinu, 4-(trifluorometyl) anilinu, 2-anisidinu, 3-anisidinu, 4-anisidinu, 2-aminobenzoové kyseliny, 3-aminobenzoové kyseliny a 4-aminobenzoové kyseliny.

V preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde solventem je n-propanol.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde redukující látkou je vodík.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde katalyzátorem je Raneyův nikl.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde třetím reaktantem je O-metylizothiourea.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde třetím reaktantem je produkt reakce mezi S-metylizothiouronium sulfátem a alkyl chloroformátem.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde alkyl chloroformát je metyl chloroformát.

V další preferované formě předkládaného vynálezu se vynález týká metody syntézy sloučeniny, která je předmětem předkládaného vynálezu, kde alkyl chloroformát je etyl chloroformát.

Popis předkládaného vynálezu uvedený výše není limitující a z následujícího popisu preferovaných forem předkládaného vynálezu a z patentových nároků budou patrné další rysy a výhody.

Popis preferovaných forem předkládaného vynálezu

Část předkládaného vynálezu je zaměřena na metody modulace funkce serin/threonin protein kináz pomocí azabenzimidazolových sloučenin. Navíc se část vynálezu týká metod identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kináz. Metody využívají buňky, které exprimují serin/threonin protein kinázy, jako je například RAF.

RAF je non-receptorová protein kináza, která se po navázání na RAS, enzym hydrolyzující guanin trifosfát, přemísťuje na buněčnou membránu. RAS se aktivuje po navázání aktivované receptorové protein tyrosin kinázy, jako je například EGFR nebo PDGFR, na adaptorovou bílkovinu, GRB2 a guanin nukleotidový výměnný faktor SOS. SOS odstraňuje guanin difosfát z RAS, nahrazuje ho guanin trifosfátem a tím aktivuje RAS. RAS poté váže RAF a následně ho aktivuje. RAF může poté fosforylovat další proteiny na serinových a threoninových reziduích, jako je například kináza MEK, která fosforyluje a následně aktivuje mitogenem aktivovanou protein kinázu (MAPK). RAF tedy slouží jako intermediální kontrolní faktor v mitogeny aktivované signálové transdukci.

Vzhledem k důležité regulační roli RAF v buňkách, mohou změny aminokyselinové sekvence RAF narušit její funkci a následně modifikovat chování buňky. Úloha RAF v buněčné proliferaci je zdůrazněna pozorováním asociace výskytu nádorových onemocnění s mutacemi v aminokyselinové sekvenci RAF. Protože mutace RAF, které měly za následek vznik nádorového onemocnění, vedly k tvorbě RAF molekul, které vykazovaly neregulovanou katalytickou aktivitu, mohou inhibitory RAF zmírnit nebo dokonce zamezit buněčné proliferaci, která vede k nádorovému bujení v těchto buňkách.

Pomocí metod, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být detekovány sloučeniny, které modulují funkci protein kinázy RAF v buňkách. RAF fosforyluje protein kinázu MEK, která následně fosforyluje mitogenem aktivovanou protein kinázu MAPK. Metody, které monitorují pouze fosforylaci MEK pomocí RAF nejsou citlivé, protože stupeň fosforylace MEK není významný. Aby se překonal tento problém, je monitorována v analýzách, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, fosforylace MEK i MAPK. MAPK fosforylační signál amplifikuje MEK fosforylační signál a umožňuje sledovat RAF dependentní fosforylaci pomocí enzymově vázané imunosorpční analýzy (ELISA). Analýza, která je předmětem předkládaného vynálezu je navíc prováděna vysokokapacitně, což umožňuje rychlou monitoraci mnoha sloučenin v krátkém časovém úseku.

Pomocí metod, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, byly identifikovány sloučeniny, které inhibují funkci RAF protein kinázy. Tyto sloučeniny patří mezi azabenzimidazolové deriváty. Ačkoli byla testována schopnost azabenzimidazolových derivátů inhibovat enzymy syntetizující nukleotidy u bakterií, mnoho z těchto sloučenin nebylo důkladně prozkoumáno s ohledem na inhibici protein kináz.

Protože RAF vykazuje významnou aminokyselinovou homologii s jinými serin/threonin protein kinázami, mohou pravděpodobně azabenzimidazolové sloučeniny, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, inhibovat i jiné serin/threonin protein kinázy než jen RAF, včetně receptorových a non-receptorových serin/threonin protein kináz.

Metody, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, se také týkají dalších sloučenin, které modulují funkci RAF v buňkách, protože popsané metody umožňují testovat velké množství molekul v krátkém časovém úseku. Z tohoto důvodu mohou být pomocí metod, které jsou předmětem předkládaného vynálezu,

identifikovány molekuly nepopsané v předkládaném vynálezu, které modulují funkci STK.

I. Biologická aktivita azabenzimidazolových sloučenin

Azabenzimidazolové sloučeniny, které jsou předmětem předkládaného vynálezu byly testovány na svoji schopnost inhibice funkce RAF protein kinázy. Biologické analýzy a výsledky těchto inhibičních studií jsou zde uváděny. Metody používané k měření modulace funkce protein kináz azabenzimidazolovými sloučeninami jsou s ohledem na širokou použitelnost podobné těm, které jsou popsány v přihlášce U.S. Application seriál No. 08/702232 Tangem et al. nazvané "Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Disease" (Lyon a Lyon spis č. 221/187) zaregistrované 23. srpna 1996. Přihláška 08/702232 je v předkládaném vynálezu začleněna jako reference v celém svém rozsahu včetně vyobrazení.

II. Cílová onemocnění určená k léčbě azabenzimidazolovými sloučeninami

Zde popsány metody, sloučeniny a farmaceutické preparáty jsou navrženy k inhibici onemocnění na podkladě buněčné proliferace pomocí modulace funkce RAF protein kinázy. Proliferativní onemocnění mají za následek nežádoucí buněčnou proliferaci jedné nebo více skupin buněk v multiceulárním organismu, což vede k jeho poškození. Zde popsány metody, sloučeniny a farmaceutické preparáty mohou být také užitečné v léčbě a prevenci jiných onemocnění organismu, jako jsou například nemoci se vztahem k předčasnému buněčnému odumírání (tj. neurologická onemocnění) nebo záněty. Tato onemocnění mohou být

výsledkem nevhodné funkce RAF molekul, nebo nevhodné funkce protein kinázových molekul příbuzných s RAF.

Alterace RAF protein kinázy, nebo protein kinázových molekul příbuzných s RAF může vést ke zvýšení nebo snížení buněčné proliferace, jak je patrné u určitých onemocnění. Stavy s narušením buněčné proliferace zahrnují nádory, fibrotická onemocnění, mezangiální choroby, abnormální angiogenezi a vaskulogenezi, hojení ran, psoriázu, restenózy a zánět.

Fibrotická onemocnění mají vztah k abnormální tvorbě buněčné extracelulární matrix. Příkladem fibrotického onemocnění je jaterní cirhóza. Jaterní cirhóza je charakterizována zvýšenou koncentrací složek extracelulární matrix vedoucí k zajištění jaterní tkáně. Jaterní cirhóza může způsobit onemocnění, jako je například cirhóza jater.

Poruchy proliferace mezangiálních buněk se vyskytují v důsledku abnormální proliferace mezangiálních buněk. Tyto poruchy zahrnují rozličné lidské choroby ledvin, jako jsou například glomerulonefritida, diabetická nefropatie, maligní nefroskleróza, trombotické mikroangiopatické syndromy, rejekce transplantátu a glomerulopatie.

Preferovanými typy nádoru, které mohou být léčeny pomocí metod a sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, jsou plicní nádory, nádory vaječníků, nádory prsu, nádory mozku, intraaxiální mozkové nádory, nádory tlustého střeva, nádory prostaty, Kaposiho sarkomy, melanomy a gliomy. Důkaz, že metody a sloučeniny, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být účinně zastavit a zvrátit proliferaci nádorových buněk, je v předkládaném vynálezu zahrnut jako reference.

Angiogenní a vaskulogenní onemocnění vznikají v důsledku nadměrné proliferace krevních cév. Proliferace krevních cév je nezbytná pro celou řadu normálních fyziologických procesů, jako

jsou například embryonální vývoj, utváření corpus luteum, hojení ran a orgánová regenerace. Proliferace krevních cév je však také nezbytná pro vývoj nádorů. Další příklady proliferčních onemocnění krevních cév zahrnují artritidu, kde novotvořené krevní cévy invadují do kloubu a ničí chrupavku. Proliferční onemocnění krevních cév navíc zahrnují choroby oka, jako je například diabetická retinopatie, kde novotvořené kapiláry v sítnici invadují do sklivce, krvácejí a způsobují slepotu. Na druhou stranu onemocnění charakterizovaná zúžením, kontrakcí nebo uzavřením krevních cév, jako jsou například restenózy, mají také původ v chybné regulaci protein kináz.

