

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

303 705

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2002-3081**
 (22) Přihlášeno: **15.02.2001**
 (30) Právo přednosti: **15.02.2000 US 60/182710**
 06.07.2000 US 60/216422
 27.10.2000 US 60/243532
 (40) Zveřejněno: **12.02.2003**
 (Věstník č. 2/2003)
 (47) Uděleno: **13.02.2013**
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **27.03.2013**
 (Věstník č. 13/2013)
 (86) PCT číslo: **PCT/US2001/004813**
 (87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2001/060814**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 403/06	(2006.01)
C07D 401/14	(2006.01)
C07D 403/14	(2006.01)
C07D 413/14	(2006.01)
A61K 31/4025	(2006.01)
A61K 31/404	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5 886 020 A; WO 98/50356 A1; WO 99/61422 A1; WO 00/38519 A1; WO 00/35908 A1; WO 01/37820 A2; WO 01/45689 A2.

Sun L. et al.: "Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: ..." J. Med. Chem., 1998, vol. 41, str. 2588-2603 (str. 2594, 2601: sloučeniny 44, 48).

(73) Majitel patentu:

SUGEN, INC., South San Francisco, CA, US
 PHARMACIA & UPJOHN COMPANY, Kalamazoo,
 MI, US

(72) Původce:

Tang Peng Cho, Morago, CA, US
 Miller Todd, Bend, OR, US
 Li Xiaoyuan, Los Altos, CA, US
 Sun Li, Foster City, CA, US
 Wei Chung Chen, Foster City, CA, US
 Shirazian Shahrzad, Corte Madera, CA, US
 Liang Congxin, Sunnyvale, CA, US
 Vojkovsky Tomas, San Mateo, CA, US
 Nematalla Asaad S., Concord, CA, US
 Hawley Michael, Kalamazoo, MI, US

(74) Zástupce:

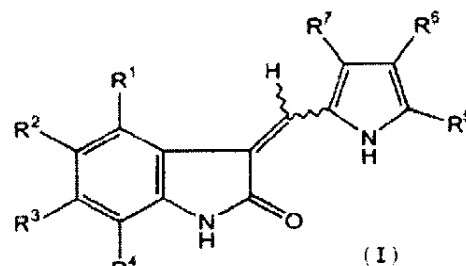
Čermák a spol., JUDr. Karel Čermák, Elišky Peškové 15,
 Praha 5, 15000

(54) Název vynálezu:

**Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová
 sloučenina pro použití jako inhibitor
 proteinkináz a farmaceutická kompozice s
 jejím obsahem**

(57) Anotace:

Pyrrolem substituované 2-indolinonové sloučeniny obecného vzorce I a jejich farmaceuticky přijatelné soli, které modulují aktivitu proteinkináz, jejich použití pro výrobu léčiva pro prevenci a léčbu buněčných poruch souvisejících s proteinkinázou, jako je rakovina.



CZ 303705 B6

Pyrrolem substituovaná 2-indolinová sloučenina pro použití jako inhibitor proteinkináz a farmaceutická kompozice s jejím obsahem

5 Oblast techniky

Předložený vynález se týká určitých 3-pyrrolem substituovaných 2-indolinonů, které modulují aktivitu proteinkináz („PK“). Sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou proto účinné při ošetření poruch spojených s abnormální aktivitou PK. Dále se předložený vynález týká farmaceutických přípravků zahrnujících tyto sloučeniny, způsobů ošetření onemocnění pomocí farmaceutických přípravků zahrnujících tyto sloučeniny a způsobů jejich přípravy.

15 Dosavadní stav techniky

Následující popis má pouze informativní charakter a neklade si za cíl být známým stavem techniky předloženého vynálezu.

PK jsou enzymy, které katalyzují fosforylaci hydroxyskupin na tyrosinových, serinových a threoninových zbytcích proteinů. Důsledky této zdánlivě jednoduché aktivity jsou ohromné; buněčný růst, diferenciaci a proliferaci, tzn. prakticky všechny aspekty života buňky tím či oním způsobem závisí na aktivitě PK. Mimoto abnormální aktivita PK souvisí se spoustou poruch sahajících od relativně život neohrožujících onemocnění, jako je psoriáza, až po extrémně virulentní onemocnění, jako je glioblastom (rakovina mozku).

PK je možno výhodně rozdělit do dvou skupin, na proteinové tyrosinkinázy (PTK) a serin-threoninkinázy (STK).

Jedním z hlavních aspektů aktivity PTK je jejich účast na receptorech růstového faktoru. Receptory růstového faktoru jsou proteiny buněčného povrchu. Pokud se na ně naváže ligand růstového faktoru, přecházejí receptory růstového faktoru na aktivní formu, která interaguje s proteiny na vnitřním povrchu buněčné membrány. To vede k fosforylaci na tyrosinových zbytcích receptoru a dalších proteinech a k tvorbě komplexů s různými cytoplazmatickými signálními molekulami uvnitř buňky, které pak ovlivňují velký počet buněčných odpovědí, jako je buněčné dělení (proliferace), buněčná diferenciaci, buněčný růst, exprese metabolických efektů do extracelulárního mikroprostředí atd. Pro detailnější informace viz Schlessinger and Ullrich, Neuron, 9: 303 – 391 (1992), na jejichž práci je zde odkazováno, včetně veškerých obrázků jako by plně byla uvedena zde.

Receptory růstového faktoru s aktivitou PTK jsou známy jako receptorové tyrosinkinázy („RTK“). Zahrnují velkou rodinu transmembránových receptorů s rozličnými biologickými aktivitami. Dosud bylo identifikováno alespoň 19 různých podskupin RTK. Příklad těchto RTK zahrnuje podskupinu označovanou jako „HER“ RTK, která zahrnuje EGFR (receptor epiteliálního růstového faktoru), HER2, HER3 a HER4. Tyto RTK se sestávají z extracelulární glykosylované vazebné domény ligandu, transmembránové domény a intracelulární cytoplazmatické katalytické domény, která může fosforylovat tyrosinové zbytky na proteinech.

Další podrodina RTK se sestává z receptoru inzulinu (IR), receptoru inzulinového typu růstového faktoru I (IGF-IR) a příbuzného receptoru inzulinu (IRR). IR a IGF-IR interagují s inzulinem, IGF-I a IGF-II za vzniku heterotetrameru dvou zcela extracelulárně glykosylovaných α podjednotek a dvou β podjednotek, které protínají buněčnou membránu a obsahují tyrosinkinázovou doménu.

Třetí podrodina RTK se označuje jako skupina receptorů růstového faktoru odvozeného od destiček („PDGF“), která zahrnuje PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, c-kit a c-fms. Tyto receptory se

sestávají z glykosylovaných extracelulárních domén složených z různého počtu klíčků imunglobulinového typu a intracelulární domény, kde tyrosinkinázová doména je přerušena nepřibuznými aminokyselinovými sekvencemi.

- 5 Další skupinou, která v důsledku své podobnosti s podrodinou PDGFR je někdy zahrnována do posledně uvedené skupiny, je podrodina receptorů fetální jaterní kinázy („flk“). Předpokládá se, že tuto skupinu tvoří receptor obsahující doménu kinázového insertu pro fetální jaterní kinázu-1 (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 a tyrosinkináza 1 typu fms (flt-1).
- 10 Dalším členem rodiny tyrosinkinázového receptoru růstového faktoru je podskupina receptorů fibroblastového růstového faktoru („FGF“). Tato skupina se sestává ze čtyř receptorů, FGFR1-4, a sedmi ligandů, FGF1-7. I když nejsou ještě plně definovány, lze říci, že se receptory skládají z glykosylované extracelulární domény obsahující různý počet klíčků imunglobulinového typu, a intracelulární domény, ve které je tyrosinkinázová sekvence přerušena oblastmi nepřibuzných
- 15 aminokyselinových sekvencí.

Ještě dalším členem podskupiny tyrosinkinázového receptoru růstového faktoru je podskupina receptoru růstového faktoru vaskulárních endotelových buněk („VEGF“). VEGF je dimerní glykoprotein podobný PDGF, nicméně má jiné biologické funkce a cílově buněčnou specifitu *in vivo*. Konkrétně se v současné době předpokládá, že má důležitou roli při vaskulogenezi a angiogenezi.

20

Úplný seznam známých podrodin RTK je popsán v Plowman *et al.*, DN&P, 7(6): 334 – 339 (1994), na jejichž práci je zde odkazováno, včetně kterýchkoliv obrázků, jako by plně bylo uvedeno zde.

25

Kromě RTK také existuje rodina zcela intracelulárních PTK označovaná nerekceptorové tyrosinkinázy („non-receptor tyrosin kinases“) nebo také „buněčné tyrosinkinázy“. Dále bude v popisu používána zkratka tohoto druhého označení, tzn. CTK. CTK neobsahují extracelulární a transmembránové domény. Do současnosti bylo identifikováno 24 jednotlivých CTK zahrnujících (11) podrodin (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak a Ack). Podrodina Src je v současnosti tvořena největším počtem CTK a zahrnuje Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr a Yrk. Podrobnější diskusi CTK poskytuje Bohlen, 1993, *Oncogene* 8: 2025 – 2031, na jejichž práci je zde odkazováno, včetně kterýchkoliv obrázků jako by plně bylo uvedeno zde.

30

Serin/threoninkinázy, STK, typu STK, jsou převážně intracelulární, ačkoliv existuje několik receptorových kináz typu STK. STK jsou nejčastěji cytosolové kinázy, tzn. kinázy, které vykonávají svoji funkci v jiné části cytoplazmy, než se nacházejí cytoplazmatické organelly a cytoskelet. Cytosol je oblast v buňce, ve které se vyskytuje velké množství buněčné intermediární metabolické a biosyntetické aktivity, např. syntéza proteinů na ribozómech probíhá v cytosolu.

35

40

Bylo zjištěno, že mnohé RTK, CTK a STK se podílejí se na četných patogenních stavech hostitele, včetně, výrazně, na rakovině. Další patogenní stavy související s PTK zahrnují, ale není to nikterak limitováno, psoriázu, hepatickou cirhózu, diabetes, angiogenezi, restenózu, oční onemocnění, revmatoidní artritidu a další zánětlivé poruchy, imunologické poruchy, např. autoimunitní choroba, kardiovaskulární onemocnění, např. ateroskleróza a různé renální poruchy.

45

Co se týče rakoviny, uvádějí se dvě hlavní zdokonalené hypotézy, jež vysvětlují nadměrnou buněčnou proliferaci, která řídí vznik nádoru souvisejícího s funkcemi, o kterých je známo, že jsou regulovány PK. Předpokládá se, že maligní buněčný růst je výsledkem poruchy mechanismu, která řídí buněčné dělení a/nebo diferenciaci. Bylo zjištěno, že proteinové produkty mnoha protoonkogenů se podílejí na transdukčních dráhách signálu, které regulují buněčný růst a diferenciaci. Tyto proteinové produkty protoonkogenů zahrnují extracelulární růstové faktory, transmembránové receptory růstového faktoru PTK (RTK), cytoplazmatické PTK (CTK) a cytosolové STK, vše je popisováno výše.

50

55

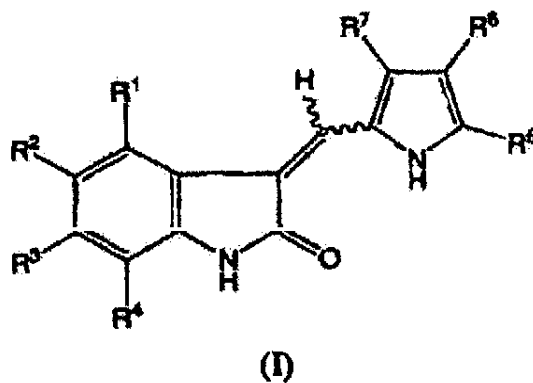
Vzhledem ke zřejmému vztahu mezi buněčnými aktivitami souvisejícími s PK a širokou škálou lidských poruch, není překvapením, že je vynakládáno velké úsilí identifikovat způsoby modula-
ce aktivity PK. Některé z těchto záměrů také zahrnovaly biomimetické postupy využívající velké
5 molekuly k identifikaci PD podílejících se na konkrétních buněčných procesech (např. mutant-
ních ligandů, U.S. patentová přihláška 4 966 849), rozpustných receptorech a protilátkách (pří-
hláška WO 94/10 202; Kendall & Thomas, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10705 – 09; Kim *et al.*, 1993, *Nature* 362: 841 – 844), RNA ligandů (Jellinek, *et al.*, *Biochemistry* 33: 1045056;
Takano, *et al.*, 1993, *Mol. Bio. Cell* 4: 358A; Kinsella, *et al.* 1992, *Exp. Cell Res.* 199: 56 – 62;
10 Wright, *et al.*, 1992, *J. Cellular Phys.* 152: 448 – 57) a inhibitorych tyrosinkináz (WO 94/03 427;
WO 92/21 660; WO 91/15 495; WO 94/14 808; U.S. patent 5 330 992; Mariani, *et al.* 1994,
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 35: 2268).

Kromě výše uvedeného byly v poslední době činěny pokusy identifikovat malé molekuly, které
15 působí jako inhibitory PK. Například bismonocyklické, bicyklické nebo heterocyklické arylové
sloučeniny (PCT WO 92/02 642) a vinylen–azaindolové deriváty (PCT WO 94/14 808)
a 1–cyklopropyl–4–pyridylchinolony (U.S. 5 330 992) se obecně popisují jako tyrosinkinázové
inhibitory. Styrylové sloučeniny (U.S. patent 5 217 999), styryl–substituované pyridylové slouče-
niny (U.S. patent 5 302 606), některé chinazolinové deriváty (EP 0 566 266 A1), selenoindoly a
20 selenidy (PCT WO 94/03 427), tricyklické polyhydroxylické sloučeniny (PCT WO 92/21 660) a
sloučeniny benzylfosfonové kyseliny (PCT WO 91/15 495) se popisují jako sloučeniny pro pou-
žití jako inhibitory PTK pro použití při léčbě rakoviny.

25 Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká určitých 3–pyrrolem substituovaných 2–indolinonových sloučenin,
které vykazují PK modulační schopnost, a tudíž jsou použitelné při ošetření poruch souvisejících
s abnormální aktivitou PK.

30 Předmětem vynálezu je pyrrolem substituovaná 2–indolinonová sloučenina obecného vzorce I:



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde:

- 35 R^1 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, $-(CH_2)_7R^{16}$ a $-C(O)NR^8R^9$,
 R^2 má význam vybraný z vodíku, halogenu, (C_1-C_{12}) arylu a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$,
 R^3 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_4) arylu, heteroarylu
40 a $-C(O)R^{15}$,
 R^4 je vodík,

R^5 má význam vybraný z vodíku a (C_1-C_4) alkylu,

R^6 je $-C(O)R^{10}$,

5 R^7 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu a (C_1-C_4) arylu,

R^8 a R^9 mají význam nezávisle vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu a (C_1-C_4) arylu,

10 R^{10} je $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$, kde n je 1, 2 nebo 3, R^{11} je vodík a R^{12} má význam vybraný z hydroxy, (C_1-C_4) alkoxy, $-C(O)R^{15}$, heteroarylu a $-NR^{13}R^{14}$,

R^{13} a R^{14} mají význam nezávisle vybraný ze skupiny sestávající z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, (C_3-C_8) cykloalkylu, (C_1-C_{12}) arylu a heteroarylu, nebo

15 R^{13} a R^{14} mohou být spojeny a tvořit heterocykloskupinu,

R^{15} má význam vybraný z vodíku, hydroxy, (C_1-C_4) alkoxy a aryloxy,

20 R^{16} má význam vybraný z hydroxy a $-C(O)R^{1r}$ a

r je 2 nebo 3,

a kde:

25 alkoxy označuje O-alkyl nebo O-cykloalkyl,

aryloxy označuje O- (C_1-C_{12}) aryl nebo O-heteroaryl,

30 heteroaryl označuje monocyklickou nebo kondenzovanou kruhovou skupinu s 5 až 12 členy kruhu, obsahující jeden, dva nebo tři heteroatomy vybrané z N, O nebo S a zbylé atomy kruhu jsou C,

35 heterocykloskupina označuje nasycený kruhový zbytek se 3 až 8 atomy kruhu, kde jeden nebo dva atomy kruhu jsou tvořeny heteroatomy vybranými z N, O nebo S(O)_n, kde n je celé číslo od 0 do 2, a zbylé atomy kruhu jsou C, kde jeden nebo dva C atomy jsou případně nahrazeny karbonylovou skupinou,

alkyly, alkoxy skupiny a cykloalkylové skupiny jsou nesubstituované,

40 arylové a heteroarylové skupiny jsou případně substituované jedním nebo dvěma substituenty, nezávisle vybranými z halogenu, (C_1-C_4) alkylu, trihalogen (C_1-C_4) alkylu, hydroxy, merkpto, kyano, *N*-amido, mono- nebo di (C_1-C_4) alkylamino, karboxy a *N*-sulfonamido,

45 heterocykloskupina je případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, (C_1-C_4) alkylu, $-(C_1-C_4)$ alkyl-karboxy, $-(C_1-C_4)$ alkyl-esteru, hydroxylu a mono- nebo di (C_1-C_4) alkylaminoskupiny.

50 Výhodně mají R^{13} a R^{14} význam nezávisle vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, heteroarylu, a jsou-li spojeny, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ a $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

Výhodně je n rovno 2 nebo 3 a R^{12} je $-NR^{13}R^{14}$, kde R^{13} a R^{14} jsou nezávisle (C_1-C_4) alkyl.

55 Výhodně je, jestliže n je 2 nebo 3 a R^{12} je $-NR^{13}R^{14}$, kde R^{13} a R^{14} jsou spojeny do skupiny vybrané z $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ nebo $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

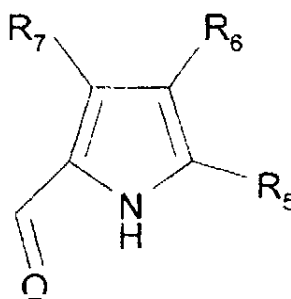
Výhodné jsou sloučeniny, kde R^1 je $-C(O)NR^8R^9$, kde R^8 je vodík a R^9 je aryl.

Předmětem předloženého vynálezu je rovněž farmaceutická kompozice obsahující jednu nebo více sloučenin obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný excipient.

Předmětem předloženého vynálezu je dále použití sloučenin podle vynálezu pro výrobu léčiva pro ošetření onemocnění zprostředkovaných abnormální aktivitou proteinkináz, konkrétně receptorových tyrosinkináz (RTK), nerekceptorových proteinových tyrosinkináz (CTK) a proteinových serin/threoninkináz (STK), v organismu, zejména lidském, které zahrnuje podání farmaceutického přípravku obsahujícího sloučeninu obecného vzorce I do uvedeného organismu. Taková onemocnění zahrnují, ale neomezuji se na ně, například rakovinu, diabetes, hepatickou cirhózu, kardiovaskulární onemocnění, např. aterosklerózu, angiogenezi, imunologické onemocnění, např. autoimunitní onemocnění, a renální onemocnění.

Účinek sloučenin podle vynálezu je založen na modulaci katalytické aktivity PK, zejména receptorových tyrosinkináz (RTK), nerekceptorových proteinových tyrosinkináz (CTK) a proteinových serin/threoninkináz (STK), sloučeninami podle předloženého vynálezu, která může být prováděna *in vitro* nebo *in vivo*. Konkrétně je receptorová proteinkináza, jejíž katalytická aktivita je modulována sloučeninou podle předloženého vynálezu, vybrána ze skupiny sestávající se z EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R a FGFR-4R. Buněčná tyrosinkináza, jejíž katalytická aktivita je modulována sloučeninou podle předloženého vynálezu, je vybrána ze skupiny sestávající se z Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Blk, Hck, Fgr a Yrk. Proteinová serin-threoninkináza, jejíž katalytická aktivita je modulována sloučeninou podle předloženého vynálezu, je vybrána ze skupiny sestávající se z CDK2 a Raf.

Pro přípravu sloučenin podle vynálezu je možno použít meziprojektu obecného vzorce II:



(II),

ve kterém

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové skupiny a $-C(O)R^{10}$;

substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové skupiny a $-C(O)R^{10}$;

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové skupiny, aryllové skupiny, heteroaryllové skupiny, $-C(O)R^{17}$ a $-C(O)R^{10}$

substituenty R^6 a R^7 mohou být spojeny dohromady za vzniku skupiny vybrané ze skupiny sestávající se z $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ a $-(CH_2)_6-$; s výhradou spočívající v tom, že alespoň jeden ze substituentů R^5 , R^6 nebo R^7 musí být $-C(O)R^{10}$;

- substituent R^{10} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, alkoxykupiny, aryloxykupiny, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ a $-NR^{13}R^{14}$;
- substituent R^{11} je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny;
- 5 substituent R^{12} je vybrán ze skupiny sestávající se z $-NR^{13}R^{14}$, hydroxyskupiny, $-C(O)R^{15}$, arylové a heteroarylové skupiny;
- substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové skupiny, kyanoalkylové skupiny, cykloalkylové skupiny, arylové a heteroarylové skupiny; nebo
- 10 substituent, R^{13} a R^{14} mohou být spojeny dohromady za vzniku heterocyklové skupiny;
- substituent R^{15} je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, hydroxyskupiny, alkoxykupiny a aryloxykupiny;
- 15 substituent R^{17} je vybrán ze skupiny sestávající se z alkylové skupiny, cykloalkylové skupiny, arylové skupiny a heteroarylové skupiny; a
- 20 n je 1, 2, 3 nebo 4.
- Výhodně jsou substituenty R^5 nebo R^6 ve sloučenině obecného vzorce II $-C(O)R^{10}$;
- substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodněji atomu vodíku nebo methylu;
- 25 substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodněji atomu vodíku nebo methylu, pokud substituent R^6 je $-COR^{10}$;
- substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodněji atomu vodíku nebo methylu, pokud substituent R^5 je $-COR^{10}$;
- 30 substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové skupiny a arylové skupiny, výhodněji atomu vodíku, methylu nebo fenylu;
- 35 substituent R^{10} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, alkoxykupiny, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ a $-NR^{13}R^{14}$;
- substituent R^{11} je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodněji atomu vodíku nebo methylu;
- 40 substituent R^{12} je vybrán ze skupiny sestávající se z $-NR^{13}R^{14}$;
- substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku nebo alkylové skupiny; nebo
- 45 substituenty R^{13} a R^{14} mohou být spojeny dohromady za vzniku heterocykloskupiny; a n je 1, 2 nebo 3.
- 50 V rámci výše uvedených výhodných skupin zahrnují výhodnější skupiny meziproductů, ve kterých substituenty R^5 , R^6 , R^{11} , R^{12} , R^{13} nebo R^{16} jsou nezávisle skupiny popsané v sekci označené „výhodné skupiny“ uvedené níže.
- Pomocí sloučenin podle vynálezu je možná identifikace chemické sloučeniny, která moduluje
- 55 katalytickou aktivitu proteinkinázy, uvedením buněk exprimujících uvedenou proteinkinázu

v kontakt se sloučeninou nebo solí podle předloženého vynálezu a následným monitorováním účinku na uvedené buňky.

5 Detailní popis vynálezu

Definice

10 Pokud není uvedeno jinak, mají následující termíny používané při popisu a v patentových nárocích tento význam:

Termín „alkylová skupina“ se vztahuje na nasycený alifatický uhlovodíkový radikál zahrnující skupiny s lineárním nebo rozvětveným řetězcem mající 1 až 20 atomů uhlíku (pokaždé když je uvedeno číselné rozmezí, např. „1–20“, znamená to, že skupina, v tomto případě alkylová skupina, může obsahovat 1 atom uhlíku, 2 atomy uhlíku, 3 atomy uhlíku, atd. až 20 atomů uhlíku včetně). Alkylové skupiny s 1 až 4 atomy uhlíku jsou označeny nižší alkylové skupiny. Pokud 15 uvedené nižší alkylové skupiny nemají substituenty, pak jsou označovány jako nesubstituované nižší alkylové skupiny. Výhodněji je alkylová skupina alkylová skupina střední velikosti s 1 až 10 atomy uhlíku, např. methyl, ethyl, propyl, 2-propyl, *n*-butyl, *izo*-butyl, *terc*-butyl, pentyl, atd. Nejvýhodněji má nižší alkylová skupina 1 až 4 atomy uhlíku, např. methyl, ethyl, propyl, 20 2-propyl, *n*-butyl, *izo*-butyl nebo *terc*-butyl, atd. Alkylová skupina může být substituovaná nebo nesubstituovaná. Pokud je substituována, je substituent(y) výhodně jeden nebo více, výhodněji jeden až tři, nejvýhodněji jeden nebo dva substituent(y) nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z halogenu, hydroxyskupiny, nesubstituované nižší alkokyskupiny, arylové skupiny případně substituované jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které 25 jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkylová skupina, aryloxyskupina případně substituovaná jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná 30 nižší alkokyskupina, 6-členná heteroarylová skupina mající 1 až 3 atomy dusíku v kruhu, přičemž uhlíky v kruhu jsou případně substituovány jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkokyskupina, 5-členná heteroarylová skupina mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z atomů 35 dusíku, kyslíku a síry, přičemž atomy dusíku a uhlíku ve skupině jsou případně substituovány jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkokyskupina, 5- nebo 6-členná heteroalicyklická skupina mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z dusíku, kyslíku a síry, přičemž atomy uhlíku a dusíku 40 (pokud je přítomen) ve skupině jsou případně substituované jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkokyskupina, merkaptoskupina, (nesubstituovaná nižší alkyl)thioskupina, arylthioskupina případně substituovaná jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které 45 jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkokyskupina, kyanoskupina, acylová skupina, thioacylová skupina, *O*-karbamyllová skupina, *N*-karbamyllová skupina, *O*-thiokarbamyllová skupina, *N*-thiokarbamyllová skupina, *C*-amidoskupina, *N*-amidoskupina, nitroskupina, *N*-sulfonamidoskupina, *S*-sulfonamidoskupina, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ a $-NR^{18}R^{19}$, kde substituenty 50 R^{18} a R^{19} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenmethylu, nesubstituované (C_3-C_6)cykloalkylové skupiny, nesubstituované nižší alkenylové skupiny, nesubstituované nižší alkynylové a arylové skupiny případně substituované jednou nebo více skupinami výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina 55 nebo nesubstituovaná nižší alkokyskupina.

Výhodně je alkylová skupina substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, 5– nebo 6–členné heterocyklické skupiny mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z dusíku, kyslíku a síry, přičemž atomy uhlíku a dusíku (pokud je přítomen) ve skupině jsou případně substituované jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, 5–členná heteroarylová skupina mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z dusíku, kyslíku a síry, přičemž atomy uhlíku a dusíku ve skupině jsou případně substituované jednou nebo více skupinami, výhodně jednou, dvěma nebo třemi skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, nebo $-MR^{18}R^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nesubstituované nižší alkylové skupiny. Ještě výhodněji je alkylová skupina substituovaná jedním nebo dvěma substituenty, které jsou nezávisle jeden na druhém hydroxyskupina, dimethylaminoskupina, ethylaminoskupina, diethylaminoskupina, dipropylaminoskupina, pyrrolidinoskupina, piperidinoskupina, morfolinoskupina, piperazinoskupina, 4–nižší alkylpiperazinoskupina, fenyl, imidazolyl, pyridinyl, pyridazinyl, pyrimidinyl, oxazolyl, triazinyl apod.

Termín „cykloalkylová skupina“ se vztahuje na 3 až 8členný čistě uhlíkatý monocyklický kruh, čistě uhlíkatý 5–ti/6–ti členný nebo 6–ti/6–ti členný kondenzovaný bicyklický kruh nebo multicyklický kondenzovaný kruh („kondenzovaný“ kruhový systém v systému), kde jeden nebo více kruhů může obsahovat jednu nebo více dvojných vazeb, ale žádný z kruhů nemá kompletně konjugovaný π -elektronový systém.

Příklady, ale neomezuující, cykloalkylových skupin zahrnují cyklopropan, cyklobutan, cyklopentan, cyklopenten, cyklohexan, cyklohexadien, adamantan, cykloheptan, cykloheptatrien apod. Cykloalkylová skupina může být substituovaná nebo nesubstituovaná. Pokud je substituovaná, je substituent(y) výhodně jeden nebo více, výhodněji jeden nebo dva substituenty, nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, halogenu, hydroxyskupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, arylové skupiny případně substituované jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma, skupinami, které nezávisle jedna na druhé je halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, aryloxykupina případně substituovaná jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma, skupinami, která nezávisle jedna na druhé je halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, 6–členná heteroarylová skupina mající 1 až 3 atomy dusíku v kruhu, přičemž uhlíky v kruhu jsou případně substituovány jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma, skupinami, které jsou nezávisle jedna na druhé halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, 5–členná heteroarylová skupina mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z dusíku, kyslíku a síry, přičemž atomy uhlíku a dusíku skupiny jsou případně substituované jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma, skupinami, kde nezávisle jedna na druhé je halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, 5–ti nebo 6–ti členná heterocyklická skupina mající 1 až 3 heteroatomy vybrané ze skupiny sestávající se z dusíku, kyslíku a síry, atomy uhlíku a dusíku (pokud je přítomen) ve skupině jsou případně substituované jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma skupinami, kde nezávisle jedna na druhé je halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina, merkaptoskupina, (nesubstituovaná nižší alkyl)thioskupina, arylthioskupina případně substituovaná jednou nebo více, výhodně jednou nebo dvěma, skupinami, kde nezávisle jedna na druhé je halogen, hydroxyskupina, nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo nesubstituovaná nižší alkoxykupina,

kyanoskupina, acylová skupina, thioacylová skupina, *O*-karbamyl, *N*-karbamyl, *O*-thio-karbamyl, *N*-thiokarbamyl, *C*-amidorskupina, *N*-amidorskupina, nitroskupina, *N*-sulfonamidorskupina, *S*-sulfonamidorskupina, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ a $-NR^{18}R^{19}$ mají význam definovaný výše.

5

Termín „alkenylová skupina“ se vztahuje na nižší alkylovou skupinu definovanou v předloženém vynálezu sestávající se z alespoň dvou atomů uhlíku a alespoň jedné dvojné vazby uhlík–uhlík. Reprezentativní příklady zahrnují, ale neomezuji se na ně, ethenyl, 1–propenyl, 2–propenyl, 1–, 2– nebo 3–butenyl apod.

10

Termín „alkynylová skupina“ se vztahuje na nižší alkylovou skupinou definovanou v předloženém vynálezu sestávající se z alespoň dvou atomů uhlíku a alespoň jedné trojné vazby typu uhlík–uhlík. Reprezentativní příklady zahrnují, ale neomezuji se na ně, ethynyl, 1–propynyl, 2–propynyl, 1–, 2– nebo 3–butynyl apod.

15

Termín „arylová skupina“ se vztahuje na čistě uhlikaté monocyklické nebo kondenzované polycyklické (tzn. kruhy, které sdílejí sousední páry atomů uhlíku) skupiny mající 1 až 12 atomů uhlíku s kompletně konjugovaným π -elektronovým systémem. Příklady arylových skupin, aniž se na ně omezují, zahrnují fenyl, naftalenyl a anthracenyl. Arylové skupiny mohou být substituované nebo nesubstituované. Pokud jsou substituované, je substituovaná skupina(y) výhodně jedna nebo více, výhodněji jedna, dvě nebo tři, ještě výhodněji jedna nebo dvě, nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z substituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, halogenu, hydroxyskupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, merkaptoskupiny, (nesubstituované nižší alkyl)thioskupiny, kyanoskupiny, acylové skupiny, thioacylové skupiny, *O*-karbamylu, *N*-karbamylu, *O*-thiokarbamylu, *N*-thiokarbamylu, *C*-amidorskupiny, *N*-amidorskupiny, nitroskupiny, *N*-sulfonamidorskupiny, *S*-sulfonamidorskupiny, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ a $-NR^{18}R^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} mají shora definovaný význam. Výhodně je arylová skupina případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, hydroxyskupiny, merkaptoskupiny, kyanoskupiny, *N*-amidorskupiny, mono nebo dialkylaminoskupiny, karboxyskupiny nebo *N*-sulfonamidorskupiny.

Termín „heteroarylová skupina“ se vztahuje na monocyklickou nebo kondenzovanou kruhovou (tzn. kruhy, jež společně sdílejí sousedící páry atomů uhlíku) skupinu mající 5 až 12 atomů v kruhu a obsahující jeden, dva nebo tři heteroatomy v kruhu vybrané z N, O nebo S a zbývající atomy v kruhu jsou C a navíc mající kompletně konjugovaný π -elektronový systém. Příklady nesubstituovaných heteroarylových skupin zahrnují, ale není to na ně omezeno, pyrrol, furan, thiofen, imidazol, oxazol, thiazol, pyrazol, pyridin, pyrimidin, chinolin, izochinolin, purin a karbazol. Heteroarylové skupiny mohou být substituované nebo nesubstituované. Pokud jsou substituované, pak substituovaná skupina(y) je výhodně jedna nebo více, výhodněji jedna, dvě nebo tři, ještě výhodněji jedna nebo dvě, nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, halogenu, hydroxyskupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, merkaptoskupiny, (nesubstituované nižší alkyl)thioskupiny, kyanoskupiny, acylové skupiny, thioacylové skupiny, *O*-karbamylu, *N*-karbamylu, *O*-thiokarbamylu, *N*-thiokarbamylu, *C*-amidorskupiny, *N*-amidorskupiny, nitroskupiny, *N*-sulfonamidorskupiny, *S*-sulfonamidorskupiny, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ a $-NR^{18}R^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} mají shora definovaný význam. Výhodně je heteroarylová skupina případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, hydroxyskupiny, merkaptoskupiny, kyanoskupiny, *N*-amidorskupiny, mono nebo dialkylaminoskupiny, karboxyskupiny nebo *N*-sulfonamidorskupiny.

Termín „heteocyklický“ se vztahuje na skupinu monocyklického kruhu nebo kondenzovaného kruhu(ů) mající 5 až 9 atomů v kruhu, kde jeden nebo dva atomy v kruhu jsou heteroatomy vybrané z N, O nebo $S(O)_n$ (kde n je celé číslo od 0 do 2) a zbývající atomy v kruhu jsou C.

55

- Kruhy mohou mít také jednu nebo více dvojných vazeb. Nicméně kruhy nemají kompletně konjugovaný π elektronový systém. Příklady nesubstituovaných heteroalicyklických skupin zahrnují, ale není to nikterak limitováno, pyrrolidinoskupinu, piperidinoskupinu, piperazinoskupinu, morfolinoskupinu, thiomorfolinoskupinu, homopiperazinoskupinu, atd. Heterocyklický kruh může být substituovaný nebo nesubstituovaný. Pokud je substituovaný, pak substituovaná skupina(y) je výhodně jedna nebo více, výhodněji jedna, dvě nebo tři, ještě výhodněji jedna nebo dvě, nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, halogenu, hydroxyskupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, merkaptoskupiny, (nesubstituované nižší alkyl)thioskupiny, kyanoskupiny, acylové skupiny, thioacylové skupiny, *O*-karbamylu, *N*-karbamylu, *O*-thiokarbamylu, *N*-thiokarbamylu, *C*-amidoskupiny, *N*-amidoskupiny, nitroskupiny, *N*-sulfonamidoskupiny, *S*-sulfonamidoskupiny, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ a $-NR^{18}R^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} mají shora definovaný význam.
- Výhodně je heteroalicyklická skupina případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, hydroxyskupiny, merkaptoskupiny, kyanoskupiny, *N*-amidoskupiny, mono nebo dialkylaminoskupiny, karboxyskupiny nebo *N*-sulfonamidoskupiny.
- Termín „heterocykl“ znamená nasycený cyklický radikál mající 3 až 8 atomů v kruhu, kde jeden nebo dva atomy v kruhu jsou heteroatomy vybrané z N, O nebo $S(O)_n$ (kde n je celé číslo od 0 do 2), zbývající atomy v kruhu jsou C, kde jeden nebo dva atomy uhlíku mohou být případně nahrazeny karbonylovou skupinou. Heterocyklylový kruh může být případně substituován jedním, dvěma nebo třemi substituenty vybranými z případně substituované nižší alkylové skupiny (substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z karboxyskupiny nebo esteru), halogenalkylové skupiny, kyanoalkylové skupiny, halogenu, nitroskupiny, kyanoskupiny, hydroxyskupiny, alkoxykupiny, aminoskupina, monoalkylaminoskupiny, dialkylaminoskupiny, aralkylové skupiny, heteroaralkylové skupiny, $-COR$ (kde substituent R je alkylová skupina) nebo $COOR$, kde substituent R je atom vodíku nebo alkylová skupina.
- Podrobněji termín heterocyklyl zahrnuje, ale není to nikterak limitováno, tetrahydropyranyl, 2,2-dimethyl-1,3-dioxolan, piperidinoskupina, *N*-methylpiperidin-3-yl, piperazinoskupina, *N*-methylpyrrolidin-3-yl, 3-pyrrolidinoskupina, morfolinoskupina, thiomorfolinoskupina, thiomorfolino-1-oxid, thiomorfolino-1,1-dioxid, 4-ethyloxykarbonylpiperazinoskupina, 3-oxopiperazinoskupina, 2-imidazolidon, 2-pyrrolidinon, 2-oxohomopiperazinoskupina, tetrahydropyrimidin-2-on a jejich deriváty.
- Výhodně je heterocyklylová skupina případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, nesubstituované nižší alkylové skupiny, nižší alkylové skupiny substituované karboxyskupiny, esterem hydroxyskupiny, mono nebo dialkylaminoskupinou.
- Termín „hydroxyskupina“ se vztahuje na skupinu $-OH$.
- Termín „alkoxykupina“ se vztahuje na skupinu $-O-$ (nesubstituovaná alkylová skupina) a $-O-$ (nesubstituovaná nebo cykloalkylová skupina). Reprezentativní příklady zahrnují, ale není to nikterak limitováno, např. methoxykupinu, ethoxykupinu, propoxykupinu, butoxykupinu, cyklopropyloxykupinu, cyklobutyloxykupinu, cyklopentyloxykupinu, cyklohexyloxykupinu, atd.
- Termín „aryloxykupina“ se vztahuje na $-O$ -arylovou skupinu, $-O$ -heteroarylovou skupinu definovanou v předloženém vynálezu. Reprezentativní příklady zahrnují, ale není to nikterak limitováno, fenoxyskupinu, pyridinyloxykupinu, furanyloxykupinu, thienyloxykupinu, pyrimidinilyloxykupinu, pyrazinyloxykupinu, atd. a jejich deriváty.
- Termín „merkaptoskupina“ se vztahuje na skupinu $-SH$.

Termín „alkylthioskupina“ se vztahuje na skupinu –S– (nesubstituovaná alkylová skupina) i –S– (nesubstituovaná cykloalkylová skupina). Reprezentativní příklady zahrnují, ale není to nikterak limitováno, např. methylthioskupinu, ethylthioskupinu, propylthioskupinu, butylthioskupinu, 5 cyklopropylthioskupinu, cyklobutylthioskupinu, cyklopentylthioskupinu, cyklohexylthioskupinu, atd.

Termín „arylthioskupina“ se vztahuje na –S–arylovou skupinu i –S–heteroarylovou skupinu definovanou v předloženém vynálezu. Reprezentativní příklady zahrnují, ale není to nikterak limitováno, fenylythioskupinu, pyridinylthioskupinu, furanylthioskupinu, thienylthioskupinu, pyrimidinylthioskupinu, atd. a jejich deriváty.

Termín „acylová skupina“ se vztahuje na skupinu –C(O)–R'', kde substituent R'' je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenmethylu, nesubstituované cykloalkylové skupiny, aryllové skupiny, případně substituované jednou nebo více, výhodně jednou, dvěma nebo třemi, substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenmethylu, nesubstituované nižší alkoxykupiny, halogenu a skupin –NR¹⁸R¹⁹, heteroarylové skupiny (vázaná přes uhlíkové atomy v kruhu) případně substituované jedním nebo více, výhodně jedním dvěma nebo třemi, substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, halogenu a skupiny –NR¹⁸R¹⁹ a heterocyklické skupiny (vázaná přes uhlíkové atomy v kruhu), případně substituované jedním nebo více, výhodně jedním, dvěma nebo třemi, substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nesubstituované nižší alkylové skupiny, trihalogenalkylové skupiny, nesubstituované nižší alkoxykupiny, halogenu a skupin –NR¹⁸R¹⁹. Reprezentativní acylové skupiny zahrnují, ale není to nikterak limitováno, acetyl, trifluoracetyl, benzoyl, atd.

Termín „aldehyd“ se vztahuje na acylovou skupinu, ve které substituent R'' je atom vodíku.

Termín „thioacylová skupina“ se vztahuje na skupinu –C(S)–R'', kde substituent R'' je definován v předloženém vynálezu.

Termín „ester“ se vztahuje na skupinu –C(O)O–R'', kde substituent R'' je definován v předloženém vynálezu vyjma toho, že substituent R'' nemůže být atom vodíku.

Termín „acetylová skupina“ se vztahuje na skupinu –C(O)CH₃.

Termín „halogen“ se vztahuje na fluor, chlor, brom nebo jod, výhodně fluor nebo chlor.

Termín „trihalogenmethyl“ se vztahuje na skupinu –CX₃, kde X je halogen definovaný v předloženém vynálezu.

Termín „trihalogenmethansulfonyl“ se vztahuje na skupiny X₃CS(=O)₂–, kde X má shora definovaný význam.

Termín „kyanoskupina“ se vztahuje na skupinu –C≡N.

Termín „methylenedioxykupina“ se vztahuje na skupinu –OCH₂O–, kde dva atomy kyslíku jsou vázány na sousedící atomy uhlíku.

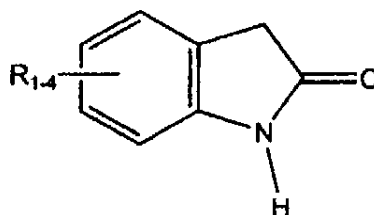
Termín „ethylenedioxykupina“ se vztahuje na –OCH₂CH₂O–, kde atomy kyslíku jsou vázány k sousedícím atomům uhlíku.

- Termín „*S*-sulfonamidoskupina“ se vztahuje na skupinu $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- 5 Termín „*N*-sulfonamidoskupina“ se vztahuje na skupinu $-\text{NR}^{18}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- Termín „*O*-karbamyl“ se vztahuje na skupinu $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- 10 Termín „*N*-karbamyl“ se vztahuje na skupinu $-\text{R}^{18}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- Termín „*O*-thiokarbamyl“ se vztahuje na skupinu $-\text{OC}(\text{S})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- 15 Termín „*N*-thiokarbamyl“ se vztahuje na skupinu $-\text{R}^{18}\text{OC}(\text{S})\text{NR}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- Termín „aminoskupina“ se vztahuje na skupinu $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou oba atomy vodíku.
- 20 Termín „*C*-amidoskupina“ se vztahuje na skupinu $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- 25 Termín „*N*-amidoskupina“ se vztahuje na skupinu $\text{R}^{18}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou definovány v předloženém vynálezu.
- Termín „nitroskupina“ se vztahuje na skupinu $-\text{NO}_2$.
- 30 Termín „halogenalkylová skupina“ se vztahuje na nesubstituovanou alkylovou skupinu, výhodně nesubstituovaná nižší alkylová skupina, mající význam definovaný výše, která je substituovaná jedním nebo více stejnými nebo rozdílnými atomy halogenu, např. $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$, atd.
- 35 Termín „aralkylová skupina“ se vztahuje na nesubstituovanou alkylovou skupinu, výhodně nesubstituovaná nižší alkylová skupina, mající význam definovaný v předloženém vynálezu, která je substituovaná arylou skupinou mající význam definovaný výše, např. $-\text{CH}_2\text{fenyl}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{fenyl}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{fenyl}$, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{fenyl}$, atd. a jejich deriváty.
- 40 Termín „heteroaralkylová skupina“ se vztahuje na nesubstituovanou alkylovou skupinu, výhodně nesubstituovaná nižší alkylová skupina, mající význam definovaný výše, která je substituovaná heteroarylovou skupinou, např. $-\text{CH}_2\text{-pyridinyl}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-pyrimidinyl}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{imidazolyl}$, atd. a jejich deriváty.
- 45 Termín „monoalkylaminoskupina“ se vztahuje na radikál $-\text{NHR}$, kde substituent R je nesubstituovaná alkylová skupina nebo nesubstituovaná cykloalkylová skupina mající význam definovaný výše, např. methylaminoskupina, (1-methylethyl)aminoskupina, cyklohexylaminoskupina, atd.
- 50 Termín „dialkylaminoskupina“ se vztahuje na radikál $-\text{NRR}$, kde každý substituent R je nezávisle nesubstituovaná alkylová skupina nebo nesubstituovaná cykloalkylová skupina mající význam definovaný výše, např. dimethylaminoskupina, diethylaminoskupina, (1-methylethyl)-ethylaminoskupina, cyklohexylmethylaminoskupina, cyklopentylmethylaminoskupina, atd.

Termín „kyanoalkylová skupina“ se vztahuje na nesubstituovanou alkylovou skupinu, výhodně nesubstituovaná nižší alkylová skupina mající význam definovaný výše, která je nesubstituovaná jednou nebo dvěma kyanoskupinami.

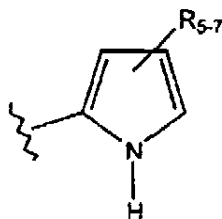
- 5 Termín „volitelný“ nebo „případně“ znamená, že následně popsaný případ nebo okolnost se může, ale nemusí, vyskytovat, a že popis zahrnuje situace, ve kterých se případ nebo okolnost vyskytuje, a situace, ve kterých se případ nebo okolnost nevyskytují. Například „heterocyklová skupina případně substituovaná alkylovou skupinou“ znamená, že alkylová skupina může, ale nemusí, být přítomná a popis zahrnuje situace, ve kterých heterocyklová skupina je substituovaná alkylovou skupinou, a situace, ve kterých heterocyklová skupina není substituovaná alkylovou skupinou.

Termín „2-indolinon“, „indolin-2-on“ a „2-oxindol“ jsou použitelné zaměnitelným způsobem a vztahují se na molekulu mající chemickou strukturu



15

Termín „pyrrol“ se vztahuje na molekulu mající chemickou strukturu:



20

Termíny „pyrrolem substituovaný 2-indolinon“ a „3-pyrrolidenyl-2-indolinon“ jsou zde zaměnitelné a vztahují se na chemickou sloučeninu mající obecnou strukturu zobrazenou obecným vzorcem I.

- Sloučeniny, které mají stejný molekulový vzorec, ale jsou odlišné v charakteru a sekvenci vazeb svých atomů nebo uspořádání svých atomů v prostoru, se nazývají „izomery“. Izomery, které jsou rozdílné v uspořádání svých atomů v prostoru, se nazývají „stereoizomery“. Stereoizomery, které nejsou zrcadlovým obrazem jeden druhého, se nazývají „diastereoizomery“, a ty jež jsou jeden druhému nekryjícím se zrcadlovým obrazem, se nazývají „enantiomery“. Pokud se v molekule sloučeniny nachází asymetrické centrum, např. k tomuto centru jsou připojeny čtyři rozdílné skupiny, může tato molekula existovat ve dvou enantiomerních formách. Enantiomer může být charakterizován absolutní konfigurací svého asymetrického centra a je popsán Cahnovým–Prelogovým pravidlem jako *R* a *S* nebo podle toho, jakým způsobem molekula stáčí rovinu polarizovaného světla (označení jako pravotočivá nebo levotočivá (+)–izomer, resp. (–)–izomer). Chirální sloučenina může existovat buď jako jednotlivý enantiomer, nebo jako směs enantiomerů. Směs obsahující stejná množství enantiomerů je nazývána „racemická směs“.

