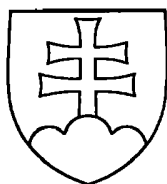


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

135-98

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶ :

A 61K 31/415
C 07D 235/06

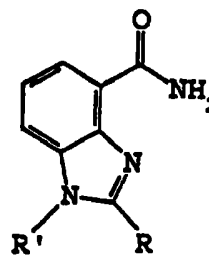
- (22) Dátum podania: 30.07.96
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9515843.2, 9611245.3
(32) Dátum priority: 02.08.95, 30.05.96
(33) Krajina priority: GB, GB
(40) Dátum zverejnenia: 03.06.98
(86) Číslo PCT: PCT/GB96/01832, 30.07.96

(71) Prihlasovateľ: NEWCASTLE UNIVERSITY VENTURES LIMITED, Newcastle upon Tyne, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Griffin Roger John, Morpeth, Northumberland, GB;
Calvert Alan Hilary, Blaydon, Tyne and Wear, GB;
Curtin Nicola Jane, Rowlands Gill, Tyne and Wear, GB;
Newell David Richard, Hexham, Northumberland, GB;
Golding Bernard Thomas, Newcastle upon Tyne, GB;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Benzimidazolové zlúčeniny, farmaceutický prostriedok obsahujúci tieto zlúčeniny a použitie týchto zlúčenín ako chemoterapeutických činidiel**

(57) Anotácia:
Použitie benzimidazol-4-karboxamidových zlúčenín všeobecného vzorca (I), v ktorom význam substituentov je uvedený v opisnej časti, alebo farmaceuticky prijateľnej soli tejto zlúčeniny, a/alebo prekurzorovej formy odvodennej od tejto zlúčeniny na prípravu prostriedku na medicínsky alebo veterinárny účel na aplikovanie na terapiu na inhibovanie aktivity enzýmu poly-(ADP-ribózy) polymerázy alebo PARP, rovnako označované ako ADP-ribosyltransferázy alebo ADPRT, pričom toto inhibovanie enzýmu tvorí prvok terapeutického liečenia. Uvedená benzimidazolová zlúčenina predstavuje aktívne PARP enzýmové inhibičné činidlo.



(I)

BENZIMIDAZOLOVÉ ZLÚČENINY, FARMACEUTICKÝ PROSTRIEDOK OBSAHUJÚCI TIETO ZLÚČENINY A POUŽITIE TÝCHTO ZLÚČENÍN AKO CHEMOTERAPEUTICKÝCH ČINIDIEL

Oblasť techniky

Vynález sa týka určitých nových benzimidazolových zlúčenín, ktoré sú predmetom záujmu z toho dôvodu, že sú prinajmenšom potenciálne vhodné ako chemoterapeutické činidlá vzhľadom na ich schopnosti inhibovať aktivitu enzýmu poly-ADP - ribosyltransferázy (EC 2.4.2.30), ktorá je rovnako známa pod označením poly (ADP – ribóza) – polymeráza, všeobecne označovaná ako ADPRT alebo PARP. Táto všeobecne používaná skratka PARP bude používaná v celom texte tohoto vynálezu.

Doterajší stav techniky

Pokiaľ sa týka doterajšieho stavu techniky, potom prinajmenšom u vyšších organizmov je o enzýme poly ADP- ribosyltransferáze známe, že katalyzuje prenos ADP- ribózovej časti z oxidovanej formy, NAD^+ , nikotínamidadeninukleotidu na nukleárne akceptorové proteíny, pričom sa tvoria homo-ADP- ribózové polyméry, a ďalej je známe, že tento proces sa vyskytuje u radu celulárnych príhod, ako je napríklad oprava DNA poškodenia, vývoj celulárnej diferenciácie, transformácie buniek onkogény a génová expresia. Spoločným znakom u celého radu týchto procesov je tvorba a oprava porúch DNA reťazca a toto pôsobenie, do ktorého je zapojený PARP enzým, sa javí ako faktor opätovného spojenia DNA reťazca sprostredkovaného ligázou II. Vo väčšine prípadov bolo zistené, že funkcia poly ADP- ribosylácie sa v týchto prípadoch vyskytla v dôsledku použitia inhibítorov PARP enzýmu, a táto skutočnosť viedla k záverom, že tieto inhibítory, tým, že sú zapojené do intracelulárneho mechanizmu DNA opravy, môžu mať vhodný chemoterapeutický účinok pokiaľ by boli schopné modifikovať charakteristiky súvisiace s odolnosťou voči liečeniu a ďalej potenciovať alebo zvyšovať

účinnosť cytotoxických liečiv pri chemoterapii alebo ožarovaní pri rádioterapii, kde primárny účinok tohoto liečenia spočíva v tom, že sa dosiahne DNA poškodenia u cieľových buniek, ako je tomu napríklad pri mnohých formách protinádorovej terapie.

V tejto súvislosti je treba uviesť, že z doterajšieho stavu techniky je známych niekoľko skupín PARP inhibítorov, včítane benzamidových zlúčenín a rôznych nikotinamidových a benzamidových analógov, najmä sú v tomto smere známe 3-substituované benzamidy s malými substitučnými skupinami, ako je napríklad 3-aminoskupina, 3-hydroxyskupina a 3-metoxyskupina. PARP inhibičný účinok určitých N-substituovaných benzamidových zlúčenín je napríklad uvádzaný v európskom patente EP-A-0 305 008, kde je rovnako navrhované použitie týchto zlúčenín v medicíne pre zvýšenie cytotoxicity radiácie alebo ako chemoterapeutických liečiv.

Vzhľadom na možnosť použitia benzamidových zlúčenín ako chemoterapeutických činidiel bola podľa rôznych štúdií vykonávaných s týmito zlúčeninami, o ktorých je známe, že inhibujú PARP inhibičný účinok, potvrdená skutočnosť, že tieto zlúčeniny môžu potenciovať cytotoxicitu u celej rady protinádorových činidiel *in vitro*, ako je napríklad bleomycin a metylačné liečivá. Konkrétnejšie vymedzenejšie výsledky potom ďalej ukázali, že tieto benzamidové zlúčeniny môžu rovnako potenciovať účinnosť cytotoxických liečiv *in vivo*, i keď požadované dávky na dosiahnutie tohoto účinku sa javia ako príliš vysoké (napríklad v oblasti 0,5 gramov/kilogram na jednu dávku v prípade 3-aminobenzamidu), takže sa tu môžu vyskytnúť s tým súvisiace problémy týkajúce sa prípravy vhodných farmaceutických prostriedkov a prípravkov a s obmedzeniami týkajúcimi sa zamedzeniu toxicity. Okrem toho je treba uviesť, že podľa doterajšieho stavu techniky bolo zistené, že celá rada známych benzamidových zlúčenín vykazuje jednoznačne účinnosť ako radiosenzitizéry, čo znamená, že napríklad zvyšuje ničenie nádorových buniek vyvolané ionizačným žiarením ako *in vitro* tak *in vivo*, pričom sa predpokladá, že v mnohých prípadoch tento účinok súvisí s tým, že tieto zlúčeniny pôsobia ako

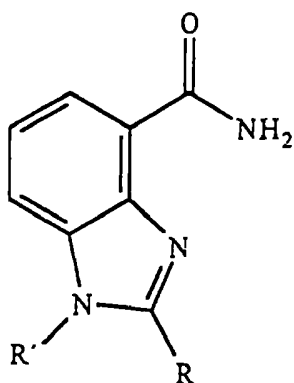
PARP inhibítory a ako látky zapojené do procesu DNA opráv.

Ovšem bez ohľadu na existujúce výsledky testov *in vivo* a *in vitro*, podľa ktorých bolo zistené, že PARP inhibítory majú značný potenciál ako vhodné chemoterapeutické liečiva, čo si zasluhuje ďalšie klinické vyhodnotenia, napríklad v súvislosti s nádorovou terapiou, je ale treba uviesť, že v súčasnej dobe dostupné PARP inhibítory nie sú považované zatiaľ za celkom vhodné látky, aby mohli predstavovať možných kandidátov liečiv, takže v tomto odbore stále existuje potreba nájsť, vyvinúť väčšiu skupinu zlúčenín, ktoré by boli potenciálne vhodné ako látky, ktoré prejavujú PARP inhibičné vlastnosti.

Podstata vynálezu

Podľa predmetného vynálezu bola identifikovaná nová skupina alebo rad zlúčenín, ktorý je zaujímavý ako PARP inhibítory, pričom tieto zlúčeniny sú využiteľné v medicíne, najmä je možné ich použiť pre podávanie v spojení s prinajmenšom určitými cytotoxickými liečivami alebo rádioterapeutickými metódami na zvýšenie cytotoxickej účinnosti týchto látok alebo metód. Všeobecne je možné uviesť, že v rozsahu zlúčenín podľa predmetného vynálezu sú určité benzimidazolové deriváty, konkrétne je možné uviesť benzimidazol-4-karboxamidové zlúčeniny, ktoré budú definované ďalej. Vzhľadom ku štruktúre týchto zlúčenín je zrejmé, že mnoho z týchto zlúčenín je hlavne dobre prispôsobiteľných ku konkurovaniu s prirodzeným substrátom NAD⁺ pre PARP enzým.

Podľa prvého aspektu sa teda predmetný vynález týka použitia zlúčenín definovaných v tomto popise na prípravu liečiva alebo veterinárneho prípravku aplikovateľného na inhibovanie aktivity enzýmu poly-(ADP-ribózy) polymerázy alebo PARP (rovnako označovaný ako ADP-ribosyltransferáza alebo ADPRT), pričom toto inhibovanie enzýmu predstavuje súčasť terapeutického liečenia, pričom táto zlúčenina predstavuje aktívne inhibičné činidlo PARP enzýmu a touto zlúčeninou je benzimidazol-4-karboxamid všeobecného vzorca I:



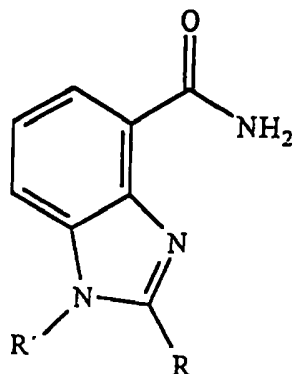
(I)

alebo farmaceuticky prijateľnú soľ a/alebo prekursorovú formu tejto zlúčeniny, pričom vo vyššie uvedenom všeobecnom vzorci I:

R je zvolený zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzolová skupina) a prípadne substituovanú aryllovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina) alebo aralkylová skupina (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina), a

R' je zvolený zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) a prípadne substituovaná aryllová skupina (ako je napríklad fenylová skupina) alebo aralkylová skupina (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina).

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí použitie benzimidazolových zlúčenín, ktoré majú nasledujúci všeobecný vzorec I:



(I)

alebo farmaceuticky prijateľné soli odvodené od tejto zlúčeniny a/alebo prekurzorové formy tejto zlúčeniny, v ktorom:

Všetky substituenty majú vyššie definovaný význam, s tou podmienkou, že :

R neznamená 4'-metánsulfonyloxy-2'-metoxyfenylovú skupinu, alebo 4'-metánsulfonylamino-2'-metoxyfenylovú skupinu a ďalej neznamená fenylovú skupinu, ktorá má substituent vybraný zo súboru zahrňujúceho alkylsulfonylovú skupinu, alkylsulfinylovú skupinu, alkánsulfonylovú skupinu, alebo alkylsulfooximinovú skupinu, alkylsulfooximinovú skupinu substituovanú na atóme dusíka alkanoylovou skupinou, alkylsulfonylovou skupinou, alebo hydroxykarbonyl-alkylénkarbonylovou skupinou, etoxyskupinu, alebo n-propoxyskupinu, z ktorých každá je substituovaná na koncovej polohe alkylsulfonylovou skupinou, alkylsulfinylovou skupinou, alkánsulfonylovou skupinou, alebo alkylsulfoximinovou skupinou, alkoxykarbonylamínovú skupinu alebo N-alkylaminokarbonylamínovú skupinu

R' neznamená prípadne substituovanú aralkylovú skupinu, a nezahrňuje bifenylovú skupinu alebo substituovanú bifenylovú skupinu, pri terapii ako účinné farmaceutické látky, najmä , ovšem nie výlučne, ako PARP inhibítov.

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patria nové benzimidazolové zlúčeniny, ktoré majú uvedený všeobecný štruktúrny vzorec I, alebo farmaceuticky prijateľné soli odvodené od týchto zlúčenín a/ alebo prekurzorových foriem týchto zlúčenín, v ktorom jednotlivé substituenty majú rovnaký význam ako bolo definované vyššie s tou podmienkou, že R', neznamená prípadne substituovanú aralkylovú skupinu a R neznamená 4' - metansulfonyloxy-2' -metoxyfenylovú skupinu alebo nesubstituovanú arylovú skupinu, ako je napríklad fenylová skupina.

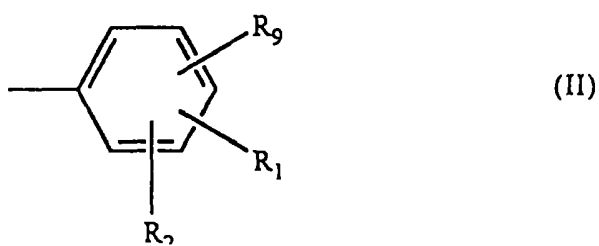
Alkylové skupiny, ktoré sú prítomné ako také alebo ako súčasť iných skupín, obvykle obsahujú 1 až 8 atómov uhlíka, vo výhodnom vyhotovení podľa

vynálezu 1 až 6 atómov uhlíka a podľa ešte výhodnejšieho vyhotovenia 1 až 4 atómy uhlíka. Konkrétne je možné uviesť, že v prípade, kedy R a/ alebo R' predstavujú alkylovú skupinu, potom sa jedná obvykle o alkylovú skupinu obsahujúcu 1 až 6 atómov uhlíka, ako je napríklad metylová skupina, etylová skupina, n-propylová skupina, i-propylová skupina, n-butylová skupina, t-butylová skupina alebo cyklohexylová skupina. V prípade, kedy R a/ alebo R' znamená fenylovú skupinu alebo zahrňuje fenylovú skupinu, potom táto skupina môže byť substituovaná, najmä v polohe 4 (para), ovšem alternatívne alebo navyše môže byť táto skupina substituovaná v polohe 2 a/alebo v polohe 3, napríklad rôznymi substituentami, medzi ktoré je možné zaradiť hydroxyskupinu, alkoxyskupinu (ako je napríklad metoxyskupina alebo

etoxykupina), ďalej kyanoskupinu, karboxyskupinu, amedovú skupinu, terazolovú skupinu, aminovú skupinu alebo substituovanú aminovú skupinu, skupinu CW_3 (ako je napríklad CF_3) alebo skupinu W , kde W znamená halogén.

V prípadoch, kedy R' znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu, potom medzi výhodné zlúčeniny vyššie uvedeného štruktúrneho vzorca I je možno zaradiť zlúčeniny, v ktorých R znamená fenylovú skupinu alebo benzylovú skupinu, ktoré majú prinajmenšom jeden substituent na benzénovom kruhu a tento substituent je vybraný zo súboru zahrňujúceho hydroxyskupinu, alkoxykupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivo a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxykupinu), ďalej $NHCOR_3$ (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu $CONH_2$), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

Konkrétne sú výhodné podľa predmetného vynálezu zlúčeniny, v ktorých R predstavuje substituovanú fenylovú skupinu všeobecného štruktúrneho vzorca II :

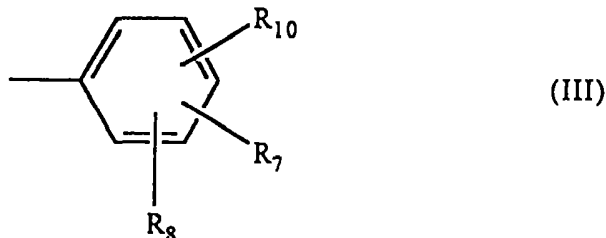


v ktorom R_1 , R_2 a R_9 sú každý nezávisle na sebe vybrané zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxykupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivo a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxykupinu), ďalej $NHCOR_3$ (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu $CONH_2$),

tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

Do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí postup prípravy zlúčeniny všeobecného štruktúrneho vzorca I, ktorý bol definovaný vyššie, v ktorom R znamená prípadne substituovanú fenylovú skupinu všeobecného štruktúrneho vzorca II, ktorý bol definovaný vyššie, pričom podstata tohoto postupu spočíva v vykonaní reakcie alkylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej s chloridom arylkyseliny, pričom takto získaný produkt sa spracuje kyselinou octovou pri zvýšenej teplote, pričom dôjde k tvorbe benzimidazolového kruhu, a potom nasleduje reakcia s kvapalným amoniakom za vzniku amidového derivátu.

V prípade, že R' predstavuje substituovanú fenylovú skupinu, potom táto skupina má výhodne štruktúrny všeobecný vzorec III:



v ktorom:

R_7 , R_8 a R_{10} sú každý nezávisle vybraný zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivo a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxyskupinu), ďalej $NHCOR_3$ (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu $CONH_2$) tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

Zlúčeniny vyššie uvedeného štruktúrneho vzorca I, ktorý bol definovaný vyššie, ktoré majú aromatický kruh obsahujúci skupinu CN ako substituent, je

možno v mnohých prípadoch rovnako využiť ako medziprodukty pre prípravu ostatných zlúčenín podľa predmetného vynálezu, lebo kyanoskupina ako substituent môže byť obvyklým spôsobom prevedená na rad rôznych iných funkčných skupín, včítane aminovej skupiny, karboxylovej skupiny, amidovej skupiny a tetrazolovej skupiny, pričom sa použijú bežne známe metódy v tomto odbore.

Do rozsahu benzimidazolových zlúčenín popisovaných v tomto vynáleze vo výhodnom vyhotovení náležia látky, ktoré sú z hľadiska svojho použitia zvlášť zaujímavé a síce

- (a) 2 –metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (b) benzimidazol-4-karboxamid,
- (c) 2-fenylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (d) 2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (e) 2-(4'-trifluormetylfenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (f) 2-(4'-hydroxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (g) 2-trifluormetylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (h) 2-(4'-metoxyfenyl)-N-metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (i) 2-(4'-nitrofenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (j) 2-(4'-kyanofenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (k) 2-(3'-trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (l) 2-(3'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (m) 2-(4'-metoxyfenyl)-l-N-benzoylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (n) 2-(4'-aminofenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (o) 2-(2'-trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (p) N-karboxybenzyl –2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid.