Vaskulogeneze a angiogeneze jsou navíc spojeny s růstem maligních solidních nádorů a metastáz. Rychle rostoucí nádory vyžadují zásobování krví bohatou na živiny a kyslík, aby mohly pokračovat v růstu. V důsledku toho dochází spolu s růstem nádoru ke vzniku abnormálně velkého množství krevních kapilár, které podporují růst nádoru. Kromě zásobování nádoru živinami, zajišťují novotvořené krevní cévy v nádorové tkáni bránu pro nádorové buňky ke vstupu do cirkulace a k metastázování do vzdálených míst v organismu. Folkman, 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:4-6.

Nevhodná aktivita RAF může stimulovat buněčnou proliferaci a z ní vyplývající onemocnění. Bylo prokázáno, že molekuly specificky navržené k modulaci funkce RAF protein kinázy inhibují buněčnou proliferaci. Konkrétně se jedná o tzv. "antisense" molekuly nukleových kyselin, které váží mRNA kódující RAF protein kinázu a blokují tak translaci. U těchto molekul bylo prokázáno, že účinně zamezují transformaci buněk A549 za podmínek *in vitro*. Monia et al., 1996, Nature Medicine 2:688; tato reference je tímto začleněna v celém svém rozsahu do předkládaného vynálezu včetně všech obrázků a tabulek. Buňky A549 jsou lidské maligní buňky.

Tyto "antisense" studie zaměřené proti RAF předkládají důkaz, že azabenzimidazolové molekuly, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, a které modulují funkci RAF protein kináz, mohou zastavit a pravděpodobně i zvrátit proliferaci maligních buněk v organismu. Tyto azabenzimidazolové sloučeniny mohou být testovány pomocí *in vitro* metod, které jsou v předkládaném vynálezu uvedeny jako příklad. Azabenzimidazolové sloučeniny mohou být navíc testovány na efekt na nádorové buňky za podmínek *in vivo* pomocí xenotransplantačních metod, které jsou v předkládaném vynálezu také uvedeny jako příklad.

Existují alespoň dvě cesty nechtěné stimulace buněčné proliferace konkrétního typu buněk v důsledku nevhodné aktivity RAF: 1) přímá stimulace růstu konkrétní buňky, nebo 2) zvýšení vaskularizace konkrétní oblasti, jako je například nádorová tkáň, čímž dochází k usnadnění růstu tkáně.

Použití předkládaného vynálezu je usnadněno zaprvé identifikací, zdali je onemocnění na podkladě buněčné proliferace způsobeno aktivitou RAF. Jakmile je takové onemocnění identifikováno, mohou být pacienti postižení tímto onemocněním identifikováni pomocí analýzy jejich příznaků za pomoci postupů dobře známých lékařům nebo veterinářům znalým oboru. Tito pacienti mohou být poté léčeni, jak je popsáno v předkládaném vynálezu.

Určení, zdali je onemocnění na podkladě buněčné proliferace způsobeno aktivitou RAF, může být provedeno zaprvé určením aktivity RAF v buňkách nebo ve specifické lokalizaci v těle pacienta. Například v případě nádorových buněk může být aktivita jedné nebo více RAF porovnána mezi nádory s normální a zvýšenou aktivitou RAF. Pokud nádorové buňky mají stejnou nebo vyšší aktivitu než je aktivita u nádorových onemocnění vznikajících na podkladě zvýšené aktivity RAF, jsou vhodnými

kandidáty pro léčbu za použití popsaných RAF modulujících metod a sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu.

V případě onemocnění na podkladě buněčné proliferace, které vznikají v důsledku nechtěné proliferace nenádorových buněk, je aktivita RAF porovnána s aktivitou vyskytující se v běžné populaci (např. průměrná aktivita vyskytující se v běžné populaci lidí nebo zvířat, kromě lidí nebo zvířat trpících onemocněním na podkladě buněčné proliferace). Pokud je nechtěná porucha buněčné proliferace charakterizována vyšší aktivitou RAF než je aktivita vyskytující se v běžné populaci, jedná se o poruchu, která je vhodným kandidátem pro léčbu za použití popsaných RAF modulujících metod a sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu.

III Farmaceutické preparáty a aplikace azabenzimidazolových sloučenin

Metody přípravy farmaceutických preparátů obsahujících sloučeniny, metody určení množství sloučenin, které mají být podány pacientovi a způsoby podání sloučenin organismu jsou uvedeny v patentové přihlášce U.S. Application Serial No. 08/702232 autorů Tang et al., která je nazvaná "Indolinone Combinatorial Libraries and Related Products and Methods for the Treatment of Disease" (Lyon a Lyon spis č. 221/187) a zaregistrované 23. srpna 1996. Tyto metody jsou dále uvedeny v mezinárodním patentu č. WO 96/22976 autorů Buzzeti et al., který je nazván "Hydrosoluble 3-Aryliden-2-Oxoinole Derivatives as Tyrosin Kinase Inhibitors" a publikován 1. srpna 1996. Oba dokumenty jsou v předkládaném vynálezu začleněny jako reference v celém svém rozsahu včetně vyobrazení. Osoby znalé oboru ocení, že tento popis je aplikovatelný na předkládaný vynález a může být snadno pro něj upraven.

Příklady provedení vynálezu

Níže uvedené příklady nejsou nijak omezující předkládaný vynález a pouze reprezentují rozličné aspekty a rysy předkládaného vynálezu. Příklady popisují metody syntézy sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu a metody měření efektu sloučeniny na funkci RAF protein kinázy.

Buňky používané v metodách jsou komerčně dostupné. Vektory nukleových kyselin vychytávané buňkami jsou také komerčně dostupné a sekvence genů rozličných protein kináz jsou snadno dostupné v sekvenčních bankách. Proto osoba znalá oboru může snadno vytvořit příhodným způsobem buněčné linie za pomoci komerčně dostupných buněk, komerčně dostupných vektorů nukleových kyselin a genů pro protein kinázy za použití technik snadno dostupných osobám znalých oboru.

Příklad 1: Postupy syntézy azabenzimidazolových sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu

Předkládaný vynález bude nyní ilustrován pomocí následujících neomezujících příkladů v kterých, ledaže je uvedeno jinak:

- (i) odpaření bylo provedeno na rotačním odpařováku pod vakuem;
- (ii) operace byly provedeny pod atmosférou inertního plynu, jako je například dusík;
- (iii) vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla provedena na sorbentu Merck LiChrosorb RP-18 silika s reverzní fází, který byl získán od společnosti E. Merck, Darmstadt, Německo;
- (iv) výtěžky jsou uvedeny pouze pro ilustraci a neznamenají nezbytně nejvyšší dosažitelný výtěžek;

- (v) body tání nejsou upravovány a byly získány za pomoci digitálního zařízení na určování bodu tání HWS Mainz SG 2000.
- (vi) Struktury všech sloučenin, které jsou v předkládaném vynálezu charakterizovány vzorcem I, II a III, byly potvrzeny protonovou magnetickou rezonanční spektroskopií na spektrofotometru Bruker AMX500-NMR, dále pomocí elementární mikroanalýzy a v některých případech pomocí hmotové spektroskopie;
- (vii) Čistota struktur byla určena pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na silika gelu (Merck Silica Gel 60 F254) nebo pomocí HPLC; a
- (viii) Meziprodukty nebyly obecně plně charakterizovány a jejich čistota byla určena pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) nebo pomocí HPLC.

Syntetické postupy

Sloučenina A-90: 2-Metoxykarbonylamino-(6-fenylmerkapt-3H-imidazo[4,5-b] pyridin

2-amino-3-nitro-6-(fenylmerkapt)pyridin byl připraven zahříváním 2-amino-6-chloro-3-nitropyridinu (84,0 g, 0,484 mol) a thiofenolátu sodného (Fluka) (72,0 g, 0,545 mol) v 2-propanolu (1500 ml) pod zpětným chlazením po dobu 2 hodin. Po ochlazení na pokojovou teplotu byla suspenze naředěna vodou (100 ml), pevná látka sbírána vakuovou filtrací, promyta vodou a 2-propanolem, a vysušena při teplotě 50°C ve vakuu, což vedlo ke vzniku 109,1 g (95% výtěžek) 2-amino-3-nitro-6-(fenylmerkapt)pyridinu, bod tání 148-152°C.

2,3-diamino-6-(fenylmerkapt)pyridin byl připraven hydrogenací 2-amino-3-nitro-6-(fenylmerkapt)pyridinu (107,1 g, 0,433 mol) pod tlakem 5 atm H₂ za přítomnosti 30 g Raneyova niklu ve 1200

ml 2-propanolu při teplotě 70°C. Po 4 hodinách (29,1 l vodíku) byla reakční směs ochlazená na teplotu 4°C za kontinuálního promíchávání. Precipitát byl sbírán vakuovou filtrací, promyt 2-propanolem, a vysušen při teplotě 50°C ve vakuu. Kombinované filtráty byly koncentrovány pod sníženým tlakem a rekrystalizovány z 2-propanolu. Po promytí hydrogenačního zařízení dvakrát 1000 ml THF, odpaření pod sníženým tlakem a rekrystalizací z 2-propanolu, byl precipitát sbírán, a vysušen při teplotě 50°C ve vakuu, což vedlo ke vzniku 80,4 g (87,1% výtěžek) 2,3-diamino-6-(fenylmerkaptopyridinu, bod tání 119-122°C.