- 35 Sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou mít jedno nebo více asymetrických center, potom mohou být takové sloučeniny připraveny jako jednotlivé (*R*)– a (*S*)– stereoizomery nebo jako jejich směsi. Například pokud substituent R^6 ve sloučenině obecného vzorce I je 2-hydroxyethyl, pak uhlík, ke kterému je hydroxy skupina připojena, tvoří asymetrické centrum, a tudíž sloučenina obecného vzorce I může existovat jako (*R*)– nebo (*S*)– stereoizomer. Pokud není uvedeno jinak, pak popis nebo označení jednotlivých sloučenin v popisné části a patentových nárocích bude zahrnovat oba enantiomery a jejich směsi, racemické nebo jiné. Způsoby

stanovení stereochemie a separace stereoizomerů jsou standardně dobře známy (viz podrobnější diskuze v Chapter 4 of „Advanced Organic Chemistry“, 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992).

- 5 Sloučeniny obecného vzorce I mohou vykazovat tautomerii a strukturní izomerii. Například sloučeniny popisované zde mohou být označeny jako *E* nebo *Z* konfigurace na dvojné vazbě spojující 2-indolinonovou část s pyrrolovou částí nebo mohou být směs *E* a *Z* konfigurace. Předložený vynález zahrnuje jakoukoliv tautomerní nebo strukturní izomerní formu a jejich směsi, které mají schopnost modulace aktivity RTK, CTK a/nebo STK, a není nikterak omezen na jakoukoliv tautomerní nebo strukturní izomerní formu.

- 10 Termín „farmaceutický přípravek“ se vztahuje na směs jedné nebo více zde popisovaných sloučenin nebo jejich fyziologicky/farmaceuticky přijatelné soli nebo proléčiva společně s dalšími chemickými komponentami, např. fyziologicky/farmaceuticky přijatelnými nosiči a excipienty. Účel farmaceutického přípravku je usnadnit podání sloučeniny do organismu.

- 15 Sloučenina obecného vzorce I může také účinkovat jako proléčivo. Termín „proléčivo“ se vztahuje na látku, která se *in vivo* přeměňuje na vlastní léčivo. Proléčiva jsou často výhodná, protože v některých případech mohou být snadněji podávána než vlastní léčivo. Mohou být např. biologicky dostupné perorálním podáním, zatímco vlastní léčivo nikoliv. Ve farmaceutických přípravcích může mít proléčivo také zlepšenou rozpustnost než vlastní léčivo. Příkladem, ale bez omezení, proléčiva by byla sloučenina podle předloženého vynálezu, která je podávána jako ester („proléčivo“) k usnadnění přenosu přes buněčnou membránu, kde rozpustnost ve vodě je na škodu mobility, ale pak je metabolicky hydrolyzována na karboxylovou kyselinu, vlastní účinnou sloučeninu, jakmile je uvnitř buňky, kde je rozpustnost ve vodě prospěšná.

- 20 Dalším příkladem proléčiva může být krátký polypeptid, například, bez omezení, polypeptid o 2 až 10 aminokyselinových, vázaný přes terminální aminoskupinu ke karboxyskupině sloučeniny podle předloženého vynálezu, kde polypeptid je hydrolyzován nebo metabolizován *in vivo* k uvolnění aktivní molekuly. Proléčiva sloučeniny podle předloženého vynálezu I spadají do rozsahu předloženého vynálezu.

- 30 Navíc se uvažuje, že sloučenina obecného vzorce I by byla metabolizována enzymy v organismu, např. lidském, na metabolit, který může modulovat aktivitu proteinkináz. Tyto metabolity spadají rovněž do rozsahu předloženého vynálezu.

- Termín „fyziologicky/farmaceuticky přijatelný nosič“ se vztahuje na nosič nebo ředidlo, které nezpůsobuje významné podráždění organismu a nenarušuje biologickou aktivitu a vlastnosti podávané sloučeniny.

- 40 Termín „farmaceuticky přijatelná excipient“ se vztahuje na inertní látku přidávanou do farmaceutického přípravku k dalšímu usnadnění podání sloučeniny. Příklady excipientů, bez omezení, zahrnují uhličitán vápenatý, fosforečnan vápenatý, různé cukry a typy škrobů, deriváty celulózy, želatinu, rostlinné oleje a polyethylenglykoly.

- 45 Termín „farmaceuticky přijatelná sůl“, jak je používán v předloženém vynálezu, se vztahuje na ty soli, které si uchovávají biologickou účinnost a vlastnosti mateřské sloučeniny. Tyto soli zahrnují:

- 50 (1) adiční soli s kyselinou, které jsou připraveny reakcí volné báze mateřské sloučeniny s anorganickými kyselinami, např. s kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou dusičnou, kyselinou fosforečnou, kyselinou sírovou a kyselinou chloristou, atp., nebo s organickými kyselinami, např. s kyselinou octovou, kyselinou šťavelovou, (D) nebo (L) kyselinou jablečnou, kyselinou maleinovou, kyselinou methansulfonovou, kyselinou ethansulfonovou, kyselinou *p*-toluensulfonovou, kyselinou salicylovou, kyselinou vinnou, kyselinou citronovou,

kyselinou jantarovou nebo kyselinou malonovou, atp., výhodně kyselinou chlorovodíkovou nebo kyselinou (L)-jablečnou, např. jako L-malátová sůl (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny; nebo

- 5 (2) soli připravené buď nahrazením kyselého protonu přítomného v mateřské sloučenině iontem kovu, např. ion alkalického kovu, ion alkalických zemin nebo hlinitý ion; anebo koordinací s organickou bází, např. ethanolaminem, diethanolaminem, triethanolaminem, tromethaminem, N-methylglukaminem, atd.

- 10 Termín „PK“ se vztahuje na receptorovou proteinovou tyrosinkinázu (RTK), nereceptorovou nebo „buněčnou“ tyrosinkinázu (CTK) a serin-threoninkinázu (STK).

- Termín „způsob“ se vztahuje na způsoby, prostředky, techniky a procedury pro dosažení uvede-
ného záměru, včetně, ale není to nikterak limitováno, způsobů, prostředků, technik a procedur
15 buď známých, nebo snadno vyvinutelných ze známých způsobů, prostředků, technik a procedur odborníky v chemických, farmaceutických, biologických, biochemických a lékařských oborech.

- Termín „modulace“ nebo „modulující“ se vztahuje na změnu katalytické aktivity RTK, CTK a STK. Konkrétně se modulace vztahuje na aktivaci katalytické aktivity RTK, CTK a STK, výhodně aktivaci nebo inhibici katalytické aktivity RTK, CTK a STK, v závislosti na koncentraci
20 sloučeniny nebo soli, které jsou RTK, CTK nebo STK vystaveny nebo, výhodněji inhibici katalytické aktivity, RTK, CTK a STK.

- Termín „katalytická aktivita“ se vztahuje na míru fosforylace tyrosinu za vlivu, přímého či nepřímého, RTK a/nebo CTK nebo fosforylace serinu a threoninu za vlivu, přímého či nepřímého,
25 STK.

- Termín „uvedení v kontakt“ se vztahuje na uvedení sloučeniny podle předloženého vynálezu a cílové PK v kontakt takovým způsobem, aby sloučenina mohla ovlivnit katalytickou aktivitu PK, buď přímo, tzn. interakcí se samotnou kinázou, nebo nepřímo, tzn. interakcí s další moleku-
30 lou, na které je katalytická aktivita kinázy závislá. Takové „uvedení v kontakt“ může být dosaženo „*in vitro*“, tzn. ve zkumavce, petriho misce, atd. Ve zkumavce může uvedení v kontakt zahrnovat pouze sloučeniny a PK dle výběru nebo může zahrnovat celé buňky. Buňky mohou být také udržovány nebo pěstovány v miskách ke kultivaci buněk a uvedeny v kontakt se sloučeninou
35 v tomto prostředí. V této souvislosti může být schopnost jednotlivé sloučeniny ovlivňovat poruchy související s PK, tzn. hodnota IC_{50} sloučeniny, definovaná níže, stanovena před použitím sloučenin *in vivo* s komplexnějšími živými organizmy. Pro buňky mimo organismus existuje mnoho způsobů, a jsou dobře známy odborné veřejnosti, včetně toho, jak uvést sloučeniny v kontakt, včetně, ale není to nikterak limitováno, přímé buněčné mikroiinjekce a mnoho technik
40 s transmembránovým nosičem.

Termín „*in vitro*“ se vztahuje na způsoby prováděné v umělém prostředí, například, ale není to nikterak limitováno, ve zkumavce nebo kultivačním médiu.

- 45 Termín „*in vivo*“ se vztahuje na způsoby prováděné v živém organismu, například, ale není to nikterak limitováno, v myším potkaním nebo králíci.

- Termíny „porucha související s PK“, „porucha řízená PK“ a „abnormální aktivita PK“ se všechny vztahují na stav charakterizovaný nepřiměřenou, tzn. sníženou nebo většinou zvýšenou katalytic-
50 kou aktivitou PK, kde jednotlivé PK mohou být RTK, CTK nebo STK. Nepřiměřená katalytická aktivita může vznikat jako výsledek buď: (1) exprese PK v buňkách, které normálně neexprimují PK, (2) zvýšené exprese PK, která vede k nežádoucí buněčné proliferaci, diferenciaci a/nebo růstu, nebo (3) snížené exprese PK, která vede k nežádoucím redukcím v buněčné proliferaci, diferenciaci a/nebo růstu. Nadměrná aktivita PK poukazuje na buď amplifikaci genu kódujícího
55 konkrétní PK, nebo produkci hladiny aktivity PK, které může korelovat s buněčnou proliferací,

diferenciaci a/nebo růstovou poruchou (tzn. zvyšováním hladiny PK se zvyšuje síla jednoho nebo více symptomů buněčné poruchy). Snížená aktivita samozřejmě znamená opak, tj. síla jednoho nebo více symptomů buněčné poruchy se zvyšuje se snižující se hladinou aktivity PK.

5 Termín „ošetření“ se vztahuje na způsob zmírnění nebo odstranění buněčné poruchy zprostředkované PK a/nebo jejích doprovodných symptomů. Konkrétně, co se týče rakoviny, znamenají tyto jednoduché termíny, že délka života pacienta ovlivněná rakovinou bude prodloužena, nebo že jeden nebo více symptomů onemocnění bude redukován.

10 Termín „organizmus“ se vztahuje na živou entitu sestávající se z alespoň z jedné buňky. Živý organizmus může být tak jednoduchý jako např. jednoduchá eukaryotická buňka, nebo tak komplexní jako savec, včetně lidí.

15 Termín „terapeuticky účinné množství“ se vztahuje na takové množství podávané sloučeniny, které zmírňuje jeden nebo více symptomů ošetřované poruchy. Co se týče rakoviny, tak terapeuticky účinné množství se vztahuje na množství, která má následující účinek:

- (1) snižuje velikost nádoru;
- 20 (2) inhibuje (tzn. zpomaluje do určité míry, výhodně zastavuje) metastázy nádoru;
- (3) inhibuje (tzn. zpomaluje do určité míry, výhodně zastavuje) růst nádoru a/nebo
- (4) zmírňuje do určité míry (nebo výhodně eliminuje) jeden nebo více symptomů souvisejících s
- 25 rakovinou.

Termín „monitorování“ znamená sledování nebo detekci účinku po uvedení sloučeniny v kontakt s buňkou exprimující konkrétní PK. Pozorovaný či detegovaný účinek může být změna buněčného fenotypu, katalytické aktivity PK nebo změna interakce PK s přirozeným vazebným partnerem. Techniky pozorování nebo detekce takových účinků jsou známy v oboru.

35 Výše citovaný účinek je vybrán ze změny nebo absence změny buněčného fenotypu, změny nebo absence změny katalytické aktivity uvedené proteinkinázy nebo změny nebo absence změny interakce uvedené proteinkinázy s přirozeným vazebným partnerem v konečném aspektu předloženého vynálezu.

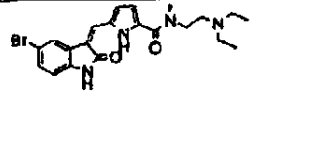
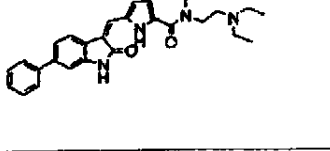
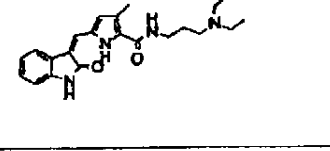
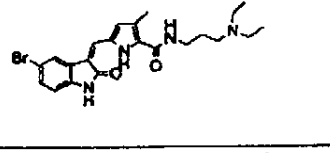
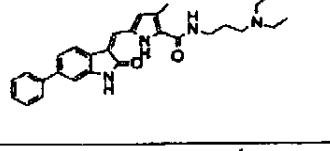
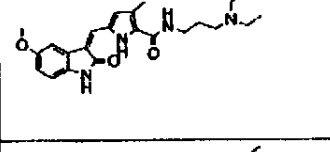
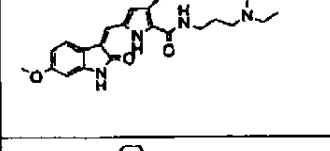
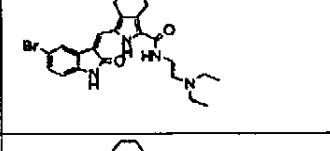
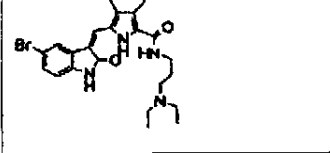
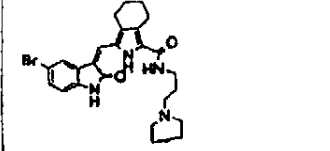
40 Termín „buněčný fenotyp“ se vztahuje na vnější projev buňky nebo tkáně nebo biologické funkce buňky nebo tkáně. Příklady buněčného fenotypu zahrnují, ale není to nikterak limitováno, velikost buňky, její růst, proliferaci, diferenciaci, přežití, apoptózu a nutriční příjem a použití. Tyto fenotypické charakteristiky jsou měřitelné technikami známými v oboru.

45 Termín „přirozený vazebný partner“ se vztahuje na polypeptid, který se váže na konkrétní PK v buňce. Přirozené vazebné partnery mohou hrát důležitou roli při propagaci signálu při procesech signální transdukce zprostředkované PK. Samotná změna interakce přirozeného vazebného partnera s PK může projevovat jako zvýšená nebo snížená koncentrace komplexu PK/přirozeného vazebného partnera a v důsledku toho jako pozorovatelná změna schopnosti PK zprostředkovat signální transdukci.

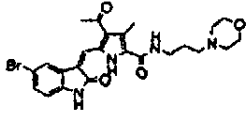
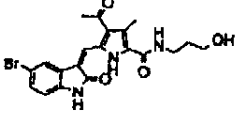
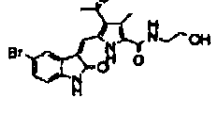
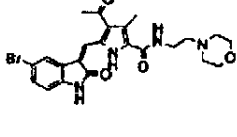
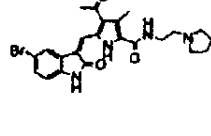
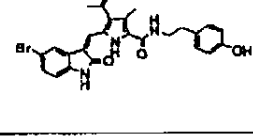
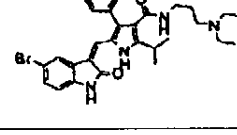
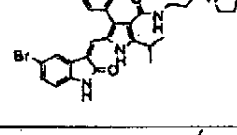
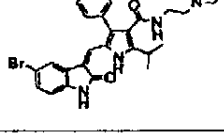
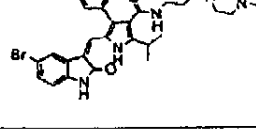
Názorné sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou uvedeny v tabulce I níže.

Tabulka 1

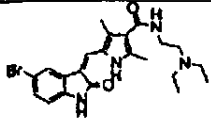
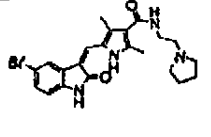
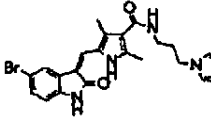
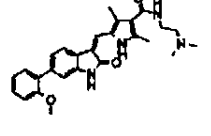
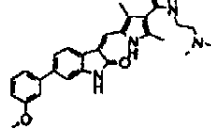
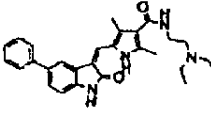
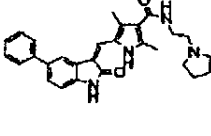
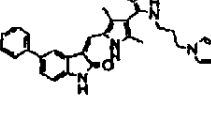
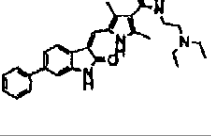
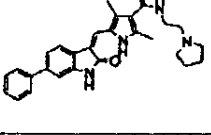
Příklad	Struktura	Název
1		4-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina
2		4-methyl-5-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina
3		methylester 4-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
4		ethylester 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
5		5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina
6		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
7		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
8		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
9		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

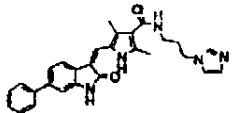
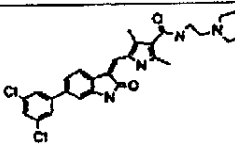
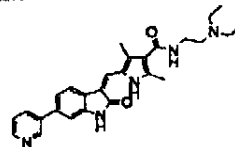
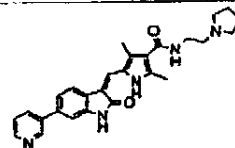
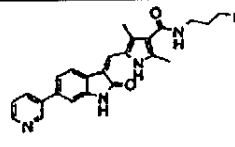
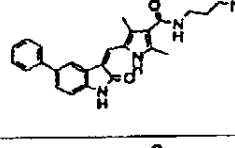
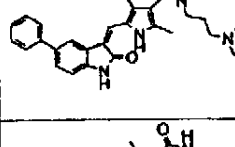
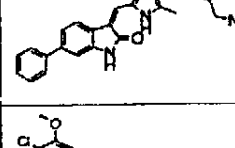
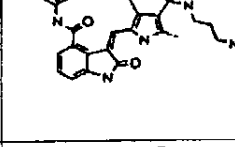
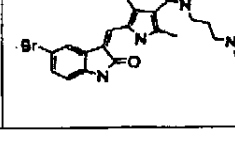
10		(2-diethylaminoethyl)methylamid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
11		(2-diethylaminoethyl)methylamid 5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
12		(3-diethylaminopropyl)amid 3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
13		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
14		(3-diethylaminopropyl)amid 3-methyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
15		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
16		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
17		(2-diethylaminoethyl)amid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
18		(3-diethylaminopropyl)amid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
19		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny

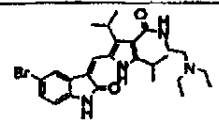
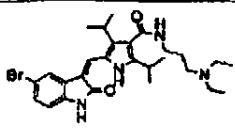
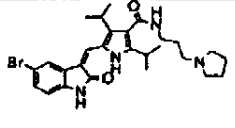
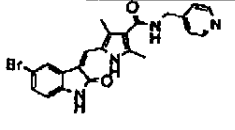
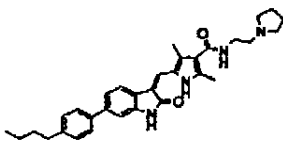
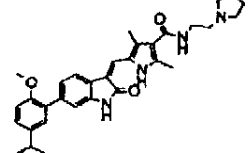
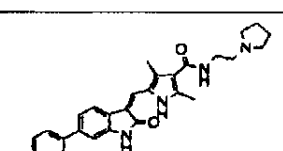
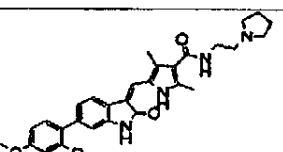
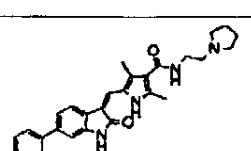
20		(2-diethylaminoethyl)amid 3-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
21		(3-diethylaminopropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
22		(3-morfolin-4-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
23		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
24		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
25		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-3-methyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
26		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
27		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
28		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
29		(3-diethylaminopropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
30		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

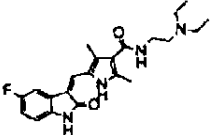
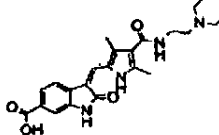
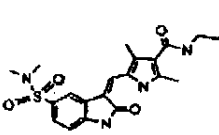
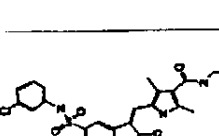
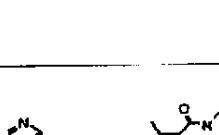
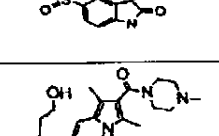
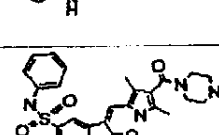
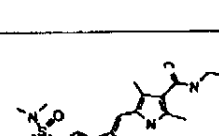
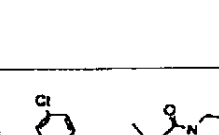
31		(3-morfolin-4-ylpropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
32		(3-hydroxypropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
33		(2-hydroxyethyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
34		(2-morfolin-4ylethyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
35		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
36		[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny
37		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
38		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
39		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
40		[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

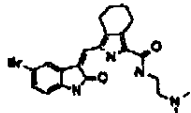
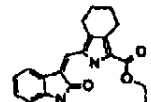
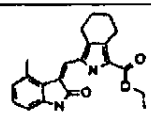
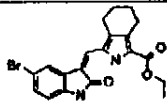
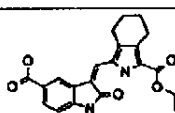
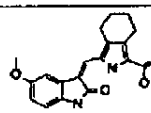
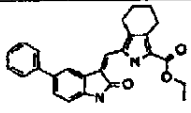
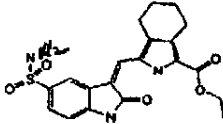
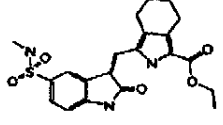
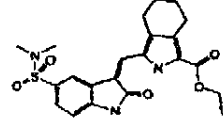
41		5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylová kyselina
42		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
43		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(2-methoxy-fenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
44		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
45		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(2-methoxy-fenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
46		ethylester 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
47		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
48		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
49		(2-dimethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
50		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny

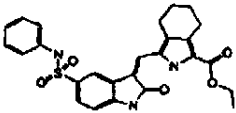
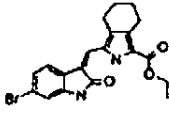
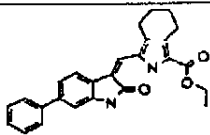
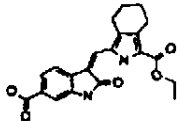
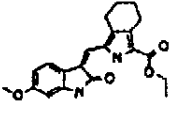
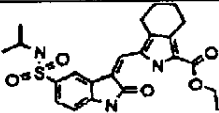
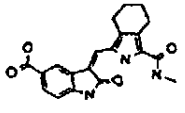
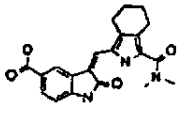
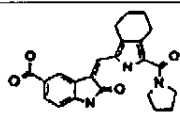
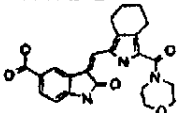
51		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
52		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
53		(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
54		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
55		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(3-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
56		(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
57		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
58		(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
59		(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
60		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny

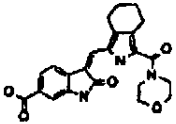
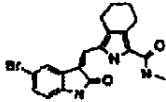
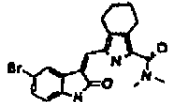
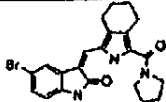
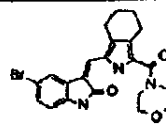
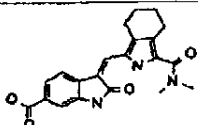
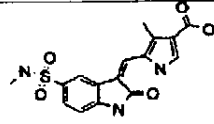
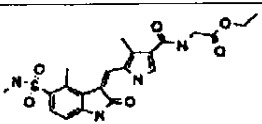
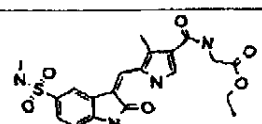
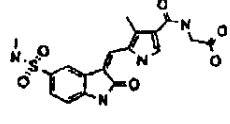
61		(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
62		(2-diethylaminoethyl)amid 5-[6-(3,5-dichlorofenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
63		(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
64		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
65		(3-dimethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
66		(3-dimethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
67		(3-diethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
68		(3-diethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-phenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
69		(3-chlor-4-methoxyfenyl)amid 3-[4-(3-diethylamino propylkarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-4-karboxylové kyseliny
70		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

71		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diizopropyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
72		(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diizopropyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
73		(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-diizopropyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
74		(pyridin-4-ylmethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
75		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(4-butylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
76		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(5-izopropyl-2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
77		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(4-ethylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
78		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(2,4-dimethoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
79		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(3-izopropylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

80		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
81		3-[4-(2-diethylaminoethylkarbamoyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylová kyselina
82		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
83		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[5-(3-chlorfenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
84		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-5-(pyridin-3-ylsulfamoyl)-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
85		3-[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-4-(2-hydroxyethyl)-1,3-dihydroindol-2-on
86		fenylamid 3-[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny
87		(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
88		(2-diethylaminoethyl)amid 5-[5-(3-chlorfenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

89		(2-dimethylaminoethyl)amid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
90		ethylester 3-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
91		ethylester 3-(4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
92		ethylester 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
93		3-(3-ethoxykarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-karboxylová kyselina
94		ethylester 3-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
95		ethylester 3-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
96		ethylester 3-(2-oxo-5-sulfamoyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
97		ethylester 3-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
98		ethylester 3-(5-dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny

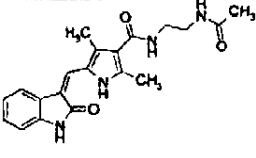
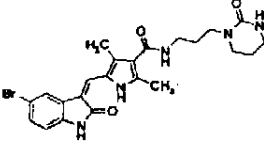
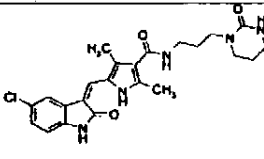
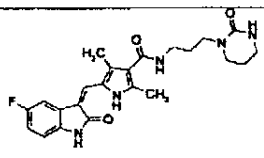
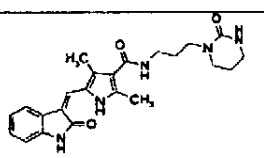
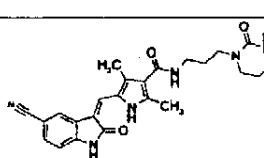
99		ethylester 3-(2-oxo-5-fenylsulfamoyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
100		ethylester 3-(6-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
101		ethylester 3-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
102		3-(3-ethoxykarbonyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylová kyselina
103		ethylester 3-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
104		ethylester 3-(5-izopropylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenemethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
105		3-(3-methylkarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-karboxylová kyselina
106		3-(3-dimethylkarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-karboxylová kyselina
107		2-oxo-3-[3-(pyrrolidin-1-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-2,3-dihydro-1H-indol-5-karboxylová kyselina
108		3-[3-(morfolin-4-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-karboxylová kyselina

109		3-[3-(morfolin-4-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylová kyselina
110		methylamid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
111		dimethylamid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny
112		5-brom-3-[3-(pyrrolidin-1-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-1,3-dihydroindol-2-on
113		5-brom-3-[3-(pyrrolidin-4-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-1,3-dihydroindol-2-on
114		3-(3-dimethylkarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylové kyseliny
115		4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
116		ethylester {[4-methyl-5-(4-methyl-5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino } octové kyseliny
117		ethylester {[4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino } octové kyseliny
118		{[4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino } octová kyselina

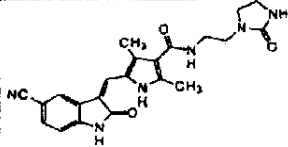
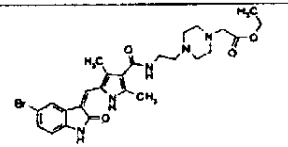
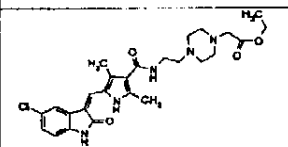
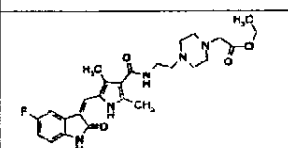
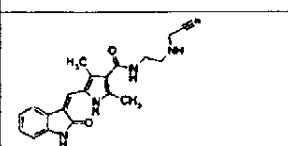
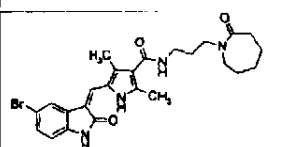
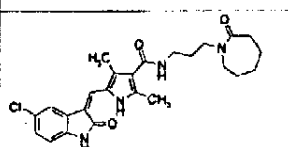
119		methylamid 3-[3-methyl-4-(piperidin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny
120		5-methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
121		ethylester 5-methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
122		ethylester 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
123		2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
124		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
125		(2-diethylaminoethyl)amid 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

126		(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-5-karboxylové kyseliny	381 [M + 1]
127		(2-diethylaminoethyl)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	415 [M + 1]

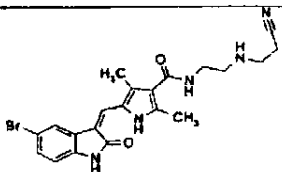
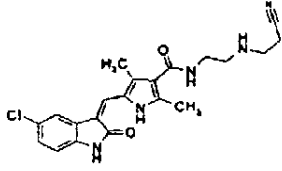
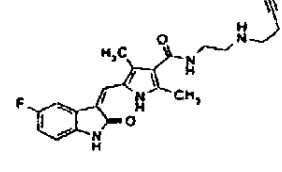
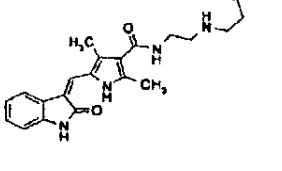
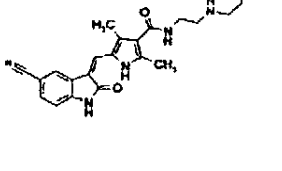
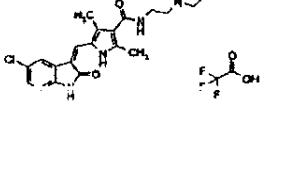
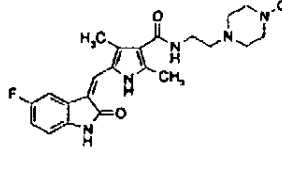
128		(2-pyrrolidin-1-ethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	379 [M + 1]
129		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	397 [M + 1]
130		(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	413 [M + 1]
131		(2-dimethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	353 [M + 1]
132		(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	371 [M + 1]
133		(2-acetylaminoethyl)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	399 [M - 1]
134		(2-acetylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	383 [M - 1]

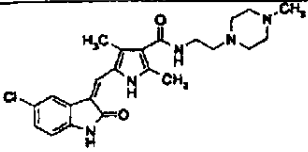
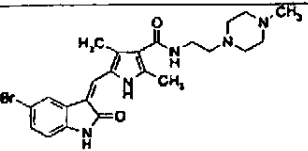
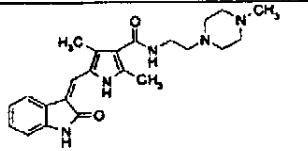
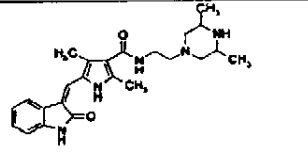
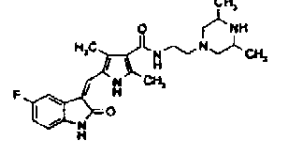
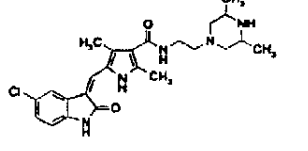
135		(2-acetylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	365 [M - 1]
136		[3-(2-oxotetrapyrimidin-1-yl)-propyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	500 [M + 1] 502 [M + 1]
137		[3-(2-oxotetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	454 [M - 1]
138		[3-(2-oxotetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	438 [M - 1]
139		[3-(2-oxotetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	422 [M + 1]
140		[3-(2-oxotetrahydropyrimidin-1-yl)-propyl]amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	447 [M + 1]

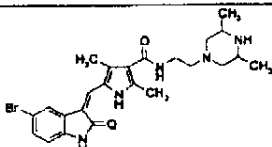
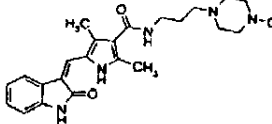
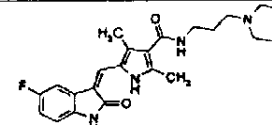
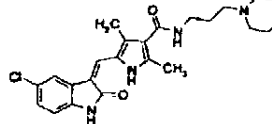
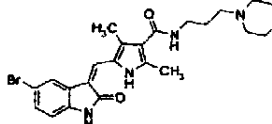
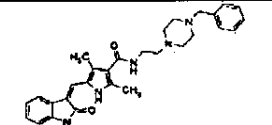
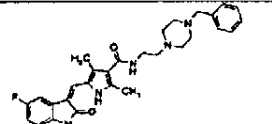
141		trifluoracetát-4-[2-((5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karbonyl)amino)ethyl]-2-oxopiperazin-1-ium	486 [M + 1] 488 [M + 1]
142		[3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propyl]-amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	430 [M - 1]
143		[2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	470 [M - 1] 472 [M - 1]
144		[2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	428 [M + 1]
145		[2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	412 [M + 1]
146		[2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethyl]-amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	392 [M - 1]

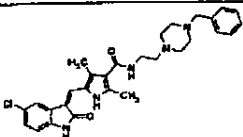
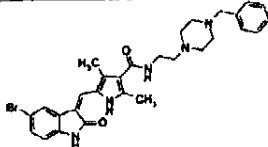
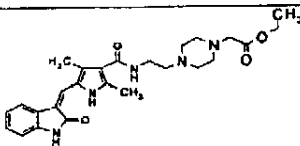
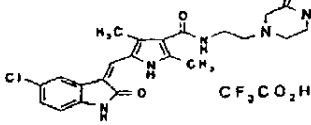
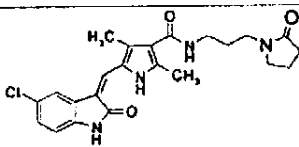
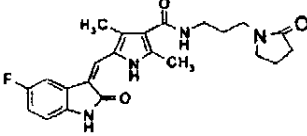
147		[2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	419 [M + 1]
148		ethylester {4-[2-({5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-piperazin-1-yl}octové kyseliny	558 [M + 1] 560 [M + 1]
149		ethylester {4-[2-({5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-piperazin-1-yl}octové kyseliny	514 [M + 1]
150		ethylester {4-[2-({5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-piperazin-1-yl}octové kyseliny	498 [M + 1]
153		[2-(kyanomethylamino)ethyl]-amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	362 [M - 1]
154		[3-(2-oxoazepan-1-yl)propyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	511 [M - 1] 513 [M - 1]
155		[3-(2-oxoazepan-1-yl)propyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-	469 [M + 1]

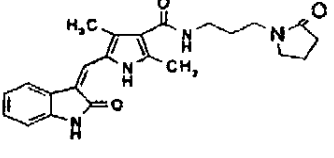
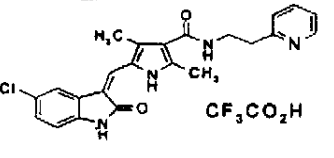
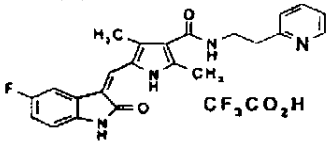
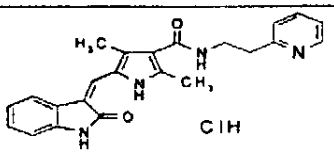
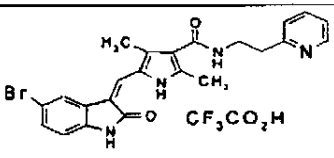
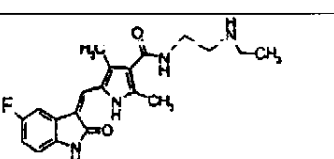
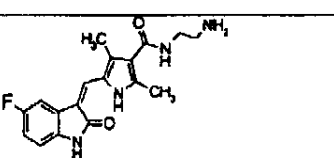
		pyrrol-3-karboxylové kyseliny	
156		[3-(2-oxoazepan-1-yl)propyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	453 [M + 1]
157		[3-(2-oxoazepan-1-yl)propyl]amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro- indol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol- 3-karboxylové kyseliny	435 [M + 1]
158		[3-(2-oxoazepan-1-yl)propyl]amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	460 [M + 1]
159		(2-acetylamineethyl)amid 5-[5- brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)- ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	443 [M - 1] 445 [M - 1]
160		Trifluoracetát-4-[2-({5-[5-fluor-2- oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)- ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-2- oxopiperazin-1-ium;	426 [M + 1]
161		trifluoracetát-4-[2-({2,4-dimethyl-5- [2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)- ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3- karbonyl}amino)ethyl]-2-oxo- piperazin-1-ium;	408 [M + 1]
162		trifluoracetát-4-[2-({5-[5-kyano-2- oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)- ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-2- oxopiperazin-1-ium;	433 [M + 1]

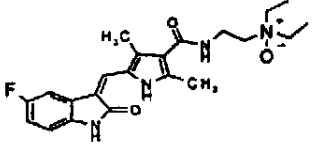
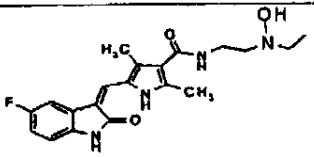
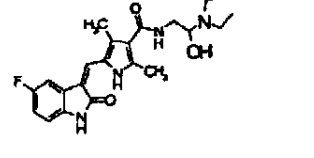
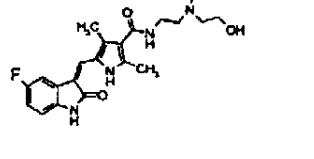
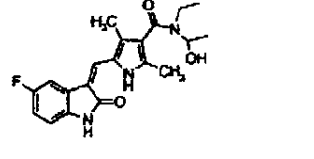
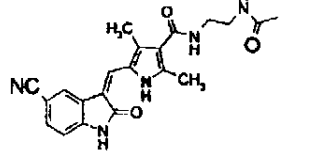
		oxopiperazin-1-ium;	
163		[2-(2-kyanoethylamino)ethyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	454 [M - 1] 456 [M - 1]
164		[2-(2-kyanoethylamino)ethyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	410 [M - 1]
165		[2-(2-kyanoethylamino)ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	394 [M - 1]
166		[2-(2-kyanoethylamino)ethyl]amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydro- indol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol- 3-karboxylové kyseliny	376 [M - 1]
167		[2-(2-kyanoethylamino)ethyl]amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karboxylové kyseliny	401 [M - 1]
168		trifluoracetát-4-[2-({5-[5-chlor-2- oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)- ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H- pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-2- oxopiperazin-1-ium;	440 [M - 1]
168		[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]- amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydro- indol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4- dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	424 [M - 1]

169		[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	440 [M - 1]
170		[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	484 [M - 1] 486 [M - 1]
171		[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 2,4-dimethyl-5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	406 [M - 1]
172		[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-ethyl]amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	422 [M + 1]
173		[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	438 [M - 1]
174		[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-ethyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	456 [M + 1]

175		[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-ethyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	498 [M - 1] 500 [M - 1]
176		[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	422 [M + 1]
177		[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	438 [M - 1]
178		[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	454 [M - 1]
179		[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]-amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	498 [M - 1] 500 [M - 1]
180		[2-(4-benzylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny	482 [M - 1]
181		[2-(4-benzylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-	500 [M - 1]

		dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	
182		[2-(4-benzylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	517 [M - 1]
183		[2-(4-benzylpiperazin-1-yl)ethyl]-amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	560 [M - 1] 562 [M - 1]
184		(3-pyrrolidin-1-yl-2-on)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	480 [M + 1]
185		trifluoracetát 4-[2-({5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karbonyl}amino)ethyl]-2-oxopiperazin-1-ium;	440 [M - 1]
186		(3-pyrrolidin-1-yl-2-on)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	
187		(3-pyrrolidin-1-yl-2-on)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny	

188		(3-pyrrolidin-1-yl-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
189		(2-pyridin-2-ylethyl)amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
190		Trifluoroctová sůl (2-pyridin-2-ylethyl)amidu 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
191		hydrochlorid (2-pyridin-2-ylethyl)amidu 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
192		Trifluoroctová sůl (2-pyridin-2-ylethyl)amidu 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
193		(2-ethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
194		(2-aminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

195		(2-diethyl- <i>N</i> -oxoaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol- (3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-2,4- dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
196		(2-ethyl- <i>N</i> -hydroxyaminoethyl)- amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydro- indol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4- dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
197		(2-diethylamino-2-hydroxyethyl)- amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydro- indol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]-2,4- dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3-karboxylové kyseliny
198		[2-ethyl-2-(2-hydroxyethyl)amino- ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2- dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]- 2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3- karboxylové kyseliny
199		[2-ethyl-2-(1-hydroxyethyl)amino- ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2- dihydroindol-(3 <i>Z</i>)-ylidenmethyl]- 2,4-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-3- karboxylové kyseliny
200		(2- <i>N</i> -acetylaminoethyl)amid 5-[5- kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3 <i>Z</i>)- ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1 <i>H</i> - pyrrol-3-karboxylové kyseliny

201		(karboxymethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
202		[2-(2-hydroxyethylamino)ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
203		trifluoracetát (2-pyridin-2-ylethyl)-amidu 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny
204		trifluoracetát (3-pyrrolidin-1-yl-2-onpropyl)amidu 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Číslo sloučenin odpovídají číslům příkladů v příkladech provedení vynálezu, tj. syntéza sloučeniny 1 v tabulce 1 je popsána v příkladu 1. Sloučeniny uvedené v tabulce 1 mají pouze ilustrativní charakter a nemají nikterak limitovat jakýmkoliv způsobem rozsah předloženého vynálezu.

Výhodná provedení

Zatímco nejširší definice byla podána v podstatě vynálezu, výhodné jsou určité sloučeniny obecního vzorce I uvedené níže.

- (1) Výhodná skupina sloučenin obecního vzorce I je taková, kde substituenty R^1 , R^2 a R^4 jsou atom vodíku.
- (2) Další výhodná skupina sloučenin obecního vzorce I je taková, kde substituenty R^1 , R^2 a R^4 jsou atom vodíku.
- (3) Další výhodná skupina sloučenin obecního vzorce I je taková, kde substituenty R^1 , R^2 a R^3 jsou atom vodíku.
- (4) Další výhodná skupina sloučenin obecního vzorce I je taková, kde substituenty R^2 , R^3 a R^4 jsou atom vodíku.
- (5) Další výhodná skupina sloučenin obecního vzorce I je taková, kde substituenty R^1 , R^2 , R^3 a R^4 jsou atom vodíku.

- (6) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituenty R^5 , R^6 nebo substituent R^7 , výhodně substituent R^5 nebo R^6 , výhodněji substituent R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, kde:

substituent R^{11} je atom vodíku nebo nižší nesubstituovaná alkylová skupina, výhodně atom vodíku nebo methyl;

n je 2, 3 nebo 4, výhodně 2 nebo 3; a

substituent R^{12} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle alkylová skupina, výhodněji nižší nesubstituovaná nižší alkylová skupina nebo substituenty R^{13} a R^{14} spojeny dohromady tvoří skupinu vybranou z $-(\text{CH}_2)_4-$, $-(\text{CH}_2)_5-$, $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ nebo $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$, výhodně substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle atom vodíku, methyl, ethyl nebo spojeny dohromady tvoří morfolin-4-yl, pyrrolidin-1-yl, piperazin-1-yl nebo 4-methylpiperazin-1-yl.

Výhodněji je substituent R^5 nebo R^6 v bodě (6) výše *N*-(2-dimethylaminoethyl)aminokarbonyl, *N*-(2-ethylaminoethyl)-*N*-methylaminokarbonyl, *N*-(3-dimethylaminopropyl)aminokarbonyl, *N*-(2-diethylaminoethyl)aminokarbonyl, *N*-(3-ethylaminopropyl)aminokarbonyl, *N*-(3-diethylaminopropyl)aminokarbonyl, 3-pyrrolidin-1-ylpropylaminokarbonyl, 3-morfolin-4-ylpropylaminokarbonyl, 2-pyrrolidin-1-ylethylaminokarbonyl, 2-morfolin-4-ylethylaminokarbonyl, 2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethylaminokarbonyl, 2-(4-methylpiperazin-1-yl)propylaminokarbonyl, 2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethylaminokarbonyl nebo 2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)propylaminokarbonyl, ještě výhodněji *N*-(2-diethylaminoethyl)aminokarbonyl nebo *N*-(2-ethylaminoethyl)aminokarbonyl.

- (7) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituenty R^5 , R^6 nebo R^7 , výhodně substituenty R^5 nebo R^6 , výhodněji substituent R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je alkylová skupina, výhodně nižší alkylová skupina substituovaná hydroxyskupinou, arylová, heteroarylová, heteroalicyklická skupina nebo karboxyskupina, výhodněji methyl, ethyl, propyl nebo butyl substituovaný hydroxyskupinou, arylová skupina, heteroalicyklická skupina, např. piperidin, piperazin, morfolin, atd., heteroarylová skupina nebo karboxyskupina. Ještě výhodněji v rámci této skupiny (7) je substituent R^5 nebo R^6 2-ethoxykarbonylmethylaminokarbonyl, karboxymethylaminokarbonyl, 3-hydroxypropylaminokarbonyl, 2-hydroxyethylaminokarbonyl, 3-triazin-1-ylpropylaminokarbonyl, triazin-1-ylethylaminokarbonyl, 4-hydroxyfenylethylaminokarbonyl, 3-imidazol-1-ylpropylaminokarbonyl, pyridin-4-ylmethylaminokarbonyl, 2-pyridin-2-ylethylaminokarbonyl nebo 2-imidazol-1-ylethylaminokarbonyl.