V prípade vyššie uvedených zlúčenín podľa predmetného vynálezu, u ktorých sa vyskytuje elektronovo bohatý aromatický kruh, sa predpokladá, že

prinajmenšom v niektorých prípadoch môže byť karboxamidová skupina uzavretá do fixovanej konformácie, ktorá je najmä priaznivá pre prezentovanie tejto zlúčeniny ako inhibítora NAD⁺ väzieb na PARP enzym, čo súvisí s intramolekulárnou vodíkovou väzbou medzi dusíkom imidazolového kruhu a jedným z vodíkových atómov karboxamidovej skupiny.

Ako už bolo vyššie uvedené, do rozsahu predmetného vynálezu rovnako patrí postup prípravy zlúčenín, ktoré sú definované vyššie (včítane medziproduktov, čo prichádza do úvahy v niektorých prípadoch), a rovnako rozsah predmetného vynálezu zahŕňa terapeutické použitie týchto zlúčenín pre liečenie cicavcov. Toto použitie zahŕňa použitie vyššie uvedených látok na prípravu medicínskych alebo veterinárnych prípravkov a farmaceutických prostriedkov obsahujúcich účinné PARP inhibičné množstvo účinnej zlúčeniny podľa vynálezu na podanie pacientovi v kombinácii s cytotoxickým liečivom alebo rádioterapeutickou metódou, pričom účelom je zvýšenie cytotoxického účinnosti týchto látok, resp. metód. Tieto prípravky alebo prostriedky je možno pripraviť ľubovoľnou bežne známou a používanou metódou podľa doterajšieho stavu techniky v odbore farmácie, pričom tieto prostriedky alebo prípravky sú určené pre podanie ľubovoľným vhodným spôsobom, ako je napríklad perorálna aplikácia, parenterálne podanie (včítane subkutánneho, intramuskulárneho alebo intravenózneho podávania) alebo miestna aplikácia, pričom metóda podávania, typ používaných prípravkov alebo prostriedkov, resp. formulácií, a dávkové množstvá je všeobecne určované bežne známymi a podrobnými návodmi používanými v súvislosti s chemoterapiou alebo rádioterapiou za použitia cytotoxických liečiv.

Pri príprave týchto farmaceutických prostriedkov vo forme sterilných kvapalných prípravkov pre parenterálne použitie je možné predom určené terapeuticky účinné netoxické množstvo každej jednotlivéj zlúčeniny, s ktorou sa uvažuje na použitie, rozpustiť vo fosfátovom pufróvacom slanom roztoku, pričom tento prípravok je možné pripraviť v jednotkovej dávkovej forme a naplniť ju do zapečatených ampuliek, ktoré sú pripravené na použitie.

Všeobecne je možné rovnako uviesť, že prinajmenšom pokiaľ sa týka vodného roztoku koncentrácie zodpovedajúceho maximálne 200 miligramov/mililiter sú výhodné na použitie podľa predmetného vynálezu, ovšem množstvo a dávkovacia metóda, ktoré sú potrebné na dosiahnutie optimálnej účinnosti, sa samozrejme môžu meniť v širokom rozsahu a budú v každom jednotlivom prípade závisieť na stanovisku lekára alebo veterinára, ktorý ošetruje daného pacienta alebo zviera. V prípadoch, kedy sa uvedená zlúčenina používa v spojení s cytotoxickým liečivom, je možné toto cytotoxické liečivo podávať súčasne, pričom je možné ho bežným spôsobom inkorporovať do rovnakého farmaceutického prostriedku alebo kompozície.

Ako už bolo vyššie uvedené, prejavujú zlúčeniny podľa predmetného vynálezu prinajmenšom účinnosť ako PARP inhibítory, pričom pri *in vitro* testoch, ktoré budú popisované v ďalšom texte, tieto zlúčeniny vykazovali pozitívnu farmakologickú účinnosť, o ktorej sa predpokladá, že reflektuje účinnosť ktorú je možné zistiť *in vivo* v priebehu terapeutického klinického použitia.

V danej súvislosti je treba rovnako zdôrazniť, že všade v popise predmetného vynálezu, kde sa popisujú zlúčeniny vyššie definovaného všeobecného vzorca I sa táto zmienka rovnako vzťahuje na ich farmaceuticky prijateľné soli a iné ostatné farmaceuticky prijateľné bioprekurzory (prekursorové formy), kde to ovšem prichádza do úvahy. Týmto vyššie uvedeným termínom „prekursor“ liečiva, ktorý je použitý v popise predmetného vynálezu, sa mieni modifikovaná forma derivátu zlúčeniny podľa predmetného vynálezu alebo deriváty farmakologicky účinných zlúčenín, ktoré podliehajú biologickému degradovaniu *in vivo* a po podaní sa prevedú takto na uvedenú účinnú zlúčeninu, najmä po perorálnom podaní alebo po intravenóznom podaní v priebehu terapeutického liečenia cicavcov. Tieto prekurzory liečiv sa všeobecne používajú z toho dôvodu, lebo majú zvýšenú rozpustnosť vo vodnom prostredí, čo napomáha prekonať problémy s ich formulovaním a rovnako v niektorých prípadoch je možné týmto spôsobom dosiahnuť relatívne

pomalé alebo kontrolované uvoľňovanie účinnej látky.

Prekurzor liečiva, ktorý splňuje všetky farmakologické požiadavky musí byť vo vode rozpustný derivát, ktorý je netoxický a zodpovedajúcim spôsobom stabilný v roztoku pri fyziologickej hodnote pH, ovšem musí sa samozrejme jednať o látku, ktorá sa biologickými účinkami rozpadá alebo konvertuje, napríklad účinkom enzymatickej degradácie alebo v dôsledku zmeny hodnoty pH v danom prostredí, na účinnú zlúčeninu na mieste, v ktorom je potrebný po jeho podaní jeho účinok v priebehu terapie. V prípade benzimidazolových zlúčenín podľa predmetného vynálezu je možné tieto formy prekurzorov liečiv dosiahnuť prevedením na karbamáty alebo deriváty aminokyselín, ako je napríklad glycin alebo iné aminokyselinové karbamátové deriváty, alebo na fosfátové deriváty. Tieto fosfátové deriváty je možno pripraviť tak, že sú citlivé na enzymatickú defosforyláciu *in vivo*, pričom tieto formy sú v súčasnej dobe považované za výhodné, najmä patria k výhodným vyhotoveniam vo vode rozpustné amónne soli alebo soli s alkalickými kovmi týchto fosfátov. Tieto zlúčeniny je možné v mnohých prípadoch pripraviť bežným spôsobom zo zlúčenín vyššie uvedeného štruktúrneho všeobecného vzorca I, ktoré majú prinajmenšom jednu hydroxylovú skupinu ako substituent, ako je tomu napríklad v prípade časti R s aromatickým kruhom, reakcie s dibenzylfosfonátovou zlúčeninou, vo výhodnom vyhotovení v prítomnosti terciárnej báze zlúčeniny, ako je napríklad N, N-diizopropyletylamin.

V prípadoch, kedy R predstavuje fenylovú skupinu (alebo benzolovú skupinu) a kedy je nutné, aby substituent bol iný ako hydroxylová skupina, ako je napríklad NO₂, CO₂H, CN, atď., na polohe 4', čo je nutné z hľadiska dosiahnutia uspokojivej PARP inhibičnej účinnosti, môže byť hydroxylový substituent, podliehajúci fosforylácii alebo iné prekurzorové modifikácie, k dispozícii na inej polohe aromatického kruhu, ako napríklad na polohe 3'.

V prípade všetkých vo vode rozpustných prekurzorových foriem, u ktorých sa predpokladá forma fosfátu, je karbamátová časť alebo iná

prekurzorová časť rozpúšťajúca sa vo vode zložkou R alebo R' vyššie uvedeného štruktúrneho vzorca I.

Rovnako sa predpokladá ako samozrejmé, že v prípade všetkých zlúčenín, ktoré sú v tomto texte uvádzané a ktoré môžu existovať vo viac ako jednej enantiomérskej forme, všetky tieto formy, zmesi obsahujúce tieto formy a ich prípravy, a rovnako tak i použitie týchto všetkých foriem patrí rovnako do rozsahu predmetného vynálezu.

Príklady vyhotovenia vynálezu

V nasledujúcich príkladoch budú bližšie popísané benzimidazolové zlúčeniny podľa predmetného vynálezu, postupy ich prípravy a rovnako tak ich medziprodukty a postupy ich prípravy a jednotlivé fázy týchto syntetických postupov s rôznymi výhodnými zlúčeninami, ktorú sú hlavne zaujímavé z hľadiska predmetného vynálezu, a ďalej použitie týchto zlúčenín ako chemoterapeutických činidiel a farmakologické testy a dosiahnuté výsledky s týmito látkami, pričom všetky tieto príklady sú iba ilustratívne a nijako neobmedzujú rozsah predmetného vynálezu.

V prvom príklade (príklad 1), je popísaný postup prípravy rôznych medziproduktov, to znamená zlúčenín, ktoré sú nutné na prípravu benzimidazolových zlúčenín podľa predmetného vynálezu, ktoré sú ďalej popisované v príkladoch 2 až 6.

P r í k l a d 1

Postup prípravy zlúčenín predstavujúcich medziprodukty.

(a) Postup prípravy 3-nitroftalamovej kyseliny

Podľa tohoto vyhotovenia bol anhydrid kyseliny 3-nitroftalovej (v množstve 10,0 gramov, čo je 50 mmolov) pridaný po častiach behom intervalu

20 minút ku koncentrovanému vodnému roztoku amoniaku (15 mililitrov), pričom takto vzniknutá reakčná zmes bola potom premiešavaná pri teplote 30° C po dobu ďalších 30 minút. Týmto spôsobom sa vykryštalizovala hmota ftalamátu amónneho, ktorý sa pri ochladzovaní usadzoval v tomto svetlo žltom roztoku, načo bola táto hmota oddelená a znovu rozpustená v minimálnom množstve teplej vody. K tomuto podielu bola potom pridávaná koncentrovaná kyselina chlorovodíková (v množstve 4,5 mililitrov), čo bolo vykonané po kvapkách a za miešania, načo bola výsledná pastovitá hmota premytá vodou a usušená vo vákuu a týmto spôsobom zhora uvedeným postupom bola pripravená požadovaná 3-nitroftalamová kyselina vo forme jemného bieleho prášku.

Výťažok: 9,01 gramov (83 %).

Teplota tavenia: 217 ° C,

Analýza pre $C_8H_6N_2O_5$:

Vypočítané :	45,71 % C	2,86% H	13,33 % N
Nájdené :	45,76% C	2,79%H	13,21% N.
ν_{max}/cm^{-1} :	3466,52,	3321,84,	1668,64, 1604,98 a 1525,89,

δ^1H (d_6 -DMSO, 200 MHz) :

7,75 (1H, br, s, CONH), 7,8 (1H, t, Ar – 5H),

8,16 (1H, brs, CONH), 8,2 (1H, d, Ar-6H)

8,3 (1H, d, Ar-4H),

$\delta^{13}C$ (d_6 -DMSO) :

127,32, 130,06, 132,28, 133,49, 134,78, 147,71, 166,25 a 166,60,

m/z (EI) : 192 ($M^+ -1$), 177, 149, 103, 75.

(b) Postup prípravy 2-amino-3-nitrobenzoovej kyseliny (alebo 3-nitroantranilovej kyseliny)

Podľa tohoto vyhotovenia bolo použité premiešavanie roztoku obsahujúceho hydroxid draselný (v množstve 24,1 gramov) vo vode (110 mililitrov) pri teplote 0° C, pričom do tohoto roztoku bol pridaný bróm (2,46 mililitrov), načo nasledoval prídavok 3-nitroftalamovej kyseliny (použitá 10 gramov, čo je 47,62 mmolu). Takto získaná reakčná zmes bola potom

premiešavaná po dobu 3 hodín pri teplote 60° C, načo bola ochladená na teplotu miestnosti a potom bola premiešavaná po dobu ďalších 12 hodín. Týmto spôsobom vznikla oranžová zrazenina, ktorá bola oddelená a potom znovu rozpustená v minimálnom množstve vody, načo bol tento podiel okysličený prídavkom koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej, čo bolo vykonané po kvapkách. Rekryštalizácia takto vzniknutej výslednej žltej pevnej látky z horúcej vody bola pripravená požadovaná 3-nitroantranilová kyselina vo forme žltých mikrokryštálikov.

Výťažok: 6,42 gramov (74%).

Teplota tavenia : 208 – 209 °C,

Analýza pre $C_7H_6N_2O_4$:

Vypočítané: 46,15 % C 3,29 % H 15,38 % N

Nájdené : 45,83 % C 3,07 % H 15,21 % N.

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3476,17, 3344,99, 3094,21 a 1687,93,

$\delta^1\text{H}$ (d_6 -DMSO, 200 MHz):

6,76 – 6,84 (1H, t, Ar-5H), 8,29 – 8,41 (2H, dd, Ar-4/6H),

8,60 (2H, s, Ar-NH₂), 13,4 - 14,0 (1H, br s, Ar-CO2H),

$\delta^1\text{C}$ (d_6 -DMSO):

113,19, 131,19, 131,97, 140,02, (Ar-4/5/6CH), 115,02,

(Ar-C-NH₂), 132,77 (Ar-C-CO₂H), 147,09 (Ar-C-NO₂), 168,95 (Ar-CO₂H),

m/z (EI) : 182 (M^+), 164.

(c) Postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-nitrobenzoovej

Podľa tohoto vyhotovenia bol plyný chlorovodík prebublávaný roztokom 2-amino-3-nitrobenzoovej kyseliny (použitá 0,5 gramov, čo je 2,75 mmolu) v metanole (40 mililitrov), čo bolo vykonávané v intervaloch 15 minút pri teplote 0° C. Takto získaná reakčná zmes bola potom zahrievaná pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 5 hodín, načo bola ponechaná ochladiť na teplotu miestnosti, pričom toto ochladzovanie prebiehalo po dobu ďalších 12 hodín, a týmto spôsobom sa v tomto roztoku usadil metylester kyseliny 2-amino-3-nitrobenzoovej vo forme žltej pevnej látky.

Výtěžok : 417 miligramov (77 %).

Teplota tavenia: 95 – 96 °C,

Analýza pre $C_8H_8N_2O_4$:

Vypočítané: 48,98 %C 4,08 %H 14,29 %N

Nájdene: 49,09 %C 3,78%H 14,03% N

ν_{max}/cm^{-1} : 3452,5, 3316,9, 1702, a 1253,7,

δ^1H (d_6 -DMSO, 200 MHz):

3,95 (3H, s, OCHH₃), 6,79 - 6,87 (1H, t, Ar-5H),

8,28 – 8,33 (1H, dd, Ar-4H), 8,41 – 8,46 (1H, dd, Ar-6H),

8,45 – 8,46 (2H, br, s, Ar-NHH₂),

m/z (EI) : 196 (M^+), 164, 118, 90, 63.

(d) Postup prípravy 2,3-diaminobenzoovej kyseliny

Pri prevádzaní tohoto postupu bol použitý roztok 3-nitroantranilovej kyseliny (v množstve 2,44 gramov, čo je 13 mmolov) v metanole (120 mililitrov), pričom k tomuto roztoku bolo pridané paládium na uhlíku ako katalyzátor (10% paládium, približne 200 miligramov), pričom tento prídavok bol vykonaný opatrným spôsobom a tento katalyzátor bol pridávaný vo forme suspenzie v metanole (10 mililitrov), načo bola takto pripravená reakčná zmes premiešavaná pod atmosférou vodíka podobu 2 hodín pokiaľ neustala absorpcia plynu. Použitý katalyzátor bol potom odstránený filtráciou cez vrstvu celitu a získaný filtrát bol odparený do sucha za zníženého tlaku, čím bol získaný surový produkt. Vyčistením tohoto produktu v chromatografickej kolóne na silikagély, kde ako elučného činidla bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 4 : 1 bola získaná požadovaná 2,3-diaminbenzoová kyselina vo forme červenej pevnej látky.

Výtěžok: 1,34 gramov (66%).

ν_{max}/cm^{-1} : 3433,73, 2882,02, 2602,30 a 1658,99,

δ^1H (d_6 -DMSO, 200 MHz) :

5,8 – 7,4 (4H, br s, 2 x NHH₂), 6,45 (1H, t, Ar-5H),

6,75 (1H, d, Ar-4H), 7,20 (1H, d, Ar-6H),

δ^{C} (d₆ – DMSO):

110,31 115,45, 118,33, 120,55, 135,03,
140,36, 170,68,

m/z (EI) : 152 (M⁺), 134, 106, 79.

(e) Postup prípravy metylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej.

Pri vykonávaní postupu podľa tohoto postupu prípravy bol použitý roztok 2,3-diaminobenzoovej kyseliny (použitá 0,2 gramov, čo je 1,32 mmol) v metanole (40 mililitrov), ktorý bol nasýtený chlorovodíkom rovnakým spôsobom ako je uvedené hore, a takto získaná reakčná zmes bola v nasledujúcej fáze zahrievaná pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 2 hodín. V ďalšom postupe bola po odparení použitého rozpúšťadla získaná pevná látka vo forme zvyšku, pričom tento pevný podiel bol rozpustený vo vode a v ďalšom postupe bola hodnota pH takto získaného roztoku upravená na 7,0 za použitia hydrogenuhličitanu sodného. Po extrahovaní tohoto podielu etylesterom kyseliny octovej (použitá dva podiely po 30 mililitroch) boli organické vrstvy spojené a tento spojený podiel bol usušený (síranom horečnatým) a použité rozpúšťadlo bolo odstránené, pričom týmto spôsobom bol získaný metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej vo forme hnedého oleja, ktorý pri triturovaní s benzínom (40/60) stuhol.

Výtťažok : 121,6 miligramov (56 %).

Teplota tavenia: 62 .- 63 °C

Analýza pre C₈H₁₀N₂O₂:

Vypočítané: 57,83 % C 6,02% H 16,87 % N

Nájdené: 58,35 % C 5,80% H 16,69 % N

δ^{H} (d₆-DMSO, 200 MHz):

3,87 (3H, s, OCH₃), 4,90 (2H, br s, Ar-2-NH₂),

6,32 (2H, br s, Ar-3-NH₂), 6,46 – 6,54 (1H, t, Ar-5H),

6,80 – 6,84 (1H, dd, Ar-4H), 7,18 – 7,23 (1H, dd, Ar-6H),

m/z (EI) : 166 (M⁺), 134, 106, 79.