2-metoxycarbonylamino-6-fenylmerkaptopyridin byl připraven přidáním metyl chloroformátu (34 ml, 0,44 mol) po kapkách ke studenému roztoku (5-15°C) S-metylizothiuronium sulfátu (53 g, 0,19 mol) (Aldrich) v 68 ml vody, zatímco teplota byla udržována pod 20°C. Poté byl opatrně přidán hydroxid sodný (116 g, 25% NaOH) a objevil se bílý precipitát. Po 20 minutách byla přidána voda (210 ml) a pH bylo upraveno na hodnotu 4,0 pomocí ledové kyseliny octové (34 ml). K této směsi byl přidán po kapkách roztok 2,3-diamino-6-(fenylmerkaptopyridinu (37,8 g, 0,174 mol) v 210 ml etanolu a směs byla zahřívána při teplotě 85-90°C po dobu 2 hodin. Po chlazení směsi přes noc byl izolován precipitát pomocí filtrace, promyt vodou (1000 ml), vysušen a rekrystalizován z kyseliny octové a etanolu při teplotě 4°C. Precipitát byl sbírán filtrací, promyt metanolem a vysušen při teplotě 50°C ve vakuu, což vedlo ke vzniku 30 g (57,4% výtěžek) 2-metoxycarbonylamino-6-fenylmerkaptopyridinu, bod tání 269-274°C.

Sloučenina A-3: 2-Metoxycarbonylamino-(6-fenoxy-3H-imidazo
[4,5-b] pyridin

Substitucí fenolátu sodného na místo thiofenolátu sodného v Příkladu A-90 vede identický proces ke vzniku 2-metoxycarbonylamino-(6-fenoxy-3H-imidazo[4,5-b] pyridinu, bod tání $>280^{\circ}\text{C}$.

Sloučenina A-4: 2-Etoxykarbonylamino-(6-fenoxy-3H-imidazo
[4,5-b] pyridin

Substitucí etyl chloroformátu na místo metyl chloroformátu v Příkladu A-3 vede identický proces ke vzniku 2-etoxykarbonylamino-(6-fenoxy-3H-imidazo[4,5-b] pyridinu, bod tání $>280^{\circ}\text{C}$.

Sloučenina A-1: 2-Oxo-6-fenoxy-3H-imidazo [4,5-b] pyridin

Reakcí O-metylizothioureý přímo s 2,3-diamino-6-(fenylmerkaptopyridinem na místo produktu reakce S-metylizothiouronium sulfátu a metyl chloroformátu v Příkladu A-3 vede identický proces ke vzniku 2-oxo-6-fenoxy-3H-imidazo [4,5-b] pyridinu, bod tání $277-278^{\circ}\text{C}$.

Sloučenina A-2: 2-Oxo-6-fenylmerkaptó -3H- imidazo [4,5-b]
pyridin

Substitucí thiofenolátu sodného na místo fenolátu sodného v Příkladu A-1 vede identický proces ke vzniku 2-oxo-6-fenylmerkaptó -3H- imidazo [4,5-b] pyridinu, bod tání $253-254^{\circ}\text{C}$.

Sloučenina A-5 - A-25:

Substitucí příslušného fenolátu za fenolát sodný v Příkladu A-1 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-23, A-24 a A-25 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-5 2-Oxo-6-(2-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-6 2-Oxo-6-(3-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-7 2-Oxo-6-(4-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-8 2-Oxo-6-(2-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-9 2-Oxo-6-(3-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-10 2-Oxo-6-(4-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-11 2-Oxo-6-(2-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-12 2-Oxo-6-(3-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-13 2-Oxo-6-(4-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-14 2-Oxo-6-(2-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-15 2-Oxo-6-(3-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-16 2-Oxo-6-(4-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-15 2-Oxo -6- [(2-trifluorometyl) fenoxy] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-16 2-Oxo -6- [(3-trifluorometyl) fenoxy] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-17 2-Oxo -6- [(4-trifluorometyl) fenoxy] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-18 2-Oxo-6-(2-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-19 2-Oxo-6-(3-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-20 2-Oxo-6-(4-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-23 2-Oxo-6-(2-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-24 2-Oxo-6-(3-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-25 2-Oxo-6-(4-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

Sloučenina A-26 - A-46:

Substitucí příslušného thiofenolátu za thiofenolát sodný v Příkladu A-2 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-44, A-45 a A-46 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-26 2-Oxo-6-(2-nitrofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-27 2-Oxo-6-(3-nitrofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-28 2-Oxo-6-(4-nitrofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-29 2-Oxo-6-(2-chlorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-30 2-Oxo-6-(3-chlorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-31 2-Oxo-6-(4-chlorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-32 2-Oxo-6-(2-metylfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-33 2-Oxo-6-(3-metylfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-34 2-Oxo-6-(4-metylfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-35 2-Oxo-6-(2-fluorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-36 2-Oxo-6-(3-fluorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-37 2-Oxo-6-(4-fluorofenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-38 2-Oxo-6-[(2-trifluorometyl)fenylmerkapt]-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-39 2-Oxo-6-[(3-trifluorometyl)fenylmerkapt]-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-40 2-Oxo-6-[(4-trifluorometyl)fenylmerkapt]-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-41 2-Oxo-6-(2-metoxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-42 2-Oxo-6-(3-metoxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-43 2-Oxo-6-(4-metoxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-44 2-Oxo-6-(2-karboxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-45 2-Oxo-6-(3-karboxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-46 2-Oxo-6-(4-karboxyfenylmerkapt)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

Sloučenina A-47 - A-68:

Substitucí příslušné anilinové soli za fenolát sodný v Příkladu A-1 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-66, A-67 a A-68 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránící skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-47 2-Oxo-6-fenylamino-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-48 2-Oxo-6-(2-nitrofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-49 2-Oxo-6-(3-nitrofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-50 2-Oxo-6-(4-nitrofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-51 2-Oxo-6-(2-chlorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-52 2-Oxo-6-(3-chlorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-53 2-Oxo-6-(4-chlorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-54 2-Oxo-6-(2-metylfenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-55 2-Oxo-6-(3-metylfenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-56 2-Oxo-6-(4-metylfenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-57 2-Oxo-6-(2-fluorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-58 2-Oxo-6-(3-fluorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-59 2-Oxo-6-(4-fluorofenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-60 2-Oxo -6- [(2-trifluorometyl) fenylamino] -3H- imidazo
[4,5-b] pyridin
- A-61 2-Oxo -6- [(3-trifluorometyl) fenylamino] -3H- imidazo
[4,5-b] pyridin
- A-62 2-Oxo -6- [(4-trifluorometyl) fenylamino] -3H- imidazo
[4,5-b] pyridin
- A-63 2-Oxo-6-(2-metoxifyenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-64 2-Oxo-6-(3-metoxifyenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-65 2-Oxo-6-(4-metoxifyenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-66 2-Oxo-6-(2-karboxifyenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-67 2-Oxo-6-(3-karboxyfenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-68 2-Oxo-6-(4-karboxyfenylamino)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

Sloučenina A-69 - A-89:

Substitucí příslušného fenolátu za fenolát sodný v Příkladu A-3 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-87, A-88 a A-89 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

A-69 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-70 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-71 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-72 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-73 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-74 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-75 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-76 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-77 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-78 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

- A-79 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-80 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-81 2- Metoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl) fenoxy] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-82 2- Metoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl) fenoxy] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-83 2- Metoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl) fenoxy] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-84 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-85 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-86 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-87 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-karboxyfenoxy)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin
- A-88 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-karboxyfenoxy)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin
- A-89 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-karboxyfenoxy)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

Sloučenina A-91 - A-111:

Substitucí příslušného thiofenolátu za thiofenolát sodný v Příkladu A-90 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-109, A-110 a A-111 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránící skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-91 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-92 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-93 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-94 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-95 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-96 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-97 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-98 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-99 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-100 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-101 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-102 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-103 2- Metoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-104 2- Metoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-105 2- Metoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-106 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-metoxyfenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-107 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-metoxyfenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-108 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-metoxyfenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin

A-109 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-karboxyfenylmerkpto)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-110 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-karboxyfenylmerkpto)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-111 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-karboxyfenylmerkpto)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

Sloučenina A-112 - A-133:

Substitucí příslušné anilinové soli za fenolát sodný v Příkladu A-3 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-131, A-132 a A-133 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

A-112 2-Metoxycarbonylamino-6-fenylamino-3H-imidazo[4,5-A-112

A-113 2-Metoxycarbonylamino-6-(2-nitrofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-114 2-Metoxycarbonylamino-6-(3-nitrofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-115 2-Metoxycarbonylamino-6-(4-nitrofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-116 2-Metoxycarbonylamino-6-(2-chlorofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-117 2-Metoxycarbonylamino-6-(3-chlorofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-118 2-Metoxycarbonylamino-6-(4-chlorofenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-119 2-Metoxycarbonylamino-6-(2-metylfenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

