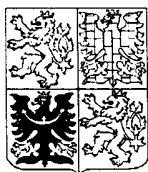


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 28.05.1998

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 28.05.1997 18.11.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/864455 1997/972614

(33) Země priority: US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 17.05.2000
(Věstník č. 5/2000)

(86) PCT číslo: PCT/US98/10999

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/54156

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4180

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 D 241/44

C 07 D 405/10

C 07 D 215/20

C 07 D 215/38

A 61 K 31/47

A 61 K 31/495

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

RHONE-POULENC RORER
PHARMACEUTICALS, INC., Collegeville, PA,
US;

(72) Původce:

Myers Michael, Reading, PA, US;
Spada Alfred P., Lansdale, PA, US;
Persons Paul E., Westborough, MA, US;
Maguire Martin P., Woburn, MA, US;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
120 00;

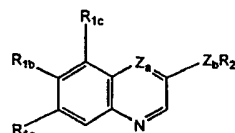
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Derivát ohinolinu a chinoxalinu, který inhibuje
od destiček odvozený růstový faktor A/nebo
P56^{lck} tyrosinkinázu**

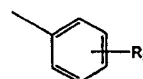
(57) Anotace:

Derivát chinolinu a chinoxalinu obecného vzorce I, kde
značená R_{1a} popřípadě substituovaný alkyl, OH, acyloxy,
vždy popřípadě substituovanou alkoxy, cykloalkyloxy,
oxaheterocyklyloxy nebo heterocyklylkarbonyloxy nebo
halogen, R_{1b} H, popřípadě substituovaný alkyl, OH, acyloxy,
vždy popřípadě substituovanou alkoxy, cykloalkyloxy,
oxaheterocyklyloxy nebo heterocyklylkarbonyloxy nebo
halogen, R_{1c} H, vždy popřípadě substituovaný alkyl, aryl,
heteroaryl, OH, acyloxy, vždy popřípadě substituovanou
alkoxy, cykloalkyloxy, heterocyklyloxy, heteroaryloxy nebo
heterocyklylkarbonyloxy, halogen, CN, R_5R_6N nebo
acyl R_5N , R_2 skupinu (a) nebo (b), R_3 H nebo F v orto nebo
para poloze, nižší alkyl v meta poloze, nižší alkoxy, halogen
nebo karbamoyl, R_4 H nebo nižší alkyl, R_5 a R_6 na sobě
nezávisle H nebo alkyl, nebo R_5 a R_6 spolu s N, na který jsou
vázány vytvářejí azaheterocyklyl, Z_h N nebo CH a Z_4 NH
nebo atom O nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo
sůl za podmínky, že R_{1a} a R_{1b} neznamenaí oba popřípadě
substituovaný alkyl, inhibuje od destiček odvozený růstový

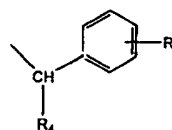
faktor a/nebo P56^{lck} tyrosinkinázu a je vhodný pro výrobu
farmaceutických prostředků pro ošetřování poruch a stavů
zahrnujících diferenciaci pro proliferaci buněk, produkci
extracelulární matrice nebo uvolňování mediátorů a/nebo
aktivaci a proliferaci buněk.



(I)



(a)



(b)

Derivát chinolinu a chinoxalinu, který inhibuje od destiček odvozený růstový faktor a/nebo P56^{lck} tyrosinkinázu

Oblast techniky

Vynález se týká inhibice proliferace buněk a/nebo produkce buněčné matrice a/nebo pohybu buněk (chemotaxe) a/nebo aktivace a proliferace T-buněk použitím derivátů chinolinu a/nebo chinoxalinu, které jsou užitečnými inhibitory proteintyrosinkinázy (TKI).

Vynález se týká modifikace a/nebo inhibice buněčné signalizace, proliferace buněk, produkce extracelulární matrice, chemotaxis, ovlivňování abnormálního růstu buněk a buněčné zánetlivé odezvy. Vynález se týká použití derivátů substituovaného chinoxalinu, které vykazují selektivní inhibici diferenciace, proliferace nebo uvolňování mediátoru účinnou inhibicí aktivity tyrosinkinázy a/nebo aktivity Lck tyrosinkinázy odvozené od receptoru (PDGF-R) růstového faktoru odvozeného od krevních destiček.