Tento metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej bol rovnako pripravený redukovaním metylesteru kyseliny 2-amino-3-nitrobenzoovej, pričom tento postup sa vykonával nasledujúcim spôsobom : roztok metylesteru kyseliny 2-aminobenzoovej (v množstve 284 gramov, čo je 1,45 mmolu) v metanole (40 mililitrov), ktorý obsahoval paládium na uhlíku ako katalyzátoru (10% Pd, približne 50 miligramov) bol premiešavaný pod atmosférou vodíka po dobu 24 hodín. Takto získaný roztok bol sfiltrovaný cez celit za účelom odstránenia katalyzátora, načo bolo použité rozpúšťadlo odparené vo vákuu a týmto spôsobom bol získaný požadovaný metylester vo forme hnedej pevnej látky (výťažok 180 miligramov, čo je 75 %) a tento produkt bol identický s metylesterom kyseliny 2,3-diaminobenzoovej, pripraveným hore popísaným spôsobom.

(f) Postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-N-benzoylaminobenzoovej.

Podľa tohoto vyhotovenia bol použitý roztok benzoylchloridu (v množstve 38,4 μ l, čo je 0,331 mmolu) v tetrahydrofurane (5 mililitrov), ktorý bol pridávaný po kvapkách do roztoku metylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (použitá 50 miligramov, čo je 0,301 mmolu) v suchom tetrahydrofurane (5 mililitrov), ktorý obsahoval trietylamin (46 μ l) a 4-dimetylaminopyridin (1,8 miligramov, čo je 5 molových %). Pre premiešanie tejto reakčnej zmesi, ktoré prebiehalo po dobu 24 hodín pri teplote 45°C, boli použité rozpúšťadlá odparené a surový produkt bol prečistený v chromatografickej kolóne na silikagély, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes benzínu (40/60) a etylacetátu v pomere 3:2. Rekryštalizáciou zo zmesi etylacetátu a benzínu (40/60) bola získaná požadovaná titulná zlúčenina vo forme bielych kryštálikov.

Výťažok: 60 miligramov (74%).

^1H (d_6 -DMSO, 200 MHz):

3,95 (3H, s, OCH_3), 6,64 (2H, br s, Ar-NH $_2$),

6,69 - 6,77 (1H, t, Ar-5H), 7,46 - 7,50 (1H, d, Ar-4H),

7,59 - 7,70 (3H, m, Ph-3 a Ph-3 4H),

7,81 - 7,85 (1H, d, Ar-6H),

8,11 - 8,14 (2H, d, Ph-2H a Ph-2 H),
 9,8 - 9,9 (1H, br, s, Ar-NHCO),
 m/z (EI) : 20 (M⁺), 253, 105.

(g) Postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(4' -metoxybenzoyl) aminobenzoovej.

Pri vykonávaní tohoto postupu bol použitý roztok metylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (460 miligramov, čo je 2,77 mmolu) v suchom tetrahydrofurane (20 mililitrov), pričom do tohoto roztoku bol pridaný 4-metoxybenzoylchlorid (v množstve 387 μ l, čo je 2,77 mmolu), ďalej trietylamín (v množstve 385,5 μ l, čo je 2,77 mmolu) a 4-dimetylamínopyridin (17 miligramov, čo je 5 % molových). Takto získaná reakčná zmes bola potom premiešavaná pri teplote miestnosti po dobu cez noc a týmto spôsobom bola získaná nerozpustná zrazenina, ktorá bola oddelená filtráciou. Oddelený filtrát bol potom odparený za zníženého tlaku a zvyšková pevná látka bola potom znova rozpustená vo vriacom metanole, načo bol tento podiel sfiltrovaný za horúca za účelom odstránenia nerozpustného materiálu. Použitie rozpúšťadla bolo potom odstránené vo vákuu a pevný zvyšok bol spojený s predtým získanou zrazeninou. Rekryštalizáciou z vodného roztoku metanolu boli získané biele kryštálky požadovanej titulnej zlúčeniny.

Výťažok: 513,2 miligramov (62 %).

Teplota tavenia : 179 - 180 °C,

Analýza pre C₁₆H₁₆N₂O₄:

Vypočítané:	64,0 %C	5,33 %H	9,33%N
Nájdene:	64,26%C	5,31%H	9,17%N.

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: : 3425,54, 3341,54, 3277,84, 1699,24, 1632,12, 1251,11,

$\delta^1\text{H}(\text{d}_6 \text{-DMSO}, 200 \text{ MHz})$:

3,92 (3H, s, OMe), 3,94 (3H, s, OMe), 6,59 (2H, s, Ar-NH2),

6,68 - 6,75 (1H, t, Ar -5H),

7,13 - 7,17 (2H, dm J=8,8, Ph-3/3 H),

7,43 - 7,46 (1H, d, Ar-4H), 7,79 - 7,83 (1H, d, Ar-6H)

8,07 - 8,12 (2H, d, J=8,8, Ph-3,3 H),

9,7 (1H, br, s, -NHCO-).

δ^{C} (d₆ - DMSO):

51,98, 55,76, 110,62, 113,79, 114,67, 125,0, 126,84, 129,12, 130,14,
133,20, 147,36, 162,21, 165,74, 168,33,

m/z (EI) : 300 (M⁺), 135, 107, 77.

(h) Postup prípravy metylesteru kyseliny 2-fenylbenzimidazol-4-karboxylovej.

Podľa tohoto postupu bol použitý roztok metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-benzoylaminobenzoovej (v množstve 6,3 miligramov, čo je 0,023 mmolu) v ľadovej kyseline octovej (0,5 mililitrov), pričom tento roztok bol premiešavaný pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 15 minút.. Po ochladení bolo použité rozpúšťadlo odstránené za zníženého tlaku, čím bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

δ^{H} (d₆ -DMSO, 200 MHz):

4,09 (3H, s, OCH₃), 7,40 - 7,48 (1H, t, Ar-5H),

7,64 - 7,70 (3H, m, 2-Ph-3H a 3 - Ph4H),

7,93 - 7,97 (1H, d, Ar-4H), 8,06 - 8,10 (1H, d, Ar-6H),

8,93 - 8,41 (2H, d, 2-Ph-2/2 H),

12,4 - 12,5 (1H, br, s, Ar-NHCO).

P r í k l a d 2

Postup prípravy benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1066).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy benzimidazol-4-karboxylovej kyseliny (zlúčenina NU1067).

Podľa tohoto postupu bola použitá zmes obsahujúca 2,3-diaminobenzoovú kyselinu (použitá 0,5 gramov, čo je 3,29 mmolu) a kyselinu mravenčiu (v množstve 405 μ l, čo je 9,87 mmolu) v kyseline chlorovodíkovej (4 M roztok, 10 mililitrov), pričom táto zmes bola zahrievaná pri teplote varu pod

spätným chladičom po dobu jednej hodiny. Takto vzniknutá zrazenina bola potom pri ochladzovaní roztoku oddelená, potom bol tento podiel opäť rozpustený vo vriacom metanole a získaný roztok bol odfarbený aktívnym uhlím.

Odparením rozpúšťadla bola získaná benzoxazol-4-karboxylová kyselina vo forme bieleho prášku.

Výťažok: 407,9 miligramov (77%).

Analýza pre $C_8H_6N_2O_2$:

Vypočítané: 46,28 % C 3,88 % H 13,49 %N

Nájdené: 46,11 % C 3,63 % H 13,27 %N.

1H (d_6 – DMSO, 200 MHz) :

7,7 -7,8 (1H, t, Ar-5H), 8,2 - 8,3 (2H, dd, Ar-4/6H),

9,65 (1H, s, imidazol-2H).

(b) Druhý stupeň – postup prípravy benzimidazol-4-karboxamidu (zlučenina NU1066).

Podľa tohoto postupu bola použitá suspenzia benzimidazol-4-karboxylovej kyseliny (v množstve 3,97,4 miligramov, čo je 2,45 mmolu) v thionylchloride (10 mililitrov), pričom táto suspenzia bola zahrievaná pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 3,5 hodiny a potom bol použitý thionylchlorid odstránený vákuovou destiláciou. Týmto spôsobom bola získaná zvyšková pevná látka, ktorá bola suspendovaná v suchom tetrahydrofurane (10 mililitrov) a potom bol tento podiel pridaný po kvapkách do koncentrovaného vodného roztoku amoniaku (50 mililitrov), čo bolo vykonané za miešania v intervale 30 minút. Prebytkový podiel rozpúšťadla bol potom odstránený vo vákuu a takto získaný zvyšok bol rozpustený v minimálnom objeme vody a potom bol tento roztok extrahovaný etylacetátom (dva podiely po 20 mililitroch). Pevná látka bola získaná po odparení spojených organických vrstiev, pričom táto pevná látka bola potom rozpustená v kyseline chlorovodíkovej (0,1 M roztok, použité 10 mililitrov), načo bola nerozpustená zrazenina odstránená odfiltrovaním. Hodnota pH získaného vodného roztoku filtrátu bola potom

opatrným spôsobom upravená na 9 po malých postupných krokoch, pri ktorých bola upravovaná hodnota pH o jednu jednotku, pričom v každom stupni bola vykonaná extrakcia etylacetátom (10 mililitrov). Jednotlivé extrakty boli spojené a tento spojený podiel bol usušený (síranom horečnatým) a použité rozpúšťadlo bolo potom odparené. Rekryštalizáciou z etylacetátu bol získaný požadovaný produkt, benzimidazol-4-karboxamid.

Výtťažok : 50 miligramov (13 %).

Analýza pre $C_9H_7N_3O$:

Vypočítané: 59,63 %C 4,35 % H 26,09 % N

Nájdené : 59,95 % C 3,90 % H 24,59 % N.

uv/nm : 210, 270, 291,

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3321,84, 3150,16 1747,73, 1680,21,

$\delta^1\text{H}$ (d_6 -DMSO, 200 MHz) :

7,4 (1H, t, Ar-5H), 7,8 - 8,0 (3H, dd, Ar-4/6H),

8,5 (1H, br s, midazol-2H), 9,4 (1H, br s, CONH),

13,1 (1H, br s, CONH).

m/z (EI) : 161 (M^+), 141, 116, 99.

P r í k l a d 3

Postup prípravy 2-metylbenzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1064).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy 2-metylbenzimidazol-4-karboxylovej kyseliny.

Podľa tohoto vyhotovenia bola kyselina octová (použitá 0,23 mililitrov) pridaná do roztoku 2,3-diaminobenzoovej kyseliny (200 miligramov, čo je 1,32 mmolu) v kyseline chlorovodíkovej (4 M roztok, použitá 0,2 mililitrov) a takto pripravená reakčná zmes bola potom zahrievaná pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 1 hodiny. Použitá rozpúšťadlá boli potom odparené a zvyškový podiel pevnej látky bol opäť rozpustený vo vriacom metanole (5 mililitrov) a tento roztok bol odfarbený aktívnym uhlím. Po odstránení rozpúšťadla bola získaná 2-metylbenzimidazol-4-karboxylová kyselina vo forme amorfnej bielej pevnej látky.

Výtťažok : 167,5 miligramov (72 %).

$\delta^1\text{H}$ (d_6 -DMSO):

2,9 (3H, s, imidazol-2CH₃), 7,6 - 7,8 (1H, t, Ar-5H),

8,1 (2H, dd, Ar-4/6H),

m/z (EI) : 176 (M⁺), 158, 130.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy 2-metylbenzimidazol- 4-karboxamidu (zlúčenina NU1064).

Podľa tohoto postupu bola použitá suspenzia 2-metylbenzimidazol-4-karboxylovej kyseliny (v množstve 500 miligramov, čo je 2,84 mmolu) v thionylchloride (10 mililitrov), pričom táto suspenzia bola zahrievaná pri teplote varu pod spätným chladičom po dobu 2 hodín a potom bol použitý thionylchlorid odstránený vákuovou destiláciou. Týmto spôsobom bola získaná zbytková pevná látka, ktorá bola opäť suspendovaná v suchom tetrahydrofurane a potom bol tento podiel pridaný po kvapkách do koncentrovaného vodného roztoku amoniaku (50 mililitrov), čo bolo vykonané za miešania v intervale 30 minút. Použitie rozpúšťadla bolo potom odstránené vo vákuu a takto získaný zvyšok bol znovu rozpustený v minimálnom objeme horúcej vody a potom bol tento roztok extrahovaný etylacetátom (dva podiely po 30 mililitroch). Odparením použitého rozpúšťadla bola získaná hnedá pevná látka, ktorá bola potom rekryštalizovaná z etylacetátu , a týmto spôsobom bola pripravená požadovaná titulná zlúčenina vo forme bielej pevnej látky.

Výtťažok: 70,1 miligramov (14 %).

Analýza pre C₉H₉N₃O:

Vypočítané: 61,71 % C 5,14 % H 24,00 % N

Nájdené: 61,47 % C 4,96 % H 23,39 % N.

uv/nm : 209, 270,

$\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3296,77, 3071,07, 1913,63, 1859,62, 1805,60,

$\delta^1\text{H}$ (d_6 -DMSO, 200 MHz):

2,68 (3H, s, imidazole-2CH₃), 7,30 - 7,38 (1H, t, Ar-5H),

7,72 - 7,46 (1H, d, Ar-4H), 7,86 - 7,90 (1H, d, Ar-6H),

7,72 - 7,90 (1H, br s, imidazol-NH), 9,4 (1H, br s, CONH),
 12,8 (1H, brs, CONH),
 m/z (EI) : 175 (M⁺), 158, 130.

P r í k l a d 4

Postup prípravy 2-fenylbenzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1070).

(a) Prvý stupeň – Postup prípravy 2-fenylbenzimidazol-4-karboxylovej kyseliny.

Podľa tohoto vyhotovenia bola použitá zmes obsahujúca 2,3-diaminobenzoovú kyselinu (v množstve 0,1 gramov, čo je 0,66 mmolu), kyselinu benzoovú (použitá 80,2 miligramov, čo je 0,66 mmolu) a kyselinu polyfosforečnú (približne 5 mililitrov), pričom táto reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote v rozmedzí od 150° do 160 °C po dobu 30 minút a potom po ochladení bol k tomuto produktu pridaný rozdrvený ľad (približne 10 gramov). Nerozpustný podiel bol odstránený z takto získaného tmavého roztoku odfiltrovaním, pričom filtrát bol extrahovaný etylacetátom (dva podiely po 20 mililitroch) za účelom odstránenia nezreagovanej kyseliny benzoovej. Vodný roztok bol potom opatrne neutralizovaný hydroxidom sodným (10 M roztok), načo bol tento podiel sfiltrovaný a filtrát bol opäť extrahovaný etylacetátom (použitá dva podiely po 30 mililitroch). Získané extrakty boli spojené a tento spojený podiel bol usušený (síranom horečnatým) a použité rozpúšťadlo bolo odparené. Chromatografickým spracovaním v kolóne naplnenej silikagélom, kde ako elučné činidlo boli použité zmesi dichlormetánu a metanolu v pomere 85 : 15 bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

Výťažok: 31,2 miligramov (20 %).

¹H (d₆-DMSO, 200 MHz):

7,4 (1H, t, Ar-5H), 7,62 (3H, brs, 3-Ph-4H a 3'-Ph-4H),
 7,91 (1H, d, Ar-6H), 7,97 (1H, d, Ar-4H), 8,39 (2H, d, Ph-2-H a Ph 2-H),
 m/z (EI): 238 (M⁺), 220, 192, 77.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy 2-fenylbenzimidazol-4-karboxamidu

(zlúčenina NU1070).

Podľa tohoto postupu bola kyselina 2-fenylbenzimidazol-4-karboxylová (použitá 50 miligramov, čo je 0,21 mmolu) rozpustená v suchom tetrahydrofurane (10 mililitrov), načo bol pridaný tionylchlorid (použitá 16,8 μ l, čo je 0,231 mmolu) a DMF (0,05 mililitrov). Takto získaná reakčná zmes bola potom premiešavaná pri teplote miestnosti po dobu 12 hodín, kedy sa vytvorila biela zrazenina, načo potom bola v ďalšom postupe takto získaná suspenzia pridaná po kvapkách do premiešavaného vodného roztoku amoniaku (10 mililitrov), čo bolo vykonané v intervale 10 minút. Takto získaná zmes bola potom premiešavaná po dobu ďalších 30 minút, načo bola zriedená vodou (20 mililitrov) a neutralizovaná kyselinou chlorovodíkovou (4 M roztok). Pri ochladzovaní tejto reakčnej zmesi sa vyzrážala biela pevná látka, ktorá bola potom oddelená filtráciou a týmto spôsobom bol získaný požadovaný 2-fenylbenzimidazol-4-karboxamid.

Výtťažok: 31 miligramov (62 %).

$\nu_{\text{max/cm}^{-1}}$: 3320, 3180, 1660, a 1600,

δ^{H} (d_6 -DMSO, 200 MHz):

7,45 (1H, t, Ar-5H), 7,72 (3H, d, 3-Ph-4H),

7,87 (1H, d, Ar-4H), 7,97 (1H, br s, CONH),

7,99 (2H, d, Ar-6H), 8,38 (2H, d, Ph-2-H a P-2-H),

9,5 (1H, br s, CONH),

m/z (EI): 237 (M^+), 220, 192, 165, 77.

P r í k l a d 5

Postup prípravy 2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1076).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy acetátovej soli metylesteru kyseliny 2-(4'-metoxyfenyl)

(b) benzimidazol-4 - karboxylovej.

Podľa tohoto postupu bol metylester kyseliny 2-amino-3-N-(4' - metoxybenzoyl) benzoovej (použitá 480 miligramov, čo je 1,6 mmolu) rozpustený v ľadovej kyseline octovej (použitá 15 mililitrov), načo bola táto reakčná zmes zahrievaná pri teplote v rozmedzí od 120° do 130 °C po dobu 30 minút. Použitá rozpúšťadla bolo potom odstránené a získaný pevný zvyšok bol potom rekryštalizovaný so zmesou etylacetátu a benzínu (40/60), čím bol získaný požadovaný titulný produkt vo forme bielej kryštalickej pevnej látky.

Výtťažok: 409 miligramov (75 %).

Teplota tavenia: 141 - 142 °C.

Analýza pre $C_{16}H_{14}N_2O_3 \cdot CH_3CO_2H$:

Vypočítané: 63,16 %C 5,26 %H 8,19 % N

Nájdená: 63,68 %C 4,79 %H 7,88 % N.

ν_{max}/cm^{-1} : 3375,33, 1718,46, 1696,80, 1282,81,
1257,81, 1257,34,

δ^1H (d_6 -DMSO, 200 MHz):

2,02 (3H, s, CH_3CO_2H), 3,97 (3H, s, OMe), 4,09 (3H, s, OMe),

7,21 - 7,25 (2H, d, $J=8,6$, Ph-3/3m H),

7,39 - 7,46 (1H, t, Ar-5H), 7,90 - 7,93 (1H, d, Ar-4H),

8,00 - 8,04 (1H, d, Ar-6H),

8,36 - 8,40 (2H, d, $J=8,6$, Ph-2,2 H), 12,1 (1H, s, Imz-H),

12,3 - 12,4 (1H, br, s, CH_3CO_2H),

$\delta^{13}C$ (d_6 -DMSO):

21,35, 52,37, 55,64 , 114,41, 121,68, 122,35, 124,34, 129,56,
153,63,

161,27, 166,13, 172,37,

m/z (EI) 282 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 250, 222, 77, 60, 43, 32.