A-120 2-Metoxycarbonylamino-6-(3-metylfenylamino)-3H-imidazo [4,5-b]pyridin

- A-121 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-metylfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-122 2-Metoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-123 2-Metoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-124 2-Metoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-125 2- Metoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl)
fenylamino] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-126 2- Metoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl)
fenylamino] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-127 2- Metoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl)
fenylamino] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-128 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-metoxyfenylamino)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-129 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-metoxyfenylamino)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-130 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-metoxyfenylamino)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-131 2- Metoxykarbonylamino -6-(2-karboxyfenylamino)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin
- A-132 2- Metoxykarbonylamino -6-(3-karboxyfenylamino)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin
- A-133 2- Metoxykarbonylamino -6-(4-karboxyfenylamino)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin

Sloučenina A-134 - A-154:

Substitucí příslušného fenolátu za fenolát sodný v Příkladu A-4 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-152, A-153 a A-154 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránící

28.03.00

skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-134 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-135 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-136 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-nitrofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-137 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-138 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-139 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-chlorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-140 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-141 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-142 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-metylfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-143 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-144 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-145 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin
- A-146 2- Etoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl) fenoxý] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-147 2- Etoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl) fenoxý] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-148 2- Etoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl) fenoxý] - 3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-149 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-metoxýfenoxý)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-150 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-151 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-metoxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-152 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-153 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-154 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-karboxyfenoxy)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

Sloučenina A-155 - A-176:

Substitucí příslušného thiofenolátu za fenolát sodný v Příkladu A-4 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-174, A-175 a A-176 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

A-155 2-Etoxykarbonylamino-6-fenylmerkpto-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-156 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-157 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-158 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-nitrofenylmerkpto)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-159 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

A-160 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

- A-161 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-chlorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-162 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-163 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-164 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-metylfenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-165 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-166 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-167 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenylmerkpto)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-168 2- Etoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-169 2- Etoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-170 2- Etoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl)
fenylmerkpto] -3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-171 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-metoxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-172 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-metoxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-173 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-metoxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo[4,5-b]pyridin
- A-174 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-karboxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin
- A-175 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-karboxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin
- A-176 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-karboxifyenylmerkpto)-3H-
imidazo [4,5-b]pyridin

Sloučenina A-177 - A-198:

Substitucí příslušné anilinové soli za fenolát sodný v Příkladu A-4 vede identický proces ke vzniku následujících příkladů. Například u sloučenin A-196, A-197 a A-198 jsou karboxy skupiny chráněné metylem, etylem, benzylem, t-butylem, nebo jinými vhodnými estery a poté jsou u těchto sloučenin tyto chránicí skupiny v posledním kroku odstraněny, což vede ke vzniku sloučenin.

- A-177 2-Etoxykarbonylamino-6-fenylamino-3H-imidazo[4,5-A-112
A-178 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-nitrofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-179 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-nitrofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-180 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-nitrofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-181 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-chlorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-182 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-chlorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-183 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-chlorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-184 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-metylfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-185 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-metylfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-186 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-metylfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-187 2-Etoxykarbonylamino-6-(2-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-188 2-Etoxykarbonylamino-6-(3-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
A-189 2-Etoxykarbonylamino-6-(4-fluorofenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin

- A-190 2- Etoxykarbonylamino -6- [(2-trifluorometyl) fenylamino]
-3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-191 2- Etoxykarbonylamino -6- [(3-trifluorometyl) fenylamino]
-3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-192 2- Etoxykarbonylamino -6- [(4-trifluorometyl) fenylamino]
-3H- imidazo [4,5-b] pyridin
- A-193 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-metoxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-194 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-metoxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-195 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-metoxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-196 2- Etoxykarbonylamino -6-(2-karboxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-197 2- Etoxykarbonylamino -6-(3-karboxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin
- A-198 2- Etoxykarbonylamino -6-(4-karboxyfenylamino)-3H-imidazo
[4,5-b]pyridin

Příklad 2: Stanovení fosforylační funkce RAF

Následující metoda zaznamenává stupeň fosforylace cílového proteinu MEK, stejně tak jako cíle proteinu MEK, proteinu MAPK, katalyzované pomocí RAF. Sekvence genu pro RAF je popsána v publikaci autorů Bonner et al., 1985, Molec. Cell. Biol. 5: 1400-1407, a je snadno dostupná v databankách genových sekvencí. Konstrukce vektoru nukleové kyseliny a použitých buněčných linií využívaných v předkládaném vynálezu je plně popsána v publikaci autorů Morrison et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 855-8859.

Materiál a reagentie

1. Buňky Sf9 (*Spodoptera frugiperda*); GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.
2. RIPA pufr: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 5 mg/l aprotininu, 0,5% Tritonu X-100;
3. Thioredoxin-MEK fúzní protein (T-MEK): Expres T-MEK a purifikace afinitní chromatografií byly provedeny podle postupů dle výrobce. Katalogové č. K 350-01 a R 350-40, Invitrogen Corp., San Diego, CA
4. His-MAPK (ERK 2); MAPK s histidinovou kotvou byla exprimována v XL1 Blue cells transformovaných vektorem pUC18 kódujícím His-MAPK. His-MAPK byla purifikována pomocí Ni-afinitní chromatografie. Katalogové č. 27-4949-01, Farmacie. Alameda, Kalifornie, jak je popsáno v předkládaném vynálezu.
5. Ovčí anti myší IgG: Jackson Laboratories, West Grove, PA, Katalogové č. 515-006-008, šarže 28563
6. Specifická protilátka proti RAF-1 protein kináze: URP2653 od UBI.
7. Potahovací pufr: PBS; fosfátový pufr, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD
8. Promývací pufr: TBST - 50 mM tris/HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100
9. Blokuující pufr: TBST, 0,1% etanolamin pH 7,4
10. DMSO, Sigma, St. Louis, Mo
11. Kinázový pufr (KB): 20 mM Hepes/HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,1% triton X-100, 1 mM PMSF, 5 mg/l aprotininu, 75 mM ortovanadátu sodného, 0,5 mM DTT a 10 mM MgCl₂.
12. Směs ATP: 100 mM MgCl₂, 300 mM ATP, 10 nCi g-³³P ATP (Dupont-NEN)/ml.
13. Zastavující roztok: 1% kyselina fosforečná; Fisher, Pittsburgh, PA.
14. Wallac celulózové filtry; Wallac, Turku, Finsko.
15. Filtrovací promývací roztok: 1% kyselina fosforečná; Fisher, Pittsburgh, PA.

16. Destičkový harvester Tomtec, Wallac, Turku, Finsko.
17. Wallac beta destičkový reader, Wallac, Turku, Finsko.
18. NUNC polypropylenové destičky s 96 jamkami s dnem ve tvaru písmene V, Applied Scientific, katalogové č. AS-72092

Postup

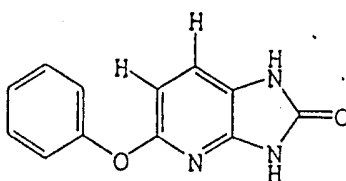
Všechny následující kroky byly prováděny při pokojové teplotě, ledaže je specifikováno jinak.

1. Potažení ELISA destičky: ELISA jamky jsou potaženy přes noc při teplotě 4°C pomocí 100 mL ovčího anti myšího afinitně purifikovaného antiséra (1 mg/100 ml potahovacího pufru). ELISA destičky mohou být použity po dobu 2 týdnů, pokud jsou skladovány při teplotě 4°C.
2. Obrátte destičku a odstraňte tekutou složku. Přidejte 100 ml blokuujícího roztoku inkubujte po dobu 30 minut.
3. Odstraňte blokuující roztok a promyjte 4-krát pomocí promývacího pufru. Položte destičku na papírový ubrousek za účelem odstranění nadbytku tekutiny.
4. Přidejte do každé jamky 1 mg specifické protilátky proti RAF-1 a inkubujte po dobu 1 hodiny. Promyjte tak, jak je popsáno v kroku 3.
5. Rozmrazte lyzáty z RAS/RAF infikovaných Sf9 buněk a naředte je pomocí TBST na 10 mg/100 ml. Přidejte 10 mg naředěného lyzátu do jamek a inkubujte jednu hodinu. Třepejte destičku během inkubace. Negativní kontroly neobsahují žádný lyzát. Lyzáty z RAS/RAF infikovaných Sf9 hmyzích buněk jsou připraveny po infikaci buněk rekombinantními bakuloviry při MOI 5 pro každý virus, a sbírány o 48 hodin později. Buňky jsou jednou promyty pomocí PBS a lyzovány v RIPA pufru. Nerozpustný materiál je odstraněn centrifugací (5 minut při 10000 g). Alikvóty lyzátů jsou zamrazeny v suchém ledu/etanolu a uskladněny při teplotě -80°C až do použití.
6. Odstraňte nenavázaný materiál a promyjte tak, jak je popsáno výše (krok 3).