- (8) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituenty R^5 , R^6 nebo R^7 , výhodně substituenty R^5 nebo R^6 , výhodněji substituent R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, kde:

substituent R^{11} je atom vodíku nebo alkylová skupina, výhodně atom vodíku nebo methyl;

n je 2, 3 nebo 4, výhodně 2 nebo 3; a

substituent R^{12} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituenty R^{13} a R^{14} spojeny dohromady tvoří heterocykl, výhodně 5, 6 nebo 7 členný heterocykl obsahující karbonylovou skupinu a 1 nebo 2 atomy dusíku. Výhodně substituent R^5 nebo R^6 je 2-(3-ethoxykarbonylmethylpiperazin-1-yl)ethylaminokarbonyl, 2-(3-oxopiperazin-1-yl)ethylaminokarbonyl, 2-(imidazolidin-1-yl-2-on)ethylaminokarbonyl, 2-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-on)ethylaminokarbonyl, 2-(2-oxopyrrolidin-1-yl)ethylaminokarbonyl, 3-(4-methylpiperazin-1-yl)propylaminokarbonyl, 3-(3-ethoxykarbonylmethylpiperazin-1-yl)propylaminokarbonyl, 3-(3-oxopiperazin-1-yl)propylaminokarbonyl, 3-(imidazolidin-1-yl-2-on)propylaminokarbonyl, 3-(tetrahydropyrimidin-1-yl-2-on)propylaminokarbonyl, 3-(2-oxopyrrolidin-1-yl)propylaminokarbo-

nyl, 2-(2-oxohomopiperidin-1-yl)ethylaminokarbonyl nebo 3-(2-oxohomopiperidin-1-yl)propylaminokarbonyl.

- (9) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituent R^5 , R^6 nebo R^7 , výhodně substituent R^5 nebo R^6 , výhodněji substituent R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde:

(a) substituent R^{10} je $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, kde:

substituent R^{11} je atom vodíku nebo alkylová skupina, výhodně atom vodíku nebo methyl;

n je 2, 3 nebo 4, výhodně 2 nebo 3; a

- substituent R^{12} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je kyanoalkyl nebo $-\text{NHCOR}^a$, kde substituent R^a je alkylová skupina;

nebo

- (b) substituent R^{10} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituenty R^{13} a R^{14} spojeny dohromady tvoří heterocykl neobsahující karbonylovou skupinu v rámci kruhu. Výhodně substituent R^5 nebo R^6 je 2-(2-kyanoethylamino)ethylaminokarbonyl, 2-(acetylamo)ethylaminokarbonyl, morfolinokarbonyl, piperidin-1-ylkarbonyl, 2-kyanomethylaminoethylaminokarbonyl nebo piperidin-1-ylkarbonyl.

- (10) Další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituent R^5 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je nižší alkylová skupina substituovaná hydroxyskupinou, nižší alkylová skupina substituovaná hydroxyalkylaminoskupinou, karboxyskupina nebo $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou nezávisle atom vodíku nebo nižší nesubstituovaná alkylová skupina, výhodněji substituent R^5 je 2-[(diethylamino)-2-hydroxyethyl]aminokarbonyl, 2-(*N*-ethyl-*N*-2-hydroxyethylamino)ethylaminokarbonyl, karboxymethylaminokarbonyl, nebo 2-(2-hydroxyethylamino)ethylaminokarbonyl.

- (11) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, substituent kde R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je nižší alkylová skupina substituovaná hydroxyskupinou, nižší alkylová skupina substituovaná hydroxyalkylaminoskupinou, karboxyskupina nebo $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, kde substituenty R^{18} a R^{19} jsou nezávisle atom vodíku nebo nižší nesubstituovaná alkylová skupina, výhodněji substituent R^6 je [2-(diethylamino)-2-hydroxy]ethylaminokarbonyl, 2-(*N*-ethyl-*N*-2-hydroxyethylamino)ethylaminokarbonyl, karboxymethylaminokarbonyl nebo 2-(2-hydroxyethylamino)ethylaminokarbonyl.

- (12) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituent R^5 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, kde substituent R^{12} je $-\text{N}^+(\text{O})\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ nebo $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$, kde substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nesubstituované nižší alkylové skupiny, výhodně substituent R^5 je 2-(*N*-hydroxy-*N*-ethylamino)ethylaminokarbonyl nebo 2- $[\text{N}^+(\text{O})(\text{C}_2\text{H}_5)_2]$ ethylaminokarbonyl.

- (13) Ještě další výhodná skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde substituent R^6 je $-\text{COR}^{10}$, kde substituent R^{10} je $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, kde substituent R^{12} je $-\text{N}^+(\text{O})\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ nebo $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$, kde substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nesubstituované nižší alkylové skupiny, výhodně substituent R^6 je 2-(*N*-hydroxy-*N*-ethylamino)ethylaminokarbonyl nebo 2- $[\text{N}^+(\text{O})(\text{C}_2\text{H}_5)_2]$ ethylaminokarbonyl.

- (14) Ve výše uvedených skupinách (6) až (13), pokud substituent R^5 je $-\text{COR}^{10}$, pak výhodnější skupina sloučenin je taková, kde:

substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodně atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *terc*-butyl, izobutyl nebo *n*-butyl, výhodněji atom vodíku nebo methyl; a

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové, arylové a heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{17}$, kde substituent R^{17} je hydroxyskupina, alkylová nebo arylová skupina, výhodněji atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *n*-, izo nebo *terc*-butyl, feny, benzoyl, acetyl nebo karboxyskupina, ještě výhodněji methyl, atom vodíku nebo feny.

(15) Ve výše uvedených skupinách (6) až (13), pokud substituent R^5 je $-COR^{10}$, pak další výhodnější skupina sloučenin je taková, kde substituenty R^6 a R^7 spojeny dohromady tvoří $-(CH_2)_4-$.

(16) Ve výše výhodných skupinách (6) až (13), pokud substituent R^6 je $-COR^{10}$, pak výhodnější skupina sloučenin je taková, kde:

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodně atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *terc*-butyl, izobutyl nebo *n*-butyl, výhodněji atom vodíku nebo methyl; a

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové, arylové a heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{17}$, kde substituent R^{17} je hydroxyskupina, alkylová nebo arylová skupina, výhodněji atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *n*-, izo nebo *terc*-butyl, feny, benzoyl, acetyl nebo karboxyskupina, ještě výhodněji methyl, atom vodíku nebo feny.

(17) V rámci výše uvedených výhodných skupin a výhodnějších skupin (6) až (16) je ještě výhodnější skupina sloučenin, taková, kde

substituent R^1 je atom vodíku, alkylová skupina, $-C(O)NR^8R^9$, nesubstituovaná cykloalkylová nebo arylová skupina, výhodně atom vodíku, feny, 3,4-dimethoxyfenylaminokarbonyl, 4-methoxy-3-chlorfenylaminokarbonyl, ještě výhodněji atom vodíku nebo methyl, nejvýhodněji atom vodíku;

substituent R^2 je kyanoskupina, atom vodíku, halogen, nižší alkoxyskupina, arylová skupina nebo $S(O)_2NR^{13}R^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je atom vodíku, arylová nebo alkylová skupina, výhodně substituent R^2 je atom vodíku, chlor, brom, fluor, methoxyskupina, ethoxyskupina, feny, dimethylaminosulfonyl, 3-chlorfenylaminosulfonyl, karboxyskupina, methoxyskupina, aminosulfonyl, methylaminosulfonyl, fenylaminosulfonyl, pyridin-3-ylaminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, izopropylaminosulfonyl, výhodněji atom vodíku, fluor nebo brom;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkoxyskupiny, $-C(O)R^{15}$, $NR^{13}C(O)R^{14}$, arylové skupiny, výhodně aryl případně substituovaný jedním nebo dvěma substituenty vybranými ze skupiny sestávajícími se z nižší alkylové skupiny, halogenu nebo nižší alkoxyskupiny a heteroarylové skupiny, výhodně heteroarylové skupiny případně substituované jedním nebo dvěma substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nižší alkylové skupiny, halogenu nebo nižší alkoxyskupiny; výhodně atom vodíku, methoxyskupina, karboxyskupina, feny, pyridin-3-yl, 3,4-dichlorfenyl, 2-methoxy-5-izopropylfenyl, 4-*n*-butylfenyl, 3-izopropylfenyl, výhodněji atom vodíku nebo feny; a

substituent R^4 je atom vodíku.

(18) Další výhodnější skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde:

substituent R^1 je atom vodíku, alkylová skupina, $-C(O)NR^8R^9$, nesubstituovaná cykloalkylová nebo arylová skupina, výhodně atom vodíku, 3,4-dimethoxyfenylaminokarbonyl, 4-methoxy-3-chlorfenylaminokarbonyl, ještě výhodněji atom vodíku nebo methyl, konkrétně atom vodíku;

substituent R^2 je kyanoskupina, atom vodíku, halogen, nižší alkoxyskupina, arylová skupina nebo $S(O)_2NR^{13}R^{14}$, kde substituent R^{13} je atom vodíku a substituent R^{14} je atom vodíku,

arylová nebo alkylová skupina, výhodně substituent R^2 je atom vodíku, chlor, brom, fluor, methoxyskupina, ethoxyskupina, fenyl, dimethylaminosulfonyl, 3-chlorfenylaminosulfonyl, karboxyskupina, methoxyskupina, aminosulfonyl, methylaminosulfonyl, fenylaminosulfonyl, pyridin-3-ylaminosulfonyl, dimethylaminosulfonyl, izopropylaminosulfonyl, výhodněji atom vodíku, fluor nebo brom;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkoxykupiny, $-C(O)R^{15}$, $NR^{13}C(O)R^{14}$, arylové skupiny, výhodně aryl případně substituovaný jedním nebo dvěma substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nižší alkylové skupiny, halogenu nebo nižší alkoxykupiny a heteroarylové skupiny, výhodně heteroarylové skupiny případně substituované jedním nebo dvěma substituenty vybranými ze skupiny sestávající se z nižší alkylové skupiny, halogenu nebo nižší alkoxykupiny; výhodně atom vodíku, methoxyskupina, karboxyskupina, fenyl, pyridin-3-yl, 3,4-dichlorfenyl, 2-methoxy-5-izopropylfenyl, 4-*n*-butylfenyl, 3-izopropylfenyl, výhodněji atom vodíku nebo fenyl; a substituent R^4 je atom vodíku.

V rámci výše uvedené výhodné skupiny (18) je výhodnější skupina sloučenin taková, kde:

substituent R^5 je $-COR^{10}$, kde substituent R^{10} je definován v podstatě vynálezu, výhodně $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ nebo $-NR^{13}R^{14}$ definovaný v podstatě vynálezu.

substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodně atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *terc*-butyl, izobutyl nebo *n*-butyl, výhodněji atom vodíku nebo methyl; a

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové, arylové a heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{17}$, kde substituent R^{17} je hydroxyskupina, alkylová nebo arylová skupina, výhodněji atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *n*-, izo nebo *terc*-butyl, feny, benzoyl, acetyl nebo karboxyskupina, ještě výhodněji methyl, atom vodíku nebo fenyl.

Ve výše uvedené výhodné skupině (18) je další výhodnější skupina sloučenin taková, kde:

substituent R^6 $-COR^{10}$, kde substituent R^{10} je definován v podstatě vynálezu, výhodně $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, nebo $-NR^{13}R^{14}$ definován v podstatě vynálezu.

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a alkylové skupiny, výhodně atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *terc*-butyl, izobutyl nebo *n*-butyl, výhodněji atom vodíku nebo methyl; a

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, alkylové, arylové a heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{17}$, kde substituent R^{17} je hydroxyskupina, alkylová nebo arylová skupina, výhodněji atom vodíku, methyl, ethyl, izopropyl, *n*-, izo nebo *terc*-butyl, fenyl, benzoyl, acetyl nebo karboxyskupina, ještě výhodněji methyl, atom vodíku nebo fenyl.

(19) Další výhodnější skupina sloučenin obecného vzorce I je taková, kde:

substituenty R^1 a R^4 jsou atom vodíku;

substituent R^2 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, nižší alkoxykupiny, $-C(O)R^{15}$ a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkoxykupiny, $-C(O)R^{15}$, $NR^{13}C(O)R^{14}$, arylové skupiny a heteroarylové skupiny;

substituent R^5 je $-C(O)R^{10}$;

substituent R^6 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nižší alkylové skupiny; a

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny a $-C(O)R^{17}$.

Dalším výhodným provedením podle předloženého vynálezu je to, ve kterém sloučenina mající strukturu popsanou v bodě (15) je:

substituent R^{10} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, nižší alkoxy skupiny a $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, kde

n je 2 nebo 3;

substituent R^{11} je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nižší alkylové skupiny; a

substituent R^{12} je vybrán ze skupiny sestávající se z arylové skupiny a $-NR^{13}R^{14}$.

Dalším výhodným provedením podle předloženého vynálezu je to, ve kterém sloučenina mající strukturu popsanou v předešlých dvou odstavcích obsahuje substituenty R^{13} a R^{14} nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny a spojené substituenty $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ nebo $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(20) Další výhodné provedení podle předloženého vynálezu je sloučenina, ve které:

substituent R^1 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, $-(CH_2)_rR^{16}$ a $-C(O)NR^8R^9$;

substituent R^2 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, arylové skupiny a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, nižší alkoxy skupiny, arylové skupiny, heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{15}$;

substituent R^4 je atom vodíku;

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nižší alkylové skupiny;

substituent R^6 je $-C(O)R^{10}$;

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové a arylové skupiny;

substituent R^{16} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny a $-C(O)R^{15}$; a

r je 2 nebo 3.

Dalším výhodným provedením podle předloženého vynálezu je sloučenina mající strukturu popsanou v přímo předchozím odstavci, ve které substituent R^3 je arylová skupina případně substituovaná jednou nebo více skupinami vybranými ze skupiny sestávající se z nižší alkylové skupiny, nižší alkoxy skupiny a halogenu.

(21) Taktéž další výhodné provedení podle předloženého vynálezu je sloučenina, ve které:

substituent R^1 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, $-(CH_2)_rR^{16}$ a $-C(O)NR^8R^9$;

substituent R^2 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, arylové skupiny a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, nižší alkoxy skupiny, arylové skupiny, heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{15}$;

substituent R^4 je atom vodíku;

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nižší alkylové skupiny;

substituent R^6 je $-C(O)R^{10}$;

substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové a arylové skupiny;

substituent R^{16} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny a $-C(O)R^{15}$; a

r je 2 nebo 3,

substituent R^{10} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, nižší alkoxy skupiny a $-NR^{13}R^{14}$ a $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, kde n je 1, 2 nebo 3,

substituent R^{11} je atom vodíku a

5 substituent R^{12} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, nižší alkoxy skupiny, $-C(O)R^{15}$, heteroarylové skupiny a $-NR^{13}R^{14}$.

(22) Dalším výhodným provedením podle předloženého vynálezu je sloučenina mající strukturu popsanou v přímo předchozím odstavci, ve které substituenty R^{13} a R^{14} jsou nezávisle
10 vybrány ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, heteroarylové skupiny a spojených substituentů $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, nebo $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(23) Další výhodné provedení podle předloženého vynálezu je sloučenina, ve které:

15 substituent R^1 je $-C(O)NR^8R^9$, kde substituent R^8 je atom vodíku a substituent R^9 je arylová skupina případně substituovaná jednou nebo více skupinami vybranými ze skupiny sestávající se z halogenu, hydroxyskupiny a nižší alkoxy skupiny;

substituent R^2 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, arylové skupiny a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

20 substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny, nižší alkoxy skupiny, arylové skupiny, heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{15}$;

substituent R^4 je atom vodíku;

substituent R^5 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku a nižší alkylové skupiny;

substituent R^6 je $-C(O)R^{10}$;

25 substituent R^7 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové a arylové skupiny;

substituent R^{16} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny a $-C(O)R^{15}$; a

r je 2 nebo 3,

(24) Další výhodné provedení podle předloženého vynálezu je sloučenina, ve které:

30 substituent R^1 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny;

substituent R^2 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, nižší alkoxy skupiny, arylové skupiny a $-C(O)R^{15}$ a $S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

substituent R^3 je vybrán ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, halogenu, arylové skupiny, heteroarylové skupiny a $-C(O)R^{15}$;

35 substituent R^4 je atom vodíku;

substituent R^5 je $-C(O)R^{10}$; a

substituent R^6 a R^7 spojeny dohromady tvoří skupinu $-(CH_2)_4-$.

40 Ve sloučenině mající strukturu popsanou v právě předešlém odstavci je výhodné provedení takové, kde substituent R^{10} je vybrán ze skupiny sestávající se z hydroxyskupiny, alkoxy skupiny, $-NR^{13}R^{14}$ a $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$, kde n je 2 nebo 3.

45 Dalším výhodným provedením podle předloženého vynálezu je to, ve kterém sloučenina mající strukturu popsanou v předešlých dvou odstavcích obsahuje substituenty R^{13} a R^{14} nezávisle vybrané ze skupiny sestávající se z atomu vodíku, nižší alkylové skupiny a spojených substituentů $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ nebo $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

Detailní popis

PK, jejichž katalytická je modulována sloučeninami podle předloženého vynálezu, zahrnují tyrosinkinázy, jenž mohou být rozděleny na dva typy, receptorové tyrosinkinázy (RTK) a buněčné tyrosinkinázy (CTK), a serin-threoninkinázy (STK). Přenos signálu zprostředkovaný RTK je přitom zahájen extracelulární interakcí se specifickým růstovým faktorem (ligandem), po níž následuje dimerizace receptoru, přechodná stimulace vlastní aktivity proteinové tyrosinkinázy a fosforylace. Vytvoří se tak vazebná místa pro molekuly intracelulární signální transdukce a vedou k vytvoření komplexů se spektrem cytoplasmatických signálních molekul, které usnadňují adekvátní buněčnou odpověď (například buněčné dělení, metabolické účinky na extracelulární mikroprostředí), viz Schlessinger a Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 303 – 391.

Bylo prokázáno, že fosforylační místa tyrosinu na receptorech růstového faktoru fungují jako vysoce afinní vazebná místa pro domény SH2 (src homologie) na signálních molekulách. Fantl *et al.*, 1992, *Cell* 69: 413 – 423; Songyang *et al.*, 1994, *Mol. Cell. Biol.* 14: 2777 – 2785; Songyang *et al.*, 1993, *Cell* 72: 767 – 778; a Koch *et al.*, 1991, *Science* 252: 668 – 678. Bylo identifikováno několik intracelulárních substrátových proteinů, které se asociují s receptorovými tyrosinkinázami (RTK). Mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin: (1) substráty, které mají katalytickou doménu, a (2) substráty, které takovou doménu nemají, ale slouží jako adaptéry a asociují se s katalyticky aktivními molekulami (Songyang *et al.*, 1993, *Cell* 72: 767 – 778). Specifita interakcí mezi receptory a doménami SH2 jejich substrátů je určována aminokyselinovými zbytky, bezprostředně obklopujícími fosforylovaný tyrosinový zbytek. Rozdíly ve vazebných afinitách mezi SH2 doménami a aminokyselinovými sekvencemi obklopujícími fosfotyrosinové zbytky na konkrétních receptorech korelují s pozorovanými rozdíly v jejich substrátových fosforylačních profilech (Songyang *et al.* 1993, *Cell* 72: 767 – 778). Z pozorování vyplývá, že funkce každé receptorové tyrosinkinázy je určována nejen profilem její exprese a dostupnosti ligandů, ale i řadou „downstreamových“ transdukčních drah signálu, které jsou aktivovány konkrétním receptorem. Fosforylace tedy poskytuje významný regulační stupeň, který určuje selektivitu signálních drah vyvolávaných konkrétními receptory růstového faktoru, jakož i receptory diferenciálního faktoru.

STK, primárně cytosolové, ovlivňují vnitřní biochemii buňky často jako zaváděcí odpověď na výskyt PTK. STK se podílí na signálním procesu, který iniciuje syntézu DNA a následnou mitózu, která vede k buněčné proliferaci.

PK signální transdukce má tedy za následek, mezi dalšími odpověďmi, buněčnou proliferaci, diferenciaci, růst a metabolismus. Abnormální buněčná proliferace může vést k širokému spektru poruch a onemocnění, včetně vývoje neoplazie, např. karcinomu, sarkomu, glioblastomu a hemangiomu, poruch, např. leukémie, psoriázy, arteriosklerózy, artritidy a diabetické retinopatie a dalších poruch souvisejících s nekontrolovanou angiogenezí a/nebo vaskulogenezí.

Přesné pochopení mechanismu, kterým sloučeniny podle předloženého vynálezu inhibují PK, není třeba znát k využívání předloženého vynálezu. Avšak předpokládá se, i když to neznamená omezení na určitý konkrétní mechanismus nebo teorii, že tyto sloučeniny interagují s aminokyselinami v katalytické oblasti PK. PK mají typicky bilobátovou strukturu, kde ATP se zřejmě váže ve šterbině mezi dvěma laloky v oblasti, ve které jsou aminokyseliny mezi PK konzervativní. Dále se předpokládá, že inhibitory PK se váží nekovalentními interakcemi, např. vodíkovou vazbou, van der Waalsovými silami a iontovými interakcemi ve stejné obecné oblasti, jako se výše zmíněný ATP váže na PK. Konkrétněji se dá říci, že 2-indolinonová složka sloučenin podle předloženého vynálezu se váže v obecné mezeře normálně obsazené adeninovým kruhem ATP. Specifita konkrétní molekuly pro příslušné PK může pak vznikat jako výsledek dalších interakcí mezi různými substituenty na 2-indolinonovém jádře a aminokyselinovými doménami specifickými vůči konkrétním PK. Různé substituenty indolinonu tedy mohou přispívat k preferenční vazbě na konkrétní PK. Možnost výběru sloučeniny, která bude aktivní v různých vazebných místech ATP (nebo jiného nukleotidu), umožňuje, že sloučeniny podle předloženého vynálezu

jsou použitelné pro zacílení jakéhokoliv proteinu na takové místo. Sloučeniny uvedené v předloženém vynálezu tedy jsou použitelné při *in vitro* testech s těmito proteiny a rovněž vykazují *in vivo* terapeutické účinky vlivem interakcí s takovými proteiny.

- 5 Dále poskytují sloučeniny podle předloženého vynálezu terapeutický způsob ošetření různých druhů pevných nádorů, včetně, ale není to na ně omezeno, karcinomů, sarkomů, včetně Kaposiho sarkomu, erythroblastomu, glioblastomu, meningiomu, astrocytomy, melanomu a myoblastomu. Ošetření nebo prevence nepevných nádorů, např. leukémie, rovněž spadá do předloženého vynálezu. Indikace mohou zahrnovat, ale bez omezení, rakoviny mozku, rakoviny močového měchýře, 10 ovariální rakoviny, rakoviny žaludku, rakoviny pankreatu, rakoviny tlustého střeva, rakoviny krve, rakoviny plic a rakoviny kostí.

- Další příklady typů poruch souvisejících s nepřiměřenou aktivitou PK, kde mohou být sloučeniny podle předloženého vynálezu použitelné při prevenci, ošetření a studiu, zahrnují, ale bez omezení, 15 buněčné proliferativní poruchy, fibrotické poruchy a metabolické poruchy.

- Buněčné proliferativní poruchy, u kterých je možná prevence, ošetření nebo další studie podle předloženého vynálezu, zahrnují rakovinu, proliferativní poruchy krevních cév a proliferativní poruchy mesangiálních buněk.

- 20 Proliferativní poruchy krevních cév se týkají poruch souvisejících s abnormální vaskulogenezí (tvorba krevních cév) a angiogenezí (šíření krevních cév). Zatímco vaskulogeneze a angiogeneze hraje důležitou roli při různých normálních fyziologických procesech, např. vývoji embrya, tvorby žlutého tělíska, hojení ran a regenerace orgánu, mohou tyto poruchy hrát klíčovou roli při 25 vývoji rakoviny, a tím vést k tvorbě nových kapilár potřebných k udržení aktivity nádoru. Další příklady proliferativních poruch krevních cév zahrnují artritidu, kde nové kapilární krevní cévy napadají klouby a ničí chrupavku, a oční onemocnění jako třeba diabetickou retinopatii, kde nové kapiláry na sítnici napadají sklivce, způsobují krvácení a slepotu.

- 30 Bylo zjištěno, že dvě strukturně příbuzné RTK vážou VEGF s vysokou afinitou: receptor tyrosinu 1 typu fms (fit-1) (Shibuya *et al.*, *Oncogene* 5: 519 – 524, 1990; De Vries *et al.*, *Science* 255: 989 – 991, 1992) a receptor KDR/FLK-1 také známý jako VEGF-R2. Bylo publikováno, že růstový faktor vaskulárních endothelových buněk je specifický mitogen endotheliálních buněk s *in vitro* promotorní aktivitou k růstu endotheliálních buněk. Ferrara & Henzel, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161: 851 – 858; Vaisman *et al.*, 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 19461 – 19566. 35 Údaje uvedené v přihlášce vynálezu U.S. č. 08/193 829, 08/038 596 a 07/975 750 důrazně poukazují na to, že VEGF není odpovědný pouze za proliferaci endotheliálních buněk, ale také za prvotní regulaci normálních a patologických angiogenezí. Obecně viz Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10) 699 – 702; Houck, *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 26031 – 26037.

- 40 Normální vaskulogeneze a angiogeneze hraje důležitou roli při různých fyziologických procesech, např. embryonálním vývoji, hojení ran, regeneraci orgánu a ženských reprodukčních procesech, např. vývoji folikul ve žlutém tělísku během ovulace a růstu placenty po těhotenství. Folkman & Shing, 1992, *J. Biological Chem.*, 267 (16): 10931 – 34. Nekontrolovatelná vaskulogeneze a/nebo angiogeneze bývá spojena s onemocněními, např. diabetem, jakož i s maligními 45 pevnými nádory, které jsou na vaskularizaci závislé z hlediska růstu. Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10) 699 – 702; Folkham, 1991, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 82: 4 – 6; Weidner, *et al.*, 1991, *New Engl. J. Med.*, 324: 1 – 5.

- 50 Předpokládaná role VEGF při proliferaci a migraci endotheliálních buněk během angiogeneze a vaskulogeneze indikuje důležitou roli receptoru KDR/FLK-1 při těchto procesech. Onemocnění, např. diabetes mellitus (Folkman, 198, in XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis (Verstraeta, *et al.*, eds.), pp. 583 – 596. Leuven Univesity Press, Leuven) a artritida, jakož i růst maligního nádoru, mohou vyplývat z nekontrolovatelné angiogeneze. Viz např. Folkman, 1971, 55 *N. Engl. J. Med.*, 285: 1182 – 1186. Receptory, na které se VEGF specificky vážou, jsou důležité

a účinné cíle regulace a modulace vaskulogeneze a/nebo angiogeneze a různých závažných onemocnění, která zahrnují abnormální buněčný růst způsobený těmito procesy. Plowman, *et al.*, 1994, DN&P, 7(6): 334 – 339. Detailněji hraje receptor pro KDR/FLK-1 vysoce specifickou roli při neovaskularizaci vytvářející vybraný cíl pro terapeutické přístupy k ošetření rakoviny a dalších onemocnění zahrnujících nekontrolovatelnou tvorbu krevních cév.

Předložený vynález tedy poskytuje sloučeniny schopné regulace a/nebo modulace tyrosinkinázové transdukce signálu, včetně transdukce signálu receptoru KDR/FLK-1 za účelem inhibice nebo podpory angiogeneze a/nebo vaskulogeneze, tzn. sloučeniny inhibují, zabraňují nebo interferují se signálem transdukovaným KDR/FLK-1 za předpokladu, že je aktivován ligandem, např. VEGF. Ačkoliv se předpokládá, že sloučeniny podle předloženého vynálezu působí na receptor nebo další komponentu společně s transdukční signální drahou tyrosinkinázy, mohou také působit přímo na nádorové buňky vznikající v důsledku nekontrolovatelné angiogeneze.

Ačkoliv názvosloví lidských a myších protějšků generického receptoru „flk-1“, je rozdílné, v mnoha ohledech jsou zaměnitelné. Myší receptor, Flk-1, a jeho lidský protějšek, KDR, mají sekvenční homologii z 93,4 % v intracelulární doméně. Myší Flk-1 se rovněž váže na lidský receptor VEGF se stejnou afinitou jako myší VEGF, a tudíž je aktivován ligandem odvozených od kterékoliv species. Millauer *et al.*, 1993, *Cell*, 72: 837 – 846; Quinn *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7533 – 7537. FLK-1 se také asociuje s a následně tyrosin fosforyluje lidské substráty RTK (např. PLC- γ nebo p85), pokud jsou koexprimovány v buňkách 293 (lidské embryonální ledvinové fibroblasty).

Proto modely, které se opírají o receptor FLK-1, jsou přímo aplikovatelné k pochopení funkce receptoru KDR. Například použití myšího receptoru FLK-1 ve způsobech, které identifikují sloučeniny, jež regulují myší dráhu signální transdukce, jsou přímo aplikovatelné k identifikaci sloučenin, které mohou být používány k regulaci lidské dráhy transdukce signálu, tzn. regulují aktivitu spojenou s receptorem KDR. Chemické sloučeniny identifikované jako inhibitory KDR/FLK-1 *in vitro* tedy mohou být potvrzeny na vhodných *in vivo* modelech. Myší i potkaní *in vivo* zvířecí modely byly potvrzeny jako excelentní způsoby zkoumání klinické účinnosti agens působících na KDR-FLK-1 indukovanou dráhu transdukce signálu.

Předložený vynález tedy poskytuje sloučeniny, které regulují, modulují a/nebo inhibují vaskulogenezi a/nebo angiogenezi ovlivněním enzymatické aktivity receptoru KDR/FLK-1 a interference se signálem transdukovaným KDR/FLK-1. Předložený vynález tedy poskytuje terapeutický přístup k ošetření mnoha druhů pevných nádorů, včetně, ale není to nikterak limitováno, glioblastomu, melanomu a Kaposiho sarkomu, a karcinomu vaječníku, plic, prsu, prostaty, pankreatu, tlustého střeva a epidermoidního karcinomu. Navíc z dostupných údajů lze říci, že podání sloučenin, které inhibují dráhu transdukce signálu zprostředkovanou KDR/Flk-1, může být také používáno při ošetření hemangiomu, restenózy a diabetické retinopatie.

Dále ještě se tento vynález týká inhibice vaskulogeneze a angiogeneze dalšími drahami zprostředkovanými receptorem, včetně dráhy zahrnující receptor flt-1.

Transdukce signálu zprostředkovaná receptorovou tyrosinkinázou je přitom zahájena extracelulární interakcí se specifickým růstovým faktorem (ligandem), po níž typicky následuje dimerizace receptoru, tranzitní stimulace vnitřní aktivity proteinové tyrosinkinázy a autofosforylace. Vytvoří se tak vazebná místa pro molekuly intracelulární signální transdukce a vedou k vytvoření komplexů se spektrem cytoplasmatických signálních molekul, které usnadňují adekvátní buněčnou odpověď (například buněčné dělení, diferenciaci, metabolické efekty, změny extracelulárního mikroprostředí), viz Schlessinger a Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 1 – 20.

Blízká homologie intracelulárních oblastí KDR/FLK-1 s receptorem PDGF- β (50,3% homologie) a/nebo příbuzným receptorem flk-1 ukazuje na indukci dráhy transdukce signálu. Například bylo pro receptor PDGF- β publikováno, že členové rodiny src (Twamley *et al.*, 1993, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 7696 – 7700), fosfatidylinositol-3'-kináza (Hu *et al.*, 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12 : 981 – 990), fosfolipáza γ (Kashishian & Cooper, 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 4 : 49 – 51), ras-GTPázu-aktivující protein (Kashishian *et al.*, 1992, *EMBO J.*, 11 : 1373 – 1382), PTP-ID/syp (Kazlauskas *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10 90 : 6939 – 6943), Grb2 (Arvidsson *et al.*, 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14: 6715 – 6726) a adaptérové molekuly Shc a Nck (Nishimura *et al.*, 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 6889 – 6896) se vážou na oblasti zahrnující různá autofosforylační místa. Obecněji viz Claesson-Welsh, 1994, *Prog. Growth Factor Res.*, 5: 37 – 54. Tudíž pravděpodobně dráhy transdukce signálu aktivované KDR/FLK-1 zahrnují dráhu ras (Rozakis *et al.*, 1992, *Nature*, 360 : 689 – 692), PI-3'-kinázu, dráhy zprostředkované src a pley. Každá z těchto dráh může hrát kruciální roli při angiogenním a/nebo vaskulogenním účinku KDR/FLK-1 v endoteliálních buňkách. Tudíž se další aspekt předloženého vynálezu týká použití zde popsaných organických sloučenin k modulaci angiogeneze a vaskulogeneze, protože tyto procesy jsou řízeny těmito drahami.

Naopak jsou zahrnuty i poruchy související se smrštěním, kontrakcí nebo zavíráním krevních cév, jako je restenóza, a mohou být ošetřovány nebo může být jim zabráněno způsoby podle předloženého vynálezu.

Fibrotické poruchy se týkají abnormální tvorby extracelulárních maticí. Příklady fibrotických poruch zahrnují hepatickou cirhózu a proliferativní poruchy mesangiálních buněk. Hepatická cirhóza je charakterizována přírůstkem konstituentů extracelulární matrice, což vede k tvorbě hepatických jizev. Zvětšená extracelulární matrice mající za následek hepatické jizvy může být také způsobena virovou infekcí, např. hepatitidou. Zdá se, že při hepatické cirhóze hrají hlavní roli lipocyty. Další implikované fibrotické poruchy zahrnují aterosklerózu.

Proliferativní poruchy mesangiálních buněk se vztahují k poruchám způsobených abnormální proliferací mesangiálních buněk. Mesangiální proliferativní poruchy zahrnují různá lidská renální onemocnění, např. glomerulonefritidu, diabetickou nefropatii a maligní nefrosklerózu, jakož i poruchy jako trombotické mikroangiopatické syndromy, odhojování transplantátu a glomerulopatie. RTK PDGFR se podílí na udržení proliferace mesangiálních buněk. Flöge *et al.*, 1993, *Kidney International* 43: 47S – 54S.

Mnoho druhů rakovin zahrnuje poruchy proliferace buněk a, jak je uvedeno výše, souvisí PK s buněčnými proliferativními poruchami. Tudíž není překvapující, že PK, např. členové rodiny RTK, souvisí se vznikem rakoviny. Některé z těchto receptorů, jako EGFR (Tuzi *et al.*, 1991, *Br. J. Cancer* 63 : 227 – 233, Torp *et al.*, 1992, *APMIS* 100 : 713 – 719), HER2/neu (Slamon *et al.*, 1989, *Science* 244 : 707 – 712) a PDGF-R (Kumabe *et al.*, 1992, *Oncogene*, 7 : 627 – 633) jsou při mnoha nádorech exprimovány v nadměrném množství a/nebo perzistentně aktivovány autokrinními kličkami. Při nejběžnějších a nejzávažnějších rakovinách byla totiž zjištěna nadměrná exprese těchto receptorů (Akbasak and Suner-Akbasak *et al.*, 1992, *J. Neurol. Sci.*, 111 – 119 – 133, Dickson *et al.*, 1992, *Cancer Treatment Res.* 61 : 249 – 273, Korc *et al.*, 1992, *J. Clin. Invest.* 90 : 1352 – 1360) a autokrinní kličky (Lee and Donoghue, 1992, *J. Cell. Biol.*, 118 : 1057 – 1070, Konc *et al.*, supra, Akbasak and Sune-Akbasak *et al.*, supra). Například EGFR souvisí s karcinomem skvamózních buněk, astrocytomem, glioblastomem, rakovinou hlavy a krku, rakovinou plic a rakovinou močového měchýře. HER2 souvisí s rakovinou prsu, ovariální rakovinou, rakovinou žaludku, rakovinou plic, rakovinou slinivky a močového měchýře. PDGFR souvisí s glioblastomem a melanomem, jakož i rakovinou plic, ovariální rakovinou a rakovinou prostaty. RTK c-met také souvisí s tvorbou maligního nádoru. Například c-met souvisí, mezi jinými rakovinami, také s kolorektálními, tyreoidálními, pankreatickými, gastrickými a hepatocelulárními karcinomy a lymfomy. Navíc c-met je spojen také s leukémií. Exprese genu c-met ve velkém množství byla také zjištěna u pacientů s Hodgkinovou a Burkittovou nemocí.

IGF-IR, kromě toho, že se podílí na nutriční podpoře a diabetu 2. typu, souvisí také s několika typy rakovin. Například IGF-I se také podílí jako autokrinní růstový stimulátor na několika typech nádorů, např. karcinomu buněk při lidské rakovině prsu (Arteaga *et al.*, 1989, *J. Clin.*

Invest. 84 : 1418 – 1423) a malobuněčného nádoru plic (Macauley *et al.*, 1990, *Cancer Res.*, 50 : 2511 – 2517). IGF-I, zatímco se celkově podílí na normálním růstu a diferenciaci nervového systému, předpokládá se, že je autokrinním stimulatorem lidského gliomu. Sandberg-Nordqvist *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53 : 2475 – 2478. Význam IGF-IR a jeho ligandů při proliferaci buněk je dále podpořen faktem, že mnoho typů buněk v kultuře (fibroblasty, epitheliální buňky, buňky hladkého svalstva, T-lymfocyty, myeloidní buňky, chondrocyty a osteoblasty (kmenové buňky kostní dřeně)) jsou stimulovány k růstu právě IGF-I. Goldring and Goldring, 1991, *Eukaryotic Gene Expression*, 1 : 301 – 326. Baserga a Coppola se domnívají, že IGF-IR hraje nejdůležitější roli při mechanismu transformace a jako takový by mohl být preferovaným cílem pro terapeutické intervence širokého spektra lidských zhoubných bujení. Baserga, 1995, *Cancer Res.*, 55 : 249 – 252, Baserga, 1994, *Cell* 79 : 927 – 930, Coppola *et al.*, 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14 : 4588 – 4595.

STK se podílejí na mnoha typech rakoviny, včetně, a to zejména, rakoviny prsu (Cance, *et al.*, *Int. J. Cancer*, 54 : 571 – 77 (1993)).

Vztah mezi abnormální aktivitou PK a onemocněním není omezen jenom na rakovinu. Například RTK souvisí s onemocněními, např. psoriázou, diabetes mellitus, endometriózou, angiogenezí, vznikem aterosklerotického plaku, Alzheimerovou nemocí, restenózou, von Hippelovým-Lindauovým onemocněním, epidermální hyperproliferací, neurodegenerativní onemocněními, makulární degenerací spojenou s věkem a hemangiomy. Například EGFR byl zjištěn při korneálním a dermálním hojení ran. Vady v inzulin-R a IGF-1R jsou indikovány při diabetes mellitus 2. typu. Úplnější korelace mezi specifickými RTK a jejich terapeutickými indikacemi lze nalézt v Plowman *et al.*, 1994, *DN&P* 7: 334 – 339.

Jak je uvedeno výše, nejen RTK, ale i CTK, včetně, ale není to nikterak limitováno, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr a yrk (Bolen *et al.*, 1992, *FASEB J.*, 6 : 3403 – 3409) se podílejí na proliferativní a metabolické dráze transdukce signálu, a lze tedy očekávat, a bylo to také tak uvedeno, že se podílejí na mnoha poruchách zprostředkovaných PTK, na které je předložený vynález zaměřen. Například bylo zjištěno, že mutovaný src (v-src) je onkoprotein (pp60^{v-src}) u kuřat. Navíc jeho buněčný homolog, proto-onkogen pp60^{c-src}, přenáší onkogenní signály mnoha receptorů. Nadměrná exprese EGFR nebo HER2/neu při nádorech vede ke konstitutivní aktivaci pp60^{c-src}, což je charakteristické pro maligní buňky, ale pro normální buňky nikoliv (zcela chybí). Na druhou stranu myši s nedostatkem exprese c-src vykazují osteopetrotický fenotyp, indikující klíčový podíl c-src na funkci osteoklastů a možnou účast na příbuzných poruchách.

Podobně se Zap70 podílí na signalizaci T-buněk, které se podílejí na autoimunitních poruchách.

STK souvisí se zánětem, autoimunitní poruchou, imunodpověďmi a hyperproliferativními poruchami, jako je restenóza, fibróza, psoriáza, osteoartritida a revmatoidní artritida.

PK se také podílejí na uhníždění embrya. Sloučeniny podle předloženého vynálezu tedy mohou poskytovat účinný způsob prevence takového uhníždění embrya, a tudíž být použitelné jako ochranný prostředek proti početí. Další poruchy, které mohou být ošetřovány nebo může být jím zamezeno sloučeninami podle předloženého vynálezu, zahrnují imunologické poruchy, např. autoimunitní choroby, např. autoimunitní onemocnění, AIDS a kardiovaskulární poruchy, např. ateroskleróza.

Konečně v současné době existuje podezření, že RTK i CTK se podílejí na hyperimunitních poruchách.

Příklady účinků mnoha názorných sloučenin podle předloženého vynálezu na několik PTK je uvedeno v tabulce 2 níže. Prezentované sloučeniny a data nemají nikterak limitovat rozsah vynálezu.

Dávky a farmaceutický přípravek

5 Sloučenina podle předloženého vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelná sůl mohou být jako takové podávány lidským pacientům nebo mohou být podávány ve farmaceutických přípravcích, ve kterých jsou výše uvedené látky smíchány s vhodnými nosiči nebo excipientem(y). Techniky přípravy a podání léčiv mohou být nalezeny v „Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA., poslední vydání.

10 Termín „podání“, jak je používán v předloženém vynálezu, se vztahuje na podání sloučeniny obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelné soli nebo farmaceutického přípravku obsahujícího sloučeninu obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl podle předloženého vynálezu do organismu za účelem prevence nebo ošetření poruch souvisejících s PK.

15 Vhodné způsoby podání zahrnují, ale není to nikterak limitováno, perorální, rektální, transmukózní nebo intestinální podání nebo intramuskulární, subkutánní, intramedulární, intratekální, přímé intraventrikulární, intravenózní, intravitreální, intraperitoneální, intranazální nebo intraokulární injekce. Výhodnými způsoby podání jsou perorální a parenterální.

20 Nebo lze podávat sloučeninu spíše místním než systémovým způsobem, např. injekcí sloučeniny přímo do místa nádoru, často v depotní nebo trvale uvolňující se formulaci.

Dále lze léčivo podávat jako systém cílově specifického podání, např. v lipozómu potaženém protilátkou specifickou na určitý nádor. Lipozómy budou zaměřeny a vychytávány nádorem.

25 Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu mohou být vyráběny standardním způsobem, např. standardním mícháním, rozpuštěním, granulací, přípravou dražé, rozmělnováním, emulgací, enkapsulací, zachytáváním nebo lyofilizací.

30 Farmaceutické přípravky pro použití podle předloženého vynálezu tak mohou být připraveny standardním způsobem za použití jednoho nebo více fyziologicky přijatelných nosičů obsahujících excipienty a pomocné látky, které usnadňují zpracování aktivních sloučenin do preparátů, které mohou být používány farmaceutickým způsobem. Vlastní příprava je závislá na vybraném způsobu podání.

35 Pro injekce mohou být sloučeniny podle předloženého vynálezu připraveny ve vodných roztocích, výhodně ve fyziologicky kompatibilních pufrch, např. Hanksův roztok, Ringerův roztok nebo pufru na bázi fyziologického roztoku. Pro transmukózní podání jsou ve formulaci používány takové penetrátory, které jsou vhodné pro překonání dané bariéry. Tyto penetrátory jsou obecně známy.

40 Pro perorální podání mohou být sloučeniny snadno připraveny spojením aktivních sloučenin se standardními farmaceuticky přijatelnými nosiči. Tyto nosiče umožňují připravit sloučeniny podle předloženého vynálezu ve formě tablet, pilulí, dražé, kapslí, roztoků, gelů, sirupů, kašovitých směsí, suspenzí, atd., pro perorální požití léku pacientem, který má být ošetřován. Farmaceutické preparáty pro perorální použití mohou být připraveny spojením aktivní sloučeniny s pevným excipientem, případně rozemletím výsledné směsi, a po přidání vhodných pomocných látek, pokud je třeba, zpracováním směsi granulí, čímž lze získat tablety nebo dražé. Vhodné excipienty jsou zejména plniva, např. cukry, včetně laktosy, sacharosy, mannitolu nebo sorbitolu; celulózové přípravky, např. kukuřičný škrob, pšeničný škrob, rýžový škrob, bramborový škrob a další látky, např. želatina, tragant, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidon (PVP). Pokud je třeba, mohou být přidány prostředky zajišťující rozpad tablety po požití, např. zesítný polyvinylpyrrolidon, agar nebo kyselina alginová nebo jejich soli, např. alginát sodný.

Jádra dražé jsou opatřena vhodnými povrchovými vrstvami. Pro tento účel mohou být používány koncentrované roztoky cukrů, které mohou případně obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidon, karbopolový gel, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, roztoky šelaku a vhodná organická rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel. Organická barviva nebo pigmenty mohou být
5 přidány do tablet nebo potahových vrstev dražé k identifikaci nebo charakterizaci rozdílných kombinací dávek aktivní sloučeniny.

Farmaceutické preparáty, které mohou být používány perorálně, zahrnují kapsle typu „flash-fit“ vyrobené ze želatiny, jakož i měkké, uzavřené kapsle vyrobené ze želatiny a změkčovačů, jako
10 je glycerol nebo sorbitol. Kapsle typu „push-fit“ mohou obsahovat aktivní složky v příměsi s fillery, např. laktosou, pojivky, např. škroby, a/nebo lubrikanty, např. talek nebo stearát hořečnatý, a případně stabilizátory. V měkkých kapslích mohou být aktivní sloučeniny rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných roztocích, např. mastných olejích, minerálním oleji nebo tekutých polyethylenglykolech. Navíc mohou být přidávány stabilizátory.

Farmaceutické přípravky, které mohou být také používány, zahrnují pevné želatinové kapsle. Nikterak nelimitujícím příkladem může být uvedena formulace aktivní sloučeniny ve formě
15 perorálního léčiva jako dvě různě silné dávky 50 a 200 mg (kódy formulace J-011248-AA-00 a J-011248-AA-01). Tyto dvě různě silné dávky jsou připraveny ze stejných granulí naplněním
20 do tuhých želatinových kapslí o různých velikostech, velikost 3 pro 50mg a velikost 0 pro 200mg kapslí. Skladba formulace může být např. podle tabulky 2.

Tabulka 2

komponenta název/kvalita	konc. v granulaci (% hmotn./hmotn.)	množství v 50 mg kapsle (mg)	množství ve 200 mg kapsle (mg)
kód formulace	J-011248-AA	J-011248-AA-00	J-011248-AA-01
aktivní sloučenina NF	65,0	50,0	200,0
Mannitol NF	23,5	18,1	72,4
kroskarmelosa sodná NF	6,0	4,6	18,4
Povidone K 30 NF	5,0	3,8	15,2
stearát hořečnatý NF	0,5	0,38	1,52
kapsle, švédská žluť NF		velikost 3	velikost 0

25 Kapsle mohou být baleny do lahvíček z hnědého skla nebo plastu za účelem ochrany aktivní sloučeniny proti světlu. Nádobky obsahující formulaci aktivní sloučeniny ve formě kapsle musí být skladovány při kontrolované teplotě (15 až 30 °C).

30 Pro podání inhalací jsou sloučeniny podle předloženého vynálezu standardně podávány ve formě aerosolového spreje v aerosolovém balení nebo v rozprašovači a s vhodným propellentem, např., bez omezení, dichlordifluormethanem, trichlorfluormethanem, dichlortetrafluorethanem nebo oxidem uhličitým. V případě stlačeného aerosolu může být pro dávkování využit ventil, který umožní uvolnění přesného množství látky. Kapsle a patrony, např. ze želatiny, pro použití v inha-
35 lačním přístroji nebo insuflátoru mohou být připraveny způsobem, při kterém je spojena prášková směs sloučeniny a vhodná prášková báze, např. laktosa nebo škrob.