(c) Druhý stupeň – Postup prípravy 2-(4'- metoxyfenyl) – benzimidazol- - karboxamidu (zlúčenina AU1076).

Pri prevádzaní tohoto postupu bola acetátová soľ metylesteru kyseliny 2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxylovej rozpustená v prebytkovom

podiel kvapalného amoniaku a potom bola táto zmes zahrievaná pri teplote 100° C v utesnenej tlakovej nádobe pri tlaku 4,0 Mpa po dobu cez noc. Amoniak bol potom ponechaný odpariť a zbytkový podiel pevnej látky bol zhromaždený a premytý ľadovo chladnou vodou (použité tri podiely po 5 mililitroch). Rekryštalizáciou z vodného roztoku metanolu bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

Výtazok: 226,4 miligramov (80%).

Teplota tavenia: 261 - 263 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{13}N_3O_2 \cdot 0,2 CH_3OH$:

Vypočítané: 66,70% C 5,08 % H 15,35% N

Nájdené: 66,07% C 4,23 % H 15,29% N

ν_{max}/cm^{-1} : 3321,47, 3140,72, 1656,23, 1608,25, 1421,43, 1242,55,

δ^H (D_6 -DMSO, 200MHz):

3,96 (3H, s, OMe), 7,23 - 7,27 (2H, d, $J=8,6$ Ph-3/3H),

7,37 - 7,45 (1H, t, Ar-5H), 7,78 - 7,82 (1H, d, Ar-4H),

7,87 (1H, brs, Imz-H), 7,93 - 7,96 (1H, d, Ar-6H),

8,27 - 8,31 (2h, d, $J=8,6$, Ph-2,2 H),

9,4 - 9,5 (1H, br s, -CONH), 13,3 - 13,4 (1H, br, s, -CONH),

m/z (EI): 267 (M^+), 249, 222, 206, 77, 32.

P r í k l a d 6

Postup prípravy 2-(4' - trifluormetyl) benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1077).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny

2-amino-3-N-(4'- trifluormetylbenzoyl)aminobenzoovej.

Podľa tohoto vyhotovenia bol použitý roztok metylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (v množstve 300 miligramov, čo je 1,807 mmolu), ku ktorému bol pridaný 4-trifluormetylbenzoylchlorid (použité 268,4 μ l, čo je 1,807

mmolu), trietylamin (použitá 251,4 μ l, čo je 1,807 mmolu) a 4-dimetylaminopyridin (použitá 11 miligramov, čo je 5 molových percent), pričom takto pripravená reakčná zmes bola potom premiešavaná pri teplote miestnosti po dobu cez noc. Použitá reakčná rozpúšťadla bola potom odstránená za zníženého tlaku a takto získaná pevná látka bola potom premytá etylacetátom. Rekryštalizáciou zo zmesi metanolu a vody, ktorá bola vykonaná dvakrát bola získaná požadovaná titulná zlúčenina vo forme bielej pevnej látky.

Výtťažok: 83,6 miligramov (14%).

Teplota tavenia: 180 - 181 °C,

Analýza pre $C_{16}H_{13}F_3N_2O_3$,

Vypočítané: 56,80%C 3,85 %H 8,28% N

Nájdene: 56,75%C 3,50 %H 8,28% N.

uv/nm 222,

δ H (d_6 -DMSO, 200 MHz):

3,93 (3H, s, OMe), 6,70 -6,76 (3H, m, Ar-5H, Ar-NH₂),

7,46 - 7,49 (1H, d, Ar-4H), 7,81 - 7,85 (1H, d, Ar-6H),

7,99 - 8,03 (2H, d), 8,29 - 8,33 (2H, d),

10,5 (1H, s, -NHCO-),

m/z (EI): 338 (M⁺), 321, 289, 145, 32.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy acetátovej

soli metylesteru kyseliny 2-(4'-trifluormetylphenyl)-benzimidazol-4-karboxylovej.

Podľa tohoto postupu bol použitý metylester kyseliny 2-amino-3-A- (4' - trifluormetylbenzoyl) aminobenzoovej (v množstve 75,7 miligramov, čo je 0,224 mmolu), ktorý bol rozpustený v ľadovej kyseline octovej (5 mililitrov) a táto reakčná zmes bola potom premiešavaná pri teplote 125 °C po dobu 0,5 hodiny. Použitá rozpúšťadla bola potom odparená a zostatková pevná látka bola premytá benzínom (40/60), a týmto hore popísaným spôsobom bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

Výtťažok: 59,6 miligramov (70%).

Teplota tavenia: 138 - 140°C,

Analýza pre $C_{16}H_{11}F_3N_2O_2CH_3CO_2H$:

Vypočítané: 56,84 %C 3,94 %H 7,37% N

Nájdené: 56,78 %C 3,98 %H 7,36% N

uv/nm 206, 319,

1H (d_6 -DMSO, 200MHz):

2,01 (3H, s, CH_3CO_2H), 7,44 - 7,52 (1H, t, Ar-5H),

7,97 - 8,14m (4H, m), 8,65 - 8,66 (2H, d),

12,1 (br s, imidazol-NH), 12,7 - 12,8 (1H, br s, CH_3CO_2H),

m(z (EI): 320 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 301, 288, 260, 145, 60, 43.

(c) Tretí stupeň - postup prípravy 2-(4'-trifluormetyl)-benzimidazol-4-karboxamid (zlúčenina NU1077).

Podľa tohoto postupu bola acetátová soľ metylesteru kyseliny 3-(4' - trifluormetylphenyl) benzimidazol-4-karbosylovej rozpustená v prebytkovom množstve kvapalného amoniaku a táto reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote 100 °C v utesnenej tlakovej nádobe pri tlaku 4,0 Mpa podobu 12 hodín. Amoniak bol potom ponechaný odpariť a pevný zvyšok bol premytý ľadovo chladnou vodou (použitie tri podiely po 5 mililitroch). Rekryštalizáciou tohoto produktu zo zmesi metanolu a vody bol získaný požadovaný produkt vo forme jemne bielych ihličiek.

Výtťažok: 19,1 gramov (48%).

Teplota tavenia: 301 - 305 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{10}F_3N_3O \cdot CH_3OH$:

Vypočítané: 56,97 % C 4,18 % H 12,46 % N

Nájdené: 56,45 % C 3,50 % H 12,41 % N

1H / D_6 -DMSO, 200 MHz):

7,45 (1H, t, Ar-5H), 7,888 - 7,92 (1H, d, Ar-4H),

7,99 (1H, br s, imidazole-NH), 8,03 (1H, d, Ar-6H),

8,06 - 8,10 (2H, d, J=88,1), 8,55 - 8,59 (2H, d, J=8,1),

9,3 - 9,4 (1H, br s, -CONH), 13,7 - 13,8 (1H, br s, -CONH),
m/z (EI) : 288 (M⁺-NH₃), 260, 69.

P r í k l a d 7

Postup prípravy 2-(4' -hydroxyfenyl) -l-H-benzimidazol -4-karboxamidu (zlúčenia NU1085).

Podľa tohoto postupu bol pod atmosférou argónu I M roztok bromidu boritého v dichlormetanu (použitie 3,8 mililitrov, čo je 3,79 mmolu) prevedený do nádoby obsahujúci 2-(4' -metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid (zlúčenina NU1076 z príkladu 5) (použitie 202,4 miligramov, čo je 0,758 mmolu). Takto získaný výsledný roztok bol potom zahrievaný pri teplote varu pod spätným chladičom podobu 24 hodín za použitia vzduchového chladiča. Použitie rozpúšťadla bolo úplne odstránené destiláciou až do sucha. Získaný pevný zvyšok bol potom spracovaný 10% -ným roztokom hydroxidu sodného (10 mililitrov), načo nasledoval prídavok koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej k neutralizovaniu tejto reakčnej zmesi (pH 7). Vzniknutá biela zrazenina bola potom oddelená filtráciou a rozpustená v etylacetáte (10 mililitrov). Organické rozpúšťadla bolo premyté vodou (dva podiely po 3 mililitroch), načo bol tento podiel usušený síranom horečnatým a takto získaný produkt bol potom zbavený rozpúšťadla odparením za zníženého tlaku.

Výtťažok: 109,5 miligramov (57%).

Teplota tavenia: 266 - 267 °C,

Analýza pre C₁₄H₁₁N₃O₂ . 0,75 MeOH:

Vypočítané: 67,04 %C 4,69 %H 15,76 %N

Nájdené: 63,27 %C 4,37% H 15,67 %N

ν_{max}/cm⁻¹ : 3424,01 3384,16, 3309,20 3249,55 3155,62, 1642,35,
1618,02, 1594,50, 1577,74

^δH 7,03 – 7,07 (2H, d, J=8,5), 7,34 - 7,42 (1H, t),

7,75 - 7,79 (1H, d), 7,85 (1H, br s), 7,90 - 7,94 (1H, d),

8,15 - 8,19 (2H, d, J=8,5), 9,4 - 9,6 (1H, br s),

10,0 - 10,4 (1H, br s), 13,0 - 13,4 (1H, br s),

m/z (EI) : 235 (M⁺), 236, 208, 93.

P r í k l a d 8

Postup prípravy 2-(4' - metoxyfenyl)-l-metylbenzimidazol- 4-karboxamidu (zlúčenina NU1090).

Podľa tohoto postupu boli 2-(4' - metoxyfenyl)- benzimidazol-4-karboxamid (zlúčenina NU1076 z príkladu 5) (použitie 105,3 miligramov, čo je 0,394 mmolu) a práškovitý hydroxid draselný (použitie 22 miligramov, čo je 0,394 mmolu) suspendované v acetóne (4 mililitre) a táto reakčná zmes bola premiešavaná tak dlho, dokiaľ všetok podiel pevných látok nebol rozpustený. Potom bol pridaný metyljodid (použitie 24,6 μ l, čo je 0,394 mmolu) a táto reakčná zmes bola zahrievaná pri teplote miestnosti po dobu cez noc. Použitie rozpúšťadlo bolo potom odstránené za zníženého tlaku a bytková biela pevná látka bola prečistená v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v priemere 95 : 5, čím bola pripravená požadovaná titulná zlúčenina vo forme jemných bielych kryštálikov.

Výťažok: 33,2 miligramov 30%

Teplota tavenia: 289 - 292 °C,

Analýza pre C₁₆H₁₅N₃O₂:

Vypočítané: 68,33 % C 5,34 % H 14,95 %N

Nájdene: 68,62 % C 5,36 % H 14,67 %N

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3309,23, 3141,44, 1671,29, 1605,30, 1255,08.

δ^{H} : 3,95 (3H, s), 4,02 (3H, s), 7,22 - 7,27 (2H, d),

7,44 - 7,52 (1H, t), 7,86 - 8,00 (5H, m), 9,4 (1H, br s, NH),

m/z (EI) : 281 (M⁺), 264, 250.

P r í k l a d 9

Postup prípravy 2-(4' -metoxyfenyl) -l-benzoylbenzimidazol- 4 -karboxamidu (zlúčenina NU1101).

Pri vykonávaní tohoto postupu bol použitý roztok obsahujúci 2-(4H -

metoxyfenyl) benzimidazol-4- karboxamid (zlúčenina NU1076 z príkladu 5) (použitie 75,1 miligramov, čo je 0,281 mmolu) a práškový hydroxid sodný (použitie 15,8 miligramov, čo je 0,281 mmolu) v acetóne (3 mililitre) a takto pripravený roztok bol premiešavaný tak dlho, dokiaľ sa nerozpustil všetok podiel pevných látok. Potom bol pridaný benzoylchlorid (v množstve 32,6 μ l, čo je 0,281 mmolu) a takto získaný roztok bol potom premiešavaný po dobu cez noc pri teplote miestnosti, pričom sa vytvorila biela zrazenina. Použité rozpúšťadlá boli odstránené za zníženého tlaku a biela pevná látka predstavujúca zvyšok bola prečistená v chromatografickej kolóne za použitia dichlormetanu a metanolu v priemere 95 : 5. Takto získaná výsledná pevná látka bola potom rekryštalizovaná so zmesou benzínu (40/60) a etylacetátu, čím bol získaný čistý produkt vo forme lesklých bielych hranoliek.

Výtťažok: 15,6 miligramov (15%).

Teplota tavenia: 207 - 210 °C,

Analýza pre $C_{22}H_{17}N_3O_3 \cdot 0,25 CH_3OH$:

Vypočítané: 70,45% C 4,47 %H 11,08%N

Nájdené: 70,45% C 4,60 %H 10,99%N

ν_{max}/cm^{-1} : 3445,99 3318,55, 2922,99, 1689,79, 1666,36,

δ^H : 3,86 (3H, s, OCH₃), 7,02 - 7,06 (12H, d),

7,50 - 7,65 (4H, m), 7,72 - 7,82 (3H, m),

7,88 - 7,92 (2H, d), 8,08 (1H, s, CONH),

8,10 - 8,14 (1H, d), 9,1 - 9,2 (1H, br s, CONH),

m/z (EI): 371 (M^+), 105.

Ďalšie príklady

Pri vykonávaní ďalších postupov podľa nasledujúcich príkladov, čo platí rovnako pre postupy podľa predchádzajúcich príkladov, boli použité určité štandardné postupy. Tieto postupy zahŕňujú:

(I) reakciu metylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej s chloridmi arylových kyselín (štandardný postup A),

(2) tvorbu benzimidazolového kruhu cyklizácie katalyzovanou kyselinou (štandardný postup B),

(3) tvorba amidovej zlúčeniny reakciou s kvapalným amoniakom (štandardný postup C).

Detailné vyhotovenia použité pri praktickej aplikácii týchto štandardných postupov sú popísané v ďalšom popise.

Štandardný postup A:

Podľa tohoto vyhotovenia bol pripravený roztok obsahujúci metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (1 ekvivalent), suchý trietylamin (1 až 1,5 ekvivalentu) a dimetylaminopyridin (DMAP – 5 molových %) v polovičnom požadovanom objeme suchého tetrahydrofuranu (THF), ktorý bol chladený v kúpeli ľadu a soli. Požadovaný chlorid kyseliny (1 ekvivalent) bol rozpustený v zbývajúcom podiele suchého tetrahydrofuranu (THF) a tento podiel bol pridaný k ochladenému roztoku za miešania behom intervalu 30 minút. Táto reakcia bola potom pomaly ponechaná ohriať na teplotu miestnosti a potom bola premiešavaná po dobu cez noc. Použitie rozpúšťadlo bolo sfiltrované a tým bola oddelená zrazenina, ktorá bola suspendovaná v etylacetáte, potom bol tento produkt dvakrát premytý vodou, potom nasledovalo premytie nasýteným roztokom soľanky a usušenie síranom horečnatým. Organická vrstva bola potom pridaná k reakčnému filtrátu a použité rozpúšťadlo bolo odstránené za zníženého tlaku. Pevný zostatok bol potom opäť rozpustený v etylacetáte, tento podiel bol potom premytý dvakrát vodou, potom nasledovalo premytie soľankou a usušenie produktu síranom horečnatým. Po odstránení použitých rozpúšťadiel za zníženého tlaku bol získaný zvyšok pevných látok, pričom tento produkt bol prečistený v chromatografickej kolóne a/ alebo rekryštalizovaný z vhodných rozpúšťadiel.

Štandardný postup B

Východisková látka bola rozpustená v ľadovej kyseline octovej a tento produkt bol ponorený do predom zahriateho olejového kúpeľa o teplote 120°C. Tento roztok bol potom zahrievaný vhodne dlhý časový interval a potom bol tento produkt ochladený na teplotu miestnosti. Kyselina octová bola potom odstránená za zníženého tlaku a pevný zvyšok bol prečistený v chromatografickej kolóne a/ alebo rekryštalizovaný vo vhodných rozpúšťadlách.

Štandardný postup C

Východisková látka bola rozpustená v prebytkovom množstve čerstvo skondenzovaného kvapalného amoniaku. Tento produkt bol potom zahrievaný pri teplote 80°C v utesnenej nádobe, kde bol generovaný tlak 4,0 Mpa, po dobu 24 hodín. Použitý amoniak bol potom odparený a získaný pevný zvyšok bol potom prečistený v chromatografickej kolóne a/ alebo rekryštalizovaný z vhodných rozpúšťadiel.

P r í k l a d 10

Postup prípravy 2-(4'-kyanofenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxamid (zlučenie NU1092).

(a) Prvý stupeň - postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(4'-kyanobenzoyl) aminobenzoovej.

Pri tomto postupe bolo použitý štandardný postup A, viď vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia boli metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (v množstve 300 miligramov, čo je 1,81 mmolu), triethylamin (použitá 251 μ l, čo je 1,81 mmolu) a DMAP (11 miligramov) rozpustené v THF (7,5 mililitrov) a táto reakčná zmes bola chladená. V ďalšom postupe bol k tejto reakčnej zmesi pridaný 4-kyanobenzoylchlorid (v množstve 299 miligramov, čo je 1,81 mmolu),

ktorý bol rozustený v THF (7,5 mililitrov). Takto získaný produkt bol prečistený v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 99 : 1, načo potom nasledovala rekryštalizácia z vriaceho metanolu. Týmto spôsobom bol získaný požadovaný produkt.

Výťažok: 196 miligramov (37%).

Teplota tavenia: 198 - 202 °C,

$\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3486,40, 3374,02, 3245,61, 2231,25, 1688,04, 1646,65

δ^{H} : 3,93 (3H, s, CO₂CH₃), 6,68 - 6,76 (1H, t),

6,72 (2H, br s, NH₂), 7,45 - 7,49 (1H, d),

7,81 - 7,86 (1H, d), 8,11 - 8,15 (2H, d, J=8,4),

8,25 - 8,29 (2H, d, J=8,4), 10,01 (1H, br s, NH),

m/z (EI): 295 (M⁺), 278, 263, 246, 130, 102.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2-(4'-kyanofenyl)-1H-benzimidazol-4-karboxylovej.

Pri tomto postupe bol použitý štandardný postup B, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol použitý metylester kyseliny 2-amino-3-A-(4'-kyanobenzoyl)-aminobenzoovej (v množstve 301 miligramov, čo je 1,02 mmolu) získaný postupom podľa prvého stupňa, pričom táto látka bola zahrievaná v ľadovej kyseline octovej (10 mililitrov). Takto získaný produkt bol potom rekryštalizovaný dvakrát za použitia zmesi benzínu (40/60) etylacetátu. Týmto spôsobom bol pripravený požadovaný produkt.