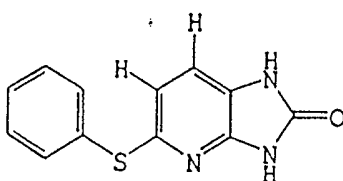
7. Přidejte 2 mg T-MEK a 2 mg His-MAEPK na jamku a upravte objem do 40 ml pomocí kinázového pufru. Metody purifikace T-MEK a MAPK z buněčných extraktů jsou zde uvedeny ve formě příkladu.
 8. Předředte sloučeniny (zásobní roztok 10 mg/ml DMSO) nebo extrakty 20 krát v TBST plus 1% DMSO. Přidejte 5 ml předředěných sloučenin/extraktů do jamek popsanych v kroku 6. Inkubujte po dobu 20 minut. Kontroly neobsahují žádný lék.
 9. Začněte kinázovou reakci přidáním 5 ml směsi ATP. Promíchávejte destičky během inkubace na ELISA destičkové třepačce.
 10. Zastavte kinázovou reakci po 60 minutách přidáním 30 ml zastavovacího roztoku do každé jamky.
 11. Umístěte fosfocelulózový filtr a ELISA destičku do Tomtec destičkového harvesteru. Seberte a promyjte filtr promývacím roztokem podle doporučení výrobce. Vysušte filtry. Utěsněte filtry a umístěte je do držáku. Vložte držák do zařízení na detekci radioaktivity a kvantifikujte radioaktivní fosfor na filtrech.
- Alternativně mohou být přeneseny 40 ml alikvóty z jednotlivých jamek destičky do korespondujících pozic na fosfocelulózovém filtru. Po vysušení filtru vzduchem položte filtry na misku. Jemně misku promíchávejte a vyměňujte promívací roztok v 15 minutových intervalech po dobu 1 hodiny. Vysušte filtry vzduchem. Utěsněte filtry a umístěte je do držáku vhodného pro měření radioaktivního fosforu ve vzorcích. Vložte držák do zařízení na detekci radioaktivity a kvantifikujte radioaktivní fosfor na filtrech.

Hodnoty IC_{50} byly měřeny podle protokolu pro následující azabenzimidazolové sloučeniny v RAF-1 ELISA analýze:

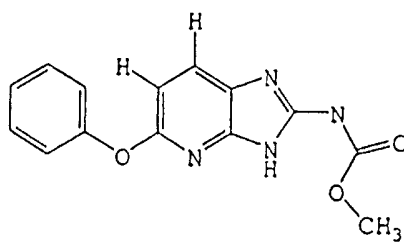
(A-1)



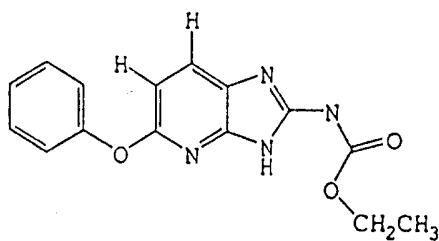
(A-2)



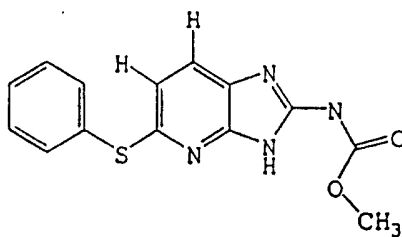
(A-3)



(A-4)



(A-90)



Hodnota IC_{50} je koncentrace azabenzimidazolového inhibitoru požadovaného ke snížení maximálního množství fosforylovaného cílového proteinu nebo buněčného růstu o 50%. Hodnoty IC_{50} měřené v RAF-1 fosforylační analýze jsou zobrazeny v Tabulce 1:

Tabulka 1

Sloučenina	IC_{50} (uM)
A-1	79
A-2	>100
A-3	6,1
A-4	6,7
A-90	0,95

Příklad 3: Purifikace MAPK a MEK

MAPK a MEK proteiny jsou snadno exprimovány v buňkách pomocí subklonování genu kódujícího tyto proteiny do komerčně dostupného vektoru, který exprimuje proteiny s polyhistidinovou kotvou. Geny kódující tyto proteiny jsou snadno dostupné v laboratořích, které normálně pracují s těmito proteiny, nebo pomocí klonování těchto genů z buněk obsahujících cDNA knihovny. Knihovny jsou snadno dostupné a osoba znalá oboru může snadno připravit próby nukleových kyselin homologních k cDNA molekul kódujících MEK nebo MAPK ze sekvencí nukleových kyselin MEK a MAPK dostupných v databázích genů, jako je například Genbank. Klonování genu může být dosaženo v krátkém

časovém úseku za použití technik běžně dostupných osobám zkušeným v oboru.

Purifikace MEK a MAPK proteinů z buněčných extraktů může provedena za použití následujícího protokolu, který je upraven podle Robbinse et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 5097-5106:

1. Proveďte lýzu buněk pomocí sonikace, osmotického stresu, nebo French presu za pomoci technik dostupných osobám znalým oboru. Vhodný sonikační pufr je uveden níže.
2. Ekvilibrujte pevnou matici, která je konjugována s niklem nebo kobaltem ekvilibračním pufrem uvedeným níže. Polyhistidinová kotva se specificky váže na atomy niklu a kobaltu na pevné matici. Ekvilibrace může být dosaženo promytím pryskyřice třikrát ekvilibračním pufrem v objemu rovném 10 objemům pevné matrice. Pevná matrice je snadno dostupná osobám znalým oboru.
3. Přidejte buněčný lyzát k pevné matici a ekvilibrujte v nádobě po určitou dobu. Alternativně může být pevná matrice naplněna do chromatografické kolony a lyzát může být nalit na kolonu obsahující pevnou matici.
4. Promyjte pevnou matici pomocí promývacího pufru uvedeného níže.
5. Proveďte eluci MEK a MAPK proteinu z pevné matrice pomocí elučního pufru (uveden níže), kterým odstraníte významnou část proteinu z pevné matrice.

Sonikační pufr

50 mM fosfát sodný, pH 8,0

0,3 M chlorid sodný

10 mM β -merkaptoetanol

1% NP40

10 mM NaF

0,5 mM Pefablock

Ekvilibrační pufr

50 mM fosfát sodný, pH 8,0

0,3 M chlorid sodný

10 mM β -merkaptoetanol

1% NP40

10 mM NaF

1 mM imidazol

Promývací pufr

50 mM fosfát sodný, pH 8,0

0,3 M chlorid sodný

10 mM β -merkaptoetanol

1% NP40

10 mM NaF

1 mM imidazol

Eluční pufr

50 mM fosfát sodný, pH 8,0

0,3 M chlorid sodný

10 mM β -merkaptoetanol

1% NP40

10 mM NaF

10-500 mM imidazol

Příklad 4: Stanovení fosforylační funkce RAF EGF receptoru

Aktivita EGF receptorové kinázy (EGFR-NIH3T3 analýza) byla měřena v celých buňkách, jak je popsáno detailně v PCT publikaci WO9640116, zaregistrované 5. června 1996 autory Tang et al. nazvané "Indolinone Compounds for the Treatment of Disease", která je v předkládaném vynálezu začleněna jako reference v celém svém rozsahu včetně vyobrazení.

Hodnoty IC_{50} měřené v analýze na EGF receptorovou fosforylaci jsou uvedeny v Tabulce 2:

Tabulka 2

Sloučenina	IC_{50} (uM)
A-1	>100
A-2	>100
A-3	>100
A-4	>100

Příklad 5: Stanovení efektu azabenzimidazolových sloučenin na růst buněk exprimujících Ras

Následující metoda měří stupeň růstu NIH-3T3 buněk exprimujících RAS. Účelem metody je určit účinky sloučenin na růst NIH-3T3 buněk exprimujících H-Ras

Materiál

96 jamkové sterilní destičky s plochým dnem
 96 jamkové sterilní destičky s kulatým dnem
 sterilní 25 ml nebo 100 ml nádoba

pipety, vícekanálová pipeta
sterilní pipetové špičky
sterilní 15 ml a 50 ml zkumavky

Reagencie

0,4% SRB v 1% kyselině octové
10 mM Tris báze
10% TCA
1% kyselina octová
sterilní DMSO (Sigma)
sloučenina v DMSO (100 mM nebo slabší zásobní roztok)
Trypsin-EDTA (GIBCO BRL)

Buněčná linie

3T3/H-Ras (NIH 3T3 klon 7 buněk exprimujících genomický fragment onkogenního H-Ras).

Buňky mohou být připraveny za použití následujícího protokolu:

1. Subklonujte fragment genu kódující Ras do komerčně dostupného vektoru, který bude stabilně transfektovat NIH-3T3 buňky. Fragment je z genomické transformující alely cHa-ras.
2. Transfektujte NIH-3T3 buňky subklonovaným vektorem pomocí metody s kalcium fosfátem. Vyberte buňky exprimující Ras konstrukt ve 2% séru v DMEM. Po dvou týdnech jsou pozorována viditelná ložiska. Vytvořte pool transformovaných buněk, abyste získali stabilně transformovanou buněčnou linii.