Sloučeniny mohou být připraveny pro parenterální podání injekcí, např. injekcí bolusu nebo kontinuální infuzí. Formulace pro injekce mohou být v jednotkových dávkovacích formách, např. v ampulích nebo v obalech pro více dávek, s přidanou konzervační látkou. Přípravky mohou být také ve formách suspenze, roztoků nebo emulzí v olejových nebo vodných nosičích a mohou obsahovat pomocné agens, např. suspenzační, stabilizační a/nebo dispergační prostředky.

Farmaceutické formulace pro parenterální podání zahrnují vodné roztoky aktivních sloučenin ve formě, která je rozpustná ve vodě. Dále mohou být suspenze aktivních sloučenin připraveny jako příslušné olejovité injekční suspenze. Vhodné lipofilní nosiče zahrnují mastné oleje, např. sezamový olej, estery syntetických mastných kyselin, např. ethyl-oleát nebo triglyceridy nebo látky jako lipozomy. Vodné injekční suspenze mohou obsahovat látky, které zvyšují viskozitu suspenze, např. sodná sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol nebo dextran. Případně suspenze mohou také obsahovat vhodné stabilizátory a/nebo agens, která zvyšují rozpustnost sloučenin, čímž umožňují připravit vysoce koncentrované roztoky.

Alternativně může být aktivní složka ve formě prášku určeného ke spojení s vhodným nosičem před použitím, např. se sterilní apyrogenní vodou.

Sloučeniny mohou být také připraveny jako rektální přípravky, např. čípky nebo retenční klyzma, pomocí např. standardních čípkovýchází, jako je kakaové máslo nebo jiné glyceridy.

Kromě výše uvedených formulací, mohou být také připraveny sloučeniny ve formě depotních preparátů. Tyto formulace s dlouhou dobou účinku mohou být podávány implantací (např. subkutánní nebo intramuskulární podání nebo intramuskulární injekcí). Tímto způsobem mohou být připraveny sloučeniny s vhodnými polymerními nebo hydrofóbními materiály (např. v emulzi s farmaceuticky přijatelným olejem) nebo ionexy nebo jako špatně rozpustné deriváty, např. špatně rozpustné soli.

Příkladem, avšak neomezujičím, farmaceutického nosiče pro hydrofóbní sloučeniny podle předloženého vynálezu je systém spolurozpouštědel obsahující benzylalkohol, nepolární surfaktant, organický polymer mísitelný s vodou a vodnou fází, např. spolurozpouštědlový systém VPD. VPD je roztok 3 % obj. benzylalkoholu, 8 % obj. nepolární surfaktantu Polysorbát 80 a 65 % obj. polyethylenglykolu 300, doplněný na konečný objem absolutním ethanolem. Systém spolurozpouštědel VPD (VPD:5W) se sestává z VPD zředěného 1:1 5% dextrózou ve vodném roztoku. Tento systém spolurozpouštědel dobře rozpouští hydrofóbní sloučeniny a sám má po systémovém podání nízkou toxicitu. Přirozeně mohou být podíly systému spolurozpouštědel značně měněny, nicméně tak, aby se zachovaly charakteristické rysy jako rozpustnosti a toxicity. Jednotlivé složky systému spolurozpouštědel mohou být měněny: např. místo polysorbátu 80 mohou být používány další nepolární surfaktanty o nízké toxicitě; velikost částic polyethylenglykolu může být různá; polyethylenglykol může být nahrazen dalšími biokompatibilní polymery, např. polyvinylpyrrolidonem; a další cukry nebo polysacharidy mohou nahradit dextrózu.

Nebo může být použit jiný dávkový systém pro hydrofóbní farmaceutické sloučeniny. Pro hydrofóbní léčiva jsou standardními příklady přenašečů a nosičů využívaných při tomto způsobu lipozomy a emulze. Navíc mohou být používána určitá organická rozpouštědla, např. dimethylsulfoxid, nicméně často za cenu větší toxicity.

Navíc sloučeniny mohou být podávány systémem trvalého, tj. postupného uvolňování, např. semipermeabilními matricemi pevných hydrofóbních polymerů obsahujících terapeutické činidlo. V obou jsou zavedeny a odborníkům známy různé materiály pro postupné uvolňování. Kapsle s postupným uvolňováním mohou v závislosti na svém chemickém charakteru uvolňovat sloučeniny po dobu několika týdnů až více než 100 dnů. V závislosti na chemickém charakteru a biologické stabilitě terapeutického reagens mohou být používány další strategie stabilizace proteinu.

Farmaceutické přípravky také mohou obsahovat vhodné nosiče nebo excipienty v pevné nebo gelové fázi. Příklady takových nosičů nebo excipientů zahrnují, ale není to na ně omezeno, uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý, různé cukry, škroby, deriváty celulózy, želatinu a polymery, např. polyethylenglykoly.

5

Mnoho sloučenin podle předloženého vynálezu modulujících PK může být ve formě fyziologicky přijatelných solí, kde nárokována sloučenina může tvořit negativně nebo pozitivně nabitou složku. Příklady solí, ve kterých sloučenina vytváří pozitivně nabitou část, zahrnují, ale není to nikterak limitováno, kvartérní amoniové soli (definované zde na jiném místě), např. hydrochlorid, sulfát, uhličitan, laktát, tartrát, malát, maleát, sukcinát, kde atom dusíku kvartérní amonické skupiny je dusík vybrané sloučeniny podle předloženého vynálezu, který zreagoval s příslušnou kyselinou. Soli, ve kterých sloučenina podle předloženého vynálezu vytváří negativně nabitou část, zahrnují, ale není to nikterak limitováno, vápenaté a hořečnaté soli vytvořené reakcí skupiny karboxylové kyseliny ve sloučenině s příslušnou bází (jako je hydroxid sodný (NaOH), hydroxid draselný (KOH), hydroxid vápenatý ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), atd.).

20

Farmaceutické přípravky vhodné pro použití v předloženém vynálezu zahrnují přípravky, ve kterých jsou aktivní složky obsaženy v množství, které je dostatečné k dosažení zamýšleného záměru, např. modulace aktivity PK nebo ošetření nebo prevence poruch spojených s PK.

Konkrétněji, terapeuticky účinné množství znamená množství sloučeniny, které je účinné k prevenci, zmírnění nebo zlepšení symptomů onemocnění nebo k prodloužení přežívání subjektu, který je ošetřován.

25

Stanovení terapeuticky účinného množství může provést pracovník zkušený v oboru, zejména na základě zde uvedených informací.

30

Pro jakoukoliv sloučeninu používanou ve způsobu podle předloženého vynálezu může být terapeuticky účinná dávka nejprve stanovena podle testů na buněčných kulturách. Pak může být dávka testována na buněčných a zvířecích modelech k získání rozmezí oběhové koncentrace, které zahrnuje IC_{50} stanovenou podle testů na buněčných kulturách (tzn. koncentrace testované sloučeniny, která je potřebná k dosažení 50% inhibice aktivity dané PK). Tyto informace mohou být používány u lidských subjektů k přesnějšímu stanovení účinných dávek.

35

40

Toxicita a terapeutická účinnost zde popsaných sloučenin může být stanovena standardními farmaceutickými postupy na buněčných kulturách nebo experimentálních zvířatech, např. stanovením IC_{50} a LD_{50} (obě jsou diskutovány v jiné části textu) pro danou sloučeninu. Data získaná z testů na buněčných kulturách a studií na zvířatech mohou být použita ke stanovení rozpětí dávky pro použití u lidí. Dávkování může být v tomto rozmezí různé v závislosti na používané dávkové formě a způsobu podání. Přesná formulace, způsob podání a dávkování mohou být vybrány jednotlivým lékařem v závislosti na stavu pacienta (viz Fingel *et al.*, 1975, v „Pharmacological Basis of Therapeutics“, Ch. 1 pl).

45

50

Množství a interval dávky mohou být upraveny individuálně k získání plazmových koncentrací účinné látky, které stačí k udržení modulačních účinků kinázy. Tyto plazmové koncentrace se označují jako minimální účinné koncentrace (MEC). Hodnota MEC bude pro každou sloučeninu jiná, ale může být stanovena z *in vitro* dat; např. koncentrace potřebná k dosažení 50 až 90% inhibice kinázy může být stanovena s použitím zde popsaných testů. Dávky potřebné k dosažení MEC budou záviset na individuálních charakteristikách a způsobu podání. Ke stanovení plazmových koncentrací může být používána HPLC nebo bioanalýzy.

55

Intervaly mezi dávkami mohou být také stanoveny pomocí hodnoty MEC. Sloučeniny by měly být podávány podle režimu, kterým se udržují plazmové hladiny nad hodnotou MEC v průběhu 10 až 90 % doby, výhodně mezi 30 až 90 % a nejvýhodněji 50 až 90 %.

V současné době se pohybují terapeuticky účinná množství sloučenin obecného vzorce I v rozmezí přibližně od 25 mg/m² do 1 500 mg/m² denně; výhodně asi 3 mg/m² denně. Výhodněji od 50 mg/qd do 400 mg/qd.

- 5 V případech lokálního podání nebo selektivní absorpce nemůže účinná místní koncentrace léčiva odpovídat plazmové koncentraci a dalším standardním způsobům používaným ke stanovení přesného množství dávky a intervalu.

- 10 Množství podávaného přípravku bude samozřejmě záviset na ošetřovaném subjektu, závažnosti jeho stavu, způsobu podání, posouzení ošetřujícího lékaře atd.

- 15 Přípravky, pokud je třeba, mohou být ve formě balení nebo zásobníku, jako je kit schválený FDA, který může obsahovat jednu nebo více jednotkových dávkovacích forem obsahujících aktivní složku. Balení může např. obsahovat kovovou nebo plastovou fólii, např. měkké průhledné balení. Balení nebo zásobník může být distribuován společně s návodem k podání. K balení nebo zásobníku může být připojeno upozornění související s obsahem ve formě předepsaného orgánem státní správy regulujícím výrobu, použití nebo prodej farmaceutických prostředků, kterým se schvaluje forma nebo složení přípravků pro lidské nebo veterinární aplikace. Upozorněním tohoto typu může být například nálepka schválená U.S. Food and Drug Administration pro léky na předpis nebo schválený příbalový leták. Také mohou být připraveny přípravky obsahující sloučeninu podle vynálezu formulovanou v kompatibilním farmaceutickém nosiči umístěné ve vhodné nádobce a označené pro ošetření indikovaného stavu. Vhodné indikované stavy uvedené na nálepce mohou zahrnovat ošetření nádoru, inhibici angiogeneze, ošetření fibrózy, diabetu atd.

- 25 Další aspekt předloženého vynálezu zahrnuje to, že sloučenina podle předloženého vynálezu nebo její sůl nebo proléčivo může být kombinována s dalšími chemoterapeutiky pro ošetření onemocnění a poruch uvedených výše. Například může být sloučenina, sůl nebo proléčivo podle předloženého vynálezu kombinována s alkylačními činidly, jako je fluorouracil (5-FU) samotný nebo v další kombinaci s leukovorinem; nebo další alkylační činidla, například, ale není to nikterak limitováno, jiná pyrimidinová analoga, např. Tegafor-uracil (UFT), kapecitabin, gemcitabin a cytarabin, alkylsulfonáty, např. busulfan (používaný při ošetření chronické granulocytové leukémie), improsulfan a piposulfan; aziridiny, např. benzodepa, karboquon, meturedpa a uredepa; ethyleniminy a methylnelaminy, např. altretamin, triethylnelamin, triethylenfosforamid, triethylenfosforamid a trimethylolmelamin; a dusíkaté yperity, např. chlorambucil (používaný při ošetření chronické lymfocytární leukémie, primární makroglobulinémie a ne Hodgkinova lymfomu), cyklofosfamid (používaný při ošetření Hodgkinovy nemoci, mnohočetného myelomu, neuroblastomu, rakoviny prsu, ovariální rakoviny, rakoviny plic, Wilmsova nádoru a rhabdomyosarkomu), estramustin, ifosfamid, novembrichin, prednimustin a uracilové yperity používané při ošetření primární trombocytózy, ne Hodgkinova lymfomu, Hodgkinovy nemoci a ovariální rakoviny); a triaziny, např. dacarbazin (používaný při ošetření sarkomu měkké tkáně).

- 45 Sloučenina, sůl nebo proléčivo předloženého vynálezu může být také používáno v kombinaci s dalšími antimetabolitovými chemoterapeutiky, například, ale není to nikterak limitováno, analoga kyseliny listové skupiny, např. methotrexát (používaný při ošetření akutní lymfocytární leukémie, choriokarcinomu, mycosis fungoides rakoviny prsu, rakoviny hlavy a krku a osteogenního sarkomu) a pteropterin; a purinová analoga, např. merkaptopurin a thioguanin, který nalezl použití při ošetření akutní granulocytární, akutní lymfocytární a chronické granulocytární leukémie.

- 50 Také se uvažuje, že sloučenina, sůl nebo proléčivo podle předloženého vynálezu může být také používáno v kombinaci s chemoterapeutiky na přírodní bázi, například, ale není to nikterak limitováno, vinkové alkaloidy, např. vinblastin (používaný při ošetření rakoviny prsu a rakoviny varlete), vinkristin a vindesin; epipodofylotoxiny, například etoposid a teniposid, obě jsou použitelné při ošetření rakoviny varlete a Kaposiho sarkomu; antibiotická chemoterapeutika, například daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, mitomycin (používaný k ošetření rakoviny žaludku, čípku,

tlustého střeva, prsu, močového měchýře a pankreatu), daktinomycin, temozolomid, plikamycin, bleomycin (používaný při ošetření rakoviny kůže, jícnu a genitourinárního traktu); a enzymatická chemoterapeutika, např. L-asparagináza.

- 5 Kromě výše uvedených mohou být také sloučeniny, soli nebo proléčiva podle předloženého vynálezu používány v kombinaci s koordinačními komplexy na bázi platiny (cisplatina, atd.); substituovanými močoviny, např. hydroxymočovina; deriváty methylhydrazinu, např. prokarbazin; adrenokortikálními supresivy, např. mitotan, aminoglutethimid; a hormony a antagonisty hormonů, např. adrenokortikosteroidy (např. prednison), progestiny (např. kapronát hydroxyprogesteronu); estrogeny (např. diethylstilbesterol); antiestrogeny, např. tamoxifen; androgeny, např. propionát testosteronu; a inhibitory aromatáz, např. anastrozol.

- 10 Také se předpokládá, že kombinace sloučeniny podle předloženého vynálezu bude účinná v kombinaci s mitoxantronem nebo paclitaxelem pro ošetření pevných nádorů nebo leukémií, například, ale není to nikterak limitováno, akutní myeloidní leukémie (nelymfocytární).

Obecný syntetický postup

K přípravě sloučenin podle předloženého vynálezu je možno použít této obecné metody:

- 20 Příslušně substituovaný 2-oxoindol (1 ekviv.), příslušně substituovaný aldehyd (1,2 ekviv.) a báze (0,1 ekviv.) se smíchají v rozpouštědle (1 až 2 ml/mmol 2-oxoindolu) a směs se pak zahřívá po dobu asi 2 až asi 12 hodin. Po ochlazení se vzniklý precipitát filtruje, promyje studeným ethanolem nebo etherem a suší za vakua, čímž se získá produkt v pevné formě. Pokud nevznikne precipitát, reakční směs se koncentruje a zbytek se trituruje směsí dichlormethanu a etheru, výsledná pevná látka se shromáždí filtrací a suší. Produkt může být případně dále čištěn chromatografií.

- 25 Báze může být organická nebo anorganická báze. Je-li používána organická báze, pak je jí výhodně dusíkatá báze. Příklady organický dusíkatých báze zahrnují, ale bez omezení, diizopropylamin, trimethylamin, triethylamin, anilin, pyridin, 1,8-diazabicyklo[5.4.1]undec-7-en, pyrrolidin a piperidin.

- 30 Příklady anorganických bázi zahrnují, ale bez omezení, amoniak, hydroxidy alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, fosforečnany, uhličitany, hydrogenuhličitany, hydrogensířany a amidy. Alkalické kovy zahrnují lithium, sodík a draslík, zatímco alkalické zeminy zahrnují vápník, hořčík a baryum.

- 40 Ve výhodném provedení předloženého vynálezu, za předpokladu, že rozpouštědlo je protické, např. voda nebo alkohol, je báze anorganická báze alkalického kovu nebo alkalické zeminy, výhodně hydroxid alkalického kovu nebo alkalické zeminy.

Odborné veřejnosti, a to na základě obecných principů organické syntézy a dosavadního popisu, nebude činit potíže zvolit pro příslušnou reakci nejvhodnější bázi.

- 45 Rozpouštědlo, ve kterém reakce probíhá, může být buď protické, nebo aprotické, výhodně protické.

- 50 Termín „protické rozpouštědlo“ se vztahuje na rozpouštědlo, která má atom(y) vodíku kovalentně vázaný k atomům kyslíku nebo dusíku, což činí vodíkové atomy značně kyselými, a tím schopnými podílet se solutem na vodíkových vazbách. Příklady protických rozpouštědel zahrnují, ale není to nikterak limitováno, vodu a alkoholy.

- 55 Termín „aprotické rozpouštědlo“ se vztahuje na rozpouštědlo, které může být polární i nepolární, ale neobsahuje kyselé vodíky, a tudíž není schopné podílet se solutem na vodíkových vazbách. Příklady nepolárních aprotických rozpouštědel zahrnují, ale není to nikterak limitováno, pentan,

hexan, benzen, toluen, methylenchlorid a tetrachlormethan. Příklady polárních aprotických rozpouštědel zahrnují chloroform, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid a dimethylformamid.

5 Ve výhodném provedení podle předloženého vynálezu je rozpouštědlo protické, výhodně voda nebo alkohol, např. ethanol.

10 Reakce je prováděna při teplotách, které jsou vyšší než pokojová teplota. Teplota se obecně pohybuje od asi 30 °C do asi 150 °C, výhodně od asi 80 °C do asi 100 °C, nejvýhodněji od asi 75 °C do asi 85 °C, což je asi teplota varu ethanolu. Termín „asi“ znamená, že teplota se výhodně pohybuje v rozmezí 10 stupňů Celsia uvedené teploty, nejvýhodněji v rozmezí 2 stupňů Celsia uvedené teploty. Tudiž například „asi“ 75 °C znamená 75 °C ± 10 °C, výhodně 75 °C ± 5 °C a nejvýhodněji 75 °C ± 2 °C.

15 2-Oxindoly a aldehydy mohou být snadno syntetizovány standardními chemickými způsoby. Z textu by mělo být odborné veřejnosti srozumitelné, že sloučeniny podle předloženého vynálezu lze připravit i jinými syntetickými způsoby a následující příklady slouží jako návrh způsobu přípravy, který nemá být nikterak limitující.

20 Příklady provedení vynálezu

Následující přípravy a příklady jsou zde pro snazší pochopení předloženého vynálezu a nemají nikterak limitovat rozsah vynálezu, ale pouze ho ilustrovat a reprezentovat.

25 Syntetické příklady

Způsob A: Formylace pyrrolů

30 POCl₃ (1,1 ekviv.) se přidá po kapkách do dimethylformamidu (3 ekviv.) při teplotě -10 °C, poté se přidá příslušný pyrrol rozpuštěný v dimethylformamidu. Po míchání po dobu dvou hodin se reakční směs zředí H₂O a alkalizuje na pH 11 s 10N KOH. Vzniklý precipitát se spojí filtrací, promyje vodou a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá požadovaný aldehyd.

35 Způsob B: Saponifikace esterů pyrrolkarboxylové kyseliny

40 Směs esteru pyrrolkarboxylové kyseliny a KOH (2 až 4 ekviv.) v EtOH se refluxuje, dokud reakce neskončí (podle TLC). Ochlazená reakční směs se okyselí na pH 3 1N HCl. Vzniklý precipitát se spojí filtrací, promyje vodou a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá pyrrolkarboxylová kyselina.

Způsob C: Amidace

45 Do míchaného roztoku pyrrolkarboxylové kyseliny rozpuštěné v dimethylformamidu (0,3M) se přidá 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (1,2 ekviv.), 1-hydroxybenzotriazol (1,2 ekviv.) a triethylamin (2 ekviv.). Přidá se příslušný amin (1 ekviv.) a reakce se míchá do té doby, dokud nedoběhne, a sleduje se na TLC. Pak se do reakční směsi přidá ethylacetát a roztok se promyje nasyceným roztokem NaHCO₃ a solankou (s dostatečnou solí), suší nad bezvodým MgSO₄ a koncentruje, čímž se získá požadovaný amid.

50 Způsob D: Kondenzace aldehydů a oxindolů obsahujících substituenty karboxylové kyseliny

Směs oxindolu (1 ekviv.), 1 ekviv. aldehydu a 1 až 3 ekviv. piperidinu (nebo pyrrolidinu) v ethanolu (0,4M) se míchá při teplotě 90 až 100 °C do té doby, dokud reakce nedoběhne, a sleduje se

na TLC. Směs se pak koncentruje a zbytek okyslí 2N HCl. Vzniklý precipitát se promyje vodou a ethanolem a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá produkt.

Způsob E: Kondenzace aldehydů a oxindolů neobsahujících substituenty karboxylové kyseliny

5

Směs oxindolu (1 ekviv.), 1 ekviv. aldehydu a 1 až 3 ekviv. piperidinu (nebo pyrrolidinu) v ethanolu (0,4M) se míchá při teplotě 90 až 100 °C do té doby, dokud reakce nedoběhne, a sleduje se na TLC. Směs se pak ochladí na pokojovou teplotu a vzniklý pevný podíl se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a suší, čímž se získá produkt. Pokud se po ochlazení reakční směsi

10

nevytvoří precipitát, směs se koncentruje a čistí sloupcovou chromatografií.

C. Příklady syntéz oxindolů

15

Následující příklady syntézy reprezentativních oxindolů nemají nikterak limitovat rozsah předloženého vynálezu. Na základě následujícího popisu budou odborné veřejnosti jasné alternativní způsoby přípravy uvedených oxindolů, jakož i dalších oxindolů používaných k přípravě sloučenin podle předloženého vynálezu. Tyto syntézy a oxindoly spadají rovněž do rozsahu a charakteru tohoto vynálezu.

20

5-amino-2-oxindol

5-Nitro-2-oxindol (6,3 g) se hydrogenuje v methanolu nad 10% palladiem na aktivním uhlí, čímž se získá 3,0 g (60% výtěžek) požadované sloučeniny ve formě pevné bílé látky.

25

5-Brom-2-oxindol

2-Oxindol (1,3 g) ve 20 ml acetonitrilu se ochladí na teplotu -10 °C a do reakční směsi se za intenzivního míchání pomalu přidá 2,0 g *N*-bromsukcinimidu. Reakční směs se míchá po dobu 1 hodiny při teplotě -10 °C a 2 hodiny při teplotě 0 °C. Precipitát se spojí, promyje vodou a suší, čímž se získá 1,9 g (90% výtěžek) požadované sloučeniny.

30

4-Methyl-2-oxindol

Diethyloxalát (30 ml) ve 20 ml suchého etheru se přidá za stálého míchání do 19 g ethoxidu draselného suspendovaného v 50 ml suchého etheru. Směs se ochladí v ledové lázni a pomalu se přidá 20 ml 3-nitro-*o*-xylenu ve 20 ml suchého etheru. Hustá tmavá červená směs se zahřívá při refluxu po dobu 0,5 hodiny, koncentruje na tmavě červenou pevnou látku a nechá reagovat s 10% roztokem hydroxidu sodného, dokud se nerozpustí téměř veškerý pevný podíl. Tmavě červená směs se nechá reagovat s 30% peroxidem vodíku, dokud se červená barva směsi nezmění na žlutou. Alternativně se směs nechá reagovat s 10% roztokem hydroxidu sodného a 30% peroxidem vodíku, dokud tmavě červená barva roztoku nezmizí. Pevný podíl se odfiltruje a filtrát okyslí 6N kyselinou chlorovodíkovou. Výsledný precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje vodou a suší za vakua, čímž se získá 9,8 g (45% výtěžek) 2-methyl-6-nitrofenyloctové kyseliny ve formě bělavé pevné látky. Pevný podíl se hydrogenuje v methanolu nad 10% palladiem na aktivním uhlí, čímž se získá 9,04 g požadované sloučeniny ve formě bílé pevné látky.

45

7-brom-5-chlor-2-oxindol

5-Chlor-2-oxindol (16,8 g) a 19,6 g *N*-bromsukcinimidu se suspenduje ve 140 ml acetonitrilu a refluxuje po dobu 3 hodin. Po 2 hodinách refluxu byl na TLC (silikagel, ethylacetát) vidět 5-chlor-2-oxindol nebo *N*-bromsukcinimid (R_f 0,8), produkt (R_f 0,85) a druhý produkt (R_f 0,9), jejichž podíly se nezměnily ani po další hodině při refluxu. Směs se ochladí na teplotu 10 °C, precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje 25 ml ethanolu a suší odsazením po dobu 20 minut v nálevce, čímž se získá 14,1 g vlhkého produktu (56% výtěžek). Pevný podíl se suspenduje ve

55

200 ml denaturovaného ethanolu a kašovitá směs se míchá a refluxuje po dobu 10 minut. Směs se ochladí v ledové lázni na teplotu 10 °C. Pevný produkt se spojí vakuovou filtrací, promyje 25 ml ethanolu a suší za vakua při teplotě 40 °C, čímž se získá 12,7 g (51% výtěžek) 7-brom-5-chlor-2-oxindolu.

5

5-Fluor-2-oxindol

5-Fluorisatin (8,2 g) se rozpustí v 50 ml hydrátu hydrazinu a refluxuje po dobu 1,0 hodiny. Reakční směs se nalije do ledové vody. Precipitát se pak filtruje, promyje vodou a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá požadovaná sloučenina.

10

5-Nitro-2-oxindol

2-Oxindol (6,5 g) se rozpustí v 25 ml koncentrované kyseliny sírové a směs se udržuje při teplotě -10 až -15 °C, zatímco se po kapkách přidává 2,1 ml dýmavé kyseliny dusičné. Po přidání kyseliny dusičné se reakční směs míchá při teplotě 0 °C po dobu 0,5 hodiny a nalije do ledové vody. Precipitát se spojí filtrací, promyje vodou a krystalizuje z 50% kyseliny octové. Krystalický produkt se pak filtruje, promyje vodou a suší za vakua, čímž se získá 6,3 g (70 %) 5-nitro-2-oxindolu.

15

20

5-Aminosulfonyl-2-oxindol

Do 100ml baňky naplněné 27 ml chlorsulfonové kyseliny se pomalu přidá 13,3 g 2-oxindolu. Reakční teplota se během přidávání udržuje pod 30 °C. Po přidání se reakční směs míchá při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny, zahřívá při teplotě 68 °C po dobu 1 hodiny, ochladí a nalije do vody. Precipitát se promyje vodou a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá 11,0 g 5-chlorsulfonyl-2-oxindolu (50% výtěžek), který se dále používá bez čištění.

25

30

5-Chlorsulfonyl-2-oxindol (2,1g) se přidá do 10 ml hydroxidu amonného v 10 ml ethanolu a míchá při pokojové teplotě přes noc. Směs se koncentruje a pevný podíl se spojí vakuovou filtrací, čímž se získá 0,4 g (20% výtěžek) požadované sloučeniny ve formě bělavé pevné látky.

5-Isopropylaminosulfonyl-2-oxindol

Do 100ml baňky naplněné 27 ml chlorsulfonové kyseliny se pomalu přidá 13,3 g 2-oxindolu. Reakční teplota se během přidávání udržuje pod 30 °C. Po přidání se reakční směs míchá při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny, zahřívá při teplotě 68 °C po dobu 1 hodiny, ochladí a nalije do vody. Precipitát se promyje vodou a suší ve vakuové sušárně, čímž se získá 11,0 g 5-chlorsulfonyl-2-oxindolu (50% výtěžek), který se dále používá bez čištění.

35

40

45

Suspenze 3 g 5-chlorsulfonyl-2-oxindol 11,5 g izopropylaminu a 1,2 ml pyridinu v 50 ml dichlormethanu se míchá při pokojové po dobu 4 hodin, během kterých se vytvoří pevný podíl, jenž se spojí vakuovou filtrací, kašovitá směs se promyje horkým ethanollem, ochladí, spojí vakuovou filtrací a suší za vakua při teplotě 40 °C přes noc, čímž se získá 1,5 g (45 %) 5-izopropylaminosulfonyl-2-oxindolu.

50

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆; DMSO=dimethylsulfoxid) δ 10,69 (s, br, 1H, NH), 7,63 (dd, J = 2 a 8 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,32 (d, J = 7 Hz, 1H, NH-SO₂-), 6,93 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,57 (s, 2H), 3,14 – 3,23 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 0,94 (d, J = 7 Hz, 6H, 2 x CH₃).

55

5-Fenylaminosulfonyl-2-oxindol

Suspenze 5-chlorsulfonyl-2-oxindolu (1,62 g, 7 mmol), anilinu (0,782 ml, 8,4 mmol) a pyridinu (1 ml) v dichlormethanu (20 ml) se míchá při pokojové po dobu 4 hodin. Reakční směs se zředí ethylacetátem (300 ml) a okyselí 1N kyselinou chlorovodíkovou (16 ml). Organická vrstva se

60

promyje hydrogenuhlíčanem sodným a solankou, suší a koncentruje. Zbytek se promyje ethanolom (3 ml) a pak chromatografuje na sloupci silikagelu ve směsi methanolu a dichlor-methanu (1:9) jako mobilní fázi, čímž se získá 5-fenylaminosulfonyl-2-oxindol.

- 5 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,71 (s, br, 1H, NH), 10,10 (s, br, 1H, NH), 7,57 – 7,61 (m, 2H), 7,17 – 7,22 (m, 2H), 7,06 – 7,09 (m, 2H), 6,97 – 7,0 (m, 1H), 6,88 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 3,52 (s, 2H).

Pyridin-3-ylamid 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny

- 10 Roztok 5-chlorsulfonyl-2-oxindolu (3 g) a 3-aminopyridinu (1,46 g) v pyridinu (15 ml) se míchá při pokojové teplotě přes noc, kdy se objeví hnědá pevná látka. Pevný podíl se filtruje, promyje ethanolom a suší za vakua, čímž se získá 1,4 g (38 %) pyridin-3-ylaminu 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny.

- 15 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,74 (s, 1H, NH), 10,39 (s, 1H, SO_2NH), 8,27 – 8,28 (d, 1H), 8,21 – 8,23 (m, 1H), 7,59 – 7,62 (m, 2H), 7,44 – 7,68 (m, 1H), 7,24 – 7,28 (m, 1H), 6,69 – 6,71 (d, 1H), 3,54 (s, 2H).
MS m/z (APCI+) 290,2.

- 20 5-Fenylloxindol

- 5-Brom-2-oxindol (5 g, 23,5 mmol) se za stálého míchání a malého zahřevu rozpustí v 100 ml toluenu a 110 ml ethanolu. Přidá se tetrakis(trifenylfosfin)palladium (1,9 g, 1,6 mol), poté 40 ml
25 (80 mmol) 2M vodného uhlíčitanu sodného. Do této směsi se přidá benzenboronová kyselina (3,7 g, 30,6 mmol) a směs se zahřívá při teplotě olejové lázně 100 °C po dobu 12 hodin. Reakční směs se ochladí, zředí ethylacetátem (500 ml), promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (200 ml), vodou (200 ml), 1N HCl (200 ml) a solankou (200 ml). Organická vrstva se suší nad síranem hořečnatým a koncentruje, čímž se získá hnědá pevná látka. Triturací dichlor-methanem se získá 3,8 g (77 %) 5-fenyl-2-oxindolu jako hnědé pevné látky.

- ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,4 (br s, 1H, NH), 7,57 (dd, J = 1,8 a 7,2 Hz, 1H), 7,5 až 7,35 (m, 5H), 7,29 (m, 1H), 6,89 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 3,51 (s, 2H, CH_2CO).

- 35 MS m/z 209 $[\text{M}]^+$.

Podobným způsobem mohou být připraveny následující oxindoly:

- 40 6-(3,5-dichlorfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,46 (br, 1H, NH), 7,64 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,27 (m, 2H), 7,05 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 3,5 (s, 2H).

- MS-EI m/z 277/279 $[\text{M}]^+$.

- 45 6-(4-Butylfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

- ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 10,39 (s, 1H, NH), 7,49 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 8 Hz, 3H), 7,17 (dd, J = 1,5 a 7,8 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 3,48 (s, 2H, CH_2CO), 2,60
50 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1,57 (m, 2H, CH_2), 1,32 (m, 2H, CH_2), 0,9 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH_3).

6-(5-Izopropyl-2-methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,29 (br s, 1H, NH), 7,16 – 7,21 (m, 2H), 7,08 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,97 – 7,01 (m, 2H), 6,89 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,47 (s, 2H, CH₂CO), 2,86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,19 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 281 [M]⁺.

6-(4-Ethylfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,39 (br s, 1H, NH), 7,50 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 7,25 (d, J = 7,5, 1H), 7,17 (dd, J = 1,6 & 7,5 Hz, 1H), 6,99 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 3,48 (s, 2H, CH₂CO), 2,63 (q, J = 7,6 Hz, 2H, CH₂CH₃), 1,20 (t, J = 7,6 Hz, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI m/z 237 [M]⁺.

6-(3-Izopropylfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,37 (br s, 1H, NH), 7,43 (m, 1H), 7,35 – 7,39 (m, 1H), 7,17 – 7,27 (m, 3H), 7,01 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 3,49 (s, 2H, CH₂CO), 2,95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,24 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 251 [M]⁺.

6-(2,4-Dimethoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,28 (br s, 1H, NH), 7,17 (m, 2H), 6,93 (dd, J = 1,6 & 7,6 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 6,63 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,58 (dd, J = 2,4 & 8,5 Hz, 1H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,45 (s, 2H, CHO).

MS-EI m/z 269 [M]⁺.

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,51 (s, 1H, NH), 8,81 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 8,55 (dd, J = 1,8 a 5,7 Hz, 1H), 8 (m, 1H), 7,45 (dd, J = 5,7 a 9,3 Hz, 1H), 7,3 (m, 2H), 7,05 (s, 1H), 3,51 (s, 2H, CH₂CO).

MS m/z 210 [M]⁺.

(3-chlor-4-ethoxyfenyl)amid 2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-4-karboxylové kyseliny

Do roztoku 4-karboxy-2-oxindolu (200 mg, 1,13 mmol) a 3-chlor-4-methoxyfenylaminu (178 mg, 1,13 mmol) v dimethylformamidu (15 ml) při pokojové teplotě se přidá benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorofosfát (BOP činidlo, 997 mg, 2,26 mmol), poté 4-dimethylaminopyridin (206 mg, 1,69 mmol), směs se míchá při pokojové teplotě po dobu 72 hodin. Reakce se pak zředí ethylacetátem (300 ml), promyje nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (100 ml), vodou, 2N kyselinou chlorovodíkovou (100 ml), vodou (3 x 200 ml) a solankou. Pak se suší nad síranem hořečnatým a koncentruje. Zbytek se trituruje ethylacetátem, čímž se získá (3-chlor-4-methoxyfenyl)amid 2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-4-karboxylové kyseliny ve formě růžové pevné látky. ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 10,50 (s br, 1H, NH), 10,12 (s, br, 1H, NH), 7,9 (s, J = 2,5 Hz, 1H), 7,62 (dd, J = 2,5 & 9 Hz, 1H), 7,38 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,32 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 9 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,69 (s, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 316 $[M]^+$.

4-Karboxy-2-oxindol

5

Roztok trimethylsilyldiazomethanu v hexanu (2M) se přidává po kapkách do roztoku 2,01 g 2-chlor-3-karboxynitrobenzenu v 20 ml methanolu při pokojové teplotě, dokud se nepřesáhne uvolňovat plyn. Ke zhášení přebytku trimethylsilyldiazomethanu se přidá kyselina octová a zbytek se suší v sušárně přes noc. Získaný 2-chlor-3-methoxykarbonylnitrobenzen je dostatečně čistý k následující reakci.

10

Dimethyl-malonát (6,0 ml) se přidá do ledově studené suspenze 2,1 g hydridu sodného v 15 ml DMSO. Reakční směs se míchá při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny, pak se ochladí na pokojovou teplotu a po částech se přidá 2-chlor-3-methoxykarbonylnitrobenzen (2,15 g) a směs se zahřívá při teplotě 100 °C po dobu 1,5 hodiny. Reakční směs se pak ochladí na pokojovou teplotu, nalije do ledové vody, okyselí na pH = 5 a extrahuje ethylacetátem. Organická vrstva se promyje solankou, suší nad bezvodým síranem sodným a koncentruje, čímž se získají 3,0 g dimethyl-2-methoxykarbonyl-6-nitrofenylmalonátu.

15

20

Dimethyl-2-methoxykarbonyl-6-nitrofenylmalonát (3,0 g) se refluxuje v 50 ml 6N kyseliny chlorovodíkové přes noc. Směs se koncentruje do sucha, přidá se 20 ml ethanolu a 1,1 g chloridu cínatého a směs se refluxuje po dobu 2 hodin. Směs se filtruje přes Celit, koncentruje a chromatografuje na sloupci silikagelu ve směsi ethylacetátu, hexanu a octové kyseliny jako mobilní fázi, čímž se získá 0,65 g (37 %) 4-karboxy-2-oxindolu jako bílé pevné látky.

25

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 12,96 (s, br, 1H, COOH), 10,74 (s, br, 1H, NH), 7,53 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,39 (t, J = 8 Hz, 1H), 7,12 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,67 (s, 2H).

D. Syntéza pyrrolem substituovaných 2-indolinonů

30

Příklad 1

4-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina

35

Ethylester 4-methyl-2-pyrrolkarboxylové kyseliny (komerčně dostupný) se formyluje podle způsobu A, čímž se získá (73 %) ethylester 5-formyl-4-methyl-2-pyrrolkarboxylové kyseliny, která se pak hydrolyzuje podle způsobu B, čímž se získá 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina (58 %).

40

Oxindol (133 mg, 1 mmol) se kondenzuje s 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylovou kyselinou (153 mg) podle způsobu D, čímž se získá 268 mg (100 %) požadované sloučeniny jako oranžovo-červené pevné látky.

45

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,84 (s, br, 1H, NH), 12,84 (s, br, 1H, COOH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H, H-vinyl), 7,18 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 7,01 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H, CH₃).

MS (negativní mód) 266,8 $[M-1]^+$.

50

Příklad 2

4-Methyl-5-(1-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylová kyselina

55

1-Methyl-1,3-dihydroindol-2-on (147mg, 1 mmol) se kondenzuje s 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylovou kyselinou (153 mg) podle způsobu D, čímž se získá 250 mg (86 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,82 (s, br, 1H, NH), 12,88 (s, br, 1H), 7,83 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,65 (s, 1H, H-vinyl), 7,26 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,02 – 7,09 (m, 2H), 6,70 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H, CH₃).

MS *m/z* 283,0 [M+1]⁺.

Příklad 3

methylester 4-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

Oxindol (105 mg, 0,79 mmol) se kondenzuje s methylesterem 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (110 mg, 0,67 mmol) podle způsobu E, čímž se získá 153,2 mg (81 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,98 (s, br, 1H, NH), 10,97 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H, H vinyl), 7,2 (dt, *J* = 1,2 & 7,7 Hz, 1H), 7,01 (dt, *J* = 1,2, 7,7 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,77 (d, *J* = 2 Hz, 1H).

MS (ES) *m/z* 283 [M⁺+1].

Příklad 4

ethylester 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Chlor-1,3-dihydroindol-2-on (2,22 g, 13,2 mmol) se kondenzuje s ethylesterem 5-formyl-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (2,43 g) podle způsobu E, čímž se získá 4,1 mg (94 %) požadované sloučeniny jako oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,95 (s, br, 1H, NH), 7,98 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,18 (dd, *J* = 2,2 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H-7), 7,34 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, H-3'), 4,27 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,29 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS (ES) *m/z* 330 [M⁺].

Příklad 5

5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina

Směs ethylesteru 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (1,3 mg, 4 mmol) a hydroxidu draselného v methanolu (25 ml) a ethanolu (25 ml) se zahřívají při refluxu přes noc. Nerozpustné látky se odstraní filtrací a směs se neutralizuje 6*N* kyselinou chlorovodíkovou, čímž se získá 0,876 g (70 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,80 (s, br, 1H, NH), 12,90 (s, br, 1H, COOH), 1,06 (s, br, 1H, NH), 8,02 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,81 (s, 1H, H-vinyl), 7,20 (dd, J = 1,8 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,89 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 6,72 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-3'), 2,35 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 302 [M⁺].

Příklad 6

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,16 g, 0,76 mmol) se kondenzuje s (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)-amidem 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (0,2 g, připravený podle způsobu C), čímž se získá 60 mg (17 %) požadované sloučeniny jako oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,42 (t, J = 5,8 Hz, 1H, CONCH₂), 8,12 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,30 (dd, J = 1,8 & 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 6,77 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-3'), 3,22 – 3,31 (m, 2H, CH₂), 2,38 – 2,43 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,62 – 1,71 (m, 6H, 3 x CH₂).

MS-EI m/z 456 a 458 [M⁺-1 a M⁺-2].

Příklad 7

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,16 g, 0,75 mmol) se kondenzuje s (3-dimethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (0,2 g, připravený podle způsobu C), čímž se získá 30 mg (8 %) požadované sloučeniny jako oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,40 (m, 1H, CONCH₂), 8,12 (d, J = 1,5 Hz, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,30 (dd, J = 1,5 & 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 6,78 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-3'), 3,23 (m, 2H, CH₂), 2,38 – 2,45 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 458 a 460 [M⁺-] a M⁺+2].

Příklad 8

(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (212 mg, 1 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (připravený z ethyl-pyrrol-2-karboxylátu podle způsobu A, B a pak C), čímž se získá 162 mg (38 %) požadované sloučeniny.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,53 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,37 (t, 1H, CONCH₂), 7,89 (m, 2H), 7,32 (dd, $J = 2,0$ Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,80 – 6,84 (m, 2H), 3,3 (m, 2H, CH₂), 2,45 – 2,55 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0,95 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

5 MS-EI m/z 430 a 432 [$M^+ - 1$ a $M^+ + 1$].

Příklad 9

10 (2-diethylaminoethyl)amid 5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (209 mg, 1 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 182 mg (42 %) požadované sloučeniny.

15 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,56 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,36 (t, 1H, CONCH₂), 7,77 (s, 1H, H-vinyl), 7,73 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,96 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 3,31 – 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,46 – 2,53 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 0,96 (t, $J = 6,9$ Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 428 [M^+].

25 Příklad 10

(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

30 5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (212 mg, 1 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-methyamidem 5-formyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 246 mg (55 %) požadované sloučeniny.

35 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,54 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 7,90 (m, 2H), 7,33 (dd, $J = 1,8$ & $8,4$ Hz, 1H), 6,82 – 6,85 (m, 3H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,57 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, CH₂), 2,45 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,91 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 444 a 446 [$M^+ - 1$ a $M^+ - 1$].

40

Příklad 11

(2-diethylaminoethyl)methyamid 5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

45 6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (209 mg, 1 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-methyamidem 5-formyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 277 mg (63 %) požadované sloučeniny.

50 ^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,58 (s, br, 1H, NH), 11,04 (s, br, 1H, NH), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,73 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,33 – 7,36 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,84 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,58 (t, 2H, CH₂), 2,44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Příklad 12

(3-diethylaminopropyl)amid 3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

Oxindol (66,5 mg, 0,5 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (připraveným z ethylesteru 3-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny podle způsobu B, pak C), čímž se získá 39 mg (21 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,34 (s, br, 1H, NH), 10,88 (s, br, 1H, NH), 7,62 – 7,67 (m, 3H), 7,17 (m, 1H), 6,99 (m, 1H), 6,87 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,63 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 3,26 – 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,41 – 2,48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, *J* = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 380 [M⁺].

Příklad 13

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (106 mg, 0,5 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 35 mg (15 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,35 (s, br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 7,89 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H, H-4), 7,80 (s, 1H, H-vinyl), 7,74 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, CONCH₂), 7,31 (dd, *J* = 1,9 & 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,83 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-7), 6,63 (s, 1H, H-3'), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,41 – 2,48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 458 a 460 [M⁺-1 a M⁺+1].

Příklad 14

(3-diethylaminopropyl)amid 3-methyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (105 mg, 0,5 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 67,8 mg (30 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,37 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,23 – 7,73 (m, 11H), 3,29 (m, 2H, CH₂), 2,41 – 2,48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,64 (m, 2H, CH₂), 0,94 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Příklad 15

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

5-Methoxy-1,3-dihydroindol-2-on (82,5 mg, 0,5 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 80 mg (39 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,45 (s, br, 1H, NH), 10,70 (s, br, 1H, NH), 7,68 – 7,70 (m, 2H), 7,32 (d, J = 1,8 Hz, 1), 6,72 – 6,79 (m, 2H), 6,60 (s, 1H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,28 (m, 2H, CH₂), 2,41 – 2,48 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 410 [M⁺].

Příklad 16

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

6-Methoxy-1,3-dihydroindol-2-on (82,5 mg, 0,5 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny, čímž se získá 63 mg (31 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,22 (s, br, 1H, NH), 10,86 (s, br, 1H, NH), 7,39 – 7,63 a 6,37 – 6,55 (m, 6H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,3 (m, 2H, CH₂), 2,45 (m, 6H, CH₂ & N(CH₂CH₃)₂), 2,28 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS m/z 410 [M⁺].

Příklad 17

(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny

Ethylester 4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny (May, Donald A.; Lash, Timothy D.; *J. Org. Chem.*, 1992, 57 : 18, 4820 – 4828) se formyluje podle způsobu A, pak B, čímž se získá 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylová kyselina.

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (1,43 g, 6,8 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-amidem 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny (1,97 g), čímž se získá 2,2 g (67 %) požadované sloučeniny jako žluto-oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,47 (s, 1H, NH), 11,0 (s, 1H, NH), 8,0 (d, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, CH), 7,28 (dd, J = 2,1 a 8,2 Hz, 1H, ArH), 7,16 (m, 1H, ArH), 6,8 (d, J = 8,3 Hz, 1H, ArH), 3,3 (s, 2H, CONH), 2,5 (m, 6H, 3 x NCH₂), 2,78 (br m, 2H, pyrrol CH₂), 2,72 (br m, 2H, pyrrol CH₂), 1,7 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,74 (br s, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 0,96 (t, J = 7,4 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI m/z 484 a 486 [M⁺-1 a M⁺-1].

Příklad 18

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (20 mg, 0,1 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)-amidem 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny (30 mg), čímž se získá 33 mg (46 %) požadované sloučeniny jako oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,68 (m, 1H, ArH), 7,4 (m, 1H, ArH), 7,29 (d, *J* = 1,9 a 8,5 Hz, 1H, ArH), 6,8 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 2,7 (br m, 4H, 2 x NCH₂), 2,4 (m, 8H, 4xNCH₂), 1,7 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (br m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, *J* = 7,4 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 499 a 501 [*M*⁺ a *M*⁺-2].