Výťažok: 203 miligramov (72 %).

Teplota tavenia: 195 - 198 °C

$\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3447,66, 2228,84, 1691,90, 1288,11,

δ^{H} : 4,09 (3H, s, CO₂CH₃), 7,44 - 7,53 (1H, t),

7,97 - 8,01 (1H, d), 8,10 - 8,13 (2H, d, J=8,4),

8,58 - 8,62 (2H, d, J=8,4), 12,8 (1H, br s),

m/z (EI): 277 (M⁺), 245, 217.

(c) Tretí stupeň – postup prípravy 2-(4'-kyanofenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1092)

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup C, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol metylester kyseliny 2-(4'-kyanofenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxylovej (použitie 169,5 miligramov, čo je 0,612 mmolu) spracovaný amoniakom pod tlakom. Získaný surový produkt bol rekryštalizovaný z vriaceho metanolu a týmto spôsobom bola pripravená požadovaná titulná zlúčenina vo forme čistých bielych kryštálikov.

Výťažok: 116,5 miligramov (73%).

Teplota tavenia: 310 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{10}N_4O \cdot 0,2 MeOH$:

Vypočítané : 67,95 %C 4,05% H 20,85%N

Nájdene: 67,81 %C 3,89% H 20,87%N

ν_{max}/cm^{-1} : 3332,27, 3274,86, 3177,98, 2230,85, 1658,54, 1608,10

δH : 7,45 - 7,49 (1H, t), 7,87 - 7,91 (1H, d),

7,91 (1H, br s), 7,98 - 8,02 (1H, d),

8,13 - 8,17 (2H, d, J=8,3), 8,50 - 8,54 (2H, d, J=8,3)

9,2 - 9,4 (1H, br s), 13,6 - 13,8 (1H, br s),

m/z (EI) : 262 (M^+), 245, 217, 102.

P r í k l a d 11

Postup prípravy 2-(4'-nitrofenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1091).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-(4' - nitrobenzoyl) aminobenzoovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup A, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia boli metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (v množstve 300 miligramov, čo je 1,807 mmolu), suchý trietylamin (použitie 276,6 μ l, čo je

1,988 mmolu) a DMAP (II miligramov) rozpustené v suchom THF (12 mililitrov). K tejto reakčnej zmesi pridaný 4- nitrobenzoylchlorid (v množstve 335,2 miligramov, čo je 1,807 mmolu), ktorý bol rozpustený v suchom THF (12 mililitrov). Takto získaný produkt bol prečistený v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 99 : 1, na čo potom nasledovala rekryštalizácia z metanolu. Týmto spôsobom bol získaný požadovaný produkt v čistej forme.

Teplota tavenia: 196 - 197 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{13}N_3O_5$:

Vypočítané: 57,14% C 4,12 % H 13,33 %N

Nájdené: 57,08% C 3,78 % H 13,25 %N

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3382,31, 3293,01, 3226,56, 1702,05, 1657,83, 1525,37

δ^{H} : 3,94 (3H, s, CO_2CH_3), 6,70 - 6,78 (1H, t),

6,66 (2H, br s, NH_2), 7,48 - 7,51 (1H, d),

7,83 - 7,87 (1H, d), 8,33 - 8,38 (2H, d, $J=8,8$),

8,48 - 8,51 (2H, d, $J=8,8$), 10,15 (1H, br s, NH),

m/z (EI): 315 (M^+), 297, 265, 165.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2- (4' -nitrofenyl) -1H-benzimidazol-4-karboxylovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup B, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol použitý metylester kyseliny 2-amino-3-A- (4' - nitrobenzoyl) – aminobenzoovej (v množstve 340,2 miligramov, čo je 1,08 mmolu), pričom táto látka bola zahrievaná v ľadovej kyseline octovej (10 mililitrov) po dobu 15 minút. Takto získaný produkt bol po rekryštalizácii z metanolu získaný v čistom stave.

Výtťažok: 208 miligramov (65%).

Teplota tavenia: 208 - 210 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{11}N_3O_4$:

Vypočítané: 60,61 %C 3,70% H 17,17% N

Nájdené: 60,69% C 3,57% H 13,96% N

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3433,70, 1720,14, 1601,84, 1513,07,
 δ_{H} : 4,21 (3H, s, CO_2CH_3), 7,57 - 7,65 (1H, t),
 8,10 - 8,12 (1H, d), 8,23 - 8,27 (1H, d),
 8,60 - 8,64 (2H, d, $J=8,8$), 8,78 - 8,82 (2H, d, $J=8,8$),
 13,04 (1H, br s, NH),
 m/z (EI) : 297 (M^+), 265.

(c) Tretí stupeň- postup prípravy 2-(4' -nitrofenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1091).

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup C, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol metylester kyseliny 2-(4' -nitrofenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxylovej rozpustený v kvapalnom amoniaku a zahrievaný za konštantného objemu v tlakovej nádobe. Získaný surový produkt bol potom prečistený v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bol použitý dichlormetán a metanol v pomere 99 : 1, pričom bola vykonaná rekryštalizácia z metanolu a týmto spôsobom bola pripravená požadovaná titulná zlúčenina.

Teplota tavenia: > 310°C,

δ_{H} : 7,48 - 7,56 (1H, t), 7,90 - 7,94 (1H, d),
 8,00 (1H, s, NH), 8,00 - 8,04 (1H, d),
 8,52 - 8,56 (2H, d, $J=8,8$), 8,60 - 8,64 (2H, d, $J=8,8$),
 9,3 - 9,4 (1H, br s, NH), 13,8 - 14,0 (1H, br s, NH).

Príklad 12

Postup prípravy 2-(3' -trifluormetylfenyl) -l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina Nu1093).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(4'-nitrobenzoyl) aminobenzoovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup A, vid' vyššie, pričom

podľa tohoto vyhotovenia boli metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (v množstve 200 miligramov, čo je 1,205 mmolu), suchý trietylamin (použitý 704 μ l, čo je 5,06 mmolu) a dimetylaminopyridin (DMAP, 7,3 miligramov) rozpustené v suchom THF (7,5 mililitrov). K tejto reakčnej zmesi pridaný 3-trifluormetylbenzoylchlorid (v množstve 183 μ l, čo je 1,205 mmolu), ktorý bol rozpustený v suchom THF (7,5 mililitrov). Takto získaný produkt bol prečistený v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 99 : 1, v ktorom boli odstránené znečisťujúce zložky, a polárnejší produkt bol eluovaný zmesou dichlormetanu a metanolu v pomere 97 : 3. Potom nasledovala rekryštalizácia z metanolu, čím bol získaný požadovaný produkt vo forme bielej pevnej látky.

Výtazok : 160,4 miligramov (26%).

Teplota tavenia: 157 - 159 °C

Analýza pre : $C_{16}H_{13}F_3N_2O_3$

Vypočítané: 56,80%C 3,85 %H 8,28%N

Nájdené : 57,14%C 3,57 % H 8,10%N

$\nu_{max}(cm^{-1})$: 3368,48, 3283,82, 2953,87, 1705,98, 1650,77, 1250,02

δ^H 3,93 (3H, s, CO_2CH_3), 6,69 - 6,77 (1H, t),

6,73 (2H, s, NH_2), 7,45 - 7,49 (1H, d),

7,82 - 7,92 (H, m), 8,06 - 8,10 (1H, d),

8,40 - 8,44 (1H, d), 8,48 (1H, s, 2 -H), 10,1 (1H, s, NH),

m/z (EI) : 338 (M^+), 320, 288, 260, 173, 145.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy acetátovej soli metylesteru kyseliny 2-(3'-trifluormetylfenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxylovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup B, viď vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol roztok metylesteru kyseliny 2-amino-3-A- (3'-trifluormetyl-benzoyl) aminobenzoovej v ľadovej kyseline octovej (6 mililitrov) zahrievaný po dobu 15 minút. Po odstránení rozpúšťadla za zníženého tlaku nasledovalo usušenie takto získaného produktu za vysokého vákua, pričom týmto spôsobom bol získaný požadovaný produkt vo forme čistej bielej látky.

Výtěžok: 154,2 miligramov (96%).

Teplota tavenia: 105 - 107°C,

Analýza pre $C_{16}H_{11}F_3N_2O_2 \cdot CH_3CO_2H$:

Vypočítané: 56,84%C 3,95 %H 7,37%N

Nájdene: 56,93%C 3,78 %H 7,32%N

$\nu_{max}^{(cm^{-1})}$: 3438,30, 3339,14, 2959,13, 1707,99, 1328,24, 1313,53

δ^H : 2,01 (3H, s, CH_3CO_2H), 4,09 (3H, s, CO_2CH_3),

7,44 - 7,51 (1H, t), 7,79 - 8,13 (4H, m),

8,71 - 8,75 (1H,d), 8,82 (1H, s), 11,8 - 12,2 (1H, br s),

12,8 - 13,0 (1H, br s),

m/z (EI) : 320 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 288, 260.

(a) Tretí stupeň – postup prípravy 2-(3' -trifluormetyl-fenyl)-l-H-benzimidazol –4-karboxamidu (zlúčenina NU1093).

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup C, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bola použitá acetátová soľ metylesteru kyseliny 2-(3' -trifluormetyl-fenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxylovej (v množstve 134,8 miligramov, čo je 0,358 mmolu), pričom táto zlúčenina bola spracovávaná prebytkovým množstvom kvapalného amoniaku v utesnenej nádobe. Takto získaný produkt bol potom prečistený rekryštalizáciou z metanolu, a týmto postupom bol získaný požadovaný produkt vo forme šedivo bielych kryštálikov.

Výtěžok: 78 miligramov (72%).

Teplota tavenia: 268 - 270 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{10}F_3N_3O \cdot 0,6 CH_3OH$:

Vypočítané : 57,74%C 3,82%H 12,95%N

Nájdene: 57,68%C 3,82%H 12,96%N

$\nu_{max}^{(cm^{-1})}$: 3488,83, 3348,86, 3176,45, 1667,66, 1600 93, 1329,63

δ^H : 7,44 - 7,52 (1H, t), 7,88 - 8,04 (5H, m),

8,66 - 8,70 (1H, d), 8,70 (1H, s, 2 H), 9,3 (1H, br s, NH),

13,6 (1H, br s, NH),

m/z (EI) : 305 (M^+), 288, 260, 145.

Príklad 13

Postup prípravy 2-(4'-metoxyfenyl) -l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1098).

(a) Prvý stupeň-postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(4'-metoxybenzoyl) aminobenzoovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup A, viď vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia boli metylester kyseliny 2,3-diaminobenzoovej (v množstve 670,3 miligramov, čo je 4,038 mmolu), suchý trietylamín (použitý 842,6 μ l, čo je 6,057 mmolu) a DMAP (25 miligramov) rozpustený v suchom THF (20 mililitrov). K tejto reakčnej zmesi pridaný roztok 3-metoxybenzoylchloridu (v množstve 567 μ l, čo je 6,038 mmolu) s suchom THF (12 mililitrov). Takto získaný pevný zvyšok bol prečistený v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 99 : 1, načo potom bol takto získaný produkt dvakrát rekryštalizovaný so zmesou benzínu (40/60) a etylacetátu. Týmto spôsobom bol získaný požadovaný produkt.

Výťažok: 282,6 miligramov (23%).

Teplota tavenia: 124 - 125 °C,

Analýza pre $C_{16}H_{16}N_2O_4$

Vypočítané: 64,0%C 5,33%H 9,33%N

Nájdene: 63,9%C 5,11%H 9,24%N

$\nu_{max}^{(cm^{-1})}$: 3386,19, 3292,38, 1697,97, 1586,87, 1520,79, 1250,27,

δ^H : 3,92 (3H, s), 3,93 (3H, s), 6,61 (2H, s, NH₂),

6,68 - 6,76 (1H, t), 7,22 - 7,27 (1H, d),

7,44 - 7,47 (1H, d), 7,49 -b 7,57 (1H, t),

7,66 (1H, s, 2 -H), 7,67 - 7,71 (1H, d),

7,79 - 7,84 (1H, d), 9,8 (1H, s, NH),

m/z (EI) : 300 (M^+), 283, 135, 107.

(b) Druhý stupeň – postup prípravy acetátovej soli metylesteru kyseliny 2-(3'-metoxyfenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxylovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup I, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol zahrievaný roztok metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(3'-metoxybenzoyl)-aminobenzoovej (použitá 356,9 miligramov, čo je 1,19 mmolu) v ľadovej kyseline octovej (12 mililitrov). Po odstránení rozpúšťadla za zníženého tlaku nasledovala rekryštalizácia so zmesou benzínu (40/60) a etylesteru kyseliny octovej a týmto spôsobom bol získaný požadovaný produkt vo forme čistej látky:

Výt'azok: 235,6 miligramov (58%).

Teplota tavenia: 93 - 94 °C,

Analýza pre $C_{16}H_{14}N_2O_3 \cdot CH_3CO_2H$:

Vypočítané: 63,16%C 5,26%H 8,18%N

Nájdené: 62,66%C 5,13%H 8,06%N

ν max (cm^{-1}): 3453,23 3375,10, 1706,75, 1257,40,

δ H: 1,99 (3H, s, CH_3CO_2H), 3,96 (3H, s), 4,06 (3H, s),

7,15 - 7,21 (1H, d), 7,38 - 7,46 (1H, t),

7,51 - 7,59 (1H, t), 7,91 - 8,00 (3H, m),

8,04 - 8,08 (1H, d), 12,0 (1H, s), 12,5 (1H, s),

m/z (EI): 282 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 250.

(c) Tretí stupeň – postup prípravy 2-(3'-metoxyfenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1098).

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup C, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol použitý roztok metylesteru kyseliny 2-(3'-metoxyfenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxylovej (v množstve 203 miligramov, čo je 0,596 mmolu) v kvapalnom amoniaku a tento roztok bol zahrievaný za konštantného objemu. Takto získaný pevný zvyšok bol potom rekryštalizovaný z metanolu, čím bol získaný požadovaný čistý produkt.

Výtazok: 73,5 miligramov (46%).

Teplota tavenia : 223 - 225 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{13}N_3O_2$:

Vypočítané: 67,42%C 4,87%H 15,73%N

Nájdene: 67,52%C 4,91%H 15,62%N

$\nu_{\max}^{(cm^{-1})}$: 3408,59, 3388,94, 3168,65, 1662,05, 1625,86, 1603,39,

δ^H : 3,99 (3H, s, OCH₃), 7,22 - 7,27 (1H, d),

7,43 - 7,51 (1H, t), 7,58 - 7,66 (1H, t),

7,85 - 8,01 (5H, m), 9,4 - 9,5 (1H, br s), 13,5 (1H, br s),

m/z (EI) : 267 (M⁺), 250.

Prík!ad 14

Postup prípravy 2-(2' - trifluormetylfenyl) -l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina) NU1104).

- (a) Prvý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amino-3-A-(2'-trifluormetylbenzoyl) aminobenzoovej.

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup A, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol roztok metylesteru kyseliny 2,3 -diaminobenzoovej (v množstve 564 miligramov, čo je 3,4 mmolu) v THF (20 mililitrov) spoločne s trietylaminom (použitie 709 μ l, čo je 5,1 mmolu) a dimetylaminopyridinom (DMAP, 21 miligramov) premiešavaný a k tejto reakčnej zmesi bol pridaný roztok 2-trifluormetylbenzoylchloridu v THF (20 mililitrov). Výsledný olejový zvyšok bol potom absorbovaný na oxide kremičitom a potom bol tento podiel podrobený spracovaniu chromatografickej kolóny, kde ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetanu a metanolu v pomere 99 : 1. Takto získaný produkt bol rekryštalizovaný zo zmesou benzínu (40/60) a etylacetátu, a týmto postupom bola pripravená titulná zlúčenina v čistom stave.

Výtazok. 303 miligramov (26%).

Teplota tavenia: 163 – 166 °C,

Analýza pre $C_{16}H_{13}F_3N_2O_3$:

Vypočítané : 56,80%C 3,85%H 8,28%N
 Nájdene: 56,91%C 3,75%H 8,29%N
 $\nu_{\max}^{(\text{cm}^{-1})}$: 3329,85, 3243,90 2955,52, 1696,66, 1663,58, 1312,69,
 δ^{H} : 3,94 (3H, s, CO₂CH₃), 6,58 (2H, s, NH₂),
 6,74 - 6,82 (1H, t), 7,57 - 7,62 (1H, d),
 7,79 - 8,03 (5H, m), 10,0 (1H, s, NH),
 m/z (EI): 338(M⁺), 321, 289, 173, 145.

(b) Druhý a tretí stupeň – postup prípravy 2-(2-trifluormetyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1104).

Podľa tohoto postupu bol získaný produkt z prvého stupňa podrobený postupne spracovávaníu štandardnými postupmi B a C, pričom bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

Príklad 15

Postup prípravy 2-(4'-aminofenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxamidu (zlúčenina NU1103).

(a) Prvý stupeň – postup prípravy metylesteru kyseliny 2-amin-3-A-(4' -aminobenzoyl) aminobenzoovej.

Podľa tohoto postupu bol metylester kyseliny 2-amino-3-A-(4' -nitrobenzoyl)aminobenzoovej (táto látka bola získaná postupom podľa prvého stupňa v príklade 11) suspendovaný v metanole (40 mililitrov) a k tejto suspenzii bola pridaná zmes 10 %-ného paládia ako katalyzátora na aktívnom uhlí (približne 50 miligramov) v metanole (10 mililitrov), pričom tento prídavok bol vykonaný za miešania a pod atmosférou argónu. Takto získaný roztok bol potom hydrogenovaný za atmosférického tlaku po dobu 2 hodín. Po sfiltrovaní cez vrstvu celitu (chránená značka), pri ktorom bol odstránený katalyzátor, bol získaný produkt, z ktorého bolo odstránené použité rozpúšťadlo za zníženého tlaku a týmto spôsobom bola pripravená biela pevná látka, ktorá bola usušená

za vysokého vákuu.

Výtťažok: 204,1 miligramov (92%).

Teplota tavenia: 197 - 200 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{15}N_3O_3$:

Vypočítané: 63,16%C 5,26%H 14,73%N

Nájdené: 62,95%C 5,30%H 14,39%N

$\nu_{\max}^{(cm^{-1})}$: 3472,55, 3374,96, 3348,97, 3283,31, 1613,91,

δ^H : 3,94 (3H, s, CO_2CH_3), 5,87 (2H, s, NH_2),

6,54 (2H, s, NH_2), 6,68 - 3,73 (2H, d),

6,73 - 6,76 (1H, t), 7,42 - 7,47 (1H, d),

7,78 - 7,82 (2H, d), 9,4 (1H, s, NH),

m/z (EI) : 285 (M^+), 267, 235, 207, 120, 92

(b) Druhý stupeň – postup prípravy acetátovej soli metylesteru kyseliny 2-(4'-aminofenyl)-1-H-benzimidazol-4-karboxyllovej .