Růstové médium

2% telecí sérum/DMEM + 2 mM glutamin, Pen/Strep

ProtokolDen 0: Umístění buněk:

Tato část metody je prováděna v boxu s laminárním prouděním.

1. Trypsinizujte buňky. Přeneste 200 ml buněčné suspenze k 10 ml izotonického roztoku. Spočítejte buňky pomocí přístroje Coulter Counter.
2. Nařeďte buňky v růstovém médiu na 60 000 buněk/ml. Přeneste 100 ml buněk do každé jamky v 96-jamkové destičce s plochým dnem, aby bylo v každé jamce 6000 buněk.
3. Použijte polovinu destičky (4 řady) pro každou sloučeninu a pracujte v kvadrupletu pro každou koncentraci sloučeniny. Pro kontrolní médium použijte 4 jamky.
4. Destičky jemně promíchejte, aby došlo k jednotnému přichycení buněk.
5. Inkubujte destičky při teplotě 37°C v inkubátoru s 10% CO₂.

Den 1: Přidání sloučeniny:

Tato část metody je prováděna v boxu s laminárním prouděním.

1. Do 96-jamkové destičky s kulatými dny přidejte 120 ml růstového média obsahujícího 2x nejvyšší finální koncentraci DMSO, která byla nalezena při skrínkou koncentrací sloučenin ve sloupcích 1 až 11. Například pokud je nejvyšší koncentrace 100 ml a ta je připravena ze 100 mM zásobního roztoku, 1x DMSO je 0,1% a 2x DMSO je 0,2%. Tato destička je použita k vytitrování sloučeniny, 4 řady na jednu sloučeninu.

2. Ve sterilní 15 ml zkumavce připravte 2x roztok nejvyšší skříninkové koncentrace sloučeniny v růstovém médiu plus 2x DMSO. Je potřeba 1 ml na buněčnou linii. Výchozí koncentrace sloučeniny je obvykle 100 mM, ale tato koncentrace se může lišit v závislosti na solubilitě sloučeniny.
3. Přeneste v kvadrupletu 240 ml 2x roztoku výchozí sloučeniny do jamek ve sloupci 12 v 96-jamkové destičce s kulatými dny. Proveďte sérii ředění 1:2 v celé destičce zprava doleva přenesením 12 ml ze sloupce 12 do sloupce 11, ze sloupce 11 do sloupce 10 atd. až ke sloupci 2. Přeneste 100 ml sloučeniny a 100 ml média do sloupce 1, na 100 ml média na buňky v korespondujících jamkách 96-jamkové destičky s plochými dny. Celkový objem na jamku by měl být 200 ml.
4. Vraťte destičku do inkubátoru a inkubujte po dobu 3 dnů.

Den 4: Vyvinutí analýzy:

Tato část metody je prováděna na laboratorním stole.

1. Aspirujte nebo vylijte médium. Přidejte 200 ml studené 10% TCA do každé jamky, abyste zafixovali buňky. Inkubujte destičku po dobu alespoň 60 minut při teplotě 4°C.
2. Odstraňte TCA a promyjte jamky 5-krát tekoucí vodou. Vysušte destičky hlavou vzhůru na papírových ubrouscích.
3. Barvěte buňky pomocí 100 ml 0,4% SRB na jamku po dobu 10 minut.
4. Vylijte SRB a promyjte jamky 5-krát pomocí 1% kyseliny octové. Vysušte kompletně destičky hlavou vzhůru na papírových ubrouscích.
5. Solubilizujte barvivo pomocí 100 ml 10 mM Tris báze po dobu 5-10 minut na třepačce.
6. Odečtěte destičky na zařízení Dynatech ELISA Plate Reader při vlnové délce 570 nm s referencí při 630 nm.

Vybrané sloučeniny inhibovaly růst buněk overexprimujících RAS, jak je ilustrováno v Tabulce 3.

Tabulka 3

Sloučenina	IC ₅₀ (uM) RAS/NIH3T3
A-3	40
A-4	20

Příklad 6: Stanovení efektu azabenzimidazolových sloučenin na
růst buněk A549

Následující metoda měří stupeň růstu buněk A549. Účelem metody je určit účinky sloučenin na růst A549 buněk lidského karcinomu plic. Buňky A549 jsou snadno dostupné z komerčních zdrojů, jako je například ATCC (CCL185).

Materiál

96 jamkové sterilní destičky s plochým dnem
96 jamkové sterilní destičky s kulatým dnem
sterilní 25 ml nebo 100 ml nádoba
pipety, vícekanálová pipeta
sterilní pipetové špičky
sterilní 15 ml a 50 ml zkumavky

Reagencie

0,4% SRB v 1% kyselině octové
10 mM Tris báze
10% TCA
1% kyselina octová
sterilní DMSO (Sigma)
sloučenina v DMSO (100 mM nebo slabší zásobní roztok)
Trypsin-EDTA (GIBCO BRL)

Buněčná linie

A549 buňky lidského karcinomu plic (ATCC CCL185)
10% fétální telecí sérum v Ham F12-K

Protokol

Den 0: Umístění buněk:

Tato část metody je prováděna v boxu s laminárním prouděním.

1. Trypsinizujte buňky. Přeneste 200 ml buněčné suspenze k 10 ml izotonického roztoku. Spočítejte buňky pomocí přístroje Coulter Counter.
2. Naředte buňky v růstovém médiu na 20 000 buněk/ml. Přeneste 100 ul buněk do každé jamky v 96-jamkové destičce s plochým dnem, aby bylo v každé jamce 2000 buněk.
3. Použijte polovinu destičky (4 řady) pro každou sloučeninu a pracujte v kvadrupletu pro každou koncentraci sloučeniny. Pro kontrolní médium použijte 4 jamky.
4. Destičky jemně promíchejte, aby došlo k jednotnému přichycení buněk.
6. Inkubujte destičky při teplotě 37°C v inkubátoru s 10% CO₂.

Den 1: Přidání sloučeniny:

Tato část metody je prováděna v boxu s laminárním prouděním.

1. Do 96-jamkové destičky s kulatými dny přidejte 120 μ l růstového média obsahujícího 2x nejvyšší finální koncentraci DMSO, která byla nalezena při skríninku koncentrací sloučenin ve sloupcích 1 až 11. Například pokud je nejvyšší koncentrace 100 μ M a ta je připravena ze 100 mM zásobního roztoku, 1x DMSO je 0,1% a 2x DMSO je 0,2%. Tato destička je použita k vytitrování sloučeniny, 4 řady na jednu sloučeninu.
2. Ve sterilní 15 ml zkumavce připravte 2x roztok nejvyšší skríninkové koncentrace sloučeniny v růstovém médiu plus 2x DMSO. Je potřeba 1 ml na buněčnou linii. Výchozí koncentrace sloučeniny je obvykle 100 μ M, ale tato koncentrace se může lišit v závislosti na solubilitě sloučeniny.
3. Přeneste v kvadrupletu 240 μ l 2x roztoku výchozí sloučeniny do jamek ve sloupci 12 v 96-jamkové destičce s kulatými dny. Proveďte sérii ředění 1:2 v celé destičce zprava doleva přenesením 12 ml ze sloupce 12 do sloupce 11, ze sloupce 11 do sloupce 10 atd. až ke sloupci 2. Přeneste 100 μ l sloučeniny a 100 μ l média do sloupce 1, na 100 μ l média a buňkách v korespondujících jamkách 96-jamkové destičky s plochými dny. Celkový objem na jamku by měl být 200 μ l.
4. Vraťte destičku do inkubátoru a inkubujte po dobu 3 dnů.

Den 5: Vyvinutí analýzy:

Tato část metody je prováděna na laboratorním stole.

1. Aspirujte nebo vylijte médium. Přidejte 200 μ l studené 10% TCA do každé jamky, abyste zafixovali buňky. Inkubujte destičku po dobu alespoň 60 minut při teplotě 4°C.
2. Odstraňte TCA a promyjte jamky 5-krát tekoucí vodou. Vysušte destičky hlavou vzhůru na papírových ubrouscích.

3. Barvěte buňky pomocí 100 ml 0,4% SRB na jamku po dobu 10 minut.
4. Vylijte SRB a promyjte jamky 5-krát pomocí 1% kyseliny octové. Vysušte kompletně destičky hlavou vzhůru na papírových ubrouscích.
5. Solubilizujte barvivo pomocí 100 ml 10 mM Tris báze po dobu 5-10 minut na třepačce.
6. Odečtěte destičky na zařízení Dynatech ELISA Plate Reader při vlnové délce 570 nm s referencí při 630 nm.

Vybrané sloučeniny inhibovaly růst buněk A549, jak je ilustrováno v Tabulce 4.

Tabulka 4

Sloučenina	IC ₅₀ (uM) A549
A-3	22 65 (2% FBS)
A-4	6 5,7 (2% FBS)

Příklad 7: Metoda určení biologické aktivity Raf modulátorů in vivo

K monitoraci účinku sloučenin, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, na inhibici nádorových buněk vaječníků, melanomu, prostaty, plic a prsu mohou být použity xenotransplantátové studie. Protokol metody je popsán v PCT publikaci WO9640116, zaregistrované 5. června 1996 autory Tang et al. nazvané "Indolinone Compounds for the Treatment of

Disease", která je v předkládaném vynálezu začleněna jako reference v celém svém rozsahu včetně vyobrazení.