Příklad 19

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 3-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (80 mg, 0,4 mmol) se kondenzuje s (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)-amidem 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny (120 mg), čímž se získá 43 mg (22 %) požadované sloučeniny jako hnědo-oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,4 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,69 (m, 1H, ArH), 7,49 (m, 1H, ArH), 7,28 (d, *J* = 1,7 a 7,8 Hz, 1H, ArH), 6,8 (d, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 3,3 (br m, 2H, 2 x NCH₂), 2,8 (m, 4H, 2 x pyrrolCH₂), 2,5 (br m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (br m, 8H, 2 x pyrrolCH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ a CONHCH₂).

MS-EI *m/z* 407 a 499 [*M*⁺ + *M*⁺-2].

Příklad 20

(2-diethylaminoethyl)amid 3-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-on (60 mg, 0,4 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 3-formyl-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-izoindol-1-karboxylové kyseliny (80 mg), čímž se získá 50 mg (38 %) požadované sloučeniny jako načervenalé pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, NH), 8,9 (d, 1H, NH), 8,7 (dd, 1H, ArH), 8,1 (dd, 1H, ArH), 7,9 (d, 1H, ArH), 7,6 (s, 1H, CH), 7,5 (dd, 1H, ArH), 7,3 (dd, 1H, ArH), 7,1 (m, 2H, ArH), 3,35 (m, 2H, CONHCH₂), 2,8 (m, 4H, 2 x pyrrolCH₂), 2,5 (br m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ a NCH₂), 1,75 (br s, 4H, 2 x pyrrolCH₂CH₂), 0,9 (t, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 484 [*M*⁺].

Příklad 21

(3-diethylaminopropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

Do směsi benzoylchloridu (1 ekviv.) a chloridu hlinitého (1 ekviv.) v dichlorethanu při teplotě 80 °C po dobu 4 hodin. Směs se pak extrahuje ethylacetátem (EtOAc) a H₂O, spojené organické

extrakty se promyjí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou, suší a koncentrují, čímž se získá 51 %) 4-benzoyl-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina.

Směs ethylesteru 4-benzoyl-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (4,13 g, 15,2 mmol) a dusičnanu ceričito-amonného (33 g, 4 ekviv.) v 50 ml směsi tetrahydrofuranu (THF), kyseliny octové (HOAc) a H₂O (1:1:1) se refluxuje přes noc. Reakční směs se pak ochladí, extrahuje EtOAc a pak alkalizuje na pH 9 uhličitanem sodným. Organická vrstva se pak promyje solankou, suší (MgSO₄) a koncentruje, poté čistí sloupcovou chromatografií, čímž se získá 3,25 g (75 %) ethylesteru 4-benzoyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny jako žluté pevné látky.

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on se kondenzuje s 4-benzoyl-5-formyl-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylovou kyselinou podle způsobu D, čímž se získá 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylová kyselina. Tato karboxylová kyselina se pak kondenzuje s *N,N*-diethyl-1,3-propandiaminem podle způsobu C, čímž se získá požadovaná sloučenina.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,96 (m, 1H, CONCH₂), 7,76 (d, *J* = 7,0 Hz, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,40 (s, 2H), 7,33 (dd, *J* = 1,6 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,84 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,42 – 2,46 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,65 (m, 2H, CH₂), 0,94 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 564 [M⁺+1].

25

Příklad 22

(3-morfolin-4-ylpropyl)amid 4-benzoyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

30

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,10 (s, 1H, NH), 11,14 (br, s, 1H, NH), 7,92 (m, 1H, CONCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,69 (t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,33 (dd, *J* = 1,9 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,85 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,56 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,35 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

35

Příklad 23

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-3-methyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

40

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,18 (s, 1H, NH), 11,14 (br, s, 1H, NH), 8,01 (m, 1H, CONCH₂), 7,74 (m, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,32 (s, 1H, H-vinyl), 7,17 (m, 1H), 6,92 (m, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,44 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,11 (s, 3H, CH₃), 1,65 – 1,75 (m, 6H, 3 x CH₂).

45

MS-EI *m/z* 482 [M⁺].

50

Příklad 24

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,01 (s, 1H, NH), 11,18 (br, s, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,33 (dd, J = 2,0 & 8,2 Hz, 1H, H₆), 6,84 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42 – 2,47 (m, 6H, 3 x C(H)₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,64 (m, 4H, 2 x CH₂).

5

Příklad 25

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-3-methyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

10

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,15 (s, 1H, NH), 11,16 (br, s, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONCH₂), 7,77 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,53 – 7,63 (m, 4H), 7,44 (m, 2H), 7,33 – 7,37 (m, 2H), 7,24 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,43 – 2,48 (m, 6 H, 3 x CH₂), 2,12 (s, H, CH₃), 1,74 (m, 2H, CH₂), 1,69 (m, 4H, 2 x CH₂).

15

MS-EI m/z 558 [M⁺].

20 Příklad 26

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-5-(6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

25

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,99 (s, 1H, NH), 11,05 (br, s, 1H, NH), 7,93 (m, 1H, CONCH₂), 7,72 (m, 2H), 7,65 (m, 1H), 7,54 (m, 2H), 7,15 (s, 1H, H-vinyl), 7,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-4), 6,51 (dd, J = 2,3 & 8,4 Hz, 1H, H-5), 6,44 (d, J = 2,3 Hz, 1H, H-7), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (m, 2H, CH₂), 2,42 až 2,46 (m, 6 H 3 x CH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,72 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2 x CH₂).

30

MS-EI m/z 512 [M⁺].

Příklad 27

35

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-5-(5-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

40

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,24 (s, 1H, NH), 10,90 (br, s, 1H, NH), 7,97 (m, 1H, CONCH₂), 7,75 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,24 (s, 1H, H-vinyl), 6,79 (m, 2H), 6,66 (m, 1H), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,43 až 2,48 (m, 6 H 3 x CH₂), 2,14 (s, 3H, CH₃), 1,71 (m, 2H, CH₂), 1,66 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI m/z 512 [M⁺].

45

Příklad 28

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-benzyol-5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

50

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,14 (br, s, 1H, NH), 8,03 (m, 1H, CONCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,38 (s, 1H, H-vinyl), 7,08 (m, 1H), 7,01

(m, 1H), 6,87 (m, 1H), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42 až 2,48 (m, 6 H 3 x CH₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI m/z 512 [M⁺].

5

Příklad 29

(3-diethylaminopropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

10

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 4-acetyl-5-formyl-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (přípraveným z ethylesteru 4-acetyl-5-formyl-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny podle způsobu B pak C), čímž se získá požadovaná sloučenina.

15

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,19 (br, s, 1H, NH), 8,15 (m, 1H, CONCH₂), 8,11 (s, 1H, H-vinyl), 7,72 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,38 (dd, J = 1,8 & 8,2 Hz, 1H, H6), 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,46 (m, 9 H, CH₃ & 3 x CH₂), 1,64 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

20

Příklad 30

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

25

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,14 (m, 1H, CONCH₂), 8,10 (s, 1H, H-vinyl), 7,70 (d, 1H, H-4), 7,36 (dd, J = 1,6 & 8,1 Hz, 1H, H-6), 6,85 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-7), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃Cl), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35 – 2,48 (m, 6H, 3 x CH₃), 1,65 – 1,71 (m, 6H, 3 x CH₂).

30

MS m/z 499 & 501 [M⁺] & [M⁺-2].

35

Příklad 31

(3-morfolin-4-ylpropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

40

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,26 (br, s, 1H, NH), 8,09 (m, 2H, H-vinyl & CONHCH₂), 7,73 (d, J = 1,5 Hz, H-4), 7,38 (dd, J = 1,5 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,55 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35 (m, 6H, 3 x CH₃), 1,68 (m, 2H, CH₂).

45

MS-EI m/z 514 & 516 [M⁺-1] & [M⁺+1].

Příklad 32

50

(3-hydroxypropyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1H-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,25 (br, s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, H-vinyl), 8,03 (m, 1H, CONCH₂), 7,71 (br s, 1H, H-4), 7,37 (br d, J = 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-7), 4,51 (br s, 1H, OH), 3,51 (br s, 2H, CH₂), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

MS-EI m/z 445 & 447 [M⁺-1] & [M⁺+1].

Příklad 34

(2-morfolin-4-ylethyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,14 (br, s, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, H-vinyl), 7,84 (m, 1H, CONCH₂), 7,71 (d, J = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,38 (dd, J = 1,8 & 8,2 Hz, 1H, H-6), 6,87 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H-7), 3,58 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,45 (m, CH₃ & CH₂).

MS-EI m/z 500 & 502 [M⁺-1] & [M⁺+1].

Příklad 35

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,23 (s, 1H, NH), 8,11 (s, 1H, H-vinyl), 7,91 (m, 1H, CONCH₂), 7,73 (d, J = 1,9 Hz, 1H, H-4), 7,39 (dd, J = 1,9 & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,88 (d, J = 8,3 Hz, 1H, H-7), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,62 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,69 (m, 4H, 2 x CH₂).

Příklad 36

[2-(4-hydroxyfenyl)ethyl]amid 4-acetyl-5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-3-methyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,21 (s, 1H, NH), 11,18 (s, 1H, OH), 9,09 (s, 1H, NH), 8,06 – 8,10 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,38 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,04 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 6,88 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,67 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 3,42 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 2,56 (s, 3H, CH₃CO), 2,37 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 507 & 509 [M⁺-1] & [M⁺+1].

Příklad 37

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Směs 2-aminoacetofenon-hydrochloridu (1 ekviv.), ethyl-izobutyrylacetátu (1,2 ekviv.) a octanu sodného (2,4 ekviv.) v H₂O se míchá při teplotě 100 °C po dobu 18 hodin a pak ochladí na pokojovou teplotu, vodná vrstva se oddekantuje a olej se rozpustí v ethylacetátu, promyje vodou

a solankou a suší, čímž se získá (93 %) ethylester 2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny ve formě červeno-hnědého oleje.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11,21 (s, br, 1H, NH), 7,14 – 7,27 (m, 5H), 6,70 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H), 4,02 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,65 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,22 (d, *J* = 7,5 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 1,04 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 257 [M⁺].

Tento pyrrol se formyluje podle způsobu A, čímž se získá (41 %) ethylester 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny jako načervenalá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,35 (s, br, 1H, NH), 9,14 (s, 1H, CHO), 7,36 (s, 5H), 3,96 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,74 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,29 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0,90 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 285 [M⁺].

Ester pyrrolkarboxylové kyseliny se hydrolyzuje podle způsobu B, čímž se získá (57 %) 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny ve formě běžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,28 (s, br, 1H, COOH), 12,02 (s, br, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, CHO), 7,35 (s, 5H), 3,81 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,28 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 257 [M⁺].

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (120 mg, 0,31 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-2-karboxylové kyseliny (připravený podle způsobu C), čímž se získá 120 mg (71 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,23 (s, br, 1H, NH), 11,08 (s, br, 1H, NH), 7,38 – 7,55 (m, 7H, Ar-H & CONHCH₂), 7,30 (s, 1H, H-vinyl), 7,26 (dd, *J* = 1,8 & 7,8 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 3,36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,07 (m, 2H, CH₂), 2,34 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 2,22 (t, *J* = 6,9 Hz, 2H, CH₂), 1,40 (m, 2H, CH₂), 1,31 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0,86 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS *m/z* 565,1 [M⁺+1].

40 Příklad 38

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-(5-Brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina (127 mg, 0,28 mmol) se kondenzuje s 3-pyrrolidin-1-ylpropylaminem (43 mg, 0,336 mmol), čímž se získá 140 mg (66 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,40 (s, br, 1H, NH), 7,38 – 7,47 (m, 7H), 7,23 – 7,27 (m, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 3,36 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,08 (m, 2H, CH₂), 2,30 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,20 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 1,62 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,42 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 1,31 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 560 a 562 [M⁺-1 a M⁺+1].

Příklad 39

(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (57 g, 0,27 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (120 mg), čímž se získá 78 mg (53 %) požadované sloučeniny jako žlutá pevná látka.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,23 (s br, 1H, NH), 11,09 (s, br, 1H, NH), 7,38 – 7,51 (m, 6H), 7,25 – 7,28 (m, 2H), 7,19 (t, 1H, CONHCH₂), 6,85 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,43 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,11 (m, 2H, CH₂), 2,28 – 2,39 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ & CH₂), 1,31 (d, *J* = 6,9 Hz, CH(CH₃)₂), 0,85 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 548 a 550 [*M*⁺-1 a *M*⁺+1].

Příklad 40

[3-(4-methylpiperazin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (53 mg, 0,25 mmol) se kondenzuje s [3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl]amidem 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (300 mg), čímž se získá 65 mg požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,22 (s br, 1H, NH), 11,08 (s, br, 1H, NH), 7,23 – 7,50 (m, 9H), 6,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 3,37 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3,05 (m, 2H, CH₂), 2,24 (m, 8H, 4xCH₂), 2,11 (m, 5H, CH₂ & CH₃), 1,42 (m, 2H, CH₂), 1,31 (d, *J* = 7,2 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 589 a 591 [*M*⁺-1 a *M*⁺+1].

Příklad 41

5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (170 mg, 0,8 mmol) se kondenzuje s 5-formyl-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (205 mg) podle způsobu D, čímž se získá 210 mg (58 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,31 (s br, 1H, NH), 11,16 (s, br, 1H, NH), 7,26 – 7,44 (m, 7H), 7,11 (s, 1H, H-vinyl), 6,85 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 3,78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,34 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 452 [*M*⁺+1].

Příklad 42

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-izopropyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (44 mg, 0,21 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amidem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (70 mg) připravený stejným způsobem jako izopopylový analog výše), čímž se získá 0,03 g (27 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,87 (s br, 1H, NH), 11,11 (s, br, 1H, NH), 7,36 – 7,51 (m, 6H), 7,26 (dd, *J* = 1,8 & 8,1 Hz, 1H), 7,2 (s, 1H, H-vinyl), 7,09 (m, 1H, CONCH₂), 6,83 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 3,17 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,29 – 2,35 (m, 6H, 3 x NCH₂), 1,59 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI *m/z* 518 a 520 [*M*⁺–1 a *M*⁺+1].

Příklad 43

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(2-Methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (50 mg, 0,21 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (70 mg), čímž se získá 0,04 g (35 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,82 (s br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,48 (m, 2H), 7,43 (m, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,16 (s, 1H, H-vinyl), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,19 (m, 2H, NCH₂), 2,49 (m, CH₃), 2,32 – 2,38 (m, 6H, 3 x NCH₂), 1,59 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI *m/z* 546 [*M*⁺].

Příklad 44

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (46 mg, 0,22 mmol) se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (65 mg), čímž se získá 60 mg (55 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,86 (s br, 1H, NH), 11,909 (s, br, 1H, NH), 7,47 – 7,49 (m, 2H), 7,38 – 7,41 ((m, 4H), 7,26 (dd, *J* = 2,2 & 8,3 Hz, 1H), 7,21 (s, 1H, H-vinyl), 7,04 (m, 1H, CONCH₂), 6,77 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 3,15 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,16 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, 3 x NCH₂), 2,02 (s, 6H, 2 x NCH₃).

MS *m/z* 493 a 494,8 [*M*⁺ a *M*⁺+2].

Příklad 45

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(2-Methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (53 mg, 0,22 mmol) se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (65 mg), čímž se získá 0,05 mg (44 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové gumy.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,82 (s br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,37 – 7,52 (m, 5H), 7,32 (m, 1H), 7,22 – 7,27 (m, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,15 (m, 2H, NCH₂), 2,49 (m, CH₃), 2,16 (t, J = 6,5 Hz, 2H, NCH₂), 2,02 (s, 6H, 2 x NCH₃).

MS m/z 521 [M⁺+1].

Příklad 46

ethylester 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (60 mg, 0,29 mmol) se kondenzuje s ethylesterem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (75 mg), čímž se získá 78 mg (60 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,01 (s br, 1H, NH), 11,13 (s, br, 1H, NH), 7,42 – 7,46 (m, 3H), 7,27 – 7,34 ((m, 4H), 7,12 (s, 1H), 6,84 (dd, J = 2,2 & 8,3 Hz, 1H), 3,99 – 4,03 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2,61 (s, 3H, CH₃), 0,98 – 1,03 (m, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 450 a 452 [M⁺-1 a M⁺+1].

Příklad 47

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,47 g, 2,2 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-2-methyl-4-fenyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,75 mg), čímž se získá 0,11 g (42 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,86 (s br, 1H, NH), 7,42 – 7,46 (m, 3H), 7,38 – 7,50 (m, 7H), 7,24 – 7,28 (m, 2H), 6,83 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 3,09 (m, 2H, NCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,38 (q, J = 7,1 Hz, 4H, 2 x NCH₂CH₃), 2,26 (t, J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂), 1,42 (m, 2H, NCH₂), 0,87 (t, J = 7,1 Hz, 6H, 2 x NCH₂CH₃).

MS m/z 535,0 a 537 [M⁺ a M⁺+2].

Příklad 48

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Směs *tert*-butyl-3-oxobutyrátu a dusičnanu sodného (1 ekviv.) v octové kyselině se míchá při pokojové teplotě, čímž se získá *tert*-butyl-2-hydroxyimino-3-oxobutyráť.

Ethyl-3-oxobutyráť (1 ekviv.), zinkový prach (3,8 ekviv.) a surový *tert*-butyl-2-hydroxyimino-3-oxobutyráť v octové kyselině se míchá při teplotě 60 °C po dobu 1 hodiny. Reakční směs se

nalije do H₂O a filtrát se spojí, čímž se získá (65 %) 2-*terc*-butyloxykarbonyl-3,5-dimethyl-4-ethoxykarbonylpyrrol.

5 Směs 2-*terc*-butyloxykarbonyl-3,5-dimethyl-4-ethoxykarbonylpyrrolu a triethylorthoformiátu (1,5 ekviv.) v trifluoroctové kyselině se míchá při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny. Reakce se koncentruje a zbytek čistí, čímž se získá (64 %) 2,4-dimethyl-3-ethoxykarbonyl-5-formylpyrrol ve formě žlutých jehliček.

10 2,4-Dimethyl-3-ethoxykarbonyl-5-formylpyrrol se hydrolyzuje podle způsobu B, čímž se získá 90 %) 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12 (br s, 2H, NH a CO₂H), 9,58 (s, 1H, CHO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃).

15 MS *m/z* 267 [M⁺].

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,17 g, 0,8 mmol) se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,2 g, připravený podle způsobu C) podle způsobu B, čímž se získá 0,3 g (83 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

25 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,60 (s br, 1H, NH), 10,94 (s, br, 1H, NH), 8,07 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H, H-4), 7,75 (s, 1H, H-vinyl), 7,44 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, CONCH₂), 7,24 (dd, *J* = 1,8 & 8,4 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, H-7), 3,26 – 3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 430 a 432 [M⁺-1 a M⁺+1].

30 Příklad 49

(2-dimethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

35 6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (0,17 g, 0,8 mmol) se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,2 g), čímž se získá 0,13 g (36 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

40 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,59 (s br, 1H, NH), 10,93 (br, 1H, NH), 7,85 (d, *J* = 7,92 Hz, 1H, H-4), 7,63 – 7,65 (m, 3H), 7,40 – 7,47 (m, 3H), 7,32 – 7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,30 (dd, *J* = ,6 & 7,9 Hz, 1H, H-5), 7,11 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, H-7), 3,28 – 3,34 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 428 [M⁺].

45

Příklad 50

50 (2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

55 5-Chlor-1,3-dihydroindol-2-on (0,1 g, 0,6 mmol) se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,15 g), čímž se získá 0,22 g (90 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 10,98 (br, 1H, NH), 7,96 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H-4), 7,75 (s, 1H, H-vinyl), 7,50 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CONCH $_2$), 7,12 (dd, $J = 2,0$ & 8,3 Hz, 1H, H-6), 6,86 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H-7), 3,26 – 3,31 (m, 2H, NCH $_2$), 2,42 (s, 3H, CH $_3$), 2,40 (s, 3H, CH $_3$), 2,36 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2,17 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

MS–EI m/z 386 [M^+].

Příklad 51

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,17 g, 0,8 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,2 g), čímž se získá 0,09 g (26 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 10,98 (br, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-vinyl), 7,42 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CONCH $_2$), 7,24 (dd, $J = 1,7$ & 8,0 Hz, 1H, H-6), 6,82 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H-7), 3,23 – 3,32 (m, 2H, NCH $_2$), 2,46 – 2,55 (m, 6H, 3 x NCH $_2$), 2,43 (s, 3H, CH $_3$), 2,42 (s, 3H, CH $_3$), 0,96 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H, 2 x NCH $_2$ CH $_3$).

MS–EI m/z 458 a 460 [$M^+ - 1$ a $M^+ - 1$].

Příklad 52

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,09 g, 0,4 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,1 g), čímž se získá 0,14 g (81 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 10,98 (br, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-vinyl), 7,53 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CONCH $_2$), 7,24 (dd, $J = 1,9$ & 8,5 Hz, 1H, H-6), 6,81 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-7), 3,29 – 3,35 (m, 2H, NCH $_2$), 2,54 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, NCH $_2$), 2,47 (m, pod DMSO), 2,42 (s, 3H, CH $_3$), 2,40 (s, 3H, CH $_3$), 1,66 – 1,69 (m, 4H, 2 x CH $_2$).

MS–EI m/z 456 a 458 [$M^+ - 1$ a $M^+ + 1$].

Příklad 53

(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,09 g, 0,4 mmol) se kondenzuje s (3-imidazol-1-ylpropyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,1 g), čímž se získá 0,1 g (59 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,63 (s br, 1H, NH), 10,99 (br, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-4), 7,77 (s, 1H, H-vinyl), 7,71 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, CONCH $_2$), 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,25 (dd,

$J = 2,2$ & $8,4$ Hz, 1H, H-6), 7,20 (s, 1H, Ar-H), 6,89 (s, 1H, Ar-H), 6,81 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H-7), 4,02 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, NCH_2), 3,18 (q, $J = 6,7$ Hz, 2H, NCH_2), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 1,93 (m, 2H, CH_2).

5 MS-EI m/z 467 a 469 [$\text{M}^+ - 1$ a $\text{M}^+ + 1$].

Příklad 54

10 (2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(2-Methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (30 mg, 0,13 mmol) se kondenzuje s (2-diethyl-aminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (30 mg), čímž
15 se získá 0,06 g (100 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové gumy.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,60 (s br, 1H, NH), 10,98 (br, 1H, NH), 7,79 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,63 (s, 1H, H-vinyl), 7,46 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CONCH_2), 7,28 – 7,35 (m, 2H), 6,99 – 7,11 (m, 4H), 3,76 (s, 3H, OCH_3), 3,27 – 3,31 (m, 2H, NCH_2), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,39 (s, 3H, CH_3),
20 2,37 (m, 3H, NCH_2), 2,18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

MS-EI m/z 458 [M^+].

25 Příklad 55

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-[6-(3-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

30 6-(3-Methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (30 mg, 0,13 mmol) se kondenzuje s (2-diethyl-aminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (30 mg), čímž se získá 8 mg (14 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,59 (s br, 1H, NH), 10,92 (s br, 1H, NH), 7,84 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,65 (s, 1H, H-vinyl), 7,42 (m, 1H, CONCH_2), 7,36 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,29 (dd, $J = 1,6$ & $7,6$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,14 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,11 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 6,91 (dd, $J = 2,8$ & $7,8$ Hz, 1H), 3,82 (s, 3H, OCH_3), 3,21 – 3,33 (m, 2H, NCH_2), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3), 2,36 – 2,40 (m, 2H, NCH_2), 2,18 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

40 MS-EI m/z 458 [M^+].

Příklad 56

45 (2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (80 mg, 0,4 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,1 g) podle způsobu B,
50 čímž se získá 79 mg (46 %) požadované sloučeniny.

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,66 (s br, 1H, NH), 10,95 (br, 1H, NH), 8,15 (d, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,81 (s, 1H, H-vinyl), 7,71 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H), 7,40 – 7,47 (m, 4H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d,

$J = 8,1 \text{ Hz}$, 1H), 3,2 – 3,31 (m, 2H, NCH_2), 2,46 – 2,55 (m, 6H, 3 x NCH_2), 2,44 (s, 6H, 2 x CH_3), 0,96 (t, $J = 7,4 \text{ Hz}$, 6H, 2 x NCH_2CH_3).

MS–EI m/z 456 [M^+].

5

Příklad 57

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

10

5-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (0,04 g, 0,2 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,04 g), čímž se získá požadovaná sloučenina ve formě žluto-oranžové pevné látky.

15

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,65 (s br, 1H, NH), 10,96 (br, 1H, NH), 8,15 (d, $J = 1,0 \text{ Hz}$, 1H), 7,80 (s, 1H, H-vinyl), 7,71 (d, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 2H), 7,49 (t, $J = 6,3 \text{ Hz}$, 1H, CONCH_2), 7,41 – 7,46 (m, 3H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d, $J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H), 4,08 (m, 4H, 2 x NCH_2), 3,32 (m, 2H, NCH_2), 2,55 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 2H, NCH_2), 2,47 (m, pod DMSO), 2,43 (s, 6H, 2 x CH_3), 1,66 (m, 4H, 2 x CH_2).

20

MS–EI m/z 454 [M^+].

Příklad 58

25

(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

30

5-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (8 mg, 0,04 mmol) se kondenzuje s (3-imidazol-1-ylpropyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (10 mg), čímž se získá 10 mg (59 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

35

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,67 (s br, 1H, NH), 10,96 (br, 1H, NH), 8,16 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H), 7,81 (s, 1H, H-vinyl), 7,65 – 7,72 (m, 4H), 7,44 (m, 4H), 7,31 (m, 1H, CONCH_2), 7,21 (s, 1H, Ar-H), 4,02 (t, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, NCH_2), 3,19 (q, $J = 6,5 \text{ Hz}$, 2H, CONCH_2), 2,44 (s, 6H, 2 x CH_3), 1,93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

40

MS–EI m/z 465 [M^+].

Příklad 59

45

(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

50

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (0,08 g, 0,4 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,1 g), čímž se získá 65 mg (38 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

55

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 10,99 (br, 1H, NH), 7,86 (d, $J = 7,8 \text{ Hz}$, 1H), 7,62 – 7,66 (m, 3H), 7,40 – 7,47 (m, 3H), 7,28 – 7,36 (m, 2H), 7,10 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH_2), 2,46 – 2,55 (m, 6H, 3 x NCH_2), 2,44 (s, 3H, 2 x CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 0,97 (t, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 6H, 2 x NCH_2CH_3).

MS-EI m/z 456 [M⁺].

Příklad 60

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (30 mg, 0,15 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (40 mg), čímž se získá 5,9 mg (8,5 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s br, 1H, NH), 10,99 (br, 1H, NH), 7,86 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,63 – 7,66 (m, 3H), 7,51 (m, 1H, CONHCH₂), 7,45 (m, 2H), 7,28 – 7,36 (m, 2H), 7,10 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 3,31 (m, 6H, 3 x NCH₂), 2,55 (t, J = 6,6 Hz, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI m/z 454 [M⁺].

Příklad 61

(3-imidazol-1-ylpropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (8 mg, 0,04 mmol) se kondenzuje s (3-imidazol-1-ylpropyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (10 mg), čímž se získá 7,3 mg (43 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s br, 1H, NH), 10,99 (br, 1H, NH), 7,86 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,62 – 7,70 (m, 5H), 7,45 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,30 (dd, J = 1,4 & 8,2 Hz, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,10 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 6,89 (s, 1H), 4,02 (t, J = 6,9 Hz, 2H, CH₂), 3,19 (m, 2H, NCH₂ CH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 1,93 (t, J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂).

MS-EI m/z 465 [M⁺].

Příklad 62

(2-diethylaminoethyl)amid 5-[6-(3,5-dichlorfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(3,5-Dichlorfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (64 mg, 0,23 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (60 mg), čímž se získá 53 mg (44 %) požadované sloučeniny ve formě světle hnědé pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s br, 1H, NH), 10,99 (s, 1H, NH), 7,89 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-4), 7,69 – 7,71 (m, 3H), 7,55 (m, 1H, CONCH₂), 7,37 (m, 2H), 7,14 (d, J = 1,4 Hz, 1H, H-7), 3,27 (m, 2H, NCH₂), 2,48 – 2,58 (m, 6H, 3 x NCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 6,8 Hz, 6H, 3 x NCH₂CH₃).

MS m/z 526,9 [M⁺+1].

Příklad 63

(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-yl-idenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-on (40 mg, 0,19 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 29 mg (33 %) požadované sloučeniny ve formě světle oranžové pevné látky.

10

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,62 (s br, 1H, NH), 11,05 (s br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,53 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,91 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,70 (s, 1H, H-vinyl), 7,40 – 7,48 (m, 2H), 7,35 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,14 (s, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH₂), 2,48 – 2,55 (m, 3 x NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,38 (s, 3H, CH₃), 0,96 (t, *J* = 6,9 Hz, 6H, 2 x NCH₂CH₃).

15

MS *m/z* 457 [*M*⁺+1].

Příklad 64

20

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-yl-idenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

25

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-on (60 mg, 0,28 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (75 mg), čímž se získá 90 mg (71 %) požadované sloučeniny ve formě světle oranžové pevné látky.

30

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 11,05 (s, br, 1H, NH), 8,86 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 8,54 (dd, *J* = 1,5 & 4,8 Hz, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,91 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,70 (s, 1H, H-vinyl), 7,44 – 7,53 (m, 2H), 7,36 (dd, *J* = 1,5 & 8,1 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,47 – 2,57 (m, 6H, 3 x NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI *m/z* 455 [*M*⁺].

35

Příklad 65

40

(3-dimethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-pyridin-3-yl-1,2-dihydroindol-3-yl-idenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

45

6-Pyridin-3-yl-1,3-dihydroindol-2-on (42 mg, 0,2 mmol) se kondenzuje s (3-dimethylaminopropyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 67 mg (75 %) požadované sloučeniny ve formě žlutohnědé pevné látky.

50

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,61 (s br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,54 (s, br, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H, H-vinyl), 7,63 (m, 1H), 7,45 – 7,48 (m, 1H), 7,35 (dd, *J* = 1,7 & 8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 3,21 – 3,27 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,28 (m, 2H, NCH₂), 2,14 (s, 6H, 2 x NCH₃), 1,64 (m, 2H, CHO).

MS-EI *m/z* 443 [*M*⁺].

Příklad 66

(3-dimethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5

5-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (67 mg, 0,32 mmol) se kondenzuje s (3-dimethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (81 mg), čímž se získá 40 mg (28 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

10

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,66 (s br, 1H, NH), 10,92 (s, br, 1H, NH), 8,14 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 7,44 (m, 3H), 7,32 (m, 1H), 6,95 (m, 1H), 3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 6H, 2 x CH₃), 2,27 (m, 2H, NCH₂), 2,13 (s, 6H, 2 x NCH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂).

MS-EI *m/z* 442 [M⁺].

15

Příklad 67

(3-diethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

20

5-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (1,5 g, 7,16 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (2 g), čímž se získá 1,3 g (40 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

25

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 10,91 (s, 1H, NH), 8,14 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, ArH), 7,8 (s, 1H, ArH), 7,7 (dd, *J* = 1,2 a 8,5 Hz, 2H, ArH), 7,6 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, CONCH₂), 2,5 (m, 12H, 3 x NCH₂ a 2 x CH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, *J* = 6,7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

30

MS-EI *m/z* 470 [M⁺].

Příklad 68

35

(3-diethylaminopropyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-6-fenyl-1,2-dihydroindol-3-yliden-methyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

40

6-Fenyl-1,3-dihydroindol-2-on (1,5 g, 7,16 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)-amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (2 g), čímž se získá 1,9 g (57 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

45

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,94 (s, 1H, NH), 7,8 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, ArH), 7,6 (s, 4H, ArH), 7,4 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H, ArH), 7,3 (m, 2H), 7,1 (d, *J* = 1,4 Hz, 1H, ArH), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,5 (m, 12H, 3 x NCH₂ a 2 x CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, *J* = 6,7 Hz, 6H, NCH₂CH₃).

MS-EI *m/z* 470 [M⁺].

50

Příklad 69

(3-chlor-4-methoxyfenyl)amid 3-[4-(3-diethylaminopropylkarbamoyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-4-karboxylové kyseliny

(3-Chlor-4-methoxyfenyl)amid 2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrrol-4-karboxylové kyseliny (1 g, 3,16 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (1 g 3,58 mmol), čímž se získá 1,7 g (85 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

MS-EI m/z 578,2 [M^+].

Příklad 70

(3-diethylaminopropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (0,5 g, 2,36 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminopropyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (0,51 g), čímž se získá 0,84 g požadované sloučeniny ve formě červeno-oranžové pevné látky.

^1H NMR (360 MHz, DMSO- d_6) δ 13,61 (s, 1H, NH), 10,99 (s, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, ArH), 7,7 (m, 4H), 7,2 (dd, $J = 1,8$ a 8,3 Hz, 2H, ArH), 6,8 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, ArH), 3,3 (br s, 4H, 2 x NCH_2), 3,2 (m, 2H, CONCH_2), 2,6 (br s, 2H, NCH_2 a 2 x CH_3), 2,4 (s, 6H, 2 x CH_3), 1,66 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 0,98 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H, NCH_2CH_3).

MS-EI m/z 472 a 474 [$M^+ - 1$, a $M^+ - 1$].

Příklad 71

(2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (100 mg, 0,47 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-diizopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (150 mg), čímž se získá 0,15 g (62 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,97 (s, 1H, NH), 10,95 (s, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H, ArH), 7,84 (m, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,23 (dd, $J = 1,3$ a 8,1 Hz, ArH), 6,8 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,3 (m, 3H, CH a NHCH_2), 2,5 (br m, 6H, 3 x NCH_2), 1,28 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H, 2 x CH_3), 1,23 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, 2 x CH_3), 0,96 (m, 6H, 2 x CH_2CH_3).

MS-EI m/z 514 a 516 [$M^+ - 1$, a $M^+ + 1$].

Příklad 72

(3-diethylaminoethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-diizopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (90 mg, 0,42 mmol) se kondenzuje s (3-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-diizopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (140 mg), čímž se získá 54 mg (25 %) požadované sloučeniny ve červeno-hnědé pevné látky.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,96 (s, 1H, NH), 8,09 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,23 (dd, $J = 1,7$ a 8,1 Hz, ArH), 6,82 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH_2), 3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (br s, 6H, 3 x NCH_2), 1,7 (br m, 2H,

CH₂CH₂CH₂), 1,28 (d, J = 6,9 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1,24 (d, J = 5,9 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1,06 (m, 6H, 2 x CH₂CH₃).

MS–EI m/z 528 a 530 [M⁺–1 a M⁺+1].

5

Příklad 73

(3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-di-
izopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

10

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (130 mg, 0,6 mmol) se kondenzuje s (3-pyrrolidin-1-ylpropyl)amidem 5-formyl-2,4-diizopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (150 mg, 0,45 mmol), čímž se získá 36 mg (15 %) požadované sloučeniny ve formě hnědo-oranžové pevné látky.

15

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,97 (s, 1H, NH), 8,10 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,23 (dd, J = 1,6 a 7,6 Hz, ArH), 6,82 (d, J = 7,6 Hz, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH₂), 3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (br s, 6H, 3 x NCH₂), 1,7 (br m, 6H, 3 x NCH₂CH₂), 1,28 (d, J = 5,6 Hz, 6H, 2 x CH₃), 1,24 (d, J = 5,7 Hz, 6H, 2 x CH₃).

20

MS–EI m/z 526 a 528 [M⁺–1 a M⁺+1].

25

Příklad 74

(pyridin-4-ylmethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

30

5-Brom-1,3-dihydroindol-2-on (170 mg, 0,8 mmol) se kondenzuje s (pyridin-4-ylmethyl)amidem 5-formyl-2,4-diizopropyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (200 mg), čímž se získá 14 mg (4 %) požadované sloučeniny ve formě žlutě pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,67 (s, 1H, NH), 11,01 (s, br, 1H, NH), 8,51 (dd, J = 1,6 & 4,3 Hz, 2H), 8,23 (t, J = 6,0 Hz, 1H, CONCH₂), 8,11 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,78 (s, 1H, H-vinyl), 7,31 (d, J = 6,0 Hz, 2H), 7,25 (dd, J = 1,9 & 8,1 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 4,45 (d, J = 6,0 Hz, 2H, NCH₂), 2,46 (s, 6H, 2 x CH₃).

35

MS–EI m/z 450 a 452 [M⁺–1 a M⁺+1].

40

Příklad 75

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(4-butylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

45

5-[6-(4-Butylfenyl)]-1,3-dihydroindol-2-on (50 mg, 0,19 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 74 mg (76 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

50

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,93 (s br, 1H, NH), 7,82 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H, H-vinyl), 7,54 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,46 (m, 1H, CONH), 7,26 (m, 3H), 7,09 (s, 1H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 2,52 – 2,64 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,58 (m, 2H, CH₂), 1,34 (m, 2H, CH₂), 0,91 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH₂CH₃).

55

MS-EI m/z 510 [M⁺].

5 **Příklad 76**

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(5-izopropyl-2-methoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

10 6-(5-izopropyl-2-methoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (50 mg, 0,17 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (45 mg), čímž se získá 67 mg (75 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

15 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 10,82 (s br, 1H, NH), 7,77 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H, H-vinyl), 7,45 (m, 1H, CONH), 7,0 – 7,19 (m, 5H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,87 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,56 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,21 (d, J = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

MS m/z 527,2 [M⁺+1].

20

Příklad 77

25 (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(4-ethylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(4-Ethylfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (45 mg, 0,19 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 60 mg (65 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

30

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,96 (s br, 1H, NH), 7,83 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H, H-vinyl), 7,51 – 7,56 (m, 3H), 7,25 – 7,30 (m, 3H), 7,08 (d, J = 1 Hz, 1H), 3,31 (m, 2H, CH₂), 2,63 (m, 2H, CH₂CH₃), 2,55 (m, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,20 (t, J = 7,5 Hz, 3H, CH₂CH₃).

35

MS m/z 482 [M⁺].

Příklad 78

40

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(2,4-dimethoxyfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

45 6-(2,4-Dimethoxyfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (51 mg, 0,19 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 30 mg (31 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

50 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,86 (s br, 1H, NH), 7,75 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,60 (s, 1H, H-vinyl), 7,49 (m, 1H, CONH), 7,22 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,58 – 6,65 (m, 2H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,55 (m, 2H, CH₂), 2,50 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS m/z 514 [M⁺+1].

55

Příklad 79

5 (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[6-(3-izopropylfenyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

6-(3-izopropylfenyl)-1,3-dihydroindol-2-on (48 mg, 0,19 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (50 mg), čímž se získá 59 mg (63 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

10 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,97 (s br, 1H, NH), 7,87 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,68 (s, 1H, H-vinyl), 7,24 – 7,55 (m, 6H), 7,13 (s, 1H), 3,34 (m, 2H, CH₂), 3,30 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,60 (m, 2H, CH₂), 2,50 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,27 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, CH(CH₃)₂).

15 MS-EI *m/z* 496 [M⁺+1].

Příklad 80

20 (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

25 5-Fluor-1,3-dihydroindol-2-on (0,54 g, 3,8 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá 0,83 g (55 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-zelené pevné látky.

30 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,66 (s, 1H, NH), 10,83 (s br, 1H, NH), 7,73 (dd, *J* = 2,5 & 9,4 Hz, 1H), 7,69 (s, 1H, H-vinyl), 7,37 (t, 1H, CONHCH₂CH₂), 6,91 (m, 1H), 6,81 – 6,85 (m, 1H), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,51 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 0,96 (t, *J* = 6,9 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS-EI *m/z* 398 [M⁺].

35 Příklad 80 (alternativní syntéza)

(2-diethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

40 Hydrát hydrazinu (55 %, 3000 ml) a 5-fluorisatin (300 g) se zahřívají při teplotě 100 °C. V průběhu 120 minut se za stálého míchání přidává po částech (100 g) další 5-fluorisatin (500 g), směs se zahřívá při teplotě 110 °C a míchá po dobu 4 hodin, ochladí na pokojovou teplotu a pevné látky se spojí vakuovou filtrací, čímž se získá surový hydrazid (2-amino-5-fluor-fenyl)octové kyseliny (748 g), hydrazid se suspenduje ve vodě (700 ml) a pH směsi se upraví na < pH 3 pomocí 12N kyseliny chlorovodíkové. Směs se míchá po dobu 12 hodin při pokojové teplotě, pevný podíl se spojí vakuovou filtrací a promyje (2x) vodou, produkt se suší za vakua, čímž se získá 5-fluor-1,3-dihydroindol-2-on (600 mg, 73 % výtěžek) ve formě hnědého prášku.

50 ¹H NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) δ 3,46 (s, 2H, CH₂), 6,75, 6,95, 7,05 (3 x m, 3H, aromatické), 10,35 (s, 1H, NH).

MS *m/z* 152 [M+1].

2-*Terc*-butylester 4-ethylesteru 3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2,4-dikarboxylové kyseliny (2600 g) a ethanol (7800 ml) se intenzivně míchají, zatímco se pomalu přidává 10N kyselina chlorovodíková (3650 ml), teplota se zvýší z 25 °C na 35 °C, čímž se začne uvolňovat plyn. Směs se ohřeje na teplotu 54 °C a míchá za dalšího zahřívání po dobu jedné hodiny na teplotu 67 °C.
 5 Směs se ochladí na teplotu 5 °C a za stálého míchání se pomalu přidává 32 l vody. Pevná látka se spojí vakuovou filtrací a promyje (3 x) vodou, pevná látka se suší na vzduchu na konstantní hmotnost, čímž se získá ethylester 2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (1418 g, 87% výtěžek) ve formě narůžovělé pevné látky.

10 ¹H NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) δ 2,10, 2,35 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH₃), 4,13 (q, 2H, CH₂), 6,37 (s, 1H, CH), 10,85 (s, 1H, NH).

MS m/z 167 [M+1].

15 Dimethylformamid (322 g) a dichlormethan (3700 ml) se ochladí v ledové lázni na teplotu 4 °C a za stálého míchání se přidá oxidchlorid fosforečný (684 g). Pevný ethylester 2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (670 g) se pomalu přidává v alikvótních podílech v průběhu 15 minut. Maximální teplota se pohybuje kolem 18 °C. Směs se zahřívá při refluxu po dobu jedné hodiny, ochladí na teplotu 10 °C v ledové lázni a najednou se za intenzivního stálého míchání
 20 přidá 1,6 l ledové vody. Teplota se zvýší na 15 °C. Za intenzivního stálého míchání se přidá 10N kyselina chlorovodíková (1,6 l). Teplota se zvýší na 22 °C. Směs se nechá stát po dobu 30 minut a vrstvy se nechají separovat, přičemž maximum teploty je 40 °C. Vodná vrstva se upraví na pH 12 až 13 pomocí 10N hydroxidu draselného (3,8 l) tak, aby teplota během přidávání nepřesáhla 55 °C.

25 Po přidání se směs ochladí na teplotu 10 °C a míchá po dobu 1 hodiny, pevná látka se spojí vakuovou filtrací a promyje (4x) vodou, čímž se získá ethylester 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (778 g, 100% výtěžek) ve formě žluté pevné látky.

30 ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1,25 (t, 3H, CH₃), 2,44, 2,48 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH₃), 4,16 (q, 2H, CH₂), 9,59 (s, 1H, CHO), 12,15 (br s, 1H, NH),

MS m/z 195 [M+1].

35 Ethylester 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (806 g), hydroxid draselný (548 g), voda (2400 ml) a methanol (300 ml) se refluxují po dobu 2 hodin za stálého míchání a ochladí na teplotu 8 °C. Směs se extrahuje (2x) dichlormethanem, vodná vrstva se upraví na pH 4 pomocí 1000 ml 10N kyseliny chlorovodíkové, přičemž teplota se udržuje pod 15 °C. Kvůli
 40 míchání se přidá voda a pevná látka se spojí vakuovou filtrací, promyje (3x) vodou a suší za vakua při teplotě 50 °C, čímž se získá 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina (645 g, 93,5 % výtěžek) ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 2,40, 2,43 (2 x s, 2 x 3H, 2 x CH₃), 9,57 (s, 1H, CHO), 12,07 (br s, 2H, NH+COOH).

45 MS m/z 168 [M+1].

5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina (1204 g) a 6020 ml dimethylformamidu se míchá při pokojové teplotě, zatímco se přidává hydrochlorid 1-(3-dimethylamino-
 50 propyl-3-ethylkarbodiimidu (2071 g), hydroxybenzotriazol (1460 g), triethylamin (2016 ml) a diethylethylendiamin (1215 ml). Směs se míchá po dobu 20 hodin při pokojové teplotě, zředí 3000 ml vody, 2000 ml solanky a 3000 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a pH se upraví na > 10 pomocí 10N hydroxidu sodného. Směs se pokaždé extrahuje (2x) 5000 ml s 10% methanolem v dichlormethanu a spojené extrakty se suší nad bezvodým síranem hořečnatým a zahušťují na rotační odparce do sucha. Směs se zředí 1950 ml toluenu a znovu zahušťuje

do sucha na rotační odparce. Zbytek se trituruje směsí hexanů a diethyletheru (4 000 ml) (3:1), pevný podíl se spojí vakuovou filtrací, promyje (2x) 400 ml ethylacetátu a suší za vakua při teplotě 34 °C po dobu 21 hodin, čímž se získá (2-diethylaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (819 g, 43% výtěžek) ve formě světle žluté pevné látky.

5

¹H NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) δ 0,96 (t, 6H, 2 x CH₃), 2,31 – 2,38 (2 x s, 2 x CH₃), 2,51 (m, 6H, 3 x CH₂), 3,28 (m, 2H, CH₂), 7,34 (m, 1H, amid NH), 9,56 (s, 1H, CHO), 11,86 (s, 1H, pyrrol NH).

10

MS *m/z* 266 [M+1].

15

(2-Diethylaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (809 g), 5-fluor-1,3-dihydroindol-2-on (438 g), ethanol (8000 ml) a pyrrolidin (13 ml) se zahřívají při teplotě 78 °C po dobu 3 hodin. Směs se ochladí na pokojovou teplotu a pevné látky se spojí vakuovou filtrací a promyje ethanolem. Pevné látky se míchají s ethanolem (5900 ml) při teplotě 72 °C po dobu 30 minut, ochladí na pokojovou teplotu, pevné látky se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a suší za vakua při teplotě 54 °C po dobu 130 hodin, čímž se získá (2-diethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (1013 g, 88 % výtěžek) jako oranžová pevná látka.

20

¹H NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) δ 0,98 (t, 6H, 2 x CH₃), 2,43, 2,44 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,50 (m, 6H, 3 x CH₂), 3,28 (q, 2H, CH₂), 6,84, 6,92, 7,42, 7,71, 7,50 (5xm, 5H, aromatické, vinyl CONH), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,68 (s, 1H, pyrrol NH).

25

MS *m/z* 397 [M-1].