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup B, vid' vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bol metylester kyseliny 2-amino-3-A-(4'-minobenzoyl) aminobenzoovej (použitá 186,5 miligramov, čo je 0,654 mmolu) spracovaný horúcim roztokom ľadovej kyseliny octovej (8 mililitrov) po dobu 30 minút, pričom po rekryštalizácii zo zmesi benzínu (40/60) a etylesteru kyseliny octovej bola získaná požadovaná titulná zlúčenina.

Výtťažok : 113,4 miligramov (91%).

Teplota tavenia: 162 - 164 °C,

Analýza pre $C_{15}H_{13}N_3O_2 \cdot CH_3CO_2H$:

Vypočítané: 62,39%C 5,20%H 12,84%N

Nájdené: 62,60%C 5,04%H 12,73%N

$\nu_{\max}^{(cm^{-1})}$: 3450,66, 3369,25, 3254,20, 1692,41, 1607,56, 1253,80,

δ^H : 2,02 (3H, s, CH_3CO_2H), 4,08 (3H, s, CO_2CH_3),

5,81 (2H, s, NH_2), 6,75 - 6,80 (2H, d, J=8,6),

7,32 - 7,40 (1H, t), 7,83 - 7,86 (1H, d),

7,93 - 7,97 (1H, d), 8,08 - 8,13 (2H, d, J=8,6),

11,9 (1H, s), 12,1 (1H, br s),

m/z (EI) : 267 (M^+ -CH₃CO₂H), 235, 207, 92, 60.

(c) Tretí stupeň – postup prípravy 2-(4'-aminofenyl) –1H-benzimidazol-4-karboxamidu (NU1103).

Pri tejto príprave bol použitý štandardný postup C, viď vyššie, pričom podľa tohoto vyhotovenia bola acetátová soľ metylesteru kyseliny l(4'-aminofenyl)-l-H-benzimidazol-4-karboxylovej (v množstve 113 miligramov, čo je 0,34 mmolu) spracovávaná kvapalným amoniakom za tlaku a po dobu 24 hodín. Požadovaná čistá titulná zlúčenina bola izolovaná od surového materiálu spracovaním v chromatografickej kolóne, pričom ako elučné činidlo bola použitá zmes dichlormetán a metanolu v pomere 90 : 10.

Výtťažok : 21,4 miligramov (25%).

Teplota tavenia: 237 - 240 °C,

¹H: 5,90 2 (H, s, NH₂), 6,79 - 6,83 (2H, d, J=8,3),

7,31 - 7,39 (1H, t), 7,71 - 7,75 (1H, d), 7,84 (1H, s, NH),

7,88 - 7,92 (1H, d), 8,00 8,04 (2H, d, J=8,3),

9,5 - 9,6 (1H, br s, NH), 13,0 (1H, br s, NH).

Test na PARP inhibičnú účinnosť

Zlúčeniny podľa predmetného vynálezu, najmä zlúčeniny uvedené v predchádzajúcich príkladoch, boli testované *in vitro* na účinnosť týkajúcu sa PARP inhibície, pričom pri týchto testoch boli použité nasledujúce látky a postupy.

V princípe bol použitý PARP test založený na aktivácii endogénnej PARP (ako bude ešte ďalej podrobne vysvetlené) v bunkách obsahujúcich exogénny [³²P] –NAD⁺ zavedený do týchto buniek suspendovaním týchto buniek v roztoku (³²P)-NAD⁺, v ktorých bolo dosiahnuté permeability vo fáze počiatočného predbežného spracovania. Takto vzniknutú poly (ADP-ribózu), ktorá bola potom syntetizovaná uvedeným enzýmom, je možno vyvrázať

trichloroocetovou kyselinou (TCA) a potom zmerať množstvá inkorporovanej rádioaktívne značnej ^{32}p , napríklad za použitia scintilačného merača, čím sa zistí miera účinnosti PARP za určitých podmienok použitých v tomto experimente. Opakovaním tohoto experimentu, pri ktorom sa použijú rovnaké podmienky, vykonávaným v prítomnosti každej testovanej zlúčeniny je potom možné zníženie enzýmovej aktivity, čo predstavuje inhibičný účinok tejto testovanej zlúčeniny, odhadnúť zo zníženia $[\text{}^{32}\text{p}]$, ak k nemu dôjde, vo vyžrážanej poly(ADP-ribóze) účinkom TCA.

Výsledky tohoto testu je možno vyjadriť ako percentuálnu inhibíciu alebo zníženie aktivity pre jednu alebo viac rozdielnych koncentrácií každej testovanej zlúčeniny, alebo je možno tento výsledok vyjadriť ako koncentráciu testovanej zlúčeniny, ktorá zníži enzýmovú aktivitu o 50%, to znamená ako IC_{50} hodnotu. To teda znamená, že je možné týmto spôsobom získať rad porovnateľných hodnôt inhibičnej účinnosti pre celú škálu rozdielnych testovaných zlúčenín.

Prakticky sa tento postup vykonával tak, že boli ako zdroj PARP enzýmu použité bunky leukémie L1210 odobraté od myši, ktoré boli predtým spracované na permeabilné bunky na exogénne $[\text{}^{32}\text{p}]\text{NAD}$ vystavením pôsobenia hypotonického pufru a šoku chladom. Vo výhodnom vyhotovení tejto metódy, u ktorej bolo zistené, že je možné dosiahnuť presné a reprodukovateľné výsledky, bolo definované množstvo malého syntetického oligonukleotídu, najmä je možné uviesť jednotlivý reťazec oligonukleotídu, ktorý má palindromickú sekvenciu CGGAATTCCG, zavedenú do bunečnej suspenzie pre aktivovanie PARP enzýmu. Táto oligonukleotidová sekvencia sa na sebe stočí dozadu a vytvorí dvojreťazovú molekulu s jediným tupým koncom, pričom táto štruktúra predstavuje efektívny substrát pre aktivovanie PARP. Jeho vlastnosti ako účinného aktivátora uvedeného enzýmu bolo potvrdené na vyhotovených testoch.

Zvolený experimentálny protokol, podľa ktorého bol syntetický

oligonukleotid, ktorý bol popísaný vyššie, zavedený do špecifického aktivátora PARP, rozlišoval medzi PARP a ďalšími mono-ADP-ribosyltransferázami v bunkách. Z vyššie uvedeného vyplýva, že zavedenie týchto syntetických oligonukleotidov spôsobovalo päťnásobnú až šesťnásobnú stimuláciu inkorporovanej rádioaktívne značnej časti, a túto skutočnosť je možné prisúdiť iba PARP aktivite.

Ďalšie detaily vykonávania tohoto testu sú uvedené v ďalšom popise.

Použité materiály.

Medzi použité materiály patria nasledujúce látky:

DTT (dithiothreitol):

Táto látka bola pripravená ako 100 mM roztok (15,4 miligramov/liter) (použitý ako antioxidantné činidlo), pričom tento roztok bol rozdelený na 500 μ l alikvotne podiely a tieto podiely boli uchovávané pri teplote -20°C .

Hypotonický pufor:

9 mM Hepes	(214 mg/100 ml)
4,5 % Dextran	(4,5 g/100 ml)
4,5 mM MgCl ₂	(92 mg/100 ml).

Vyššie uvedené zložky boli rozpustené asi v 80 mililitroch destilovanej vody, načo bola hodnota pH upravená na 7,8 (za pomoci NaOH/HCl), pričom objem roztoku bol potom upravený na 100 mililitrov destilovanou vodou a tento roztok bol potom uchovávaný v chladničke. DTT bol pridávaný na koncentráciu 5 mM tesne pred samotným použitím (50 μ l/mililiter).

Izotonický pufor:

40 mM Hepes	(1,9 g/200 ml)
130 mM KCl	(1,94 g/200 ml)

4 % Dextran	(8 g/200 ml)
2 mM EGTA	(152 mg/200 ml)
2,3 mM MgCl ₂	(94 mg/200 ml)
225 mM sacharóza	(15,39 g/200 ml).

Vyššie uvedené zložky boli rozpustené v približne 150 mililitroch destilovanej vody, hodnota pH bola upravená na 7,8 (za pomoci NaOH/HCl), takto získaný roztok bol upravený na objem 200 mililitrov prídavkom destilovanej vody a uchovaný v chladničke. DTT bol pridávaný na koncentráciu 21,5 mM tesne pred samotným použitím (25 µl/mililiter).

NAD:

NAD bol uchovávaný ako pevná látka vo forme predom zvážených alikvotných podielov pri teplote -20°C. Z týchto podielov boli pripravené roztoky o koncentrácii približne 6 mM (4 až 4,5 miligramov/mililiter) tesne pred vykonaním testu, pričom molarita bola stanovená zmeraním optickej hustoty (O.D.) pri 260 nm. Zásobné roztoky boli potom zriedené vodou tak, aby bola dosiahnutá koncentrácia 600 µM, načo bolo pridané malé množstvo ³²P značeného NAD (to znamená 2 až 5 µl/mililiter).

Oligonukleotid:

Použitý bol oligonukleotid, ktorý mal palindromickú sekvenciu CGGAATTCCG, ktorý bol syntetizovaný bežným spôsobom metódami bežne známymi z doterajšieho stavu techniky, načo bol tento oligonukleotid vákuovo vysušený a uchovávaný vo forme pelet v mrazničke. Pred použitím bola táto látka upravená na koncentráciu 200 µg/mililiter v 10 mM Tris/HCl, o hodnote pH 7,8, s tým, že každá peleta bola úplne rozpustená v 50 mililitroch pufru. Takto získaný roztok bol potom zahrievaný na teplotu 60°C na vodnom kúpeli po dobu 15 minút, načo bol tento roztok ponechaný pomaly ochladiť, aby bolo zaistené správne opätovné spevnenie. Po pridaní 9,5 mililitrov pufru bola zistená koncentrácia zmeraním optickej hustoty zriedeného vzorku pri 260 nm.

Zásobný roztok bol potom zriedený na koncentráciu 200µg/mililitrov a tento roztok bol potom uchovávaný vo forme 500 µl alikvotných podielov v mrazničke, pripravený na okamžité použitie.

TCA:

Roztoky TCA (trichloroctové kyseliny) boli pripravené v dvoch koncentráciách, a síce 10% TCA + 10% difosforečnan sodný, a 1% TCA + 1 % difosforečnan sodný.

Bunky:

Bunky L1210, ktoré boli použité ako zdroj PARP enzýmu, boli uchovávané v nasledujúcej forme: suspenzia kultúry v RPMI médiu + 10 % fetálneho bovinného séra + glutamin a antibiotika (penicilín a streptomycín). Rovnako boli pridané HEPES a hydrogénuhličitan sodný, pričom tieto bunky boli naočkované 100 mililitrami až 200 mililitrami média, takže bola dosiahnutá koncentrácia približne 8×10^5 /mililiter v okamžiku vykonávania testu.

Použitá metóda:

Testované zlúčeniny boli obvyklým spôsobom pripravené ako koncentrované roztoky v DMSO (dimetylsulfoxid). Rozpustnosť týchto zlúčenín bola zistená tak, že bol podiel DMSO roztoku pridaný k podielu izotonického pufru v takých požadovaných konečných podieloch, ktoré boli použité k vykonaniu testu, a po určitom intervale bol tento roztok preskúmaný pod mikroskopom na zistenie známkov tvorby kryštálikov.

Požadované množstvo buniek, zistené vyhodnotením na hemocytometri, bolo podrobené odstredeniu (pri 1500 otáčkach za minútu v odstredivke „Európa“, model 24M, pričom odstredovanie bolo vykonávané po dobu 5 minút), načo bol supernatant odstránený a získané pelety boli potom opäť suspendované v 20 mililitroch slaného roztoku pufrovaného fosfátom prostého Ca^{2+} a Mg^{2+} iónov (Dulbecova modifikácia A, používaná skratka Dul A), čo bolo vykonané pri teplote 4°C, načo bolo vykonané opätovné

odstreďovanie pri 1500 otáčkach za minútu pri teplote 4°C. Potom bol opäť odstránený supernatant, bunky boli znovu suspendované o koncentrácii 3×10^7 buniek/mililiter v ľadovo chladnom hypotonickom pufré a potom boli ponechané po dobu 30 minút na ľade. Potom bolo pridaných deväť objemov ľadovo chladného izotonického pufru, pričom tieto bunky, ktoré boli teraz v stave, keď boli permeabilné na exogénne NAD^+ , boli potom použité v intervale ďalšej hodiny na vykonanie vlastného testu. Permeabilizácia týchto buniek bola v tejto fáze zistená pridaním zásobných alikvotných podielov buniek do rovnakého objemu tryptánovej modrej, ponechaním v klude po dobu 5 minút a vyhodnotením na hemocytometri. Bunky, ktoré boli spracované tak, že boli permeabilné, zachycovali tryptánovú modrú a javili sa ako sfarbené.

Test bol potom vykonaný tak, že boli použité bežné súpravy plastických trubíc o objeme 15 mililitrov s kónickým dnom, ktoré boli uložené v kúpeli s pretrepávanou vodou o teplote 26 °C, čo je optimálna teplota pre tento enzým. V obvyklom vyhotovení tohoto testu bol použitý oligonukleotidový roztok o koncentrácii 5 μg /mililiter a roztoku obsahujúceho testovanú zlúčeninu v DMSO o koncentrácii 2%, a tento test bol vykonaný štyrikrát, pričom pri vykonávaní tohoto testu bolo do každej testovacej trubice pridaného 5 μl oligonukleotidového roztoku, 50 μl roztoku obsahujúceho 600 μM NAD^+ [^{32}p] – NAD , 8 μl roztoku obsahujúceho testovanú zlúčeninu a DMSO a 37 μl vody. Pred zahájením experimentu bol tento „koktail“ predbežne zahrievaný po dobu 7 minút pri teplote 26°C, a rovnako tak to bolo vykonané s bunkovou suspenziou. Reakcia bola potom naštartovaná prídavkom 300 μl bunečnej suspenzie. Táto reakcia bola potom zastavená prídavkom 2 mililitrov ľadovo chladného 10% TCA + 10% roztoku difosforečnanu sodného.

Okrem toho čo už bolo uvedené, bolo obvykle použitých šesť testovacích trubíc ako porovnávacie pokusy (slepé testy), pričom tieto testovacie trubice obsahovali rovnaké zložky ako bolo uvedené vyššie, ovšem pred pridaním bunečnej suspenzie, bol pridaný roztok TCA k zamedzeniu priebehu akejkoľvek reakcie. Týmto spôsobom bolo vykonané korigovanie na

všetky nešpecifické väzby označeného materiálu na použitý filter.

Po pridaní bunečnej suspenzie v určitých časových intervaloch do každej z testovacích trubíc bol do každej testovacej trubice pridaný roztok obsahujúci 10 % TCA + 10% difosforečnanu sodného o teplote 4°C, čo bolo vykonané presne 5 minút po prídavku bunečnej suspenzie do tejto testovacej trubice. V ďalšom postupe, po ponechaní týchto trubíc na ľade po dobu minimálne jednej hodiny, boli obsahy jednotlivých trubíc sfiltrované za pomoci oddelených filtračných náleviek za použitia odsávacej filtračnej aparatúry a GF/C filtračných prvkov (hrubá strana smerom nahor) zvlhčených 10 % TCA. Po sfiltrovaní obsahu každej trubice a opláchnutí filtrov, čo bolo vykonané niekoľkokrát roztokom 1% TCA + 1% difosforečnanu sodného, boli tieto filtre opatrným spôsobom odstránené a usušené a potom boli umiestnené do jednotlivých scintilačných skúmaviek. Okrem toho boli použité štyri ďalšie scintilačné skúmavky, ktoré boli použité ako referenčné štandardy a tieto skúmavky obsahovali 10µl roztoku 600 µM NAD⁺ [³²p]-NAD, pričom do každej skúmavky bolo pridané 10 mililitrov scintilačného činidla. Vyhodnocovanie bolo potom prevádzané po dobu 2 minút na β-počítači k zisteniu prítomného ³²p, a týmto spôsobom bolo stanovené množstvo prítomné poly (ADP-ribózy) a aktivita PARP enzýmu.

Výsledky in vitro PARP inhibičných testov.

Okrem vykonania PARP enzýmového testu, pri ktorom boli použité zhora uvedené štandardné metódy, a testovaná bola celá rada zlúčenín pripravených podľa predmetného vynálezu, boli rovnako vykonané porovnávacie testy, pri ktorých bola vyššie uvedená štandardná metóda použitá na určité benzamidové zlúčeniny, konkrétne benzamid, 3-hydroxybenzamid a 3-metoxibenamid, o ktorých je známe, že prejavujú určitý PARP inhibičný účinok. V nasledujúcej tabuľke, ktorá je uvedená na konci popisnej časti, je v tabuľkovej forme uvedený prehľad niektorých príkladných zlúčenín, ktoré spadajú do rozsahu predmetného vynálezu a/ alebo predstavujú všeobecne

známe zlúčeniny, ktoré boli testované zhora popísanou metódou, a rovnako sú tu uvedené výsledky PARP inhibičných testov získaných pri vykonávaní jedného alebo viac iných testovacích experimentov, pričom tieto výsledky sú vyjadrené buď ako percentuálne inhibície pri koncentrácii 10 μM alebo, čo je obvyklejšie, ako hodnoty IC_{50} , pre testované zlúčeniny pri použití vyššie popísanej testovacej metódy.

Pri posudzovaní dosiahnutých výsledkov je možné považovať známe PARP inhibítory, to znamená benzamid, 3-aminobenzamid a 3-metoxybenzamid, ako referenčné zlúčeniny. I keď sa dosiahnuté výsledky nejako líšia, všeobecne je možné uviesť, že zlúčeniny podľa predmetného vynálezu, ktoré boli testované, vykazovali relatívne vysoký stupeň inhibičnej účinnosti. Hlavne sú v tomto smere benzimidazolkarboxamidy, ktoré sú označené referenčnými značkami NU1064, NU1066, NU1086, a hlavne zlúčeniny označené NU1070, NU1076, NU1077, NU1085, NU1090, NU1091, NU1092, NU1093 a NU1098, pričom z týchto zlúčenín vykazovali zlúčeniny pod označením NU1091 a NU1092 výnimočne dobré výsledky pokiaľ sa týka inhibičnej účinnosti.

Ďalšie štúdie na biologickú aktivitu.