Zde ilustrativně popsany předkládaný vynález může být použit v nepřítomnosti jakýchkoli limitací, které zde nejsou specificky uvedeny. Uváděné termíny a výrazy jsou použity jako termíny popisné a nikoli omezující. Rozličné modifikace těchto termínů a výrazů jsou možné a jsou zahrnuty do rozsahu předkládaného vynálezu. Proto by mělo být rozuměno, že ačkoli předkládaný vynález byl specificky uveden preferovanými formami předkládaného vynálezu, jsou možné změny a modifikace konceptů zde uvedených, které by mohli být použity osobami znalými oboru, považovány za patřící do rozsahu tohoto vynálezu, jak je definováno v připojených patentových nárocích.

Osoba znalá oboru ocení, že předkládaný vynález je možno dobře přizpůsobit k provedení záměrů a získání výsledků a výhod zde zmíněných. Molekulární komplexy a metody, postupy, způsoby léčby, molekuly, specifické sloučeniny zde popsané reprezentují současně preferované formy předkládaného vynálezu, slouží jako příklady a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu. Změny a další použití, které bude zřejmě osobám znalým oboru, které jsou zahrnuty do podstaty předkládaného vynálezu jsou definovány rozsahem patentových nároků.

Osobám znalým oboru bude snadno zřejmé, že mohou být provedeny rozličné náhrady a modifikace předkládaného vynálezu, aniž by došlo k odchýlení od rozsahu a podstaty předkládaného vynálezu.

Všechny patenty a publikace zmíněné ve specifikacích svědčí o úrovni osob znalých oboru, kterých se předkládaný vynález týká. Všechny patenty a publikace jsou zde začleněny formou reference ve stejném rozsahu, jako kdyby každá individuální publikace byla začleněna individuálně.

Zde ilustrativně popsany předkládaný vynález může být použit v nepřítomnosti jakýchkoli limitací, které zde nejsou specificky uvedeny. Z tohoto důvodu například jakýkoli ze zde uváděných termínů, "tvořený", "skládající se esenciálně z" a "skládající se" může být nahrazen jakýmkoli z ostatních dvou výrazů. Uváděné termíny a výrazy jsou použity jako termíny popisné a nikoli omezující. Rozličné modifikace těchto termínů a výrazů jsou možné a jsou zahrnuty do rozsahu předkládaného vynálezu. Proto by mělo být rozuměno, že ačkoli předkládaný vynález byl specificky uveden preferovanými formami předkládaného vynálezu, jsou možné změny a modifikace konceptů zde uvedených, které by mohli být použity osobami znalými oboru, považovány za patřící do rozsahu tohoto vynálezu, jak je definováno v připojených patentových nárocích.

Navíc tam, kde jsou rysy nebo aspekty předkládaného vynálezu popisovány v termínech Markushových skupin, rozeznají osoby znalé oboru, že vynález je také popisován v termínech podskupiny členů Markushovy skupiny. Například pokud je X popisováno jako vybrané ze skupiny tvořené brómem, chlórem a jódem, jsou uvedeny plné popisy patentových nároků pro X, které je bróm a X, které je bróm a chlór.

Reference, které nebyly v předkládaném vynálezu začleněny jako reference, včetně patentových i nepatentových referencí, jsou zde výslovně začleněny jako reference pro všechny účely. Další formy předkládaného vynálezu jsou uvedeny v následujících patentových nárocích.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob in vitro modulace funkce serin/threonin protein kinázy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje stupeň kontaktování buněk exprimujících tuto serin/threonin protein kinázu se sloučeninou na bázi azabenzimidazolu.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že serin/threonin protein kinázou je RAF.
3. Způsob in vitro identifikace sloučenin, které modulují funkci serin/threonin protein kinázy, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že zahrnuje následující stupně:
 - a) kontaktování buněk exprimujících tuto serin/threonin protein kinázu se sloučeninou na bázi azabenzimidazolu a
 - b) monitorování účinku na takto zpracované buňky.
4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinkem je změna nebo absence změny buněčného fenotypu.
5. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinkem je změna nebo absence změny buněčné proliferace.
6. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinkem je změna nebo absence změny katalytické aktivity serin/threonin protein kinázy.
7. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že účinkem je změna nebo absence změny interakce

mezi serin/threonin protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem, jak je to uvedeno v popisu.

8. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje následující kroky:

a) lýzu buněk za účelem získání lyzátu obsahujícího serin/threonin protein kinázu;

b) adsorpci serin/threonin protein kinázy na protilátku;

c) inkubaci adsorbované serin/threonin protein kinázy se substrátem nebo substráty; a

d) adsorpci substrátu nebo substrátů na pevný nosič nebo protilátku,

příčemž krok monitorování účinku na buňky zahrnuje měření koncentrace fosfátu v substrátu nebo substrátech.

9. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že serin/threonin protein kinázou je RAF a způsob zahrnuje následující kroky:

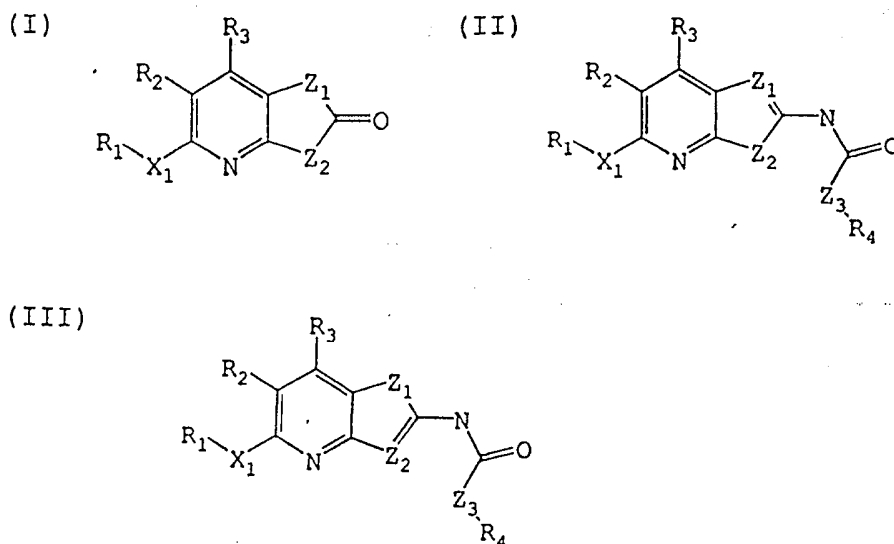
a) lýzu buněk pro získání lyzátu obsahujícího RAF;

b) adsorpci RAF na protilátku;

c) inkubaci adsorbované RAF s MEK a MAPK; a

d) adsorpci MEK a MAPK na pevný nosič nebo protilátku či protilátky,
příčemž krok monitorování účinku na buňky zahrnuje měření koncentrace fosfátu v MEK a MAPK.

10. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako sloučeniny na bázi azabenzimidazolu použije sloučeniny obecného vzorce I, II nebo III



kde

a) R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené

- (i) vodíkem;
- (ii) nasyceným nebo nenasyceným alkylem;
- (iii) skupinou vzorce NX_2X_3 , kde X_2 a X_3 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (iv) halogenem nebo trihalogenmethylovou skupinou;
- (v) ketonem vzorce $-CO-X_4$, kde X_4 je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;

- (vi) karboxylovou kyselinou vzorce $-(X_5)_n\text{-COOH}$ nebo esterem vzorce $-(X_6)_n\text{-COO-X}_7$, kde X_5 , X_6 a X_7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem a n je 0 nebo 1;

- (vii) alkoholem vzorce $-(X_8)_n\text{-OH}$, nebo alkoxy skupinou vzorce $-(X_8)_n\text{-O-X}_9$, kde X_8 a X_9 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyčeným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou a n je 0 nebo 1;

- (viii) amidem vzorce -NHCOX_{10} , kde X_{10} je vybrán ze skupiny tvořené alkylem, hydroxyem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;

- (ix) $\text{-SO}_2\text{NX}_{11}\text{X}_{12}$, kde X_{11} a X_{12} jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;

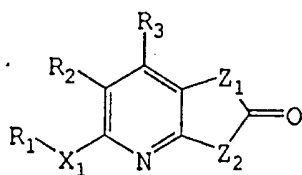
- (x) homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;

- (xi) aldehydem vzorce $-CO-H$; a
- (xii) sulfonem vzorce $-SO_2X_{13}$, kde X_{13} je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem; a
- b) Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou, kyslíkem, NH a NR_4 , přičemž platí, že když jeden ze symbolů Z_1 a Z_2 představuje dusík, NH nebo NR_4 , potom zbývající symbol představuje dusík, síru, kyslík, NH nebo NR_4 ; a
- c) Z_3 a X_1 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou a kyslíkem.