Příklad 81

30

3-[4-(2-diethylaminoethylkarbamoyl)-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-6-karboxylová kyselina

35

2-Oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-6-karboxylová kyselina (80 g, 0,45 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá 210 mg (92 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

40

¹H NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,6 (s, 1H, NH), 7,76 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H, H-vinyl), 7,57 (dd, *J* = 1,5 & 8,0 Hz, 1H), 7,40 – 7,42 (m, 2H), 3,28 (m, 2H, CH₂), 2,88 (m, H-piperidin), 2,54 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,56 (m, H-piperidin), 0,97 (t, *J* = 6,98 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS *m/z* 424 [M⁺].

45

Příklad 82

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

50

Dimethylamid 2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-5-sulfonylové kyseliny (90 g, 0,38 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (100 mg), čímž se získá 100 mg (54 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,30 (s, br, 1H, NH), 8,25 (d, 1H), 7,92 (s, 1H, H-vinyl), 7,48 – 7,53 (m, 2H), 7,07 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,61 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,56 (t, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS–EI m/z 485 [M⁺].

Příklad 83

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[5-(3-chlorfenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

(3-Chlorfenyl)amid 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonylové kyseliny (120 mg, 0,38 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (100 mg), čímž se získá 150 mg (69 %) požadované sloučeniny ve formě žluto-oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,26 (s, br, 1H, NH), 10,30 (br s, 1H, NH), 8,26 (d, 1H), 7,79 (s, 1H, H-vinyl), 7,51 – 7,57 (m, 2H), 7,22 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,44 (m, 2H, CH₂), 2,57 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS–EI m/z 568 [M⁺].

Příklad 84

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2,4-dimethyl-5-[2-oxo-5-(pyridin-3-ylsulfamoyl)-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Pyridin-3-ylamid 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonová kyselina (110 mg, 0,38 mmol) se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (100 mg), čímž se získá 150 mg (74 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 8,04 (m, 1H), 7,76 (s, 1H, H-vinyl), 7,49 – 7,54 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 7,14 (m, 1H), 6,94 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,56 (t, J = 7,06 Hz, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,43 (s, 6H, CH₂), 2,43 (s, 6H, 2 x CH₃), 1,68 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS m/z 535 [M⁺].

Příklad 85

3-[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmethyl]-4-(2-hydroxyethyl)-1,3-dihydroindol-2-on

4-(2-Hydroxyethyl)-1,3-dihydroindol-2-on (71 mg, 0,4 mmol) se kondenzuje s 3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-karbaldehydem, čímž se získá 90 mg (55 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14,25 (s, 1H, NH), 10,88 (s, 1H, NH), 7,57 (s, 1H, H-vinyl), 7,03 (m, 1H), 6,75 – 6,82 (m, 2H), 4,86 (m, 1H, OH), 3,70 (m, 2H, CH₂), 3,04 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,28 (br s, 7H), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,18 (s, 3H, CH₃).

5 MS m/z (+ve) 409,3 [M⁺].

Příklad 86

10 fenylamid 3-[3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny

Fenylamid 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny (110 mg, 0,4 mmol) se kondenzuje s 3,5-dimethyl-4-(4-methylpiperazin-1-karbonyl)-1H-pyrrol-2-karbaldehydem, 15 (100 mg), čímž se získá 50 mg (24 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,52 (s, 1H, NH), 11,26 (s, 1H, NH), 10,08 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,75 (s, 1H, H-vinyl), 7,50 (dd, J = 1,6 & 8,3 Hz, 1H), 7,19 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 2,49 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,28 (m, 10H, 2 x CH₃ & 2 x CH₂), 2,18 (s, 3H, CH₃), 20

MS-EI m/z 519 [M⁺].

Příklad 87

25 (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-dimethylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Dimethylamid 2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny (90 mg, 0,38 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (100 mg), čímž se získá 80 mg (43 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11,30 (s, 1H, NH), 8,27 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,94 (s, 1H, H-vinyl), 7,49 (dd, J = 1,7 & 8,0 Hz, 1H), 7,44 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,07 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,60 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,53 (m, 2H, CH₂), 2,45 – 2,50 (m, 10H, 2 x CH₃ & N(CH₂CH₃)₂), 0,96 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂). 35

MS-EI m/z 487 [M⁺].

40

Příklad 88

45 (2-diethylaminoethyl)amid 5-[5-(3-chlorfenylsulfamoyl)-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

(3-chlorfenyl)amid 2-Oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-sulfonové kyseliny (120 mg, 3,8 mmol) se kondenzuje s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (100 mg), čímž se získá 80 mg (37 %) požadované sloučeniny ve formě žluté pevné látky. 50

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,24 (s, 1H, NH), 10,29 (s, 1H, NH), 8,25 (d, J = 1,87 Hz, 1H), 7,79 (s, 1H, H-vinyl), 7,52 (dd, J = 1,87 & 8,3 Hz, 1H), 7,42 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,22 (t, J = 8,02 Hz, 1H), 7,15 (t, J = 2 Hz, 1H), 7,08 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,27

(m, 2H, CH₂), 2,48 – 2,57 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS–EI m/z 570,1 [M⁺].

5

Příklad 95

10 ethylester 3-(2-oxo-5-fenyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,74 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,13 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinyl), 7,70 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 7,49 (dd, J = 1,7 Hz & 8,0 Hz, 1H), 7,44 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 7,32 (m, 1H), 6,96 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,25 (q, J = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,30 (t, J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

15

MS–EI m/z 412 [M⁺].

20 Příklad 99

ethylester 3-(2-oxo-5-fenylsulfamoyl-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-karboxylové kyseliny

25 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 11,33 (s, 1H, NH), 10,07 (s, 1H, NH), 8,24 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinyl), 7,57 (dd, J = 1,8 & 8,0 Hz, 1H), 7,21 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,11 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 6,99 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,98 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,27 (q, J = 7,0 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,80 (m, 2H, CH₂), 2,73 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,30 (t, J = 7,0 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

30

MS–EI m/z 491 [M⁺].

Příklad 109

35

3-[3-(morfolin-4-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-2-en-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylová kyselina

40 ¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,75 (br s, 1H, COOH), 11,08 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H, H-vinyl), 7,62 (dd, J = 1,4 & 7,8 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 3,65 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,55 (dd, J = 1,4 & 7,8 Hz, 1H), 7,41 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 3,65 (m, 4H, 2 x CH₂), 3,55 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,54 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2 x CH₂).

45

MS–EI m/z 421 [M⁺].

Příklad 112

50 5-brom-3-[3-(pyrrolidin-1-karbonyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-1,3-dihydroindol-2-on

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,56 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,05 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,74 (s, 1H, H-vinyl), 7,28 (dd, J = 1,3 & 8,3 Hz, 1H), 6,83 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 3,57

(m, 4H, 2 x CH₂), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,65 (m, 2H, CH₂), 1,88 (m, 4H, 2 x CH₂), 1,71 (m, 4H, 2 x CH₂).

MS-EI m/z 439 & 441 [M⁺-1] & [M⁺+1].

5

Příklad 114

3-(3-dimethylkarbamoyl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-izoindol-1-ylmetylen]-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-6-karboxylová kyselina

10

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,72 (br s, 1H, COOH), 11,05 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,72 (s, 1H, H-vinyl), 7,62 (dd, J = 1,3 & 7,9 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 3,03 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,55 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2 x CH₂).

15

MS-EI m/z 379 [M⁺].

20 Příklad 115

4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,56 (br s, 1H, NH), 8,24 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,86 (s, 1H, H-vinyl), 7,74 (d, J = 2,96 Hz, 1H), 7,56 (dd, J = 1,5 & 8,1 Hz, 1H), 7,20 (br m, 1H, NHCH), 7,03 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 2,57 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃).

25

MS-EI m/z 361 [M⁺].

30

Příklad 116

ethylester {[4-methyl-5-(4-methyl-5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino}octové kyseliny

35

Ethylester 4-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (viz D. O. Cheng, T. L. Bowman a E. LeGoff; *J. Heterocyclic Chem.*; 1976; 13; 1145-1147) se formyluje podle způsobu A, hydrolyzuje podle způsobu B, poté amiduje (způsob C), čímž se získá ethylester [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-3-karbonyl)amino]octové kyseliny.

40

4-Methyl-5-methylaminosulfonyl-2-oxindol (50 mg, 0,21 mmol) se kondenzuje s ethylesterem [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-3-karbonyl)amino]octové kyseliny (100 mg, 0,42 mmol) a piperidinem (0,1 ml) v ethanolu (2 ml), čímž se získá 50 mg (52 %) požadované sloučeniny.

45

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 11,29 (v, br, s, 1H NH-CO), 8,33 (t, J = 5,8 Hz, 1H, CONCH₂), 7,83 (d, J = 3,11 Hz, 1H), 7,80 (s, 1H, H-vinyl), 7,71 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 7,34 (br m, 1H, NHCH₃), 6,89 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 7,1 Hz, 2, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J = 5,8 Hz, 2H, GlyCH₂), 2,86 (s, 3H, CH₃), 2,48 (s, 3H, CH₃), 2,42 (d, J = 4,71 Hz, 3H, HNCH₃), 1,20 (t, J = 7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

50

MS-EI m/z 460 [M⁺].

Příklad 117

ethylester {[4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino}octové kyseliny

5 Směs 5-methylaminosulfonyl-2-oxindolu (0,06 g, 0,22 mmol), ethylesteru [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-3-karbonyl)amino]octové kyseliny (0,075 g, 0,27 mmol) a piperidinu (2 kapky) v ethanolu (5 ml) se zahřívá v uzavřené baňce při teplotě 90 °C po dobu 12 hodin. Po ochlazení se precipitát spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem, trituruje směsí dichlor-
10 methanu a etheru a suší, čímž se získá 0,035 g (36 %) požadované sloučeniny ve formě nažloutlé hnědé pevné látky.

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,6 (s, 1H, NH), 11 (v, br, s, 1H NH-CO), 8,30 (t, J = 5,7 Hz, 1H, CONCH₂), 8,25 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 7,88 (s, 1H, H-vinyl), 7,84 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 7,57
15 (dd, J = 1,9 & 8,5 Hz, 1H), 7,14 (br m, 1H, NHCH₃), 7,04 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 4,11 (q, J = 6,7 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J = 5,7 Hz, 2H, GlyCH₂), 2,55 (s, 3H, CH₃), 2,41 (m, 3H, NCH₃), 1,20 (t, J = 6,7 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

MS-EI m/z 446 [M⁺].

20

Příklad 118

25 {[4-methyl-5-(5-methylsulfamoyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karbonyl]amino}octová kyselina

Směs ethylesteru [(5-formyl-4-methyl-1H-pyrrol-3-karbonyl)amino]octové kyseliny (0,142 g, 0,59 mmol) a 1H NaOH (1,2 ml) v methanolu (10 ml) se míchá při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Reakce se koncentruje a zbytek se kondenzuje s 5-methylaminosulfonyl-2-oxindolem
30 (0,13 g, 0,48 mmol) a piperidinem (0,12 ml) v ethanolu (12 ml), čímž se získá 0,11 g (52 %) požadované sloučeniny.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,98 (br s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,75 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 7,51 (dd, J = 2 & 8,2 Hz, 1H), 7,21 (m na br, s, 2H), 6,97 (d, J = 8,1 Hz, 1H),
35 3,41 (d, J = 4,2 Hz, 2H, CH₂NH), 2,54 (s, 3H, pyrrol-CH₃), 2,39 (s, 3H, ArCH₃).

MS m/z 417 [M⁺-1].

40 Příklad 120

5-methyl-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,77 (br s, 1H, NH), 12,49 (s, COOH), 11,07 (s, 1H, NH),
45 8,39 (s, 1H, H-vinyl), 7,43 (d, J = 7,47 Hz, 1H), 7,20 (t, J = 7,47 Hz, 1H), 7,03 (t, J = 7,47 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 7,47 Hz, 1H), 6,49 (d, J = 1,53 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H, CH₃).

MS-EI m/z 269 [M+H]⁺.

50

Příklad 121

ethylester 5-methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

55

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,79 (s, 1H, NH), 11,08 (s, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, H-vinyl), 7,45 (d, J = 7,52 Hz, 1H), 7,20 (t, J = 7,52 Hz, 1H), 7,03 (t, J = 7,52 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 7,52 Hz, 1H), 6,50 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 4,26 (q, J = 7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,32 (t, J = 7,2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

5

MS m/z 297,1 [M+1]⁺.

Příklad 122

10

ethylester 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

15

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,72 (s, 1H, NH), 11,16 (s, 1H, NH), 8,29 (s, 1H, H-vinyl), 7,53 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,35 (dd, J = 2,0 & 8,05 Hz, 1H), 6,87 (t, J = 8,05 Hz, 1H), 6,53 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 4,28 (q, J = 7,03 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,33 (t, J = 7,03 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

20

MS m/z 375 & 377 [M+H]⁺.

Příklad 123

25

2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina

30

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,72 (s, 1H, NH), 12,57 (s, 1H, COOH), 11,10 (s, 1H, NH), 8,36 (s, 1H, H-vinyl), 7,51 (d, J = 1,4 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 1,4 & 8,17 Hz, 1H), 6,87 (t, J = 8,17 Hz, 1H), 6,52 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H, CH₃).

MS m/z 347 & 349 [M+H]⁺.

Příklad 124

35

(2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

40

Do roztoku 2-formyl-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (250 mg, 1,63 mmol) v dimethylformamidu (3 ml) se přidá 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (376 mg, 1,2 ekvív.), 1-hydroxybenzotriazol (265 mg, 1,2 ekvív.), triethylamin (0,45 ml, 2 ekvív.), 1-hydroxybenzotriazol (265 mg, 1,2 ekvív.), triethylamin (0,45 ml, 2 ekvív.) a 1-(2-aminoethyl)pyrrolidin (0,23 ml, 1,1 ekvív.). Po míchání při pokojové teplotě přes noc se reakce zředí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou (s extra solí) a extrahuje 10% methanolem v dichlormethanu. Spojené organické vrstvy se promyjí solankou, suší nad bezvodým síranem sodným a koncentrují, čímž se získá 130 mg (2-pyrrolidin-1-yl)ethyl)amidu 2-formyl-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

45

50

Směs 5-brom-2-oxindolu (106 mg, 0,5 mmol), (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidu 2-formyl-5-methyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (125 mg, 1 ekvív.) a piperidinu (0,2 ml) v ethanolu (2 ml) se zahřívá v uzavřené baňce při teplotě 80 °C po dobu 1 hodiny, pak se ochladí, vzniklý precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a ethylacetátem a suší, čímž se získá požadovaná sloučenina ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, 1H, NH), 11,06 (br s, 1H, NH), 8,56 (s, 1H, H-vinyl), 8,15 (m, 1H, CONCH₂), 7,48 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,31 (dd, J = 1,8 & 7,9 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 3,35 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2,56 (t, J = 6,91 Hz, 2H, HNCH₂CH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2 x CH₂).

5

MS m/z 443/445 [M⁺ a M⁺+2].

Příklad 125

10

(2-diethylaminoethyl)amid 2-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

15

Do roztoku 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (320 mg, 2,1 mmol) v dimethylformamidu (3 ml) se přidá 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (483 mg, 1,2 ekviv.) 1-hydroxybenzotriazol (340 mg, 1,2 ekviv.), triethylamin (0,59 ml, 2 ekviv.) a N,N-diethylethylendiamin (0,32 ml, 1,1 ekviv.). Po míchání při pokojové teplotě přes noc se reakce zředí nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou (s extra solí) a extrahuje 10% methanolem v dichlormethanu. Spojené organické vrstvy se promyjí solankou, suší se bezvodým síranem sodným a koncentrují, čímž se získá (2-diethylaminoethyl)amid 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

20

Směs 5-brom-2-oxindolu (106 mg, 0,5 mmol), (2-diethylaminoethyl)amidu 2-formyl-5-methyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (126 mg, 1 ekviv.) a piperidinu (0,2 ml) v ethanolu (2 ml) se zahřívá v uzavřené baňce při teplotě 80 °C po dobu 1 hodiny, pak se ochladí, precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a ethylacetátem a suší, čímž se získá požadovaná sloučenina ve formě oranžové pevné látky.

25

¹H NMR (360 MHz, DMSO-d₆) δ 13,62 (s, 1H, NH), 11,11 (br s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, H-vinyl), 8,1 (m, 1H, CONCH₂), 7,49 (d, J = 2,2 Hz, 1H), 7,31 (dd, J = 2,2 & 8,3 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 6,58 (d, J = 2,24 Hz, 1H), 3,31 (m, 2H, HNCH₂CH₂), 2,59 (m, 6H, 3 x CH₂), 2,36 (s, 3H, CH₃), 0,99 (t, J = 6,8 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

30

MS m/z 445/447 [M⁺ a M⁺+2].

35

Příklad 126

40

(2-diethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

45

Směs 1,3-dihydroindol-2-onu (266 mg, 2 mmol), (2-diethylaminoethyl)amidu 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (530 mg, 2 mmol) a piperidinu (1 kapka) v ethanolu se zahřívá při teplotě 90 °C po dobu 2 hodin. Reakce se ochladí na pokojovou teplotu, výsledný precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a suší, čímž se získá 422 mg (55 %) požadované sloučeniny ve formě světle žluté pevné látky.

50

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,7 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 7,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,64 (s, 1H, H-vinyl), 7,41 (t, J = 5,4 Hz, 1H, NH), 7,13 (dt, J = 1,2 & 7,6 Hz, 1H), 6,99 (dt, J = 1,2 & 7,6 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 3,28 (m, 2H), 2,48 – 2,55 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

MS + ve APCI 381 [M⁺ + 1].

Příklad 127

5 (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Směs 5-chlor-1,3-dihydroindol-2-onu (335 mg, 2 mmol), (2-diethylaminoethyl)amidu 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (530 mg, 2 mmol) a piperidinu (1 kapka) v ethanolu se zahřívá při teplotě 90 °C po dobu 2 hodin. Reakce se ochladí na pokojovou teplotu, výsledný precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje ethanolem a suší, čímž se získá 565 mg (68 %) požadované sloučeniny ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,0 (s, 1H, NH), 7,98 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,77 (s, 1H, H-vinyl), 7,44 (t, NH), 7,13 (dd, *J* = 2,1 & 8,4 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3,28 (g, 2H), 2,48 – 2,53 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, *J* = 7,0 Hz, 6H, N(CH₂CH₃)₂)

MS + ve APCI 415 [*M*⁺ + 1].

20

Příklad 128

(2-pyrrolidin-1-ethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

25

1,3-Dihydroindol-2-on se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá požadovaná sloučenina.

MS + ve APCI 379 [*M*⁺ + 1].

30

Příklad 129

35 (2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

5-Fluor-1,3-dihydroindol-2-on se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá požadovaná sloučenina.

40 MS + ve APCI 397 [*M*⁺ + 1].

Zvětšení měřítka:

45 5-Formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina (61 g), 5-fluor-1,3-dihydroindol-2-on (79 g), ethanol (300 ml) a pyrrolidin (32 ml) se refluxuje po dobu 4,5 hodiny. Do směsi se přidá octová kyselina (24 ml) a v refluxu se pokračuje po dobu 30 minut. Směs se ochladí na pokojovou teplotu a pevné látky se spojí vakuovou filtrací a promyjí (2x) ethanolem. Pevné látky se míchají po dobu 130 minut v 40% acetonu ve vodě (400 ml) obsahující 12N kyselinou chlorovodíkovou (6,5 ml). Pevné látky se spojí vakuovou filtrací a promyjí (2x) 40% acetonem ve vodě.

50 Pevné látky se suší za vakua, čímž se získá 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (86 g, 79 % výtěžek) ve formě oranžové pevné látky. ¹H-NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) 2,48, 2,50 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 6,80, 6,88, 7,68, 7,72 (4xm, 4H, aromátová a vinyl), 10,88 (s, 1H, CONH), 12,12 (s, 1H, COOH), 13,82 (s, 1H, pyrrol NH), MS *m/z* 299 [*M*–1].

55

5-[5-Fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina (100 g) a dimethylformamid (500 ml) se míchají a přidá se benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorfosfát (221 g), 1-(2-aminoethyl)pyrrolidin (45,6 g) a triethylamin (93 ml). Směs se míchá po dobu 2 hodin při pokojové teplotě, pevný produkt se spojí vakuovou filtrací a promyje ethanolem. Pevné látky se promývají za míchání v ethanolu (500 ml) po dobu jedné hodiny při teplotě 64 °C a ochladí na pokojovou teplotu. Pevné látky se spojí vakuovou filtrací, promyjí ethanolem a suší za vakua, čímž se získá (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (101,5 g, 77% výtěžek). ¹H NMR (dimethylsulfoxid-d₆) δ 1,60 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,40, 2,44 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,50 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,57, 3,35 (2 x m, 4H, 2 x CH₂), 7,53, 7,70, 7,73, 7,76 (4xm, 4H, aromatický a vinyl), 10,788 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, pyrrol NH), MS m/z 396 [M+1].

15 Příklad 130

(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

20 5-Chlor-1,3-dihydroindol-2-on se kondenzuje s (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá požadovaná sloučenina.

MS + ve APCI 417 [M⁺ + 1].

25

Příklad 131

(2-dimethylaminoethyl)amid 2,4-dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

30

1,3-Dihydroindol-2-on se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá požadovaná sloučenina.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH), 7,78 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,63 (s, 1H, H-vinyl), 7,48 (t, 1H, NH), 7,13 (dt, 1H), 6,98 (dt, 1H), 6,88 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 3,31 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

35

MS + ve APCI 353 [M⁺ + 1].

40

Příklad 132

(2-dimethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

45

5-Fluor-1,3-dihydroindol-2-on se kondenzuje s (2-dimethylaminoethyl)amidem 5-formyl-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, čímž se získá požadovaná sloučenina.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 13,68 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH), 7,76 (dd, J = 2,4 & 9,4 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H, H-vinyl), 7,51 (t, 1H, NH), 6,93 (m, 1H), 6,84 (dd, J = 4,6 & 8,4 Hz, 1H), 3,31 (q, J = 6,6 Hz, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

50

55 MS + ve APCI 371 [M⁺ + 1].

Příklad 193

5 (2-ethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

10 (2-Ethylaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (99 g), ethanol (400 ml), 5-fluor-2-oxoindol (32 g) a pyrrolidin (1,5 g) se refluxují po dobu 3 hodin za stálého míchání, směs se ochladí na pokojovou teplotu a pevné látky spojí vakuovou filtrací, míchají v ethanolu při teplotě 60 °C, ochladí na pokojovou teplotu a spojí vakuovou filtrací. Produkt se suší za vakua, čímž se získá (2-ethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (75 g, 95% výtěžek). ¹H NMR (dimethylsulfoxid-*d*₆) δ 1,03 (t, 3H, CH₃), 2,42, 2,44 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,56 (q, 2H, CH₂), 2,70, 3,30 (2 x t, 4H, 2 x CH₂), 6,85, 6,92, 7,58, 7,72, 7,76 (5xm, 5H, aromatický, vinyl a CONH), 10,90 (br s, 1H, CONH), 13,65 (br s, 1H, pyrrol NH).

MS m/z 369 [M-1].

20 Příklad 195

(2-diethyl-*N*-oxoaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

25 Způsob A:

30 (2-Diethylaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (598 mg) a dichlormethan (60 ml) v ledové lázni se nechají reagovat s 3-chlorperbenzoovou kyselinou (336 mg) a směs míchá při pokojové teplotě přes noc, rozpouštědlo se odpařuje na rotační odparce a zbytek se suspenduje v methanolu (20 ml). Přidá se voda (20 ml) obsahující hydroxid sodný (240 mg) a směs se míchá po dobu jedné hodiny, precipitát se spojí vakuovou filtrací, promyje 5 ml vody a suší za vakua, čímž se získá (2-diethyl-*N*-oxoaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (510 mg, 82% výtěžek) ve formě oranžové pevné látky. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 13,72 (br s, 1H, NH), 11,02 (br s, 1H, CONH), 9,81 (br s, 1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, aromatické), 7,70 (s, 1H, aromatické), 6,93 (td, 1H, aromatické), 6,84 (m, 1H, aromatické), 3,63 (m, 2H, CH₂), 3,29 (m, 2H, CH₂), 3,14 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,47 (s, 1H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,64 (t, 6H, 2 x CH₃).

40 MS m/z 415 [M+1].

Způsob B:

45 (2-Diethylaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (10 g) se suspenduje v dichlormethanu (100 ml) a ochladí v ledové lázni. 3-Chlorperoxybenzoová kyselina (13,1 g) se přidá za stálého míchání a směs se nechá ohřát na pokojovou teplotu a míchá přes noc. Směs se zahušťuje na rotační odparce do sucha a chromatografuje na sloupci silikagelu v 20% methanolu v dichlormethanu jako mobilní fázi. Frakce obsahující produkt se spojí a zahušťují na rotační odparce do sucha, čímž se získá (2-diethyl-*N*-oxoaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (9 g, 83% výtěžek).

55 (2-Diethyl-*N*-oxoaminoethyl)amid 5-formyl-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (9 g), 5-fluor-1,3-dihydroindol-2-on (9 g, 83% výtěžek) a pyrrolidin (9 g, 83% výtěžek) (0,1 g) se refluxují v ethanolu (30 ml) po dobu 4 hodin. Směs se ochladí v ledové lázni a precipitát se spojí vakuovou filtrací a promyje ethanolem. Pevné látky se míchají v ethylacetátu (30 ml), spojí

vakuovou filtrací, promyje ethylacetátem a suší za vakua, čímž se získá (2-diethyl-*N*-oxoaminoethyl)amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dimethylindol (3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (10,3 g, 80% výtěžek) ve formě oranžové pevné látky.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 13,72 (br s, 1H, NH), 11,02 (br s, 1H, CONH), 9,81 (br s, 1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, aromatické), 7,70 (s, 1H, aromatické), 6,93 (td, 1H, aromatické), 6,84 (m, 1H, aromatické), 3,63 (m, 2H, CH₂), 3,29 (m, 2H, CH₂), 3,14 (m, 4H, 2 x CH₂), 2,47 (s, 1H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,64 (t, 6H, 2 x CH₃). MS *m/z* 415 [M+1].

10

Příklad 190

[2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

15

5-[5-Fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (120 mg, 0,4 mmol) se protřepává s 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC) a podrobí HCl (96 mg, 0,5 mmol), bezvodému 1-hydroxybenztriazolu (68 mg, 0,5 mmol) a 2-(2-aminoethylpyridinu zakoupenému u firmy Aldrich v bezvodém dimethylformamidu (DMF; 3 ml) po dobu 2 až 3 dnů při pokojové teplotě. Reakční směs se zředí s 1 M NaHCO₃ (1,5 ml), pak 8 ml vody. Surový precipitát se spojí filtrací, promyje vodou, suší a čistí krystalizací nebo chromatografií, čímž se získá [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

25

Příklad 189

[2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

30

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu výše, ale nahradí se 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (127 mg), čímž se získá [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

35

Příklad 192

[2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

40

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190 výše, ale nahradí se 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylová kyselina 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (145 mg), čímž se získá [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

45

Příklad 191

[2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3*Z*)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

50

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190 výše, ale nahradí se 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny 5 [2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (113 mg), čímž se získá [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

Příklad 203

[2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190 výše, ale nahradí se 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (123 mg), čímž se získá [2-(pyridin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-kyano-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

Příklad 142, 186, 187, 188 a 204

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladech 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 1-(2-aminoethyl)pyrrolidinem zakoupeným u firmy Aldrich Chemical Company, Inc., čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklad 143 až 147

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladech 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 1-(2-aminoethyl)imidazolin-2-onem (připraveným zahříváním dimethylkarbonátu s bis(2-aminoethyl)aminem (2 ekvivalenty) v uzavřené baňce při teplotě 150 °C po dobu 30 minut. Poté se postupuje podle způsobu popsaného v patentu US č. 2 613 212 (1950) uděleného Rohm & Haas Co. Surový produkt se čistí na silikagelu ve směsi chloroformu, methanolu, vodného amoniaku (80:25:2) jako mobilní fázi, čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklad 148 až 151 a 184

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin ethylesterem 4-(2-aminoethyl)piperazin-1-octové kyseliny (připravený následujícím způsobem: ethylester piperazin-1-octové kyseliny (11,22 g) se nechá reagovat s jodacetonitrilem (5,0 ml) v přítomnosti uhličitanu draselného (6,9g) v ethylacetátu (260 ml) při teplotě 0 °C. Po přidání jodacetonitrilu (45 min) se reakční směs následně míchá při pokojové teplotě po dobu 11 hodin. Reakční směs se filtruje a filtráty se odpařují. Zbytek se hydrogenuje v přítomnosti boridu kobaltu (připraveného z CoCl₂ a tetrahydridoboritanu sodného) při pokojové teplotě při tlaku 50 psi (344,74 kPa) po dobu 2 dnů v ethanolu. Filtrací, odpařováním a chromatografickou purifikací ve směsi chloroformu, methanolu a vodného amoniaku (80:25:2) jako mobilní fázi se získá požadovaný amin (3,306 g) ve formě světle žlutého oleje, čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklad 152 a 153

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 2-[(2-aminoethylamino)acetonitrilem (přípraveným následujícím způsobem: roztok jodacetonitrilu (50 mmol) v ethylalkoholu (80 ml) se přidává do roztoku ethylen-
 5 diaminu (150 ml) v ethylalkoholu (60 ml) při teplotě 0 °C po dobu 30 minut. V míchání se pokračuje po další 1 hodinu při teplotě 0 °C, pak při pokojové teplotě po dobu 14 hodin. Přidá se 55 mmol uhličitanu draselného, míchá po dobu 30 minut. Směs se filtruje a filtrát se koncentruje při pokojové teplotě. Zbytek se čistí na sloupci silikagelu ve směsi chloroformu, methanolu
 10 a vodného amoniaku (80:15:1,5), čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklad 154 až 158

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladech 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 1-(3-aminopropyl)azepin-2-onem (přípraveným podle způsobu publikovaného v Kraft A.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 6, 1999, 705–14, kromě hydrolyzy pomocí DBU, která se provádí při teplotě 145 °C v přítomnosti čistého hydroxidu lithného (1 hodina,
 20 5 ml 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu – DBU, 2 ml vody, 420 mg hydrátu hydroxidu lithného).

Purifikací surového produktu na sloupci silikagelu ve směsi chloroformu, methanolu, vodného amoniaku (80:40:4) jako mobilní fázi se získá 1-(3-aminopropyl)azepin-2-on (4,973 g, 87%
 25 výtěžek), čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklady 133 až 135, 159 a 200

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin *N*-acetyلهthylendiaminem, (přípraveným zahříváním směsi ethylacetátu s ethylendiaminem (1,5 ekviv.) při teplotě 160 °C po dobu 1 hodiny v uzavřené baňce a vakuo-
 30 vou destilací. Produkt se získá v 56% výtěžku. *N*-acetyلهthylendiamin je také dostupný u firmy Aldrich), čímž se získají požadované sloučeniny.

Příklady 146 až 140

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 1-(3-aminopropyl)tetrahydropyrimidin-2-onem (přípravený stejným
 40 způsobem jako 1-(3-aminopropyl)azepin-2-on podle způsobu publikovaného v Kraft A.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 6, 1999, 705–14: 1,3,4,6,7,8-hexahydro-2*H*-pyrimido[1,2- α]-pyrimidin (4,939 g), hydrát hydroxidu lithného (918 mg) a 2 ml vody se zahřívají bez rozpouštědla v uzavřené nádobě při teplotě 145 °C po dobu 1 hodiny. Surový produkt se čistí na sloupci silikagelu ve směsi chloroformu, methanolu a vodného amoniaku (80:40:44) jako mobilní fázi,
 45 čímž se získá čistý amin (5,265 g, 94% výtěžek).

Příklady 141, 160 až 162 a 185

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladech 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 1-(2-aminoethyl)piperazin-2-onem (přípraveným následujícím způsobem: čistý *tert*-butyldifenylsilylchlorid (25 ml, 97,7 mmol) se přidává po kapkách do roztoku DBU (19,5 ml, 130 mmol) a bis(2-aminoethyl)aminu (4,32 ml, 40 mmol) v bezvodém dimethyl-
 50 acetamidu (80 ml) při pokojové teplotě po ochlazení ve vodní lázni v průběhu 5 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu se přidá ethylester bromoctové kyseliny (6,70 ml, 60 mmol). Reakční

směs se míchá po dobu 25 minut, pak se odpařuje za vysokého vakua a zbytek se rozpustí v methanolu (200 ml). Přidá se KHCO_3 (10 g) a KF (12 g, 200 mmol) a směs se míchá při teplotě 60 °C po dobu 5 hodin. Přidá se 10 g Na_2CO_3 a směs se míchá po dobu 10 minut, ochladí a filtruje, filtráty se odpařují. Zbytek se extrahuje hexany (2 x 250 ml), látky nerozpustné v hexanech se rozpustí v ethanolu (60 ml), filtrují a odpařují. Zbytek se čistí na sloupci silikagelu ve směsi chloroformu, methanolu a vodného amoniaku (80:40:4) jako mobilní fázi, čímž se získá čistý amin (4,245 g, 74% výtěžek), čímž se získají požadované sloučeniny.

10 Příklady 163 až 167

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladech 190, 189, 191, 192 a 203 výše, ale nahradí se 2-(2-aminoethyl)pyridin 3-[(21-aminoethyl)amino]propionitrilem (přípraveným z ethylendi-aminu (150 mmol) a akrylonitrilu (50 mmol) v THF při pokojové teplotě podle způsobu publikovaného v Israel, M. *et al.*: *J. Med. Chem.* 7, 1964, 710-16, čímž se získá požadovaný amin (4,294 g)), čímž se získají požadované sloučeniny.

20 Příklad 168

[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Do míchané žluté kalné směsi 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (90 mg), DMF (0,8 ml) a triethylaminu (TEA: 0,084 ml) v 20ml baňce se přidá benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)fosfonium hexafluorofosfát – BOP činidlo (199 mg). Směs se v průběhu 5 minut vyčeří, do čiré směsi se přidá 2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethylamin¹ (51 mg) a výsledný roztok se míchá při pokojové teplotě přes noc. Žluté produkty v pevné formě z reakčního systému vyprecipitují. Podle TLC (10% methanol v methylenchloridu) by se veškerá výchozí látka měla konvertovat na produkt. Pevný podíl izolovaný vakuovou filtrací se jednou promyje ethanolem (1 ml), pevný podíl se sonikuje v diethyletheru (2 ml) po dobu 20 minut a spojí vakuovou filtrací. Po sušení za vakua se získá (4-methylpiperazin-1-ylethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (79 mg, 62% výtěžek).

¹H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,13 (s, 3H, CH_3), 2,40, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 2,41 (m, 2H, CH_2), 2,47 (m, 8H, 4x CH_2), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,82 (dd, $J = 4,5, 8,7$ Hz, 1H), 6,91 (td, $2J = 2,4, 3J = 8,8$ Hz, 1H), 7,43 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,75 (dd, $J = 2,8, 9,6$ Hz, 1H) (aromatický a vinylyl), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, NH).

LC-MS (m/z 424,4 (M-1).

45 Příklad 169

(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 168 výše, ale nahradí se 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou (95 mg, 0,3 mmol), čímž se získá (4-methylpiperazin-1-ylethyl)amid 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (76 mg, 58% výtěžek).

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,84 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,11 (dd, J = 2,0, 8,0 Hz, 1H), 7,44 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, J = 2,0 Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,98 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH).

5

LC-MS (m/z) 440,2 (M-1).

Příklad 170

10

(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

15

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 168 výše, ale nahradí se 5-(5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou, čímž se získá (4-methylpiperazin-1-ylethyl)amid 5-(5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (39 mg, 54%) z SU01-1670 (54 mg, 0,15 mmol).

20

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,14 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4 x CH₂), 3,31 (m, 2H, CH₂), 6,80 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,23 (dd, J = 2,0, 8,0 Hz, 1H), 7,44 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,09 (d, J = 2,0 Hz, 1H) (aromatický a vinyl), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH).

25

LC-MS (m/z) 486,6 (M).

Příklad 172

30

(4-methylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

35

Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 168 výše, ale nahradí se 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylová kyselina SU014900 5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylovou kyselinou, čímž se získá (4-methylpiperazin-1-ylethyl)amid 5-(2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny SU0146903 (136 mg, 84 %) z SU01-2120 (112,8 mg, 0,4 mmol).

40

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,39, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (t, 2H, CH₂), 6,86 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,96 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,10 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,76 (d, J = 7,6 Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH).

45

LC-MS (m/z) 406,6 (M-1).

Příklad 171

50

[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

55

Do míchané žluté kalné směsi 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (112,8 mg, 0,4 mmol), DMF (0,5 ml) a triethylaminu

(0,111 ml) v 20 ml reakční baňce se přidá BOP činidlo (265 mg). Směs se po 5 minutách vyčechá. Do čiré směsi se přidá 2-(2,6-dimethylpiperazin-1-yl)ethylamin (68,6 mg) (viz Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R., Mosquera, L. Labeaga, A., Innrarity, A. Orjals, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2870-2880) a výsledný roztok se míchá při pokojové teplotě přes noc. Podle TLC (10% methanol v methylenchloridu) by měla veškerá výchozí látka zreagovat na produkt. Reakční směs se zahušťuje do sucha a čistí zrychlenou chromatografií ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}=20/1-15/1$), poté rekrystalizuje, čímž se získá [2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-[2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (83 mg, 50% výtěžek).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1,15, 1,16 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 1,95 (t, $J = 11,6$ Hz, 2H, CH_2), 2,41, 2,47 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 2,50 (m, 2H, CH_2), 3,03 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,86 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,97 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,11 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,48 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,75 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH).

LC-MS (m/z) 422,2 (M).

20 Příklad 173

[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

25 Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 168 výše, čímž se získá požadovaná sloučenina (60 mg, 0,2 mmol).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 0,891, 0,907 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 1,49 (t, $J = 10,4$ Hz, 2H), 2,40, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 2,41 (m, 2H, CH_2), 2,74 (m, 4H), 3,30 (m, 2H), 6,82 (dd, $J = 4,5, 8,7$ Hz, 1H), 6,90 (td, $2J = 2,4, 3J = 8,4$ Hz, 1H), 7,42 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,74 (dd, $J = 4,6, 8,4$ Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,65 (s, 1H, NH).

LC-MS (m/z) 438,4 (M-1).

35 Příklad 174

[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

40 Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 171 výše, čímž se získá požadovaná sloučenina (31,2 mg, 34 %) z 5-[5-chlor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (63 mg, 0,2 mmol).

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 1,15, 1,16 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 1,95 (t, $J = 11,6$ Hz, 2H, CH_2), 2,40, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH_3), 2,50 (m, 2H, CH_2), 3,03 (d, $J = 11,2$ Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,85 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,11 (dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, 1H), 7,52 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,63 (s, 1H, NH).

50 LC-MS (m/z) 456,2 (M+1).

Příklad 175

[2-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)ethyl]amid 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny

- 5 Postupuje se podle způsobu uvedeného v příkladu 171 výše, čímž se získá požadovaná sloučenina (40 mg, 40 %) z 5-[5-brom-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (74 mg, 0,2 mmol).
- 10 ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 1,15, 1,16 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 1,95 (t, J = 11,6 Hz, 2H, CH₂), 2,40, 2,42 (2 x s, 6H, 2 x CH₃), 2,50 (m, 2H, CH₂), 3,03 (d, J = 10,4 Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,81 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,24 (dd, J = 2,0, 8,4 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,10 (d, J = 2,0 Hz, 1H) (aromatické a vinyl), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH).
- 15 LC-MS (m/z) 498,4 (M+1).

Biologické příklady

- 20 Následující testy byly používány k nalezení takových sloučenin, které mají optimální stupeň požadované aktivity.

Postupy testů

- 25 Následující testy mohou být používány ke stanovení míry aktivity a účinku různých sloučenin podle předloženého vynálezu na jednu nebo více PK. Obdobné testy mohou být navrženy společně podle stejných zásad pro kterékoliv PK pomocí standardních a známých technik.
- 30 Několik testů popsaných v předloženém vynálezu je prováděno technikou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay) (Voller, *et al.*, 1980, „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“, Manual of Clinical Immunology, 2d ed., Rose and Friedman, Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C., 359-371). Obecný postup je následující: sloučenina je zavedena do buněk exprimujících testovanou kinázu, buď přírodní nebo rekombinantní, po vybraný časový interval,
- 35 po kterém, pokud testovaná kináza je receptor, je přidán ligand aktivující receptor. Buňky se lyzují a lyzát se převede do jamek destičky pro ELISA techniku předem potažených specifickou protilátkou rozpoznávající substrát enzymatické fosforylační reakce. Nesubstrátové komponenty buněčného lyzátu se odmyjí a míra fosforylace substrátu se deteguje protilátkou specificky rozpoznávající fosfotyrosin v porovnání s buňkami, které nepřišly v kontakt s testovanou sloučeninou.
- 40 Tyto výhodné postupy provádění ELISA experimentů pro specifické PK jsou uvedeny níže. Nicméně úprava těchto postupů určených pro stanovení aktivity sloučenin proti dalším RTK, jakož i pro CTK a STK, je odborné veřejnosti zřejmá. Další testy popsané v předloženém vynálezu měří množství DNA vytvořené v rámci odpovědi na aktivaci testované kinázy, jenž je obecným měřítkem proliferativní odpovědi. Obecný způsob tohoto testu je následující: sloučenina je
- 45 zavedena do buněk exprimujících testovanou kinázu, buď přírodní, nebo rekombinantní, po vybraný časový interval, po kterém, pokud testovaná kináza je receptor, je přidán ligand aktivující receptor. Po inkubaci (alespoň přes noc) se přidá činidlo značící DNA, např. 5-romdeoxyuridin (BrdU) nebo H³-thymidin. Množství značené DNA se deteguje buď anti-BrdU protilátkou
- 50 nebo měřením radioaktivity a je srovnáváno s kontrolními buňkami, které nepřišly v kontakt s testovanou sloučeninou.

GST-FLK-1 biologický test

Tento test analyzuje aktivitu tyrosinkinázy GST-Flk1 na poly(glu, tyr) peptidech. Materiály a činidla:

- 5 1. Corning destičky ELISA o 96 jamkách (Corning Catalog No. 5805-96).
2. poly(glu, tyr) 4:1, lyofilizát (Sigma Catalog # P0275).
3. Příprava destiček k testu potažených poly(glu, tyr) (pEY): potažení 2 µg/jamka látkou poly(glu, tyr) (pEY) v 100 µl PBS, skladování při pokojové teplotě po dobu 2 hodin nebo při teplotě 4 °C přes noc. Přikrytí destiček kvůli odpařování.
- 10 4. PBS pufr: pro 1 l, smíchání 0,2 g KH₂PO₄, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl a 8 g NaCl a přibližně 900 ml dH₂O. Po rozpuštění veškerých činidel se pH upraví na 7,2 pomocí HCl. Upravení objemu na celkový 1 l pomocí dH₂O.
5. PBST pufr: na 1 l PBS pufru se přidá 1,0 ml Tween-20.
- 15 6. TBB-Blokující pufr: pro 1 l, smíchání 1,21 g TRIS (pufru na bázi tris(hydroxymethyl)-aminomethanu), 8,77 g NaCl, 1 ml TWEEN-20 v přibližně 900 ml dH₂O, pH se upraví na 7,2 pomocí HCl, přidání 10 g BSA, míchání k úplnému rozpuštění, objem se doplní na celkový 1 l pomocí dH₂O, filtrování k odstranění pevných částic.
- 20 7. 1% BSA v PBS: k vytvoření 1 x pracovního roztoku se přidá 10 g BSA do přibližně 990 ml PBS pufru, míchání k úplnému rozpuštění, objem se doplní na celkový 1 l pomocí PBS pufru, filtrování k odstranění pevných částic.
8. 50mM Hepes pH 7,5,
9. GST-Flk1cd purifikovaný od transformace sf9 rekombinantního baculoviru (SUGEN, Inc.).
- 25 10. 4% DMSO v dH₂O.
11. 10mM ATP v dH₂O.
12. 40mM MnCl₂.
13. Kinázový ředící pufr (KDB): smíchání 10 ml Hepes (pH 7,5), 1 ml 5M NaCl, 40 µl 100mM orthovanadičnanu sodného a 0,4 ml 5% BSA v dH₂O s 88,56 ml dH₂O.
- 30 14. polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V, Applied Scientific Catalog # AS-72092.
15. EDTA: přidání 14,12 g ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) do přibližně 70 ml dH₂O, přidání 10N NaOH, dokud se EDTA nerozpustí, upravení pH na 8,0, upravení na celkový objem 100 ml pomocí dH₂O.
- 35 16. 1° protilátkový ředící pufr: smíchání 10 ml 5% BAS v PBS pufru s 89,5 ml TBST.
17. Anti-fosfotyrosinová monoklonální protilátka konjugovaná s peroxidázou z křenu selského (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).
18. 2,2'-Azonobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová kyselina) (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).
- 40 19. 10% SDS.

Postup:

- 45 1. Corning destičky ELISA o 96 jamkách potažené 2 µg polyEY peptidu ve sterilním PBS podle kroku 3 z oddílu materiály a činidla.

2. odstranění nenavázané tekutiny z jamek invertující destičkou. Promytí TBST (1 x). Protřepání destičky na papírové pásce k odstranění přebytku tekutiny.
3. Do každé jamky se přidá 100 µl 1% BSA v PBS, inkubace za třepání po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
- 5 4. Opakování kroku 2.
5. Prosycení jamek 50mM HEPES (pufru na bázi 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonové kyseliny; pH 7,5) (150 µl/jamka).
6. Zředění testované sloučeniny pomocí dH₂O/4% DMSO na čtyřnásobnou požadovanou finální testovací koncentraci v polypropylenových destičkách o 96 jamkách.
- 10 7. Přidání 25 µl zředění testované sloučeniny do ELISA destičky v kontrolním jamkách, zavedení 25 µl dH₂O/4% DMSO.
8. Přidání 25 µl 40mM MnCl₂ s 4x ATP (2µM) do každé jamky.
9. Přidání 25 µl 0,5M EDZA do negativních kontrolních jamek.
10. Zředění GST-Flkl na 0,005 µg (5 ng)/jamku pomocí KDB.
- 15 11. Přidání 50 µl zředěného enzymu do každé jamky.
12. Inkubace za třepání po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
13. Zastavení reakce přidáním 50 µl 250mM EDTA (pH 8,0).
14. Promytí 3 x TBST a protřepání destičky na papírové pásce k odstranění tekutiny.
- 20 15. Přidání 100 µl anti-fosfotyrosinového HRP konjugátu na jamku, 1:5000 zředění v protilátkovém ředicím pufru. Inkubace za třepání po dobu 90 minut při pokojové teplotě.
16. Promývání podle kroku 14.
17. Přidání 100 µl ABTS roztok o pokojové teplotě do každé jamky.
18. Inkubace za třepání po dobu 10 až 15 minut. Odstranění jakýchkoliv bublinek.
- 25 19. Zastavení reakce přidáním 20 µl 10% dodecylsulfátu sodného (SDS) do každé jamky.
20. Měření na přístroji Dynatech MR7000 ELISA s testovacím filtrem při 410 nM a referenčním filtrem při 630 nM.

PYK2 biologické testy

- 30 Tento test se používá k měření *in vitro* aktivity kinázy HA epitopem značené pyk2 o plné délce (FL.pyk2-HA) při testu ELISA technikou.