Podľa týchto metód boli opäť použité kultúry bunecných línií leukémie L1210 odobraté od myší, pričom boli vykonané experimenty na inhibícii rastu za účelom zistenia cytostatických účinkov zlúčenín podľa predmetného vynálezu a okrem toho boli vykonané testy na klonogénne prežívanie k zisteniu cytotoxicity, najmä vo vzťahu na použitie zlúčenín podľa predmetného vynálezu v spojení s cytotoxickými činidlami poškodzujúcimi DNA, ako sú napríklad cytotoxické protinádorové liečivá alebo gama ožarovanie. Poškodzovanie DNA a účinok PARP inhibítorov na proces tvorenia rozrušeného DNA reťazca a jeho opravy bol rovnako zisťovaný pomocou testu na poruchu DNA reťazca a monitorovanie alkalickej elúcie, pričom boli použité metódy všeobecne známých a publikovaných.

Pri teste na inhibovanie rastu boli v obvyklom vyhotovení L1210 bunky naočkované v koncentrácii 1×10^4 /mililiter do 24 jímkových multiplat, pričom tento test bol uskutočnený v trojakom vyhotovení, načo boli po 24 hodinách pridané zlúčeniny alebo testované liečiva vo zvolených kombináciách a koncentráciách. V tomto časovom okamžiku bola jedna zostava vzorov (zdvojený pokus) vyhodnotená pomocou Coulterovho počítacza (N_0) a po 48 hodinách boli vyhodnotené zbývajúce vzorky (N_1). Týmto spôsobom mohla byť odhadnutá percentuálna (%) inhibícia rastu v prípade vzorov ošetrovaných liečivou látkou. V prípade experimentov s kombináciami látok, kedy bola skúmaná možnosť synergických účinkov na rast buniek alebo klonogenicita, bola ako kontrolná hodnota braná pevná koncentrácia cytotoxického vzorku liečiva, to znamená temozolomidu (TM).

Príklady testov na cytotoxicitu in vitro.

Podľa jedného z príkladných vyhotovení testu na cytotoxicitu *in vitro* bola použitá zlúčenina NU1064 (čo je 2-metylbenzimidazol-4-karoxamid), pričom podľa toho postupu boli myši leukemickej bunky L1210 postupne inkubované zvyšujúcu sa koncentráciu vyššie uvedenej zlúčeniny NU1064 v prítomnosti alebo v neprítomnosti $100\mu\text{M}$ metylačného činidla, temozolomidu, v konečnej koncentrácii DMSO 1%, pričom tento postup bol prevádzaný v intervale 24 hodín pri teplote 36°C . Tieto bunky boli potom peletované, načo boli opätovne suspendované v čerstvom médiu, potom boli spočítané a naočkované k utvoreniu kolónii v 0,15% agaróze v médiu neobsahujúcom liečivú látku. Po jednom týždni boli kolónie životaschopných buniek označené MTT (1 mililiter 0,5 mg/mililiter) a sčítané. Účinnosť na platni v prípade kontrolných vzorov (89%) a temozolomidu samotného (32%) bola normalizovaná na 100% prežívajúcich buniek a účinnosť a platni v prípade buniek ošetrovaných NU1064 bola vyjadrená ako percento týchto hodnôt.

V prípade použitia samotnej zlúčeniny NU1064 nastáva určité mierne

zníženie prežitia buniek (relatívna účinnosť na platni pri koncentrácii 100 μ M a 200 μ M zlúčeniny NU1064 = 72%, respektíve 54%), ovšem značného zvýšenia temozolomidovej cytotoxicity so zvyšujúcimi sa koncentráciami zlúčeniny NU1064 (relatívna účinnosť na platni pri koncentrácii 100 μ M a 200 μ M zlúčeniny NU1064 = 28%, respektíve 2%) naznačuje na určité podporovanie temozolomidovej cytotoxicity súvisiacej so zvyšujúcou sa koncentráciou zlúčeniny NU1064. Tieto výsledky sú ilustrované na priloženom obr. I.

Pri iných testoch na klonogénne prežívanie boli obvyklým spôsobom bunky L1210 vystavené pôsobeniu rôznych koncentrácií TM + pevné koncentrácie PARP inhibítora po stanovený časový interval 16 hodín, pričom predtým boli spočítané a naočkované formácie kolónii v 0,12 až 0,15 % agaróze v médiu neobsahujúcom liečivo. Po 7 až 10 dňoch boli kolónie označené 0,5 mg/ml MTT a spočítané vizuálne na mriežkovom boxe. Týmto spôsobom bolo možné znázorniť krivky na prežívanie a stanoviť hodnotu DEF₁₀, pričom táto hodnota DEF₁₀ je definovaná ako pomer koncentrácie TM, pri ktorej je dosiahnuté zníženie prežitia na 10%, delené koncentráciou TM, pri ktorej je dosiahnuté zníženie prežitia na 10 % v prítomnosti stanovenej koncentrácie PARP inhibítora.

Pri ďalšom teste na klonogénne prežitie je možné k poškodeniu buniek použiť ožarovanie gama paprškami. V obvyklom vyhoptovení tohoto testu sa bunky L1210 (3 mililitre, 4 x 10³ /mililiter v plastických nádobkách) ožiaria pri teplote 4°C rôznymi dávkami gama žiarenia v prítomnosti alebo v neprítomnosti zlúčeniny, ktorá je testovaná, a konečnej koncentrácii 2% DMSO. Tieto bunky sa potom inkubujú pri teplote 37°C po dobu 2 hodín za kontinuálnej prítomnosti alebo neprítomnosti PARP inhibítora, načo sa naočkujú za účelom tvorby kolónii.

Oprava potenciálneho lethálneho poškodenia (PLD) nastáva v prípade, keď sú bunky udržiavané v stacionárnej fáze po iniciovaní PLD, načo sa ponechá prebehnúť bunečné delenie. Pri ďalšom typickom experimente sa

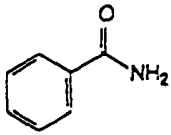
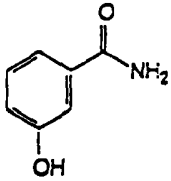
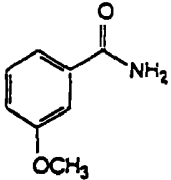
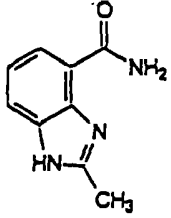
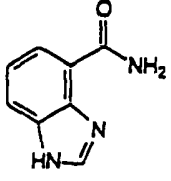
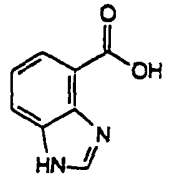
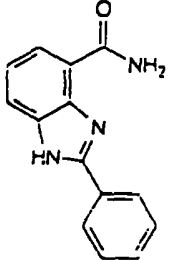
testovanie potenciálnych PARP inhibítorov, sa bunky L1210 a PLD spôsobeným gama žiarením ponechajú opraviť v prítomnosti alebo neprítomnosti testovanej zlúčeniny nasledujúcim spôsobom: L1210 bunky sa udržiavajú v kultivačnom prostredí pokiaľ sa nedosiahne stacionárna fáza ($>10^6$ buniek/mililiter). Potom sa prevedie zriedenie na $1,5 \times 10^5$ /mililiter v kondicionovanom médiu z kultúry zo stacionárnej fázy za účelom zabránenia bunecného delenia. Vzorky buniek o objeme 2 mililitrov v dvojacom vyhotovení v plastických nádobkách boli potom uchovávané na ľade, tesne pred a okamžite po ožiarení vykonanom gama paprškami „8 Gray“. Potom sa pridá 1 mililiter koncovej koncentrácie testovanej zlúčeniny (3x) v kondicionovanom médiu zo stacionárnej kultúry tak, aby sa dosiahli vhodné koncové koncentrácie (to znamená 10^6 buniek /mililiter 1% DMSO + testované zlúčeniny) a potom sa tieto bunky inkubujú pri teplote 37°C po dobu 0, 2 a 4 hodiny, načo sa vykoná opätovné suspendovanie v médiu neobsahujúcom liečivo a naočkovanie za účelom tvorby kolónii. Vhodnú kontrolu pre stanovenie relatívneho prežitia buniek môžu poskytnúť neožiarené kultúry stacionárnej fázy inkubované pri teplote 37°C po dobu 0, 2 alebo 4 hodiny obsahujúce 1% DMSO + rovnaké množstvo testovanej zlúčeniny. V neprítomnosti PARP inhibítora sa prežívanie buniek obvykle zvyšuje s pokračujúcim časom. Napríklad je možné uviesť, že v prípade jedného radu vykonávaných experimentov, v prípade, keď bolo vykonané naočkovanie bezprostredne po ožiarení (bez opravy) prežilo iba asi 0,2 % buniek, ovšem po 4 hodinách opravnej periódy sa toto množstvo zvýšilo na 0,7%. Účinné PARP inhibítory blokujú túto opravu a tým znižujú rýchlosť prežitia.

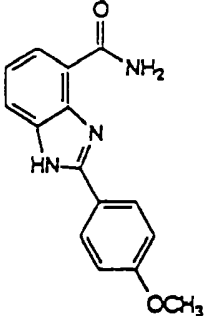
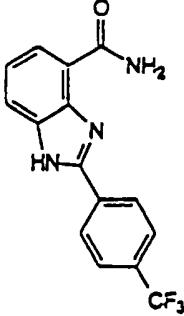
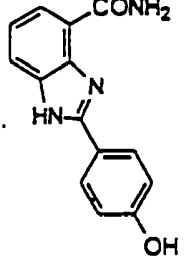
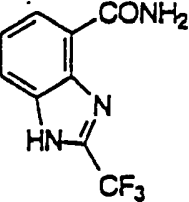
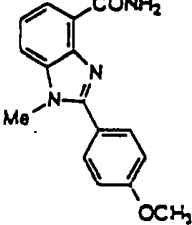
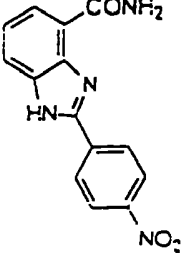
Pokiaľ sa týka testu na poškodenie DNA reťazca, čo bolo zmienené v prechádzajúcom texte, obvykle sa tento postup vykonáva tak, že sa vzorky buniek L1210 inkubujú po určitý časový interval, ako napríklad po dobu 1 hodiny, určitou stanovenou koncentráciou, ako napríklad $150\mu\text{M}$, temozolomidu a okrem kontrolných vzorov sa testovanie vykonáva v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií testovaných PARP inhibítorov. Čím je účinnejší inhibítor, tým sa dosiahne väčšia rýchlosť alkalického elúcie (merítko miery rozrušenia reťazca)

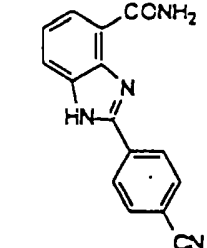
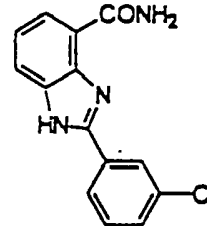
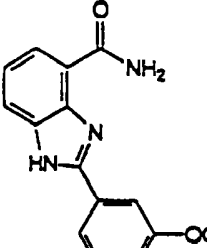
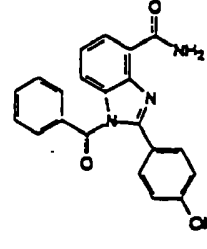
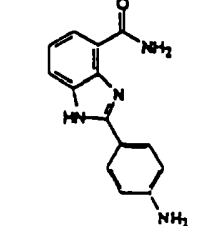
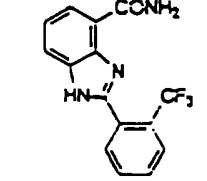
v porovnaní so samotným temozolomidom.

K uvedeným testom je možné všeobecne uviesť, že tieto vykonané štúdie plne podporujú predpoklad, že PARP inhibičné charakteristiky testovaných zlúčenín reflektujú schopnosť týchto zlúčenín potenciovať cytotoxicitu činidiel poškodzujúcich DNA, ako sú určité cytotoxické protinádorové liečiva a ožarovanie používané pri rádioterapii. Vzhľadom k vyššie uvedenému, ak sa vezmú do úvahy silné PARP inhibičné charakteristiky zlúčenín podľa predmetného vynálezu, je možné predpokladať, že sú tieto zlúčeniny najmä vhodné pre podávanie v spojení s týmito cytotoxickými liečivami alebo rádioterapii za účelom zosilnenia cytotoxického účinku týchto činidiel v priebehu liečby popisované vyššie.

V nasledujúcom je uvedená tabuľka s výsledkami farmakologických testov, ktoré boli bližšie popísané v hore uvedenom texte.

Pomocné označenie	Názov zlúčeniny	Štruktúra	% inhibície pri 10 μ M alebo hodnota IC_{50}
Ref	benzamid C_7H_7O Molekulová hmotnosť 121,1		$IC_{50} = 12.4 \pm 3.1 \mu M$
Ref	3-hydroxybenzamid $C_7H_7NO_2$ Molekulová hmotnosť 137		$IC_{50} = 8.0 \pm 3.5 \mu M$ (7)
Ref	3-methoxybenzamid $C_8H_9NO_2$ Molekulová hmotnosť 151		55
NU1064	2-methylbenzimidazol-4-karboxamid $C_9H_9N_3O$ Molekulová hmotnosť 175,38		$IC_{50} = 1.09 \pm 0.23 \mu M$ (3)
NU1066	benzimidazol-4-karboxamid $C_8H_7N_3O$ Molekulová hmotnosť 161,16		$IC_{50} = 1.26 \mu M$ $IC_{50} = 1.02 \mu M$
NU1067	benzimidazol-4-karboxylová kyselina $C_8H_6N_2O_2$ Molekulová hmotnosť 162,14		Inaktívny
NU1070	2-fenylbenzimidazol-4-karboxamid $C_{14}H_{11}N_3O$ Molekulová hmotnosť 237,26		$IC_{50} = 92 \text{ nM}$ $IC_{50} = 103 \text{ nM}$

<p>NU1076</p>	<p>2-(4-methoxyfenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₃H₁₃N₃O₂ Molekulová hmotnosť 267,28</p>		<p>IC₅₀ = 59 nM</p>
<p>NU1077</p>	<p>2-(4-trifluormethyl- fenyl)benzimidazol-4- karboxamid C₁₃H₁₀N₃OF₃ Molekulová hmotnosť 305,25</p>		<p>IC₅₀ = 75 nM</p>
<p>NU1085</p>	<p>2-(4-hydroxyfenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₄H₁₁N₃O₂ Molekulová hmotnosť 253,26</p>		<p>IC₅₀ = 77 nM</p>
<p>NU1086</p>	<p>2-trifluormethyl- benzimidazol-4- karboxamid C₁₆H₁₅N₃O₂ Molekulová hmotnosť 281,31</p>		<p>IC₅₀ = 1.6 μM</p>
<p>NU1090</p>	<p>2-(4-methoxyfenyl)-<i>N</i>- methylbenzimidazol-4- karboxamid C₁₆H₁₅N₃O₂ Molekulová hmotnosť 281,31</p>		<p>IC₅₀ = ~100 nM</p>
<p>NU1091</p>	<p>2-(4-nitrofenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₄H₁₀N₄O₃ Molekulová hmotnosť 282,25</p>		<p>IC₅₀ = 22 nM</p>

<p>NU1092</p> <p>2-(4-kyanofenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₄H₁₀N₄O Molekulová hmotnosť 262,27</p>		<p>IC₅₀ = 33 nM</p>
<p>NU1093</p> <p>2-(3-trifluormethyl- fenyl)benzimidazol-4- karboxamid C₁₅H₁₀N₄OF₃ Molekulová hmotnosť 305,25</p>		<p>IC₅₀ = 76 nM</p>
<p>NU1098</p> <p>2-(3-methoxyfenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₅H₁₃N₄O₂ Molekulová hmotnosť 267,28</p>		<p>IC₅₀ = 130 nM</p>
<p>NU1101</p> <p><i>N</i>-benzoyl-2-(4- methoxyfenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₂₂H₁₇N₃O₃ Molekulová hmotnosť 371,39</p>		<p>IC₅₀ = 0,27 μM</p>
<p>NU1103</p> <p>2-(4-aminofenyl)- benzimidazol-4- karboxamid C₁₄H₁₂N₄O Molekulová hmotnosť 252,27</p>		<p>IC₅₀ = 91 nM</p>
<p>NU1104</p> <p>2-(2-trifluormethyl- fenyl)benzimidazol-4- karboxamid C₁₅H₁₀N₄OF₃ Molekulová hmotnosť 305,25</p>		<p>Netestované</p>

NU1105	N-karboxybenzyl-2-(4-methoxyfenyl)-benzimidazol-4-karboxamid $C_{23}H_{19}N_3O_4$ Molekulová hmotnosť 401,42		1.9 μ M
--------	---	--	-------------

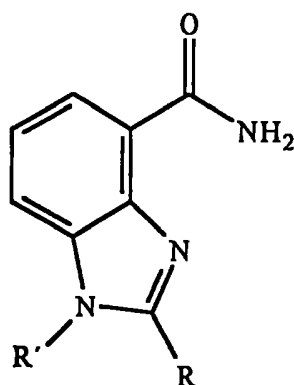
Z á v e r

Predmetný vynález je treba brať komplexne tak, že zahrňuje jednotlivé nové znaky alebo kombinácie týchto znakov, ktoré sú popisované v tomto texte, pričom hlavné aspekty predmetného vynálezu je možno principiálne, ovšem neobmedzujúcim spôsobom, v širších medziach vyjadriť nasledujúcim spôsobom:

- (i) Nové zlúčeniny všeobecného vzorca I, definovaného vyššie,
- (ii) Zlúčeniny všeobecného vzorca I so substituentami definovanými vo vyššie uvedenom texte (včítane foriem predstavujúcich prekurzory liečiv a solí týchto látok) použiteľné na terapiu alebo určené na použitie v lekárstve a na prípravu liečebných prípravkov, použiteľných napríklad ako PARP inhibítory na podávanie v kombinácii s cytotoxickými liečivami alebo s rádioterapiou na potenciovanie účinnosti týchto prostriedkov pri liečení nádorov,
- (iii) Postup prípravy nových zlúčenín všeobecného vzorca I, definovaných vo vyššie uvedenom texte, včítane všetkých nových medziproduktov vzniknutých pri vykonávaní tohoto postupu
- (iv) Farmaceutické prostriedky obsahujúce zlúčeninu všeobecného vzorca I, ktorá bola definovaná vyššie, spoločne s farmaceuticky prijateľnou nosičovou látkou, a
- (v) Postup prípravy farmaceutického prostriedku, definovaného ad (iv) vid' vyššie, to znamená metódami uvedenými vyššie.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie benzimidazolovej zlúčeniny všeobecného štruktúrneho vzorca I



(I)

alebo farmaceuticky prijateľnej soli tejto zlúčeniny a/alebo prekurzorovej formy odvodenej od tejto zlúčeniny na prípravu prostriedku na medicínsky alebo veterinárny účel na aplikovanie na terapiu na inhibovanie aktivity enzýmu poly-(ADP-ribózy) polymerázy alebo PARP, rovnako označované ako ADP-ribosyltransferázy alebo ADPRT, pričom toto inhibovanie enzýmu tvorí prvok terapeutického liečenia, pričom uvedená benzimidazolová zlúčenina predstavuje aktívne PARP enzýmové inhibičné činidlo a v tomto štruktúrnom vzorci I:

R je zvolený zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substituovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina) alebo aralkylovú skupinu (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina), a

R' je zvolený zo súboru zahrňujúceho vodík, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je

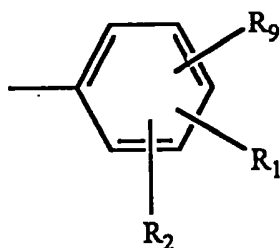
napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substituovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina) alebo aralkylovú skupinu (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina).