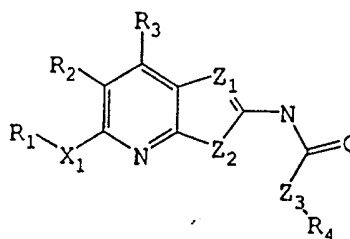
11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sloučenina na bázi azabenzimidazolu je vybrána ze skupiny tvořené SABI sloučeninami definovanými v popisu.

12. Použití sloučenin na bázi azabenzimidazolu obecného vzorce I, II nebo III

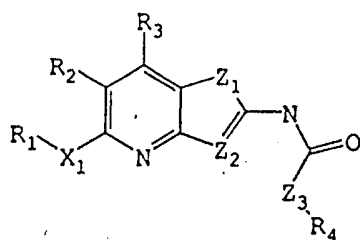
(I)



(II)



(III)



kde

a) R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené

- (i) vodíkem;
- (ii) nasyceným nebo nenasyceným alkylem;
- (iii) skupinou vzorce NX_2X_3 , kde X_2 a X_3 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (iv) halogenem nebo trihalogenmethylovou skupinou;
- (v) ketonem vzorce $-CO-X_4$, kde X_4 je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (vi) karboxylovou kyselinou vzorce $-(X_5)_n-COOH$ nebo esterem vzorce $-(X_6)_n-COO-X_7$, kde X_5 , X_6 a X_7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem a n je 0 nebo 1;
- (vii) alkoholem vzorce $-(X_8)_n-OH$, nebo alkoxy skupinou vzorce $-(X_8)_n-O-X_9$, kde X_8 a X_9 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem,

halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou a n je 0 nebo 1;

- (viii) amidem vzorce -NHCox_{10} , kde X_{10} je vybrán ze skupiny tvořené alkylem, hydroxylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;
 - (ix) $\text{-SO}_2\text{NX}_{11}\text{X}_{12}$, kde X_{11} a X_{12} jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
 - (x) homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;
 - (xi) aldehydem vzorce -CO-H ; a
 - (xii) sulfonem vzorce $\text{-SO}_2\text{X}_{13}$, kde X_{13} je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem; a
- b) Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou, kyslíkem, NH a NR_4 , přičemž platí, že když jeden ze symbolů Z_1 a Z_2 představuje dusík, NH nebo NR_4 , potom zbývající symbol představuje dusík, síru, kyslík, NH nebo NR_4 ; a

c) Z_3 a X_1 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou a kyslíkem;

pro výrobu léčiva pro léčení abnormálních stavů tvořených rakovinou a fibrotickými poruchami.

13. Použití podle nároku 12, kde léčivo je určeno pro savce.

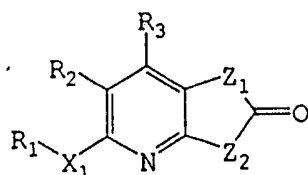
14. Použití podle nároku 12, kde abnormálním stavem je nádorové onemocnění ze skupiny tvořené plicními nádory, nádory vaječníků, nádory prsu, nádory mozku, intraaxiálními mozkovými nádory, nádory tlustého střeva, nádory prostaty, sarkomy, Kaposiho sarkomy, melanomy a gliomy.

15. Použití podle nároku 12, kde abnormální stav je spojen s aberací v dráze signální transdukce charakterizované interakcí mezi serin/threonin protein kinázou a přirozeným vazebným partnerem.

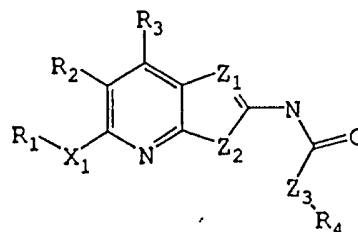
16. Použití podle nároku 15, kde serin/threonin protein kinázou je RAF.

17. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu obecného vzorce I, II nebo III

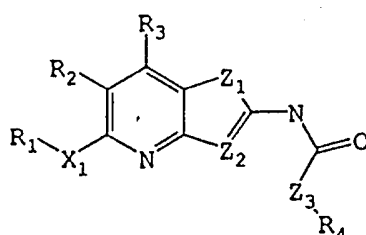
(I)



(II)



(III)



kde

a) R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené

- (i) vodíkem;
- (ii) nasyceným nebo nenasyceným alkylem;
- (iii) skupinou vzorce NX_2X_3 , kde X_2 a X_3 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (iv) halogenem nebo trihalogenmethylovou skupinou;
- (v) ketonem vzorce $-CO-X_4$, kde X_4 je vybrán ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (vi) karboxylovou kyselinou vzorce $-(X_5)_n-COOH$ nebo esterem vzorce $-(X_6)_n-COO-X_7$, kde X_5 , X_6 a X_7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem a n je 0 nebo 1;
- (vii) alkoholem vzorce $-(X_8)_n-OH$, nebo alkoxy skupinou vzorce $-(X_8)_n-O-X_9$, kde X_8 a X_9 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem,

21.08.00

halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem,
nitroskupinou a esterovou skupinou a n je 0 nebo 1;

- (viii) amidem vzorce -NHCOX_{10} , kde X_{10} je vybrán ze skupiny tvořené alkylem, hydroxylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním nebo více substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxykem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;
- (ix) $\text{-SO}_2\text{NX}_{11}\text{X}_{12}$, kde X_{11} a X_{12} jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené vodíkem, alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem;
- (x) homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, jehož kruh je popřípadě substituovaný jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxykem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;
- (xi) aldehydem vzorce -CO-H ; a
- (xii) sulfonem vzorce $\text{-SO}_2\text{X}_{13}$, kde X_{13} je vybrán ze skupiny tvořené nasyceným nebo nenasyceným alkylem a homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem; a
- b) Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou, kyslíkem, NH a NR_4 , přičemž platí, že když jeden ze symbolů Z_1 a Z_2 představuje dusík, NH nebo NR_4 , potom zbývající symbol představuje dusík, síru, kyslík, NH nebo NR_4 ; a

21.08.00

c) Z_3 a X_1 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem, sírou a kyslíkem.

18. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 17, kde Z_1 a Z_2 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené dusíkem a NH.

19. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 18, kde R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vybrány ze skupiny tvořené

(i) vodíkem;

(ii) nasyceným nebo nenasyceným alkylem popřípadě substituovaným homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem nebo polycyklickým zbytkem, přičemž kruhy výše uvedených skupin jsou popřípadě substituovány jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, halogenem, trihalogenmethylem, hydroxylem, alkoxyem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou;;

(iii) homocyklickým nebo heterocyklickým zbytkem, přičemž kruhy výše uvedených skupin jsou popřípadě substituovány jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, halogenem, trihalogenmethylem, hydroxylem, alkoxyem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou.

20. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 19, kde R_2 a R_3 představují atomy vodíku.

21. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 20, kde R_1 představuje fenylskupinu popřípadě substituovanou jedním, dvěma nebo třemi substituenty nezávisle vybranými ze skupiny tvořené alkylem, alkoxyem, halogenem, trihalogenmethylem, karboxylátem, nitroskupinou a esterovou skupinou.

22. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 21, kde R_1 je vybrán ze skupiny substituentů SABI.

23. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 22, kde X_1 je vybrán ze síry, kyslíku a NH.

24. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 23, kde Z_3 představuje kyslík.

25. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 24, kde R_4 představuje methylskupinu nebo ethylskupinu.

26. Sloučeniny na bázi azabenzimidazolu podle nároku 25, vybrané se souboru sloučenin SABI.

27. Farmaceutická kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje sloučeninu na bázi azabenzimidazolu podle kteréhokoliv z nároků 17 až 26, nebo její sůl a fyziologicky přijatelný nosič nebo ředidlo.

28. Způsob výroby sloučenin na bázi azabenzimidazolu obecného vzorce I podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje následující stupně:

- a) reakci 2-amino-6-chloro-3-nitropyridinu s druhým reaktantem, kterým je substituovaný arylový kruh, v rozpouštědle, za vzniku prvního meziprojektu;

21.08.00

- b) redukci prvního meziproduktu za přítomnosti katalyzátoru a redukčního činidla, za vzniku druhého meziproduktu;
- c) reakci druhého meziproduktu se třetím reaktantem; a
- d) purifikaci sloučeniny definované v nároku 17.

29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako rozpouštědla použije n-propanolu.

30. Způsob podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako substituovaného arylového kruhu použije substituovaného fenolu, substituovaného thiofenolu nebo substituovaného anilinu.

31. Způsob podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako substituovaného fenolu, substituovaného thiofenolu nebo substituovaného anilinu použije reaktantu ze souboru reaktantů SABI.

32. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako redukčního činidla použije vodíku.

33. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako katalyzátoru použije Raneyova niklu.

34. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako třetího rektantu použije O-methylisomočoviny.

35. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako třetího rektantu použije produktu reakce S-methylisothuroniumsulfátu s alkylchlorformiátem.

21.08.00

36. Způsob podle nároku 35, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se jako alkylchlorformiátu použije methyl-
chlorformiátu nebo ethylchlorformiátu.