Materiály a činidla:

- 35
1. Corning Elisa destičky o 96 jamkách.
 2. 12CA5 monoklonální anti-HA protilátka (SUGEN, Inc.)
 3. PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok Dulbecco (Gibco Catalog # 450-1300EB))
 - 40 4. TBST pufr: pro 1 l, smíchání 8,766 g NaCl, 6,057 g TRIS a 1 ml 0,1% Triton X-100 v přibližně 900 ml dH₂O. Upravení pH na 7,2 a doplnění objemu na 1 l.
 5. Blokující pufr: pro 1 l, smíchání 100 g 10% BSA, 12,1 g 100mM TRIS, 58,44 g 1M NaCl a 10 ml 1% TWEEN-20.

6. FL.pyk2–HA z sf9 buněčného lyzátu (SUGEN, Inc.).
7. 4% DMSO v MilliQue H₂O.
8. 10mM ATP v dH₂O.
9. 1M MnCl₂.
- 5 10. 1M MgCl₂.
11. 1M Dithiothreitol (DTT).
12. 10X fosforylace kinázového pufru: smíchání 5,0 ml 1M Hepes (pH 7,5), 0,2 ml 1M MnCl₂, 1,0 ml 1M MgCl₂, 1,0 ml 10% Triton X-100 v 2,8 ml dH₂O. Těsně před použitím přidání 0,1 ml 1M DTT.
- 10 13. NUNC propylenové destičky o 96 jamkách s V dnem.
14. 500mM EDTA v dH₂O.
15. Protilátkový ředicí pufr: pro 100 ml, 1 ml 5% BSA/PBS a 1 ml 10% Tween-20 v 88 ml TBS.
16. HRP–konjugovaná anti–Ptyr P99), Santa Cruz Biotech Cat. No. SC–7020.
- 15 17. ABTS, Moss, Cat. No. ABST–2000.
18. 10% SDS.

Postup:

- 20 1. Corning ELISA destičky o 96 jamkách potažené 0,5 µg na jamku 12CA5 protilátkou anti–HA v 100 µl PBS. Skladování přes noc při teplotě 4 °C.
2. Odstranění nenavázané HA protilátky z jamek invertující destičkou. Promytí destiček dH₂O. Protřepání destičky na papírové pásce k odstranění přebytku tekutiny.
3. Přidání 150 µl blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
- 25 4. Promytí destiček 4x TBS–T.
5. Zředění lyzátu v PBS (1,5 µg lyzát/100 µl PBS).
6. Přidání 100 µl zředěného lyzátu do každé jamky. Protřepávání při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
7. Promytí podle kroku 4.
- 30 8. Přidání 50 µl 2 X kinázového pufru do ELISA destičky obsahující zachycenou pyk2–HA.
9. Přidání 25 µl 400µM testované sloučeniny v 4% DMSO do každé jamky. Pro kontrolní jamky použití samotného 4% DMSO.
10. Přidání 25 µl 0,5M EDTA do negativních kontrolních jamek.
- 35 11. Přidání 25 µl 20µM ATP do všech jamek. Inkubace za třepání po dobu 10 minut.
12. Zastavení reakce přidáním 25 µl 500mM EDTA (pH 8,0) do všech jamek.
13. Promytí podle kroku 4.
14. Přidání 100 µl HRP konjugované anti–Ptyr zředěné 1 : 6000 v protilátkovém ředícím pufru do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
- 40 15. Promytí destiček 3 x s TBST a 1 x s PBS.

16. Přidání 100 µl ABST roztoku do každé jamky.
17. Pokud je třeba zastavení reakce přidáním 20 µl 10% SDS do každé jamky.
18. Měření na přístroji Dynatech MR7000 ELISA s testovacím filtrem při 410 nM a referenčním filtrem při 630 nM.

5 FGFR1 biologické testy

Tento test je používán k měření *in vitro* kinázové aktivity FGF1–R při ELISA testu.

Materiály a činidla:

10

15

20

25

30

35

40

1. Elisa destičky Costar o 96 jamkách (Corning Catalog # 3369).
2. Poly(Glu–Tyr) (Sigma Catalog # P0275).
3. PBS (Gibco Catalog # 450–1300EB)
4. 50mM Hepes pufovací roztok.
5. Blokující pufr (5% BSA/PBS).
6. Purifikovaná GST–FGFR1 (SUGEN, Inc.)
7. Kinázový ředicí pufr. Smíchání 500 µl 1M Hepes (GIBCO), 20 µl 5% BSA/PBS, 10 µl 100mM orthovanadičnanu sodného a 50 µl 5M NaCl.
8. 10mM ATP.
9. ATP/MnCl₂ fosforylační směs: smíchání 20 µl ATP, 400 µl 1M MnCl₂ a 9,56 ml dH₂O.
10. NUNC polypropylenové destičky o 96 jamkách s dnem do V (Applied Scientific Catalog # AS–72092).
11. 0,5M EDTA.
12. 0,05% TBST. Přidání 500 µl TWEEN do 1 litru TBS.
13. Králičí polyklonální anti–fosfotyrosinové sérum (SUGEN, Inc.).
14. Kozí proti–králičí IgG peroxidázový konjugát (Biosource, Catalog # ALI0404).
15. ABTS roztok.
16. ABTS/H₂O₂ roztok.

Postup:

1. ELISA destičky Costar o 96 jamkách potažené poly(Glu, Tyr) v 100 µl PBS v množství 1 µg na jamku. Skladování přes noc při teplotě 4 °C.
2. Promytí potažených destiček PBS (1 x).
3. Přidání 150 µl 5% BSA/PBS blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
4. Promytí destiček 2 x s PBS, pak s 50mM Hepes (1 x). Protřepání destiček na papírové pásce k odstranění přebytku tekutiny a bublinek.
5. Přidání 25 µl 0,4mM testované sloučeniny v 4% DMSO nebo samotného 4% DMSO (kontrolní) do destiček.
6. Zředění purifikované GST–FGFR1 v kinázovém ředicím pufru (5 ng kináza/50 µl KDB/jamka).

7. Přidání 50 μ l zředěné kinázy do každé jamky.
8. Nastartování kinázové reakce přidáním 25 μ l/jamka čerstvě připraveného ATP/Mn⁺⁺ (0,4 ml 1M MnCl₂, 40 μ l 10mM ATP, 9,56 ml dH₂O), čerstvě připravený).
9. Toto je rychlá kinázová reakce a musí být zastavena pomocí 25 μ l 0,5M EDTA způsobem, který je podobný přidání ATP.
10. Promytí destiček 4x čerstvým TBST.
11. Vytvoření protilátkového ředícího pufru: na 50 ml: smíchání 5 ml 5% BSA, 250 μ l 5% mléka a 50 μ l 100mM vanadičnanu sodného, doplnění na konečný objem pomocí 0,05% TBST.
12. Přidání 100 μ l na jamku anti-fosfotyrosin (1 : 10000 zředění v ADB). Inkubace za třepání po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
13. Promytí podle kroku 10.
14. Přidání Biosource koziho proti-králíčího IgG peroxidázového konjugátu (1:6000 zředění v ADB) 100 μ l na jamku. Inkubace za třepání po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
15. Promytí podle kroku 10 a pak s PBS k odstranění bublinek a přebytku TWEEN.
16. Přidání 100 μ l ABTS/H₂O₂ roztoku do každé jamky.
17. Inkubace za třepání po dobu 10 až 20 minut.
Odstranění jakýchkoliv bublinek.
18. Měření na přístroji Dynatech MR7000 pro techniku elisa: testovací filter při 410 nM, referenční filter při 630 nM.

EGFR biologické testy

Tento test je používán k měření *in vitro* kinázové aktivity FGF1-R při ELISA testu.

25 Materiály a činidla:

1. ELISA destičky Corning o 96 jamkách.
2. SUMO1 monoklonální protilátka proti-EGFR (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
- 30 4. TBST pufr.
5. Blokující pufr: pro 100 ml, smíchání 5,0 g Carnation Instant Non-fat Milk[®] 100 ml PBS.
6. A431 buněčný lyzát (SUGEN, Inc.).
7. TBS pufr:
- 35 8. TBS + 10% DMSO: pro 1 l, smíchání 1,514 g TRIS, 2,192 g NaCl a 25 ml DMSO; doplnění na 1 litr celkového objemu pomocí dH₂O.
9. ATP (Adenosin-5'-trifosfát, z koňského svalu, Sigma Cat. No. A-5394), 1,0mM roztok v dH₂O. Toto činidlo by mělo být připraveno těsně před použitím a skladování v ledu.
10. 1,0mM MnCl₂.
- 40 11. ATP/MnCl₂ fosforylační směs: k vytvoření 10 ml, smíchání 300 μ l 1mM ATP, 500 μ l MnCl₂ a 9,2 ml dH₂O. Připravení těsně před použitím a skladování v ledu.
12. polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V.

13. EDTA.
14. Králičí polyklonální anti-fosfotyrosinové sérum (SUGEN, Inc.).
15. Kozí proti-králičí IgG peroxidázový konjugát (Biosource Cat. No. ALI0404).
16. ABTS.
- 5 17. 30% peroxid vodíku.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0,2M HCl.

Postup:

- 10 1. ELISA destičky Corning o 96 jamkách potažené 0,5 µg SUMO1 v 100 µl PBS na jamku. Skladování přes noc při teplotě 4 °C.
2. Odstranění nenavázané SUMO1 z jamek invertující destičkou kvůli eliminaci tekutiny. Promytí 1 x dH₂O. Protřepání destičky na papírové roušce k odstranění přebytku tekutiny.
- 15 3. Přidání 150 µl blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
4. Promytí destiček 3 x deionizovanou vodou, pak 1 x TBST. Protřepání destičky na papírové roušce k odstranění přebytku tekutiny a bublinek.
5. Zředění lyzátu v PBS (7 µg lyzát/100 µl PBS).
- 20 6. Přidání 100 µl zředěného lyzátu do každé jamky. Protřepávání při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
7. Promytí destiček podle bodu 4 výše.
8. Přidání 120 µl TBS do ELISA destičky obsahující zachycenou EGFR.
9. Zředění testované sloučeniny 1 : 10 v TBS, zavedení do jamek.
- 25 10. Přidání 13,5 µl zředěné testované sloučeniny do ELISA destičky. Přidání 13,5 µl TBS v 10% DMSO do kontrolních jamek.
11. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
12. Přidání 15 µl fosforylační směsi do všech jamek kromě negativních kontrolních jamek. Konečný objem v jamkách by měl být přibližně 150 µl s 3M ATP/5 mM MnCl₂ konečné koncentrace v každé jamce. Inkubace za třepání po dobu 5 minut.
- 30 13. Zastavení reakce za třepání přidáním 16,5 µl EDTA roztoku. Protřepávání další 1 minutu.
14. Promytí 4x deionizovanou vodou, 2 x s TBST.
15. Přidání 100 µl anti-fosfotyrosinu (1:3000 zředění v TBST) na jamku. Inkubace za třepání po dobu 30 až 45 minut při pokojové teplotě.
- 35 16. Promytí podle bodu 4 výše.
17. Přidání 100 µl Biosource kozího proti-králičího IgG peroxidázového konjugátu (1:2000 zředění v TBST) do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
- 40 18. Promytí podle 4 výše.
19. Přidání 100 µl ABTS/H₂O₂ roztoku do každé jamky.

20. Inkubace 5 až 10 minut za třepání. Odstranění jakýchkoliv bublinek.
21. Pokud je třeba, zastavení reakce přidáním 100 μ l 0,2M HCl na jamku.
22. Měření na přístroji Dynatech MR7000 ELISA: testovací filter při 410 nM, referenční filter při 630 nM.

5 PDGFR biologické testy

Tento test se používá k měření *in vitro* kinázové aktivity FGF1–R při ELISA testu.

Materiály a činidla:

10

1. Elisa destičky Corning o 96 jamkách.
2. 28D4C10 monoklonální proti–PDGFR protilátka (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. TBST pufr.

15

5. Blokující pufr (stejný jako pro EGFR biologické testy).
6. NIH 3T3 buněčný lyzát exprimující PDGFR– β (SUGEN, Inc.).
7. TBS pufr.

20

8. TBS + 10% DMSO.
9. ATP.
10. $MnCl_2$.
11. Kinázová pufrovací směs k fosforylaci: pro 10 ml, smíchání 250 μ l 1M TRIS, 200 μ l 5M NaCl, 100 μ l 1M $MnCl_2$ a 50 μ l 100mM Triton X–100 v dostatečném množství dH_2O k připravení 10 ml.
12. Polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V.

25

13. EDTA.
14. Králičí polyklonální anti–fosfotyrosinové sérum (SUGEN, Inc.).
15. Kozí proti–králičí IgG peroxidázový konjugát (Biosource Cat. No. ALI0404).
16. ABTS.
17. 30% roztok peroxidu vodíku.

30

18. ABTS/ H_2O_2 .
19. 0,2M HCl.

Postup:

35

1. ELISA destičky Corning o 96 jamkách potažené 0,5 μ g 28D4C10 v 100 μ l PBS na jamku. Skladování přes noc při teplotě 4 °C.
2. Odstranění nenavázané 28D4C10 z jamek invertující destičkou kvůli zbavení se tekutiny. Promytí 1 x dH_2O . Protřepání destičky na papírové pásce k odstranění přebytku tekutiny.
3. Přidání 150 μ l blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace po dobu 30 minut při pokojové teplotě za třepání.
4. Promytí destiček 3 x s deionizovanou vodou, pak 1 x TBST. Protřepání destičky na papírové roušce k odstranění přebytku tekutiny a bublinek.

40

5. Zředění lyzátu v HNTG (10 µg lyzát/100 µl HNTG).
6. Přidání 100 µl zředěného lyzátu do každé jamky. Protřepávání při pokojové teplotě po dobu 60 minut.
7. Promytí destičky podle kroku 4.
- 5 8. Přidání 80 µl pracovní směsi kinázového pufru do ELISA destičky obsahujících zachycený PDGFR.
9. Zředění testované sloučeniny 1 : 10 v TBS, v polypropylenových destičkách o 96 jamkách.
- 10 10. Přidání 10 µl zředěné testované sloučeniny do ELISA destičky. Přidání 10 µl TBS + 10% DMSO do kontrolních jamek. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
11. Přidání 10 µl ATP přímo do všech jamek kromě negativních kontrolních jamek (konečný objem v jamce by měl být přibližně 100 µl s 20µM ATP v každé jamce). Inkubace 30 minut za třepání.
- 15 12. Zastavení reakce přidáním 10 µl EDTA roztoku do každé jamky.
13. Promytí 4x deionizovanou vodou, (2x) s TBST.
14. Přidání 100 µl anti-fosfotyrosinu (1:3000 zředění v TBST) na jamku. Inkubace za třepání po dobu 30 až 45 minut při pokojové teplotě.
15. Promytí podle kroku 4.
- 20 16. Přidání 100 µl Biosource koziho proti-králičího IgG peroxidázového konjugátu (1:2000 zředění v TBST) do každé jamky. Inkubace za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě.
17. Promytí podle kroku 4.
18. Přidání 100 µl ABTS/H₂O₂ roztoku do každé jamky.
- 25 19. Inkubace 10 až 30 minut za třepání. Odstranění jakýchkoliv bublinek.
20. Pokud je třeba, zastavení reakce přidáním 100 µl 0,2M HCl na jamku.
21. Měření na přístroji Dynatech MR7000 ELISA s testovacím filtrem při 410 nM a referenčním filtrem při 630 nM.

Testy s buněčnou HER-2 kinázou

30

Tento test je používán k měření aktivity HER-2 kinázy v celých buňkách při ELISA testu.

Materiály a činidla:

35

1. DMEM (GIBCO Catalog #11965-092).
2. Fetální bovinní sérum (FBS, GIBCO Catalog #16000-044), tepelná inaktivace ve vodní lázni po dobu 30 minut při teplotě 56 °C.
3. Trypsin (GIBCO Catalog #25200-056).
4. L-Glutamin (GIBCO Catalog #25030-081).
- 40 5. HEPES (GIBCO Catalog #15630-080).
6. Růstové médium

Smíchání 500 ml DMEM, 55 ml teplem inaktivovaného FBS, 10 ml HEPES a 5,5 ml L-Glutaminu.

7. „Starve“ médium

Smíchání 500 ml DMEM, 2,5 ml teplem inaktivovaného FBS, 10 ml HEPES a 5,5 ml L-Glutaminu.

8. PBS.

9. Mikrotitrační destičky o 96 jamkách s plochým dnem určeným pro tkáňovou kulturu (Corning Catalog # 25860).

10. 15 cm misky na tkáňovou kulturu (Corning Catalog #08757148).

11. ELISA destičky Corning o 96 jamkách.

12. polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V.

13. Přenosné cartridge Costar pro Transtar 96 (Costar Catalog #7610).

14. SUMO 1: monoklonální proti-EGFR protilátka (SUGEN, Inc.).

15. TBST pufr.

16. Blokující pufr: 5% Carnation Instant Milk® v PBS.

17. EGF ligand: EGF-201, Shinko, American, Japan. Suspendovaný prášek v 100 µl 10mM HCl. Přidání 100 µl 10mM NaOH. Přidání 800 µl PBS a převedení do Eppendorfovy baňky. Skladování při teplotě -20 °C do té doby, dokud se nepoužije.

18. HNTG Lyzovací pufr. Pro zásobní roztok 5X HNTG, smíchání 23,83 g Hepes, 43,83 g NaCl, 500 ml glycerolu a 100 ml Triton X-100 a dostatečné množství dH₂O k vytvoření 1 l celkového roztoku.

Pro 1 x HNTG*, smísení 2 ml HNTG, 100 µl 0,1M Na₃VO₄, 250 µl 0,2M Na₄P₂O₇ a 100 l EDTA.

19. EDTA.

20. Na₃VO₄. K vytvoření zásobního roztoku se smíchá 1,84 g Na₃VO₄ s 90 ml dH₂O. Upravení pH na 10. Vaření v mikrovlnce po dobu jedné minuty (roztok se vyčechá). Ochlazení na pokojovou teplotu. Upravení pH na 10. Opakování cyklu zahřívání/chlazení, dokud pH nezůstane na 10.

21. 200mM Na₄P₂O₇.

22. Králíčí polyklonální antisérum specifické pro fosfotyrosin (proti-Ptyr protilátka, SUGEN, Inc.).

23. Afinitně purifikované antisérum, kozí proti-králíčí IgG protilátka, peroxidázový konjugát (Biosource Cat # ALI0404).

24. ABTS roztok.

25. 30% roztok peroxidu vodíku.

26. ABTS/H₂O₂.

27. 0,2M HCl.

Postup:

1. Corning ELISA destičky o 96 jamkách potažené SUM01 v koncentraci 1,0 µl na jamku v PBS, 100 µl finálního objemu na jamku. .Skladování přes noc při teplotě 4 °C.

2. V den použití se odstraní potahovací pufr a destičky se promyjí 3 x dH₂O a jednou TBST pufrem. Pokud není stanoveno jinak, mělo by být promývání provedeno tímto způsobem.
3. Přidání 100 µl blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace destiček za třepání po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Těsně před použitím pomytí destiček.
4. Použití EGF^r/HER-2 chimeia/3T3-C7 buněčných linií při tomto testu.
5. Vybrané misky mající 80 až 90% konfluenci. Sbíráni buněk trypsinizací a centrifugací při 1000 rpm za pokojové teploty po dobu 5 minut.
6. Resuspendování buněk v „starve“ médiu a měření s trypanovou modří. Je vyžadována životnost vyšší než 90 %. Naočkování buněk ve smrtícím médiu při hustotě 2500 buněk na jamku, 90 µl na jamku, v mikrotitrační destičce o 96 jamkách. Inkubace naočkovaných buněk přes noc při teplotě 37 °C pod 5% CO₂.
7. Start s testem po dvou dnech od naočkování.
8. Testované sloučeniny se rozpustí v 4% DMSO. Vzorky jsou pak dále zředěny přímo na destičkách „starve“ médiem DMEM. Typicky bude toto zředění 1:10 nebo větší. Všechny jamky jsou pak převedeny do buněčných destiček v dalším zředění 1:10 (10 µl vzorku a média do 90 µl „starve“ média. Finální koncentrace DMSO by měla být 1% nebo nižší. Může být také používáno standardní sériové zředění.
9. Inkubace pod 5% CO₂ při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin.
10. Přípravení EGF ligand zředěním zásobního roztoku EGF (16,5 µM) v horkém DMEM na 150nM.
11. Přípravení čerstvého HNTG* v dostatečném množství pro 100 µl na jamku; skladování na ledu.
12. Po 2 hodinách inkubace s testovanou sloučeninou se přidá připravený EGF ligand do buněk, 50 µl na jamku, na konečnou koncentraci 50nM. Pozitivní kontrolní jamky obdrží stejné množství EGF. Do negativních kontrolních jamek se nepřidá EGF. Inkubace při teplotě 37 °C po dobu 10 minut.
13. Odstranění testované sloučeniny, EGF a DMEM. Promytí buněk 1 x PBS.
14. Převedení HNTG* do buněk, 100 µl na jamku. Umístění do ledu na dobu 5 minut a mezitím odstranění blokujícího pufru z ELISA destiček a promytí.
15. Seškrabání buněk z destičky mikropipetou a homogenizace buněčného materiálu opakovaným nasáváním a disperzací HNTG* lyzovacího pufru. Převedení lyzátu do potažené, blokové, promyté ELISA destičky. Nebo k převedení lyzátu do destičky použití převáděcího cartridge Costar.
16. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
17. Odstranění lyzátu, promytí, převedení čerstvě zředěné anti-Ptyr protilátky (1 : 3000 v TBST) do ELISA destiček, 100 µl na jamku.
18. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě, po dobu 30 minut.
19. Odstranění anti-Ptyr protilátky, promytí, převedení čerstvě zředěné BIOSOURCE protilátky do ELISA destičky (1 : 8000 v TBST, 100 µl na jamku).
20. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
21. Odstranění BIOSOURCE protilátky, promytí, převedení čerstvě připraveného ABTS/-H₂O₂ roztoku do ELISA destičky, 100 µl na jamku.
22. Inkubace, za třepání, po dobu 5 až 10 minut, odstranění jakýchkoliv bublinek.

23. Zastavení reakce přidáním 100 µl 0,2M HCl na jamku.

24. Měření na přístroji Dynatech MR7000 ELISA s testovacím filtrem nastaveným na 410 nM a referenčním filtrem na 630 nM.

Testy cdk2/cyklin A

5

Tento test je používán k měření *in vitro* aktivity serin/threoninkinázy lidské cdk2/cyklin A při „Scintillation Proximity Assay“ (SPA).

Materiály a činidla:

10

1. Polyethylenové tereftalátové (flexi) destičky Wallac o 96 jamkách (Wallac Catalog # 1450-401).
2. Amersham Redivue [$\gamma^{33}\text{P}$] ATP (Amersham catalog #AH 9968).
3. Polyvinyltoluenové SPA kuličky potažené Amersham streptavidinem (Amersham catalog #RPNQ0007), kuličky by měly být reaktivovány v PBS bez hořčiku nebo vápníku při 20 mg/ml.
4. aktivovaný cdk2/cyclin A enzymový komplex purifikovaný od Sf9 buněk (SUGEN, Inc.).
5. Biotinylovaný peptidový substrát (Debtide). Peptid biotin-X-PKTPKKAKKL se rozpustí v dH_2O při koncentraci 5 mg/ml.
6. Peptid/ATP směs: pro 10 ml, smíchání 9,979 ml dH_2O , 0,00125 ml „studeného“ ATP, 0,010 ml Debtide a 0,010 ml $\gamma^{33}\text{P}$ ATP. Mezní koncentrace na jamku bude 0,5M „studeného“ ATP, 0,1 pg Debtide a 0,2 pCi $\gamma^{33}\text{P}$ ATP.
7. Kinázový pufr: pro 10 ml, smíchání 8,85 ml dH_2O , 0,625 ml TRIS (pH 7,4), 0,25 ml 1M MgCl_2 , 0,25 ml 10% NP40 a 0,025 ml 1M DTT. Přidání čerstvého množství těsně před použitím.
8. 10mM ATP v dH_2O .
9. 1M Tris, upravení pH na 7,4 s HCl.
10. 1M MgCl_2 .
11. 1M DTT.
12. PBS (Gibco Catalog # 14190-144).
13. 0,5M EDTA.
14. Zastavovací roztok: pro 10 ml, smíchání 9,25 ml PBS, 0,005 ml 100mM ATP, 0,1 ml 0,5M EDTA, 0,1 ml 10% Triton X 100 a 1,25 ml 20 mg/ml SPA kuliček.

Postup:

35

1. Přípravení roztoků testovaných sloučenin v 5 x požadovaných konečných koncentrací v 5% DMSO. Přidání 10 µl do každé jamky. Pro negativní kontroly použití samotného 10 µl 5% DMSO v jamkách.
2. Zředění 5 µl roztoku cdk2/cyclin A s 2,1 ml 2 x kinázovým pufrem.
3. Přidání 20 µl enzymu do každé jamky.
4. Přidání 10 µl 0,5M EDTA do negativních kontrolních jamek.
5. K nastartování kinázové reakce se přidá 20 µl směsi peptid/ATP do každé jamky. Inkubace po dobu 1 hodiny bez třepání.

40

6. Přidání 200 µl zastavovacího roztoku do každé jamky.
7. Ponechání v klidu po dobu alespoň 10 minut.
8. Centrifugace destiček přibližně při 2300 rpm po dobu 3 až 5 minut.
9. Měření pomocí Triluxu nebo podobného přístroje.

5 Test transfosforylace MET

Tento test se používá k měření hladin fosfotyrosinu na poly(glutamová kyselina:tyrosin (4:1)) substrátu jako způsobu identifikace agonistů/antagonistů met transfosforylace substrátu.

10 Materiály a činidla:

1. Corning Elisa destičky o 96 jamkách, Corning Catalog # 25805-96.
2. Poly(glu, tyr) 4 : 1, Sigma, Cat. No.; P 0275.
3. PBS, Gibco Catalog # 450-1300EB
- 15 4. 50mM HEPES.
5. Blokující pufr: rozpuštění 25 g bovinního sérumalbuminu, Sigma Cat. No. A-7888, v 500 ml PBS, filtrování přes 4 µl filtr.
6. Purifikovaný GST fúzního proteinu obsahujícího Met kinázovou doménu, Sugen, Inc.
7. TBST pufr.
- 20 8. 10% vodný (MilliQue H₂O) DMSO.
9. 10mM vodný (dH₂O) adenosin-5'-trifosfát, Sigma Cat. No. A-5394.
10. 2 x kinázový ředící pufr: pro 100 ml, smíchání 10 ml 1M HEPES při pH 7,5 s 0,4 ml 5% BSA/PBS, 0,2 ml 0,1M orthovanadičnanu sodného a 1 ml 5M chloridu sodného v 88,4 ml dH₂O.
- 25 11. 4 X ATP reakční směs: pro 10 ml, smíchání 0,4 ml 1M chloridu manganatého a 0,02 ml 0,1M ATP v 9,56 ml dH₂O.
12. 4 X negativní kontrolní směs: pro 10 ml, smíchání 0,4 ml 1M chloridu manganatého v 9,6 ml dH₂O.
- 30 13. Polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V, Applied Scientific Catalog # S-72092.
14. 500mM EDTA.
15. Protilátkový ředící pufr: pro 100 ml, smíchání 10 ml 5% BSA/PBS, 0,5 ml 5% Carnation Instant Milk® a 0,1 ml 0,1M orthovanadičnanu sodného v 88,4 ml TBST.
16. Králičí polyklonální antofosfotyrosinová protilátka, Sugen, Inc.
- 35 17. Kozí proti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Biosource, Inc.
18. ABTS roztok: pro 1 l, smíchání 19,21 g kyseliny citronové, 35,49 g Na₂HPO₄ a 500 mg ABTS s dostatečným množstvím dH₂O k vytvoření 1 l.
19. ABTS/H₂O₂: smíchání 15 ml ABST roztoku s 2 µl H₂O₂ pět minut před použitím.
20. 0,2M HCl.

Postup:

1. ELISA destičky potažené 2 µg Poly(Glu-Tyr) v 100 µl PBS. Skladování přes noc při teplotě 4 °C.
- 5 2. Blokování destiček se 150 µl 5% BSA/PBS po dobu 60 minut.
3. Promytí destiček (2x) s PBS, 1 x s 50 mM Hepes pufrém pH 7,4.
4. Přidání 50 µl zředěné kinázy do všech jamek. (Purifikovaná kináza se zředí s kinázovým ředicím pufrém. Finální koncentrace by měla být 10 ng/jamku.
- 10 5. Přidání 25 µl testované sloučeniny (v 4% DMSO) nebo samotného DMSO (4% v dH₂O) pro kontrolu destiček.
6. Inkubace kinázy/sloučeniny směsi po dobu 15 minut.
7. Přidání 25 µl 40mM MnCl₂ do negativních kontrolních jamek.
8. Přidání 25 µl ATP/MnCl₂ směsi do všech dalších jamek (kromě negativní kontroly). Inkubace po dobu 5 minut.
- 15 9. Přidání 25 µl 500mM EDTA k zastavení reakce.
10. Promytí destiček 3 x TBST.
11. Přidání 100 µl králičí polyklonální anti-Ptyr zředěné 1 : 10000 v protilátkovém ředicím pufru do každé jamky. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny.
12. Promytí destiček 3 x TBST.
- 20 13. Zředění Biosource HRP konjugované anti-králičí protilátky 1:6000 v protilátkovém ředicím pufru. Přidání 100 µl na jamku a inkubace při pokojové teplotě, za třepání, po dobu jedné hodiny.
14. Promytí destiček 1 x s PBS.
15. Přidání 100 µl ABTS/H₂O₂ roztoku do každé jamky.
- 25 16. Pokud je třeba, zastavení reakce přidáním 100 µl 0,2M HCl na jamku.
17. Měření destiček na přístroji Dynatech MR7000 s testovacím filtrem při 410 nM a referenčním filtrem při 630 nM.

IGF-1 transfosforylační test

- 30 Tento test se používá k měření hladiny fosfotyrosinu v poly(glutamové kyselině : tyrosinu) (4:1) kvůli identifikaci agonistů a/nebo antagonistů gst-IGF-1 transfosforylace substrátu.

Materiály a činidla:

- 35 1. Corning Elisa destičky o 96 jamkách.
2. Poly(Glu-tyr) (4:1), Sigma Cat. No. P 0275.
3. PBS, Gibco Catalog # 450-1300EB.
4. 50mM HEPES
- 40 5. TBB blokující pufr: pro 1 l, smíchání 100 g BSA, 12,1 g TRIS (pH 7,5), 58,44g chloridu sodného a 10 ml 1% TWEEN-20.
6. Purifikovaný GST fúzní protein obsahující IGF-1 kinázovou doménu (Sugen, Inc.)
7. TBST pufr: pro 1 l, smíchání 6,057 g Tris, 8,766 g chloridu sodného a 0,5 ml TWEEN-20 s dostatečným množstvím dH₂O k vytvoření 1 litru.

8. 4% DMSO v Milli-Q H₂O.
 9. 10mM ATP v dH₂O.
 10. 2 X kinázový ředicí pufr: pro 100 ml, smíchání 10 ml 1M HEPES (pH 7,5), 0,4 ml 5% BSA v dH₂O, 0,2 ml 0,1M orthovanadičnanu sodného a 1 ml 5M chloridu sodného s dostatečným množstvím dH₂O k vytvoření 100 ml.
 11. 4 X ATP reakční směs: pro 10 ml, smíchání 0,4 ml 1M MnCl₂ a 0,008 ml 0,01M ATP a 9,56 ml dH₂O.
 12. 4 X negativní kontrolní směs: smíchání 0,4 ml 1M chloridu manganatého v 9,60 ml dH₂O.
 13. Polypropylenové destičky NUNC o 96 jamkách s dnem do V.
 14. 500mM EDTA v dH₂O.
 15. Protilátkový ředicí pufr: pro 100 ml, smíchání 10 ml 5% BSA v PBS, 0,5 ml 5% Carnation Instant Non-fat Milk v PBS a 0,1 ml 0,1M orthovanadičnanu sodného v 88,4 ml TBST.
 16. Králičí polyklonální antifosfotyrosinová protilátka, Sugen, Inc.
 17. Kozí proti-králičí HRP konjugovaná protilátka, Biosource.
 18. ABTS roztok.
 20. ABTS/H₂O₂: smíchání 15 ml ABTS s 2 µl H₂O₂ 5 minut před použitím.
 21. 0,2M HCl v dH₂O.
- 20 Postup:
1. ELISA destičky potažené 2,0 µg/jamku Poly(Glu, Tyr) 4:1 (Sigma P0275) v 100 µl PBS. Skladování destičky přes noc při teplotě 4 °C.
 2. Promytí destičky 1 x s PBS.
 - 25 3. Přidání 100 µl TBB blokujícího pufru do každé jamky. Inkubace destičky po dobu 1 hodiny za třepání při pokojové teplotě.
 4. Promytí destiček 1 x PBS, pak (2 x) s 50mM Hepes pufr pH 7,5.
 5. Přidání 25 µl testované sloučeniny v 4% DMSO (připravené zředěním zásobního roztoku 10mM testované sloučeniny v 100% DMSO s dH₂O) do destičky.
 - 30 6. Přidání 10,0 ng gst-IGF-1 kinázy v 50 µl kinázovém ředicím pufru do všech jamek.
 7. Nastartování kinázové reakce přidáním 25 µl 4 X ATP reakční směsi do všech jamek k testování a k pozitivní kontrole. Přidání 25 µl 4 X negativní kontrolní směsi do všech jamek k negativní kontrole. Inkubace po dobu 10 minut za třepání při pokojové teplotě.
 8. Přidání 25 µl 0,5M EDTA (pH 8,0) do všech jamek.
 - 35 9. Promytí destiček 4 x s TBST pufrem.
 10. Přidání králičího polyklonálního anti-fosfotyrosinového antiséra v zředění 1 : 10000 v 100 µl protilátkovém ředicím pufru do všech jamek. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.
 11. Promytí destiček podle kroku 9.
 - 40 12. Přidání 100 µl Biosource proti-králičí HRP v zředění 1 : 10000 v protilátkovém ředicím pufru do všech jamek. Inkubace, za třepání, při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.

13. Promytí destiček podle kroku 9, následně jedno promytí v PBS ke snížení bublinek a přebytku Tween-20.
14. Vyvolání přidáním 100 µl na jamku ABTS/H₂O₂ do každé jamky.
15. Po asi 5 minutách měření na přístroji k měření ELISA destiček s testovacím filtrem při 410 nm a referenčním filtrem při 630 nm.

Testy inkorporace BrdU

Při následujících testech se využívá buněk upravených k expresi vybraného receptoru a následně stanovení účinku vybrané sloučeniny na aktivitu DNA syntézy indukované ligandem stanovením inkorporace BrdU do DNA.

Následující materiály, činidla a postup jsou obecným způsobem při každém následujícím testu inkorporace BrdU.

Změny ve specifických testech jsou uvedeny.

Materiály a činidla:

1. Příslušný ligand.
2. Příslušné upravené buňky.
3. BrdU značící činidlo: 10mM, v PBS (pH 7,4) (Boehringer Mannheim, Germany).
4. FixDenat: fixační roztok (hotový k použití) (Boehringer Mannheim, Germany).
5. Anti-BrdU-POD: myší monoklonální protilátka konjugovaná s peroxidázou (Boehringer Mannheim, Germany).
6. TMB substrátový roztok: tetramethylbenzidin (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).
7. PBS promývací roztok: 1 x PBS, pH 7,4.
8. Albumin, hovězí (BSA), frakce V prášková (Sigma Chemical Co., USA).

Obecný postup:

1. Buňky se naočkují v množství 8000 buněk na jamku v 10% CS, 2mM Gln v DMEM na destičku o 96 jamkách. Buňky se inkubují přes noc při teplotě 37 °C v 5% CO₂.
2. Po 24 hodinách se buňky promyjí s PBS a pak jsou vystaveny prostředí bez séra zavedením do média neobsahujícího sérum (0% CS DMEM s 0,1% BSA) po dobu 24 hodin.
3. Třetí den se příslušný ligand a testovaná sloučenina najednou přidají do buněk. Do negativních kontrolních jamek se přidá DMEM bez séra pouze s 0,1% BSA; K pozitivním kontrolním buňkám se přidá ligand bez testované sloučeniny. Testované sloučeniny se připraví v DMEM bez séra s ligandem v destičce o 96 jamkách a sériově zředí na 7 testovacích koncentracích.
4. Po 18 hodinách aktivace ligandu se zředěné BrdU značící činidlo (1:100 v DMEM, 0,1% BSA) a buňky inkubují s BrdU (finální koncentrace = 10 µM) po dobu 1,5 hodiny.
5. Po inkubaci se značícím činidlem se médium odstraní dekantací a poklepáním převrácené destičky na papírové utěrce. Přidá se roztok FixDenatu (50 µl na jamku) a destičky se inkubují při pokojové teplotě po dobu 45 minut na destičkovém třepači.

6. Roztok FixDenatu se řádně odstraní dekantací a poklepáním převrácené destičky na papírové utěrce. Přidá se mléko (5% dehydrované mléko v PBS, 200 µl na jamku) jako blokovací roztok a destička se inkubuje po dobu 30 minut při pokojové teplotě na destičkovém třepači.
- 5 7. Blokovací roztok se odstraní dekantací a jamky se promyjí 1 x s PBS. Přidá se anti-BrdU-POD roztok (1 : 200 zředění v PBS, 1% BSA) (50 µl na jamku) a destičky se inkubují po dobu 90 minut při pokojové teplotě na destičkovém třepači.
- 10 8. Protilátkový konjugát se řádně odstraní dekantací a promýváním jamek 5 x s PBS a destička se suší invertováním a poklepáním na papírové utěrce.
- 15 9. Přidá se TMB substrátový roztok (100 µl na jamku) a inkubuje se po dobu 20 minut při pokojové teplotě na destičkovém třepači, dokud se nevyvine zbarvení, které je dostatečné k fotometrické detekci.
10. Absorbance vzorků se měří při 410 nm (v módu „duální vlnové délky“ s filtrem při 490 nm jako referenční vlnovou délkou) na přístroji Dynatech k měření ELISA destiček.

Testy inkorporace BrdU indukované EGF

Materiály a činidla:

1. Myši EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japonsko).
2. 3T3/EGFRc7.

Testy inkorporace BrdU řízené Her-2 a indukované EGF

Materiály a činidla:

1. Myši EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japonsko).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr s Her-2 kinázovou doménou).

Testy inkorporace BrdU řízené Her-4 a indukované EGF

Materiály a činidla:

1. Myši EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japonsko).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr s Her-4 kinázovou doménou).

Testy inkorporace BrdU indukované PDGF

Materiály a činidla:

1. Lidské PDGF B/B (Boehringer Mannheim, Německo)-
2. 3T3/EGFRc7.

Testy inkorporace BrdU indukované FGF

Materiály a činidla:

1. Lidská FGF2/bFGF (Gibco BRL, USA)-
2. 3T3c7/EGFr

Testy inkorporace BrdU indukované IGF1

Materiály a činidla:

- 5 1. Lidská rekombinantní (G511, Promega Corp., USA)
2. 3T3/IGF1r.

Testy inkorporace BrdU indukované inzulinem

10 Materiály a činidla:

1. Inzulin, krystalický, bovinní, zinek (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

15 Testy inkorporace BrdU indukované HGF

Materiály a činidla:

1. Rekombinantní lidská HGF (Cat. No. 249-HF, R & D Systems, Inc. USA).
- 20 2. BxPC-3 buňky (ATCC CRL-1687).

Postup:

- 25 1. Buňky se naočkují v množství 9000 buněk na jamku v RPMI 10% FBS na destičku o 96 jamkách. Buňky se inkubují přes noc při teplotě 37 °C v 5% CO₂.
2. Po 24 hodinách se buňky promyjí s PBS a následně jsou podrobeny bezsérovému prostředí ve 100 µl média bez séra (RPMI s 0,1% BSA) po dobu 24 hodin.
- 30 3. Třetí den se k buňkám přidá 25 µl obsahujících ligand (připravený v koncentraci 1 µ/ml v RPMI s 0,1% BSA; finální koncentrace HGF je 200 ng/ml) a testované sloučeniny. Do negativních kontrolních jamek se přidá 25 µl RPMI pouze s 0,1% BSA bez séra; k pozitivním kontrolním buňkám se přidá ligand (HGF), ale bez testované sloučeniny. Testované sloučeniny se připraví v 5 svých finálních koncentracích v RPMI s ligandem bez séra v destičce o 96 jamkách a sériově zředí na 7 testovacích koncentracích. Typicky je nejvyšší finální koncentrace testované sloučeniny 100 µM a jsou používána 1 : 3 zředění (tzn. rozmezí finální koncentrace testované sloučeniny je 0,137–100µM).
- 35 4. Po 18 hodinách aktivace ligandu se do každé jamky přidá 12,5 µl zředěného BrdU značícího činidla (1 : 100 v RPMI, 0,1% BSA) a buňky jsou inkubovány s BrdU (finální koncentrací je 10µM) po dobu 1 hodiny.
5. Stejně jako v obecném postupu.
- 40 6. Stejně jako v obecném postupu.
7. Blokovací roztok se odstraní dekantací a jamky se promyjí jednou s PBS. Přidá se anti-BrdU-POD (1 : 100 zředění v PBS, 1% BSA) (100 µl na jamku) a destička se inkubuje po dobu 90 minut při pokojové teplotě na destičkovém třepači.
8. Stejně jako v obecném postupu.
- 45 9. Stejně jako v obecném postupu.
10. Stejně jako v obecném postupu.

Testy s HUV-EC-C

Tento test se používá k měření aktivity sloučenin proti PDGF-R, FGF-R, VEGF a FGF nebo Flk-1/KDR, přičemž všechny jsou přirozeně exprimovány buňkami HUV-EC. Den 0

5

1. Promytí a trypsinizace HUV-EC-C buněk (lidské endotheliální buňky žíly pupečníkové (American Type Culture Collection catalogue no. 1730 CRL)) Promytí fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem Dulbecco (D-PBS, zakoupený u Gibco BRL, catalogue no. 14190-029) dvakrát při asi 1 ml na 10 cm² buňky s tkáňovou kulturou. Trypsinizace s 0,05% trypsin-EDTA v neenzymatickém buněčném disociačním roztoku (Sigma Chemical Company, catalogue no. C-1544). 0,05% Trypsin se připraví zředěním 0,25% trypsinu na 1mM EDTA (Gibco, catalogue no. 25200-049) v buněčném disociačním roztoku. Trypsinizace s asi 1 ml na 25 až 30 cm² buňky s tkáňovou kulturou po dobu asi 5 minut při teplotě 37 °C. Po uvolnění buněk z baňky se přidá ekvivalentní objem testovacího média a převede se do 50ml sterilní centrifugační zkumavky (Fisher Scientific, catalogue no. 05-539-6).

15

2. Promytí buněk s asi 35 ml testovacího média v 50ml sterilní centrifugační zkumavku přidáním testovacího média, centrifugace po dobu 10 minut při přibližně 200 x g, aspirace supernatantu a resuspendace s 35 ml D-PBS. Opakuje se promytí (2x) s D-PBS, resuspendace buněk v asi 1 ml testovacího média na 15 cm² baňky s tkáňovou kulturou. Testovací médium se sestává z F12K média (Gibco BRL, catalogue no. 21127-014) a 0,5 % záhřevem inaktivovaného fetálního bovinního séra. Počítání buněk pomocí Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) a přidání testovacího média do buněk za vzniku koncentrace 0,8 až 1,0 x 10⁵ buněk na ml.

20

3. Přidání buněk do destiček s plochým dnem o 96 jamkách při koncentraci 100 µl na jamku nebo 0,8 až 1,0 x 10⁴ buněk na jamku, inkubace přibližně 24 hodiny při teplotě 37 °C, 5% CO₂.

25

Den 1

1. Přípravení dvojnásobných titrací testované sloučeniny v separovaných destičkách o 96 jamkách, obecně 50µM až do 0µM. Použití stejného testovacího média, jak je uvedeno v dni 0, krok 2 výše. Titrace se provedou přidáním 90 µl na jamku testované sloučeniny při koncentraci 200µM (4 X finální koncentrace v jamce) na vrch jamky příslušného sloupce destičky. Poněvadž zásobní testovací sloučenina je obvykle 20mM v DMSO, obsahuje 200µM koncentrace léčiva 2% DMSO.

35

Jako ředicí roztok pro titrace testované sloučeniny za účelem zředění testované sloučeniny, a zároveň udržení konstantní koncentrace DMSO, se používá zředění až 2 % DMSO v testovacím médiu (F12K + 0,5 % fetálního bovinního séra). Přidání tohoto ředicího roztoku do zbývajících jamek ve sloupci při koncentraci 60 µl na jamku. Odebrání 60 µl ze 120 µl 200µM zředění testované sloučeniny v nejvyšší jamce sloupce a smíchání s 60 µl v druhé jamce sloupce. Odebrání 60 µl z této jamky a smíchání s 60 µl ve třetí jamce sloupce a tak dále, dokud nejsou kompletní dvojnásobné titrace. Když je předposlední jamka smíchána, odebere se 60 µl ze 120 µl v této jamce a odstraní se. V poslední jamce se nechá 60 µl ředicího roztoku DMSO a média jako kontrola obsahující netestovanou sloučeninu. Přípravení 9 sloupců titrované testované sloučeniny v dostatečné množství pro ztrojnásobení jamek, kde každá obsahuje: (1) VEGF (zakoupení u Pero Tech Inc, catalogue no- 100-200, (2) růstový faktor endotheliálních buněk (ECGF) (také známý jako kyselý fibroblastový růstový faktor nebo aFGF) (zakoupený u Boehringer Mannheim Biochemica, catalogue no. 1439 600) nebo (3) lidská PDGF B/B (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany) a kontrolu testovacího média. ECGF se připraví se sodnou solí heparinu.

45

50

2. Převedení 50 µl na jamku zředění testované sloučeniny do testovacích destiček o 96 jamkách obsahujících 0,8 až 1,0 x 10⁴ buněk v 100 µl na jamku HUV-EC-C buněk ze dne 0 a inkubace přibližně 2 hodiny při teplotě 37 °C, 5% CO₂.

3. Provedeno třikrát, přidání 50 μ l na jamku 80 μ l na ml VEGF, 20 ng na ml ECGF nebo kontrolního média ke každé testované sloučenině. Jako u testovaných sloučenin jsou koncentrace růstového faktoru 4 X požadované finální koncentrace. Použití testovacího média ze dne 0, kroku 2, k přípravě koncentrací růstových faktorů. Inkubace přibližně 24 hodin při teplotě 37 °C, 5% CO₂. Každá jamka bude obsahovat 50 μ l zředění testované sloučeniny, 50 μ l růstového faktoru nebo média a 100 μ l buněk, které jsou v celkovém množství 200 μ l na jamku. Tudiž 4X koncentrace testované sloučeniny a růstových faktorů se zředí na 1 X a přidají se do jamek.