2. Použitie podľa nároku 1, benzimidazolovej zlúčeniny definovanej v tomto nároku, podľa ktorého alkylová skupina alebo každá prítomná alkylová skupina, buď ako taká alebo ako súčasť alkoxy skupiny alebo inej skupiny, obsahuje 1 až 6 atómov uhlíka.

3. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny podľa nároku 1 alebo 2, podľa ktorého:

R znamená prípadne substituovanú fenylovú skupinu, ktorá má štruktúrny všeobecný vzorec II:

I



(II)

v ktorom:

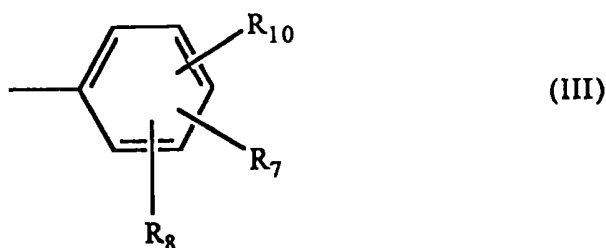
R_1 , R_2 a R_9 sú každý nezávisle na sebe vybrané zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxy skupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivo a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxy skupinu), ďalej NHCOR_3 (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu CONH_2), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

4. Použitie podľa nároku 1, benzimidazolovej zlúčeniny definovanej v nároku 3 podľa ktorého R_1 znamená skupinu inú než atóm vodíka, pričom táto

skupina je v polohe 4' , a R_2 a R_9 znamenajú každý atóm v' díka.

5. Použitie zlúčeniny podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, podľa ktorého:

R' znamená prípadne substituovanú fenylovú skupinu, ktorá má všeobecný štruktúrny vzorec III:



v ktorom:

R_7 , R_8 a R_{10} sú každý nezávisle vybraný zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivu a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxyskupinu), ďalej NHCOR_3 (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako je napríklad skupina CONH_2), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

6. Použitie podľa nároku 1, benzimidazolovej zlúčeniny podľa nároku 5, podľa ktorého

R_7 znamená skupinu inú než atóm vodíka, pričom táto skupina je v polohe 4' , a R_8 a R_{10} znamenajú každý atóm vodíka.

7. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny definovanej v tomto nároku , podľa ktorého R znamená skupinu vybranú zo súboru zahrňujúceho metylovú skupinu, etylovú skupinu, n-propylovú skupinu, i-propylovú skupinu, n-butylovú skupinu, t-butylovú skupinu a cyklohexylovú skupinu.

8. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny definovanej v tomto nároku , podľa ktorého R' znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu a R znamená fenylovú skupinu alebo benzylovú skupinu, ktoré obsahujú prinajmenšom jeden substituent na benzenovom kruhu, pričom tento substituent je vybraný zo súboru zahrňujúci hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, NO₂, N₃, NR₅R₆, (kde R₅ a R₆ každý jednotlivo a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxyskupinu), ďalej NHCOR₃ (kde R₃ je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO₂R₄ (kde R₄ znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu CONH₂) , tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxalkylovú skupinu, skupinu CW₃ alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN.

9. Použitie zlúčeniny podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny, podľa ktorého je uvedená zlúčenina vybraná zo súboru zahrňujúceho:

- (a) 2-metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (b) benzimidazol- 4-karboxamid,
- (c) 2-fenylbenzimidazol –4-karboxamid,
- (d) 2-(4' -metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (e) 2-(4' -trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (f) 2-(4' - hydroxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (g) 2-trifluormetylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (h) 2-(4' - metoxyfenyl)-A-metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (i) 2-(4' - nitrofenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (j) 2-(4' - kyanofenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (k) 2-(3' - trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (l) 2-(3' - metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (m) 2-(4' - metoxyfenyl) –l-N-benzoylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (n) 2-(4' - aminofenyl) benzimidazol-4- karboxamid,
- (o) 2-(2' - trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid, a

- (p) N-karboxybenzyl-2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid.

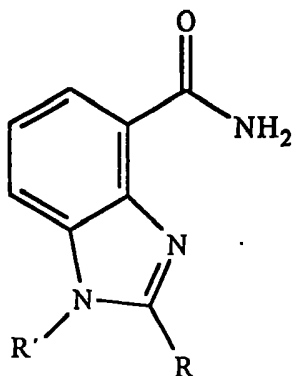
10. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny, podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, podľa ktorého je uvedená zlúčenina vo forme prekursoru liečiva, ktorá má ako substituent skupinu vybranú zo súboru zahrňujúceho fosfátovú skupinu, karbamátovú skupinu alebo aminokyselinovú skupinu.

11. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny, ktorou je fosfátový derivát zlúčeniny uvedeného štruktúrneho vzorca I a ktorý predstavuje formu prekursoru liečiva benzimidazolovej zlúčeniny definovanej v niektorom z nárokov 1 až 9.

12. Použitie podľa nároku 1 benzimidazolovej zlúčeniny vo forme fosfátového prekursoru liečiva predstavujúceho vo vode rozpustnú fosfátovú amónnu soľ alebo fosfátovú soľ alkalického kovu odvodenú od zlúčeniny všeobecného štruktúrneho vzorca I, definovaného v niektorom z nárokov 1 až 9, ktorá má prinajmenšom jednu hydroxylovú skupinu ako substituent.

13. Použitie podľa nároku 12, podľa ktorého benzimidazolová zlúčenina všeobecného štruktúrneho vzorca I, od ktorého je odvodený fosfátový precursor liečiva, má hydroxylovú skupinu ako substituent, ktorý zreagoval s dibenzylfosfonátom.

14. Benzimidazolová zlúčenina všeobecného štruktúrneho vzorca I:



(I)

alebo farmaceuticky prijateľná soľ odvodená od tejto zlúčeniny a/alebo forma prekursoru liečiva tejto zlúčeniny, charakterizovaná tým, že v tomto všeobecnom štruktúrnom vzorci I:

R je zvolený zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substituovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina) alebo aralkylovú skupinu (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina),

S tou podmienkou, že

R neznamená 4'-metánsulfonyloxy-2'-metoxyfenylovú skupinu, alebo

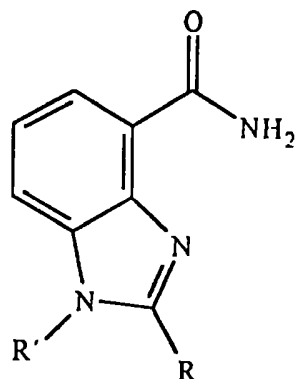
4'-metánsulfonylamino-2'-metoxyfenylovú skupinu a ďalej neznamená fenylovú skupinu, ktorá má substituent vybraný zo súboru zahrňujúceho alkylsulfonylovú skupinu, alkylsulfonylovú skupinu, alkánsulfonylovú skupinu, alebo alkylsulfoximinovú skupinu, alkylsulfoximinovú skupinu substituovanú na atóme dusíka alkanoylovou skupinou, alkylsulfonylovou skupinou, alebo hydroxykarbonyl-alkylénkarbonylovou skupinou, etoxyskupinu, alebo n-propoxyskupinu, z ktorých každá je substituovaná na koncovej polohe alkylsulfonylovou skupinou, alkylsulfonylovou skupinou, alkánsulfonylovou skupinou, alebo alkylsulfoximinovou skupinou, alkoxykarbonylamínovú skupinu alebo N-alkylaminokarbonylamínovú skupinu a

R' je zvolený zo súboru zahrňujúceho vodík, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substituovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina),

s tou podmienkou, že R' neznamená bifenylovú skupinu alebo substituovanú bifenylovú skupinu,

na použitie v terapii ako účinné farmaceutické látky.

15. Zlúčenina všeobecného štruktúrneho vzorca I:



(1)

alebo farmaceuticky prijateľná soľ odvodená od tejto zlúčeniny,
v ktorom:

R je zvolený zo súboru zahrňujúceho vodík, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substiuovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina) alebo prípadne substituovanú aralkylovú skupinu (ako je napríklad benzylová skupina alebo karboxybenzylová skupina), a

s tou podmienkou, že R neznamená 4'-metánsulfonyloxy-2'-metoxyfenylovú skupinu, alebo 4'-metánsulfonylamino-2'-metoxyfenylovú skupinu a ďalej neznamená fenylovú skupinu, ktorá má substituent vybraný zo súboru zahrňujúceho alkylsulfenylovú skupinu, alkylsulfinylovú skupinu, alkánsulfonylovú skupinu, alebo alkylsulfooximinovú skupinu, alkylsulfooximinovú skupinu substituovanú na atóme dusíka alkanoylovou skupinou, alkylsulfonylovou skupinou, alebo hydroxykarbonyl-alkylénkarbonylovou skupinou, etoxyskupinu, alebo n-propoxyskupinu, z ktorých každá je substituovaná na koncovej polohe alkylsulfenylovou skupinou, alkylsulfinylovou skupinou, alkánsulfonylovou skupinou, alebo alkylsulfooximinovou skupinou, alkoxykarbonylamínovú skupinu alebo N-alkylaminokarbonylamínovú skupinu a

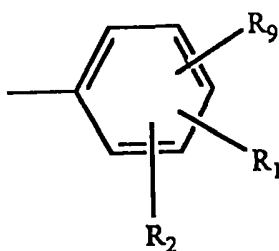
R' je zvolený zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, alkylovú skupinu, hydroxyalkylovú skupinu (ako napríklad $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), acylovú skupinu (ako je napríklad acetylová skupina alebo benzoylová skupina) alebo prípadne substituovanú arylovú skupinu (ako je napríklad fenylová skupina),

s tou podmienkou, že R' neznamená bifenylovú, alebo substituovanú bifenylovú skupinu,

16. Zlúčenina podľa nároku 14 alebo 15, v ktorej alkylová skupina alebo každá prítomná alkylová skupina, buď ako taká alebo ako súčasť alkoxy skupiny alebo inej skupiny, obsahuje 1 až 6 atómov uhlíka.

17. Zlúčenina podľa nároku 14, 15 alebo 16, v ktorej:

R znamená fenylovú skupinu, ktorá má štruktúrny všeobecný vzorec II:



(II)

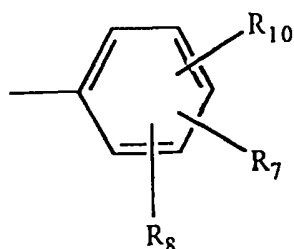
v ktorom:

R_1 , R_2 a R_9 sú každý nezávisle na sebe vybrané zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxy skupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivito a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkosystupinu), ďalej NHCOR_3 (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu CONH_2), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

18. Zlúčenina podľa nároku 17, v ktorej R_1 znamená skupinu inú než atóm vodíka, pričom táto skupina je v polohe 4', a R_2 a R_9 znamenajú každý atóm vodíka.

19. Zlúčenina podľa niektorého z nárokov 14 až 18, v ktorej:

R' znamená prípadne substituovanú fenylovú skupinu, ktorá má všeobecný štruktúrny vzorec III:



(III)

v ktorom:

R_7 , R_8 a R_{10} sú každý nezávisle vybraný zo súboru zahrňujúceho atóm vodíka, hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivu a na sebe nezávisle znamenajú atóm vo vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxyskupinu), ďalej NHCOR_3 (kde R_3 je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO_2R_4 (kde R_4 znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu CONH_2), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxalkylovú skupinu, skupinu CW_3 alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN .

20. Zlúčenina podľa nároku 19, v ktorej R_7 znamená skupinu inú než atóm vodíka, pričom táto skupina je v polohe 4', a R_8 a R_{10} znamenajú každý atóm vodíka.

21. Zlúčenina podľa nároku 14 alebo 15, v ktorej R znamená skupinu vybranú zo súboru zahrňujúceho metylovú skupinu, etylovú skupinu, n-propylovú skupinu, i-propylovú skupinu, n-butylovú skupinu, t-butylovú skupinu a cyklohexylovú skupinu.

22. Zlúčenina podľa nároku 14 alebo 15, v ktorej R' znamená atóm vodíka a R znamená fenylovú skupinu alebo benzylovú skupinu, ktoré obsahujú prinajmenšom jeden substituent na benzénovom kruhu, pričom tento substituent je vybraný zo súboru zahrňujúceho hydroxyskupinu, alkoxyskupinu, NO_2 , N_3 , NR_5R_6 (kde R_5 a R_6 každý jednotlivu a na sebe nezávisle znamenajú atóm vodíka, alkylovú skupinu alebo alkoxyskupinu), ďalej

NHCOR₃ (kde R₃ je alkylová skupina alebo arylová skupina), CO₂R₄ (kde R₄ znamená atóm vodíka alebo alkylovú skupinu), amidovú skupinu (ako napríklad skupinu CONH₂), tetrazolovú skupinu, alkylovú skupinu, hydroxalkylovú skupinu, skupinu CW₃ alebo W (kde W znamená halogén) a skupinu CN.

23. Zlúčenina podľa nároku 14 alebo 15, pričom touto zlúčeninou je jedna zlúčenina vybraná zo súboru zahrňujúceho:

- (a) 2-metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (b) benzimidazol-4-karboxamid,
- (c) 2- (4' -metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (d) 2- (4' - trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (e) 2- (4' -hydroxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (f) 2-trifluormetylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (g) 2- (4' metoxyfenyl) -N-metylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (h) 2- (4' - nitrofenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (i) 2- (4' - kyanofenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (j) 2- (3' -trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid,
- (k) 2- (3' - metoxyfenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (l) 2- (4' -metoxyfenyl)-l-N-benzoylbenzimidazol-4-karboxamid,
- (m) 2- (4' - aminofenyl)benzimidazol-4-karboxamid,
- (n) 2- (2' - trifluormetylfenyl) benzimidazol-4-karboxamid, a
- (o) N-karboxybenzyl - 2-(4'-metoxyfenyl) benzimidazol-4-karboxamid.

24. Zlúčenina podľa niektorého z nárokov 14 až 23, pričom táto zlúčenina je vhodná pre perorálne alebo intravenózne terapeutické podávanie a táto zlúčenina je vo forme prekurzoru liečiva, ktorá je ako substituent skupiny vybraný zo súboru zahrňujúceho fosfátovú skupinu, karbamátovú skupinu alebo aminokyselinovú skupinu.

25. Zlúčenina podľa nároku 24, kde forma prekursoru liečiva je fosfátový derivát zlúčeniny vyššie uvedeného všeobecného štruktúrneho vzorca I.

26. Zlúčenina podľa nároku 25, pričom táto zlúčenina vo forme fosfátového prekursoru liečiva predstavujúceho vo vode rozpustnú fosfátovú amónnu soľ alebo fosfátovú soľ alkalického kovu odvodenú od zlúčeniny všeobecného štruktúrneho vzorca I, ktorá má prinajmenšom jednu hydroxylovú skupinu ako substituent.

27. Zlúčenina podľa nároku 26, pričom zlúčenina uvedeného všeobecného štruktúrneho vzorca I, od ktorého je odvodený fosfátový precursor liečiva, má hydroxylovú skupinu ako substituent, ktorá zreagovala s divenzylfosfonátom.

28. Spôsob prípravy zlúčeniny podľa nároku 17, **vyznačujúci sa tým**, že zahrňuje stupne reakcie alkylesteru kyseliny 2,3-diaminobenzoovej s chloridom arylkyseliny, spracovanie získaného produktu kyselinou octovou pri zvýšenej teplote na dosiahnutie tvorby benzimidazolového kruhu a reakcie s kvapalným amoniakom za vzniku amidového derivátu.

29. Zlúčenina podľa niektorého z nárokov 14 až 27 na použitie v terapii ako aktívne PARP-inhibičné činidlo.

30. Použitie zlúčeniny podľa niektorého z nárokov 14 až 27 na prípravu prostriedku na medicínske alebo veterinárne účely na aplikovanie pri terapeutickom liečení cicavcov.

31. Farmaceutický prostriedok alebo kompozícia na medicínske účely **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje zlúčeninu podľa nároku 29 v jednotkovej dávkovej forme určenej pre podávanie cicavcom prispievajúca k liečeniu súčasne s PARP-inhibičným činidlom v priebehu terapie.

32. Farmaceutický prostriedok alebo kompozícia na medicínske účely, **vyznačujúca sa tým**, že obsahuje účinné PARP-inhibičné množstvo zlúčeniny definované v niektorom z nárokov 14 až 27 spoločne s farmaceuticky prijateľnou nosičovou látkou.

33. Farmaceutický prostriedok alebo kompozícia podľa nároku 31 alebo 32, **vyznačujúca sa tým**, že je určená na použitie v spojení s cytotoxickými činidlami alebo rádioterapiou pri protinádorovej terapii.

34. Farmaceutický prostriedok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje účinné PARP inhibičné množstvá zlúčeniny podľa nároku 29 v zmesi s terapeuticky vhodným a účinným množstvom cytotoxického liečiva pre použitie pri protinádorovej terapii.

35. Spôsob terapeutického liečenia vykonávaného u cicavcov, u ktorých inhibovanie aktivity PARP enzýmu je považované za prispievajúce k liečeniu **vyznačujúce sa tým**, že tento postup zahŕňa podávanie týmto cicavcom účinného PARP-inhibičného množstva zlúčeniny podľa niektorého z nárokov 14 až 27.

36. Spôsob podľa nároku 35, **vyznačujúci sa tým**, že sa vykonáva v spojení s podávaním cytotoxického liečiva alebo rádioterapiu poškodzujúcou DNA v priebehu protinádorovej terapie.

Obr. 1

Klonogénny test s bunkami L1210
NU1064 +/- 100 μ M temozolomidu
(1% DMSO)