Den 2

1. Přidá se ³H-thymidin (Amersham, catalogue no. TRK-686) při 1 μ Ci na jamku (10 μ l na jamku 100 μ Ci na ml roztoku připraveného v RPMI médiu + 10% zářevem inaktivované fetální bovinní sérum) a inkubace přibližně 24 hodin při teplotě 37 °C, 5% CO₂. RPMI se zakoupí u Gibco BRL, catalogue no. 11875-051.

Den 3

1. Vymrazení destiček přes noc při teplotě -20 °C.

Den 4

Rozmrazení destiček a jejich odběr pomocí harvesteru na 96 jamkové destičky (Tomtec Harvester[®]) na filtrační plachetky (Wallac, catalogue no. 1205-401), měření na tekutém scintilačním počítači Wallac Betaplate[™].

V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky biologického testování některých exemplárních sloučenin podle předloženého vynálezu. Výsledky jsou vyjádřeny v hodnotách IC₅₀, mikromolární (μ M) koncentrace testované sloučeniny, jenž způsobuje 50% změnu aktivity cílových PKT v porovnání s aktivitou PTK kontrolní skupiny, které nebyla podávána testovaná sloučenina. Přesněji uvedené výsledky indikují koncentraci testované sloučeniny potřebné k 50% redukci aktivity cílové PTK. Biologické testy, které byly nebo mohou být používány ke stanovení sloučenin, jsou popsány detailněji níže.

Tabulka 3

Příklad	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	buněk EGF IC50 (μ M)	Her2 kináza IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
1	57,68	15,16	>100	>100	>100			>100
2	>100		>100	>100	>100			
3	9,85	9,62	>100	>100	>100			>100
4	3,57	>20	>100	>100	>100	>100		
5	8,3	16,06	>100	>100	>100	>100		
6	4,04		>100	3,26	7,82	2,43		
7	7,74		>100	5,07	9,8	4,24		
8	12,1		>100	51,34	20,08	5,5		
9	0,96		>100	>100	>100	16,38		
10	5,72		>100	94,04	15,86	8,06		

Příklad	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	buňky EGF IC50 (μ M)	Her2 kináza IC50 (μ M)	cdk2apa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
11	9,77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21,46	>100		27,73		
13	>20		81,92	8,17		2,66		
14	13,01		42,41	>100		66,02		
15	>20		>100	>100		98,61		
16	>20		98,06	>100		23,32		
17	8,25	2,47	94,35	0,83	11,47	15,94	>10	
18	2,67			2,57	9,23	4,99		
19	7,5			6,86	34,18	8,37		
20	11,53			>100	41,16	8		
21	7,18		>100	40,34		27,69		
22	>20		>100	>100		87,67		
23	>20		>100	36,64		4,05		
24			>100	16,84		5,31		
25	12,55		>100	23,48		7,9		
26	16,03		66,87	34,67		10,04		
27			>100	26,5		3,91		
28	4,5		71,27	53,66		2,67		
29	10,12		>100	26,72		3,98		
30	9,4		>100	18,69		4,1		
31	>50		>100	9,83		47,19		
32	45,74		5,94	>100		>100		
34	>50		>100	>100		>100		
35	>20		>100	80,4		54,14		
36	>20		>100	>100		>100		
37	0,22		3,06	10,78	9,84	1,4		
38	4,17		3,06	6,04	8,97	2,16		
39	3,38		4,69	3,67	14,54	3,53		
40	4,5		7,9	6,52		6,27		
42	0,1		0,12	11,95	74,55	20,43		
43	1,12		8,38	>100	37,33	53,37		
44	<0,05		0,02	20,73	67,46	6,99		
45	1,71		>100	>100	29,95	>100		
46	30,62		6,18	>100	>100	>100		
47	0,08	1,56	0,06	11,42	41,54	8,4	>20	1,05
48	0,006	0,3	<0,78	17,88	21,58	7,93		0,09
49			<0,78	>100	43,86	>100		
50			<0,78	>100	20,34	>100		

Příklad	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	buňky EGF IC50 (μ M)	Her2 kináza IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
51	0,006	1,66	0,01	18,1	21,61	23,24	16,69	0,35
52	0,08	1,26	<0,78	12,53	>100	>100	10,66	0,45
53			<0,78	>100	>100	>100		
54	1,98		<0,78	23,88	9,76	7,02		
55	0,27		0,53	6,03	35,99	77,82		
56	2,32		3,19	>100	10,03	7,11		
57	0,06		7,98	>100	9,97	6,94		
58			21,14	>100	>100	>100		
59			<0,78	>100	>100	>100		
60			<0,78	>100	>100	>100		
61			<0,78	>100	>100	>100		
62	8,00		8,32	>100	>100	>100		
63	0,21		<0,78	8,59	>100	>100		
64	0,55		<0,78	30,49	>100	>100		
65	0,37		<0,05	>100	74,36	15,97		
66	<0,05			>100	11,84	2,76		
67	0,39		24,77	31,38	19,79	2,56		
68	1,16		0,03	>100	23,52	34,13		
69	0,3		56,55	>100	97,54	>100		
70	0,09	1,50	0,0030	10,57	6,42	7,99	12,62	0,63
71	15,21		22,5	>100		9,91		
72	6,06		10,54	>100	39,94	9,65		
73	5,95		14,12	>100	39,5	8,59		
74	1,2		0,09	46,75		>100		
75	2,7		61,55	>100		>100		
76	3,33		19,18	5,11		3,01		
77	0,49		25,01	>100		>100		
78	1,94		70,62	9,33		4,25		
79	1,49		>100	27,39		>100		
80	0,13	4,29	0,001	>100		50,19	17,19	0,28
81	0,21		0,18	>100		>100		
82	2,03	7,69	6,88	>100		>100		0,31
83	0,34	0,41	9,46	2,18		86,9		0,008
84	1,38		12,51	67,2		5,86		0,006
85	0,2	0,8	2,59	>100		3,76		
86	1,45	1,3	19,6	41,8		>100		3,58
87	3,27	7,56	6,46	>100		9,1		0,17
88	0,35	1,18	8,06	2,36		>100		0,09

Příklad	bio flkGST IC50 (μ M)	bio FGFR1 IC50 (μ M)	bio PDGF IC50 (μ M)	bio EGF IC50 (μ M)	buňky EGF IC50 (μ M)	Her2 kináza IC50 (μ M)	cdk2spa C50 (μ M)	bio pyk2 IC50 (μ M)
89	7,84		47,58	8,53	9,67	15,97		
115	7,3		7,48	>100		>100	0,006	
116.	>20		>100	>100		>100	<0,0005	
117	0,91		12,9	>100		>100	0,006	
118	1,93		1,2	>100		>100	0,002	
119	1,38		61,63	>100		>100	<0,0005	

In vivo zvířecí modely

5 Zvířecí modely xenoimplantátu

Schopnost lidských nádorů růst jako xenoimplantáty v athymické myši (např. Balb/c, nu/nu) poskytuje užitečný *in vivo* model pro studium biologických odpovědí na terapii lidských nádorů. Od první úspěšné xenotransplantace lidských nádorů do athymické myši, (Ryggard and Povlsen, 10 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77: 758–760), bylo transplantováno mnoho různých buněčných linií lidského nádoru (např. mamární, plicní, genotourinární, gastrointestinální, hlavy a krku, glioblastom, kostní a maligní melanomy) a úspěšně rostly u nahých myší. Následující testy mohou být používány ke stanovení hladiny aktivity, specifity a účinku různých sloučenin podle předloženého vynálezu. Ke stanovení sloučenin jsou použitelné tři obecné typy testů: 15 buněčné/katalytické, buněčné/biologické a *in vivo*. Smyslem buněčných/katalytických testů je stanovit vliv sloučeniny na schopnost TK k fosforylaci tyrosinových zbytků na známém substrátu v buňce. Smyslem buněčných/biologických testů je stanovit vliv sloučeniny na biologickou odpověď stimulované TK v buňce. Smyslem *in vivo* testů je stanovit účinek sloučeniny ve zvířecím modelu na příslušnou poruchu, např. rakovinu.

20 Vhodné buněčné linie pro subkutánní xenoimplantátové experimenty zahrnují C6 buňky (gliom, ATCC # CCL 107), A375 buňky (melanom, ATCC # CRL 1619), A431 buňky (epidermoidní karcinom, ATCC # CRL 1555), Calu 6 buňky (plicní, ATCC # HTB 56), PC3 buňky (prostaty, ATCC # CRL 1435), SCOV3TP5 buňky a NIH 3T3 fibroblasty geneticky upravené k nadměrné 25 expresi EGFR, PDGFR, IGF-1R nebo kterékoliv jiné testované kinázy. Následující postup může být používán k provedení xenoimplantátových experimentů:

30 Samčí athymické myši (BALB/c, nu/nu) se zakoupí u Simonson Laboratories (Gilroy, CA). Všechna zvířata byla chována v čistotě v mikronizolačních klecích s Alpha-dri podestýlkou. Byla jim poskytnuta sterilní žrádlo pro hlodavce a voda dle potřeby.

35 Buněčné linie byly pěstovány v příslušném médiu (např. MEM, DMEM, Ham's F10 nebo Ham's F12 plus 5% až 10% fetální bovinní sérum (FBS) a 2mM glutamin (GLN)). Všechna buněčná kultivační média, glutamin a fetální bovinní sérum byla zakoupena u firmy Gibco Life Technologies (Grand Island, NY), pokud není uvedeno jinak. Všechny buňky byly kultivovány v prostředí o vlhkosti 90 až 95 a 5 až 10% CO₂ při teplotě 37 °C. Všechny buněčné linie byly rutinně subkultivovány dvakrát týdně a byly negativní na mykoplasmu, což bylo stanoveno metodou Mycotest (Gibco).

40 Buňky byly sbírány při nebo téměř při konfluenci s 0,05% Trypsin-EDTA a peletovány při 450 x g po dobu 10 minut. Pelety byly resuspendovány ve sterilním PBS nebo médiu (bez FBS) na příslušnou koncentraci a buňky byly implantovány do zadního boku myši (8 až 10 myši na skupinu, 2 až 10 x 10⁶ buněk na zvíře). Růst nádoru byl měřen po dobu 3 až 6 týdnů pomocí

venierových kaliperů. Objemy nádorů byly vypočteny jako délka x šířka x výška, pokud není uvedeno jinak. Hodnoty P byly vypočteny pomocí Studentova t-testu. Testované sloučeniny v 50 až 100 μ l excipientu (DMSO nebo VPD:D5W) mohou být podány IP injekcí v různých koncentracích obecně počínaje dnem jedna po implantaci.

5

Model invaze nádoru

Byl vyvinut následující model invaze nádoru a může být používán ke stanovení terapeutické hodnoty a účinnosti sloučenin vykazujících selektivní inhibici receptoru KDR/FLK-1.

10

Postup

Jako experimentální zvířata byly používány osm týdnů staré nahé myši (samice) (Simonsen Inc.). Implantace nádorových buněk může být provedena při odtahu s laminárním proudem. Při anestézii byl koktejl z látky Xylazin/Ketamin (100 mg na kg ketaminu a 5 mg na kg Xylazinu) podáván intraperitoneálně. Byla provedena incize vedená středem k odhalení dutiny břišní (přibližně 1,5 cm délky) k injektování 10^7 nádorových buněk v objemu 100 μ l média. Buňky byly injektovány buď do duodenálního lalůčku pankreatu, anebo pod serózu tlustého střeva. Peritoneum a svaly byly zašity 6–0 hedvábným kontinuálním stehem a kůže byla stažena pomocí svorek. Zvířata byla denně sledována.

20

Analýza

Po 2 až 6 týdnech v závislosti na makroskopických pozorováních zvířat byly myši usmrceny a lokální metastáze nádoru do různých orgánů (plíce, játra, mozek, žaludek, slezina, srdce, svaly) byly excidovány a analyzovány (měření velikosti nádoru, stupně invaze, imunochemie, stanovení hybridizace *in situ*, atd.).

25

C-kit test

30

Tento test se používá k detekci míry fosforylace c-kit tyrosinu

MO7E (lidská akutní myeloidní leukémie) buňky byly sérem starvovány („starved“) přes noc v 0,1% séru. Buňky byly dále před stimulací ligandem předem ošetřeny sloučeninou (souběžně se sérovou starvací), stimulovány 250 ng na ml rh-SCF po dobu 15 minut. Po stimulaci byly buňky lyzovány a imunoprecipitovány protilátkou anti-c-kit. Hladiny fosfotyrosinu a proteinu byly stanoveny technikou Western blotting.

35

Test MTT proliferace

40

Buňky MO7E byly starvovány sérem a předem ošetřeny sloučeninou podle způsobu uvedeného pro fosforylační experimenty. Buňky byly nanášeny v množství 4×10^5 buněk na jamku do misky o 96 jamkách v 100 μ l RPMI + 10% séru. Byl přidán rh-SCF (100 ng na ml) a destička byla inkubována po dobu 48 hodin. Po 48 hodinách bylo přidáno 10 μ l 5 mg na ml MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium-bromid] a po dobu 4 hodin se nechala běžet inkubace. Byl přidán kyselý izopropanol (100 μ l z 0,04N HCl v izopropanolu) a byla měřena optická hustota při vlnové délce 550 nm.

45

Apoptóзовý test

50

Buňky MO7E byly inkubovány +/- SCF a +/- sloučenina v 10% FBS s rh-GM-CSF (10 ng na ml) a rh-IL-3 (10 ng na ml). Vzorky byly testovány v 24 a 48 hodinách. K měření aktivované kaspázy-3 byly vzorky promývány s PBS a permeabilizovány s ledově studeným 70% ethanolem. Buňky byly pak barveny s Pe-konjugovanou polyklonální králičí anti-aktivní kaspázou-3 a

analyzovány FACS. K měření štěpené PARP byly vzorky lyzovány a analyzovány technikou western blotting s protilátkou anti-PARP.

Dodatečné testy

Dodatečné testy, které mohou být používány ke stanovení sloučenin podle předloženého vynálezu, zahrnují, ale není to nikterak limitováno, bio-flk-1 test, EGF receptor-HER2 chimérický receptorový test na celých buňkách, bio-src test, bio-lck test a test měřící funkci fosforylace raf. Postupy provádění jednotlivých testů mohou být nalezeny v US patentu č. 6 130238, zde je uvedeno jako odkaz, včetně kterýchkoliv obrázků.

Měření buněčné toxicity

Terapeutické sloučeniny by měly být účinnější při inhibici aktivity receptorové tyrosinkinázy než při projevech cytotoxického účinku. Měření účinnosti a buněčné toxicity sloučeniny může být provedeno stanovením terapeutického indexu, tzn. IC_{50}/LD_{50} . Hodnota IC_{50} , dávka, kterou se dosáhne 50% inhibice, může být měřena standardními technikami, např. popsány v předloženém vynálezu. Hodnota LD_{50} , tj. dávka, která vede k 50% toxicitě, může být také měřena standardními technikami (Mossman, 1983, *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63), měřením množství uvolněného LDH (Korzeniewski a Callwaert, 1983, *J. Immunol. Methods*, 64: 313, Decker a Lohmann-Matthes, 1988, *J. Immunol. Methods*, 115: 61) nebo měření letální dávky na zvířecích modelech. Sloučeniny s velkým terapeutickým indexem jsou výhodné. Terapeutický index by měl být větší než 2, výhodně alespoň 10, výhodněji alespoň 50.

B. Příklad výsledků z buněčných testů za použití (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

K potvrzení účinnosti (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80)

detekované při biochemických testech (*vide infra*) byla vyhodnocována její schopnost inhibovat ligand-dependentní fosforylaci RTK při testech na buňkách pomocí NIH-3T3 myších buněk upravených k nadměrné expresi Flk-1 nebo lidských PDGFR β . (2-Diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhiboval VEGF-dependentní fosforylaci Flk-1 tyrosinu s hodnotou IC_{50} přibližně 0,03 μ M. Tato hodnota je podobná 0,009 μ M K_i hodnotě stanovené pro inhibici Flk-1 (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) determinované při biochemických testech, což indikuje, že (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) se snadno penetruje do buněk. V souladu s biochemickými údaji (*vide infra*) indikujícími, že (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) měl srovnatelnou aktivitu proti Flk-1 a PDGFR, bylo také zjištěno, že inhibuje PDGF-dependentní fosforylaci receptoru v buňkách s hodnotou IC_{50} přibližně 0,03 μ M. Schopnost (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhibovat c-kit, úzce příbuzné s RTK, která váže faktor kmenových buněk (SDF), byla stanovena použitím MO7E buněk, které exprimují tento receptor. V těchto buňkách (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhiboval SCF-dependentní c-kit fosforylaci s hodnotou IC_{50} 0,01 až 0,1 μ M. Tato sloučenina také inhibovala SCF-stimulovanou c-kit fosforylaci u akutní myeloidní leukémie (AML) blastů izolovaných z periferní krve pacientů.

Kromě testování schopnosti (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) na inhibici ligand-dependentní fosforylace receptoru v buňkách byl také pozorován vliv na ligand-dependentní proliferativní odpověď buněk *in vitro* (viz tabulka 4). Při těchto studiích byly buňky přes noc uvedené do stavu klidu starvací sérem a indukovány k DNA syntéze po přidání příslušné mitogenního ligandu. Jak je uvedeno v tabulce 4, (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhiboval PDGF-indukovanou proliferaci NIH-3T3 buněk exprimujících nadměrné množství PDGFR β nebo PDGFR α s hodnotou IC₅₀ 0,031 a 0,069 μ M a SCF-indukovanou proliferaci MO7E buněk s hodnotou IC₅₀ 0,007 μ M.

Tabulka 4

receptor	biochemické	buněčné IC ₅₀	
	K _i ¹ (μ M)	fosforylace receptoru (μ M)	ligand-dependentní proliferace (μ M)
Flk-1/KDR	0,009	0,03 ²	0,004 ³
PDGFR α	0,008	0,03 ⁴	0,031 ⁴
PDGFR β	ND	ND	0,069 ⁵
FGFR	0,83	ND	0,7 ³
c-kit	ND	0,01 až 0,1	0,007 ⁶
ND = nebylo stanoveno			
¹ stanoveno pomocí rekombinantního enzymu			
² stanoveno pomocí NIH-3T3 buněk exprimujících Flk-1 bez přísunu séra			
³ stanoveno pomocí HUVEC bez přísunu séra			
⁴ stanoveno pomocí NIH-3T3 buněk exprimujících PDGFR bez přísunu séra			
⁵ stanoveno pomocí NIH-3T3 buněk exprimujících PDGFR bez přísunu séra			
⁶ stanoveno pomocí MO7E buněk bez přísunu séra			

Jak vyplývá z tabulky 4, existuje obecná shoda mezi biochemickou a buněčnou aktivitou (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80), což podporuje závěr, že tato sloučenina překračuje buněčné membrány. Dále lze vyvodit, že buněčné odpovědi jsou výsledkem aktivity sloučeniny 80 proti naznačenému cíli. Naproti tomu, při testování v přítomnosti kompletního růstového média *in vitro*, byly třeba podstatně vyšší koncentrace (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) (> 10 μ M) k inhibici růstu různých lidských nádorových buněk (viz tabulka 5). To ukazuje, že sloučenina přímo neinhibovala růst těchto buněk v koncentracích nutných k inhibici fosforylace receptoru závislé na ligandu a proliferace buněk.

Tabulka 5

buněčná linie	původ	IC ₅₀ (μM)	LD ₅₀ (μM)
HT29	karcinom tlustého střeva	10	22
A549	plíň karcinom	9,5	22
NCI-H460	NSC plicní karcinom	8,9	20
SF767T	gliom	7,9	14
A431	epidermoidní karcinom	6,0	18

Výsledky uvedené v tabulce 5 byly získány inkubací buněk po dobu 48 hodin v kompletním růstovém médiu v přítomnosti sériových zředění (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny. Na konci růstové periody bylo stanoveno relativní množství buněk. Hodnoty IC₅₀ byly vypočteny jako koncentrace sloučeniny, která inhibovala růst buněk z 50 % vzhledem k neošetřeným buňkám. Hodnoty LD₅₀ byly vypočteny jako koncentrace sloučeniny, která způsobí 50% snížení počtu buněk vzhledem k výchozímu stavu experimentu.

Relevantnější test na bázi buněk, ve kterém se vyhodnocuje antiangiogenní schopnost (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80), zahrnuje *in vitro* test mitogeneze použitím lidských endotheliálních buněk žíly pupečnickové (HUVEC) jako modelového systému pro proliferaci endotheliálních buněk rozhodující pro angiogenní proces. Při tomto testu je mitogenní odpověď, měřená jako přírůstek DNA syntézy, indukována v HUVEC bez přísunu séra po přidání VEGF nebo FGF. V těchto buňkách (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhiboval VEGF- a FGF-indukovanou mitogenní odpověď na dávce závislým způsobem s hodnotami IC₅₀ 0,004 μM, resp. 0,7 μM, za předpokladu, že sloučenina byla přítomna v průběhu 48hodinového testu.

Výše uvedené výsledky byly získány s použitím HUVEC bez přísunu séra, které byly inkubovány s mitogenními koncentracemi VEGF (100 ng/ml) nebo FGF (30 ng/ml) v přítomnosti sériových zředění (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) po dobu 24 hodin. Mitogenní odpověď během následujících 24 hodin v přítomnosti ligandu a inhibitoru byla kvantifikována měřením DNA syntézy na bázi inkorporace bromdeoxyuridinu do buněčné DNA.

V oddělených experimentech inhibovala sloučenina 80 VEGF-dependentní fosforylaci ERK 1/2 (p42/44MAP kinázy), prvotní downstreamový cíl Flk-1/KDR, na dávce závislým způsobem. Bylo také zjištěno, že v tomto systému je inhibiční aktivita sloučeniny 80 dlouhodobá; inhibuje VEGF-dependentní fosforylaci ERK 1/2 i 48 hodin po odstranění (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) z média a po krátké expozici (2 hodiny) vůči mikromolárním koncentracím sloučeniny.

Bylo zjištěno, že VEGF je důležitý faktor přežití pro endotheliální buňky. Poněvadž (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhibuje VEGF-dependentní mitogenní odpovědi HUVEC, byl zkoumán účinek sloučeniny na přežití HUVEC. V těchto experimentech bylo používáno štěpení substrátu kaspázy 3 poly-ADP-ribosyl polymerázy (PARP) jako indikace apoptózy. HUVEC kultivované za bez sérových podmínek po dobu 24 hodin vykazovaly výraznou míru štěpení PARP, což bylo detekováno akumulací štěpení 23 kDa PARP fragmentu.

Tomu bylo do velké míry zabráněno přidáním VEGF do buněčného média, a tím se v tomto testu ukázalo, že VEGF působí jako faktor přežití. Bylo zjištěno, že (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhibuje KDR signalizaci. Tudiž (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhibuje VEGF-zprostředkované přežití HUVEC na dávce závislým způsobem. Tato data tedy indikují, že sloučenina 80 indukuje apoptózu v endoteliálních buňkách v kultuře v přítomnosti VEGF.

10 C. *In vivo* studie účinnosti

i. Účinnost proti stabilizovaným nádorovým xenoimplantátům

In vivo účinnost (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) byla studována na ubkutánních (SC) modelech xenoimplantátu použitím lidských nádorových buněk implantovaných do oblasti zadní části boku athymické myši. Po implantaci se před započítáním perorálního ošetřování sloučeninou nádory nechaly stabilizovat na velikost 100 až 550 mm³.

Denní perorální podání sloučeniny 80 způsobovalo na dávce závislou inhibici růstu A431 nádoru, za předpokladu, že ošetření bylo započato po nárůstu nádorů do velikosti 400 mm³. Byla pozorována statisticky významná ($P < 0,05$) inhibice růstu nádoru při dávkách 40 mg na kg denně (74% inhibice) a 80 mg na kg denně (84% inhibice) (viz tabulka 6). V předchozích experimentech nebyla vyšší (160 mg na kg denně) dávka sloučeniny účinnější proti stabilizovaným nádorům A431 než dávka 80 mg na kg denně. Navíc myši ošetřované dávkou 160 mg sloučeniny na kg denně ztrácely tělesnou váhu, což indikuje, že vyšší dávka nebyla také tolerována. Podobné výsledky byly získány při experimentu, ve kterém byly nádory A431 ponechány narůst pouze do velikosti 100 mm³ (viz tabulka 5). Při tomto druhém experimentu byla pozorována kompletní regrese nádorů u šesti z osmi zvířat ošetřovaných dávkou 80 mg na kg denně po dobu 21 dnů. U těchto šesti zvířat nebyl pozorován nový nárůst nádorů během 110 dnů pozorování po skončení ošetření. U dvou zvířat, ve kterých nádory znovu narostly do velké velikosti (2000 až 3000 mm³), nádory ustoupily jako reakce na druhé kolo ošetření sloučeninou 80. Důležité je, že ve všech experimentech, při kterých se testovala účinnost sloučenin, byla dávka (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) v množství 80 mg na kg denně dobře snášena, i když byla podávána kontinuálně po dobu více než 100 dnů.

Tabulka 6

počáteční objem nádoru	sloučenina ¹ (mg/kg denně)	% inhibice (denní)	Hodnota P
400	80	84 (36)	0,001
	40	74 (36)	0,003
	20	51 (36)	0,130
100	80	93 (40)	0,002
	40	75 (40)	0,015
	10	61 (40)	0,059

¹ sloučenina 80

Výsledky v tabulce 6 byly získány s buňkami A431 ($0,5 \times 10^6$ buněk na myš), které byly implantovány SC do oblasti zadního boku athymické myši. Denní perorální podání (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) v nosiči na bázi Cremophore nebo kontrolním nosiči se započalo v době, kdy nádory dosáhly indikovaného průměrného objemu. Nádory byly měřeny vernierovými kaliperami a objem nádoru byl spočten jako délka x šířka x výška. Hodnoty P byly vypočteny srovnáním velikosti nádorů u zvířat, která byla ošetřována sloučeninou 80 ($n = 8$), s těmi zvířaty, která byla ošetřována nosičem ($n = 16$), v poslední den experimentu pomocí dvoustranného Studentova t-testu.

Účinnost sloučeniny 80 proti etablovaným lidským nádorům různého původu byla stanovena pomocí Colo205 karcinom tlustého střeva), SF763T (gliom) a NCI-H460 (nemalobuněčný plicní karcinom) xenoimplantátů (viz tabulka 7). Tyto experimenty byly provedeny s (2-diethylaminoethyl)amidem 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) podávaným perorálně v množství 80 mg na kg denně; dávka, která byla účinná a dobře tolerována.

Tabulka 7

	typ nádoru	Počáteční objem nádoru	% inhibice (denní)	Hodnota P
A431 ¹	epidermoidní	100	93 (40)	0,002
A431 ¹	epidermoidní	400	84 (36)	0,001
Colo205	tlustého střeva	370	77 (54)	0,028
NCI-H460	plicní	300	61 (54)	0,003
SF763T	gliom	550	53 (30)	0,001
¹ údaje získané z experimentu uvedeného v tabulce 5				

Ve výše zmíněných experimentech, jakmile nádory dosáhly indikované velikosti, byla sloučenina 80 podávána jednou denně v množství 80 mg na kg v nosiči na bázi Cremophoru. Procentuální inhibice v porovnání s kontrolní skupinou ošetřovanou nosičem byla vypočtena na konci experimentů. Hodnoty P byly spočteny srovnáním velikosti nádorů u zvířat, která byla ošetřována sloučeninou, s těmi zvířaty, která byla ošetřována nosičem, pomocí dvoustranného Studentova t-testu.

Ačkoliv (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny (sloučenina 80) inhiboval růst všech typů nádorů uvedených v tabulce 7, byl pozorován rozdíl v odpovědích různých modelů xenoimplantátů. Konkrétně růst NCI-H460 a SF763T nádorů byl zastaven nebo ve velké míře zpomalen, jelikož nádory Colo205, jako třeba nádory A431, ustoupily po ošetření (2-diethylaminoethyl)amidem 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

Kvůli stanovení molekulární báze rozdílů v odpovědi u modelů xenoimplantátů byly studovány nádory. Byly vyhodnocovány nádory SF763T, které byly při molekulární hladině méně responzivní na ošetření (2-diethylaminoethyl)amidem 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny, pomocí imunohistologických technik k stanovení účinku ošetření sloučeninou. Tyto studie byly původně prováděny na tomto typu nádoru, protože nádory SF763T jsou vysoce vaskularizovány mikrocévy, jenž silně exprimují

endotheliální buněčný marker CD31, a jsou tudíž velmi vhodné pro studie hustoty nádorových mikrocév (MVD). Imunohistologické stanovení nádorů SF763T ukazuje, že nádory z ošetřovaných zvířat měly sníženou MVD v porovnání s kontrolními skupinami ošetřovanými nosičem, což je v souladu s antiangiogenním mechanismem účinku sloučeniny 80; MVD byla $24,2 \pm 4,1$ u 5 zvířat ošetřovaných sloučeninou 80, v porovnání s $39,3 \pm 5,7$ u těch, které byly ošetřovány jen nosičem. Jak se předpokládá na základě zastavení doprovodného růstu nádoru, vyložena inhibice proliferace nádorových buněk byla evidentní u nádorů, které byly ošetřované sloučeninou 80. Tyto nádory měly poloviční mitotický index nádorů, které byly ošetřovány nosičem (data nejsou uvedena). Účinek sloučeniny 80 na MVD a proliferaci nádorových buněk indikuje, že sloučeniny 10 mají výrazné antiangiogenní a protinádorové účinky, i za podmínek, při kterých nádory neustupují.

Schopnost sloučeniny 80 inhibovat fosforylaci PDGFR a následnou signalizaci *in vivo* byla také vyhodnocována na nádorech SF763T, které exprimují vysoké hladiny PDGFR β . Ošetření 15 SF763T nádorů sloučeninou 80 silně inhibovalo fosforylaci PDGFR β tyrosinu v etablovaných SF763T nádorech. Sloučenina 80 také snižovala hladiny fosforylované (aktivované) fosfolipázy C gamma (PLC- γ), okamžitý downstreamový indikátor aktivace PDGFR. Tato data demonstrují, že perorální podání sloučeniny 80 způsobuje přímý účinek na cílovou aktivitu (PDGFR) v nádorech *in vivo*.

Na základě důkazu, že schopnost sloučeniny 80 inhibovat VEGF-dependentní signalizaci v HUVEC *in vitro* je dlouhodobá (*vide supra*), účinnost sloučeniny byla stanovena po nečastém podání sloučeniny do modelu Colo205 nádoru. Jak je uvedeno v tabulce 8, bylo 80 mg na kg (91% inhibice) a 40 mg na kg (84% inhibice) účinných, za předpokladu, že dávka byla podávána 25 denně, nikoliv týdně. Na rozdíl od vyšších dávek sloučeniny 80 (160 mg na kg), které inhibovaly (52% inhibice) růst etablovaných nádorů Colo205 při podání 2 x týdně, z čehož lze usuzovat, že tato sloučenina může být účinná při nefrekventovaném podání ve vyšších dávkách. Mělo by být uvedeno, že dávkovací režimy mohou být stanoveny odbornou veřejností bez náležitého zkoušení.

30

Tabulka 8

dávka (mg/kg)	frekvence	inhibice %	hodnota P
160	2 x týdně	52	0,085
	1 x týdně	17	NS
80	denně	91	0,039
	2 x týdně	19	NS
	1 x týdně	0	NS
40	denně	84	0,028
	2 x týdně	36	NS
NS: nevýznamná hodnota ($P > 0,05$)			

Výsledky z tabulky 8 byly získány z buněk Colo205 ($0,5 \times 10^6$ buněk na myš), které byly 35 implantovány SC do oblasti zadního boku athymické myši. Perorální podání sloučeniny 80 podle indikovaného režimu bylo započato v době, kdy nádory dosáhly objemu 400 mm^3 . Nádory byly měřeny vernierovými kalipery a objem nádoru byl vypočten jako délka x šířka x výška produktu.

Hodnoty P byly vypočteny srovnáním velikosti nádorů u zvířat, která byla ošetřována sloučeninou 80, se zvířaty, která byla ošetřována nosičem, v poslední den experimentu pomocí dvoustranného Studentova t-testu.

5 ii. Účinnost sloučeniny 80 na modelu diseminovaného onemocnění

Kromě podpory trvalého růstu pevných primárních nádorů, je angiogeneze také esenciální složka podporující vznik diseminovaného onemocnění v důsledku metastáze z primárního nádoru. Účinek sloučeniny 80 na vznik diseminovaného onemocnění byl zkoumán na modelu kolonizace plicního melanomu B16–F1 myši. Při tomto modelu kolonizují B16–F1 buňky inokulované intra-
10 venózně *via* ocasní žílu athymické myši plíce a vytváření nádory. Jak je uvedeno v tabulce 8, podle vyhodnocení měření celkové hmotnosti plic účinně snižuje perorální podání sloučeniny 80 v množství 80 mg na kg denně hmotnost B16–F1 buněk v plicích. Tato data naznačují, že sloučenina 80 může inhibovat diseminované onemocnění *in vivo*.

15

Tabulka 9

	hmotnost plic (g)	% inhibice	hodnota P
nosič	0,83 ± 0,07	-	-
sloučenina ¹	0,41 ± 0,04	50	< 0,001
¹ sloučenina 80			

Výsledky z tabulky 9 byly získány z athymické myši, která byla inokulována B16–F1 nádorovými buňkami (5 × 10⁵ buněk na myš). Myši byly ošetřeny denně perorální dávkou sloučeniny 80 v množství 80 mg na kg denně (n = 10) nebo nosičem (n = 18) po dobu 24 dnů po inokulaci nádoru. Na konci doby ošetřování byly myši usmrceny a jejich plíce byly izolovány a zváženy. Procentuální inhibice byla vypočtena srovnáním hmotnosti plic u zvířat, která byla ošetřována sloučeninou 80, se zvířaty, které byly ošetřovány pouze nosičem. Hodnota P byly stanoveny
25 pomocí dvoustranného Studentova t-testu.

D. Příklady biologické aktivity

Příklady *in vivo* účinnosti sloučenin podle předloženého vynálezu jsou uvedeny v tabulce 2.

30

Závěr

Při studiích zaměřených na výzkum farmakokinetických charakteristik sloučenin z výhodných provedení podle předloženého vynálezu bylo prokázáno, že perorální podání jednotlivé dávky uvedených sloučeniny vede k vysoké biologické dostupnosti u myši. Dobrá perorální biologická dostupnost a lineární farmakokinetika ukazují, že sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu mají příznivé farmakokinetické charakteristiky.

Navíc sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu jsou účinnými inhibitory aktivity tyrosinkinázy z dělené kinázové domény RTK Flk–1/KDR a PDGFR, které se podílejí na angiogenezi, a RTK c–kit, receptoru pro faktor kmenových buněk (SCF), který se podílí na určitých hematologických rakovinách. Ve vysokých koncentracích sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu také inhibují aktivitu tyrosinkinázy FGFR–1, třetí RTK podílející se na angiogenezi. V souladu s jejich biochemickou aktivitou inhibují sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu ligand–dependentní fosforylaci tyrosinu cílových RTK a
45 *in vitro* mitogenní odpověď lidských endoteliálních buněk žíly pupečnickové (HUVEC) stimulované VEGF nebo FGF, PDGFR–exprimujících NIH–3T3 buněk stimulovaných PDGF, a MO7E

buněk akutní myeloidní leukémie stimulovaných SCF. Naproti tomu sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu přímo neinhibují proliferaci nádorových buněk v kompletním růstovém médiu kromě koncentrací vyšších o 2 až 3 řády, než jsou koncentrace nutné k inhibici ligand-dependentních mitogenních odpovědí. Při studiích xenoimplantátu na myších inhibovaly sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu růst etablovaných lidských nádorů různého původu způsobem závislým na dávce a v koncentracích, které byly dobře snášeny i po prodloužení dávkování (> 100 dnů). Při dávce 80 mg na kg denně indukovaly sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu regresí velkých etablovaných A431 a Colo205 nádorů a způsobovaly značnou inhibici růstu nebo stagnaci SF763T a NCI-H460 nádorů. U myši majících SF763T nádory způsobovaly sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu redukce hustoty mikrocév, fosforylaci PDGFR v nádorech a mitotický index v nádorových buňkách. Při této dávce také sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu inhibovaly plicní kolonizaci nádorovými buňkami B16-F1 v modelu metastázy nádoru. Studie režimů ukázaly, že sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu jsou nejúčinnější, pokud jsou podávány denně. Přímý důkaz antiangiogenní aktivity sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu byl proveden na SF763T nádorech, ve kterých byla hustota mikrocév redukována. Přímý důkaz, že sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu inhibovaly fosforylaci PDGFR a signalizaci *in vivo*, byl také proveden na SF763T nádorech.

Když se vše spojí, podporují tato data názor, že perorálně podávané sloučeniny z výhodných provedení podle předloženého vynálezu jsou antiangiogenní prostředky pro ošetření rakovin, včetně pevných nádorů a hematologických zhoubných bujení, ve kterých angiogeneze a/nebo signalizace přes c-kit jsou důležité z hlediska patologie onemocnění.

Je zřejmé, že sloučeniny, postupy a farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou účinné při modulaci aktivity PK, a tudíž se předpokládá jejich účinnost jako terapeutických prostředků při poruchách souvisejících s RTK, CTK a STK.

Odborník též snadno ocení, že předkládaný vynález je dobře uzpůsoben k uskutečňování popsaných aspektů a dosahování uvedených cílů a výhod, stejně jako těch, které jsou mu inherentně vlastní. Molekulární komplexy a zde popisované metody, postupy, terapie, molekuly a konkrétní sloučeniny představují výhodná provedení a jsou pouze příklady, které nijak neomezuji rozsah vynálezu. Odborníkovi jsou zřejmé jejich obměny a další použití, která jsou zahrnuta v duchu vynálezu, jak je definován připojenými patentovými nároky.

Odborníkovi je rovněž zřejmé, že je možno provádět různé náhrady a modifikace předkládaného vynálezu, aniž by se překročil rozsah a myšlenka vynálezu.

Všechny patenty a publikace zmíněné v textu jsou ukazatelem úrovně odborníků, kterých se vynález týká. Všechny patenty publikace jsou zde zahrnuty formou odkazu, jako by bylo pro každou jednotlivou publikaci konkrétně a jednotlivě uvedeno, že je zde zahrnuta jako odkaz.

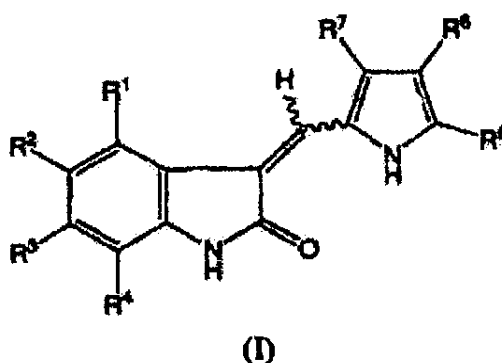
Vynález, zde ilustrativně popsán, může být výhodně prováděn za absence jakéhokoli prvku nebo prvků nebo omezení, která zde nejsou konkrétně uvedena. Tak například v každém případě zde může být kterýkoli z výrazů „zahrnující“, „sestávající v podstatě z“ a „sestávající z“ nahrazen kterýmkoli ze zbývajících dvou. Termíny a výrazy, které zde byly použity, jsou používány jako výrazy popisné a nikoli omezující a při jejich použití neexistuje vyloučení jakýchkoli ekvivalentů uvedených a popsaných znaků nebo jejich částí, ale potvrzuje se, že v rozsahu nárokovaného vynálezu jsou možné různé modifikace. Je tedy nutno zdůraznit, že ačkoliv je vynález popsán konkrétně pomocí výhodných provedení a volitelných znaků, může se odborník uchýlit k modifikacím a variacím zde uvedených konceptů a tyto modifikace a variace se považují za spadající do rozsahu vynálezu, definovaného připojenými patentovými nároky.

Tam, kde jsou znaky nebo předměty vynálezu popisovány pomocí Markushových definic, je navíc odborníkovi zřejmé, že vynález je tím také definován pomocí každého jednotlivého člena nebo podskupiny takové Markushovy skupiny. Například je-li význam symbolu X definován jako vybraný ze skupiny sestávající z bromu, chloru a jodu, jsou tím plně popsány nároky pro X znamenající brom i nároky pro X znamenající chlor.

Další provedení spadají do rozsahu připojených patentových nároků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová sloučenina obecného vzorce I



nebo její farmaceuticky přijatelná sůl, kde:

R^1 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, $-(CH_2)_nR^{16}$ a $-C(O)NR^8R^9$,

R^2 má význam vybraný z vodíku, halogenu, (C_1-C_{12}) arylů a $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$,

R^3 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_{12}) arylů, heteroarylů a $-C(O)R^{15}$,

R^4 je vodík,

R^5 má význam vybraný z vodíku a (C_1-C_4) alkylu,

R^6 je $-C(O)R^{10}$,

R^7 má význam vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu a (C_1-C_{12}) arylů,

R^8 a R^9 mají význam nezávisle vybraný z vodíku, (C_1-C_4) alkylu a (C_1-C_{12}) arylů,

R^{10} je $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$, kde n je 1, 2 nebo 3, R^{11} je vodík a R^{12} má význam vybraný z hydroxy, (C_1-C_4) alkoxy, $-C(O)R^{15}$, heteroarylů a $-NR^{13}R^{14}$,

R^{13} a R^{14} mají význam nezávisle vybraný ze skupiny sestávající z vodíku, (C_1-C_4) alkylu, (C_3-C_8) cykloalkylu, (C_1-C_{12}) arylů a heteroarylů, nebo

R^{13} a R^{14} mohou být spojeny a tvořit heterocykloskupinu,

R^{15} má význam vybraný z vodíku, hydroxy, (C_1-C_4) alkoxy a aryloxy,

R^{16} má význam vybraný z hydroxy a $-C(O)R^{17}$ a

r je 2 nebo 3,

a kde:

alkoxy označuje O-alkyl nebo O-cykloalkyl,

aryloxy označuje O-(C_1 - C_{12})aryl nebo O-heteroaryl,

heteroaryl označuje monocyklickou nebo kondenzovanou kruhovou skupinu s 5 až 12 členy kruhu, obsahující jeden, dva nebo tři heteroatomy vybrané z N, O nebo S a zbylé atomy kruhu jsou C,

heterocykloskupina označuje nasycený kruhový zbytek se 3 až 8 atomy kruhu, kde jeden nebo dva atomy kruhu jsou tvořeny heteroatomy vybranými z N, O nebo $S(O)_n$, kde n je celé číslo od 0 do 2, a zbylé atomy kruhu jsou C, kde jeden nebo dva C atomy jsou případně nahrazeny karbonylovou skupinou,

alkyly, alkoxy skupiny a cykloalkylové skupiny jsou nesubstituované,

arylové a heteroarylové skupiny jsou případně substituované jedním nebo dvěma substituenty, nezávisle vybranými z halogenu, (C_1 - C_4)alkylu, trihalogen(C_1 - C_4)alkylu, hydroxy, merkaptu, kyano, *N*-amido, mono- nebo di(C_1 - C_4)alkylamino, karboxy a *N*-sulfonamido,

heterocykloskupina je případně substituovaná jedním nebo dvěma substituenty nezávisle vybranými z halogenu, (C_1 - C_4)alkylu, $-(C_1-C_4)$ alkyl-karboxy, $-(C_1-C_4)$ alkyl-esteru, hydroxyly a mono- nebo di(C_1 - C_4)alkylaminoskupiny.

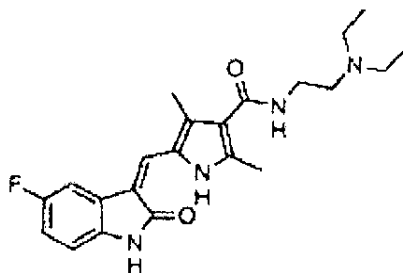
2. Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R^{13} a R^{14} mají význam nezávisle vybraný z vodíku, (C_1 - C_4)alkylu, heteroarylu, a jsou-li spojeny, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ a $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

3. Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde n je 2 nebo 3 a R^{12} je $-NR^{13}R^{14}$, kde R^{13} a R^{14} jsou nezávisle (C_1 - C_4)alkyl.

4. Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde n je 2 nebo 3 a R^{12} je $-NR^{13}R^{14}$, kde R^{13} a R^{14} jsou spojeny do skupiny vybrané z $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ nebo $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

5. Pyrrolem substituovaná 2-indolinonová sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R^1 je $-C(O)NR^8R^9$, kde R^8 je vodík a R^9 je aryl.

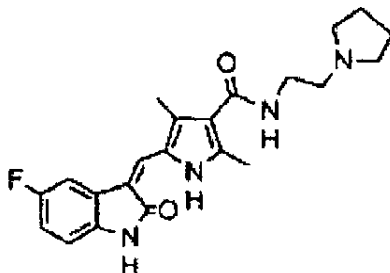
6. Sloučenina podle nároku 1, kterou je (2-diethylaminoethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrol-3-karboxylové kyseliny vzorce



nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

7. Sloučenina podle nároku 1, kterou je L-malátová sůl (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

8. Sloučenina podle nároku 1, kterou je (2-pyrrolidin-1-ylethyl)amid 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny vzorce



nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

9. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že zahrnuje pyrrolem substituovanou 2-indolinonovou sloučeninu podle nároku 1 obecného vzorce I nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient.

10. Farmaceutická kompozice, **vyznačující se tím**, že zahrnuje sloučeninu podle nároku 6 nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl a farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient.

11. Farmaceutická kompozice podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že zahrnuje L-malátovou sůl (2-diethylaminoethyl)amidu 5-(5-fluor-2-oxo-1,2-dihydroindol-3-ylidenmethyl)-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxylové kyseliny.

12. Použití pyrrolem substituované 2-indolinonové sloučeniny podle nároku 1 nebo 6 nebo její farmaceuticky přijatelné soli pro výrobu léčiva pro léčbu poruchy organismu související s proteinkinázou.

13. Použití podle nároku 12, kde uvedená porucha související s proteinkinázou je vybrána z poruchy související s receptorovou tyrosinkinázou, poruchy související s nereceptorovou tyrosinkinázou a poruchy související se serin-threoninkinázou.

14. Použití podle nároku 12, kde uvedená porucha související s proteinkinázou je vybrána z poruchy související s EGFR, poruchy související s PDGFR, poruchy související s IGFR a poruchy související s flk.

15. Použití podle nároku 12, kde uvedenou poruchou související s proteinkinázou je rakovina vybraná z karcinomu skvamózních buněk, astrocytomu, Kaposiho sarkomu, glioblastomu, plicní rakoviny, rakoviny močového měchýře, rakoviny hlavy a krku, melanomu, ovariální rakoviny, rakoviny prostaty, rakoviny prsu, malobuněčné rakoviny plic, gliomu, kolorektální rakoviny, genitourinární rakoviny a gastrointestinální rakoviny.

16. Použití podle nároku 12, kde uvedená porucha související s proteinkinázou je vybrána ze skupiny sestávající z diabetu, autoimunitní poruchy, hyperproliferativní poruchy, restenózy, fibrózy, psoriázy, von Heppelovy-Linadaurovy nemoci, osteoartritidy, revmatoidní artritidy, angiogeneze, zánětlivé poruchy, imunologické poruchy a kardiovaskulární poruchy.

17. Použití podle nároku 12, kde uvedeným organismem je člověk.

Konec dokumentu