Dosavadní stav techniky

Buněčná signalizace je zprostředkovávána systémem interakcí, mezi něž patří styk buňka-buňka nebo buňka-matrice nebo kontakt extracelulární receptor-substrát. Extracelulární signál je často přenášen na ostatní části buněk cestou fosforylačního děje zprostředkovaného tyrosinkinázou, což ovlivňuje signalizační komplex vázaný na proudění proteinů substrátu buněčnými membránami. Specifický soubor receptorových enzymů, jako je receptor inzulinu, receptor epidermálního růstového faktoru (EGF-R) nebo receptor růstového faktoru odvozeného od destiček (PDGF-R) jsou příklady enzymů tyrosinkinázy, které se podílejí na buněčné signalizaci. Autofosforylace enzymu je žádoucí pro účinnou enzymem zprostředkovávanou fosforylaci subs-

trátu proteinů obsahujících tyrosinové zbytky. Je známo, že tyto substráty jsou zodpovědné za řadu buněčných dějů, včetně například buněčné proliferace, produkce buněčné matrice, migrace buněk a apoptosy.

Je zřejmé, že velké množství chorobných stavů je způsobováno buď neřízenou reprodukcí buněk nebo nadprodukcí matrice nebo špatně řízeným programovaným zánikem buněk (apoptosis). Mezi tyto chorobné stavy patří řada buněčných typů a zahrnují poruchy, jako je leukemie, rakovina, glioblastoma, lupénka, zánětlivá onemocnění, kostní choroby, fibrotické choroby, atherosklerosa a restenosa, vyskytující se po angioplastice koronárních, stehenních nebo ledvinových arterií, nebo jako jsou fibroproliferativní choroby jako je arthritida, plicní, ledvinová a jaterní fibrosa. Kromě toho jde o neřízené buněčné proliferativní stavy po bypasovém koronárním chirurgickém zásahu. Má se zato, že inhibice aktivity tyrosinkinázy je využitelná při řízení nekontrolované reprodukce buněk nebo nadprodukce matrice nebo špatně řízeného programovaného zániku buněk (apoptosis).

Je také známo, že některé inhibitory tyrosinkinázy mohou být v interakci s více než jedním typem enzymu tyrosinkinázy. Četné enzymy tyrosinkinázy jsou rozhodující pro normální funkci těla. Bylo by například nežádoucí bránit působení inzulínu ve většině normálních okolností. Proto by mohly sloučeniny, které inhibují aktivitu tyrosinové kinázy PDGF-R při koncentracích menších, než jaké jsou účinné k inhibici kinázy inzulínového receptoru, poskytovat užitečná činidla k selektivnímu léčení chorob vyznačujících se proliferací buněk a/nebo produkcí buněčné matrice a/nebo pohybu buněk (chemotaxis), jako je restenosa.

Četná literatura popisuje inhibitory tyrosinkinázy, které jsou selektivní pro receptorové enzymy tyrosinkináz, jako jsou

EGF-R nebo PDGF-R nebo enzymy nerekceptorových cytosolických tyrosinkináz, jako jsou v-abl, p56lck nebo c-src. Nejnovější přehledy, jejichž autory jsou Spada a Myer (Exp. Opin. Ther. Patents 5 (8), str. 805, 1995) a Bridges (Exp. Opin. Ther. Patents 5 (12), str. 1245, 1995) shrnují literaturu o inhibitech tyrosinkinázy a o selektivních inhibitorech EGF-R. Kromě toho Law a Lydon podali souhrn protirakovinového potenciálu inhibitorů tyrosinkináz (Emerging Drugs: The Prospect For Improved Medicines, str. 241 až 260, 1996).

Známé inhibitory aktivity tyrosinkinázy PDGF-R zahrnují inhibitory na bázi chinolinu uvádí Maguire a kol. (J. Med. Chem. 37, str. 2129, (1994)) a Dolle a kol. (J. Med. Chem. 37, str. 2627, 1994). Zprávu o třídě inhibitorů na bázi fenylaminopyrimidinu podal nedávno Traxler a kol. v evropském patentovém spisu číslo EP 564409 a Zimmermann J., Traxler P. a kol. (Biorg. & Med. Chem. Lett. 6 (11), str. 1221 až 1226) a Buchdunger E. a kol. (Proc. Nat. Acad.Sci. 92, str. 2558, 1995). Přes pokrok v této oblasti neexistují činidla z této třídy sloučenin, která byla schválena pro použití u lidí k léčení proliferativního onemocnění.

Vztah mezi multifaktoriálním onemocněním restonosou a PDGF a PDGF-R je ve vědecké literatuře dobře dokumentován. Avšak poslední výzkumy poznatků fibrotických chorob plic (Antoniades H.N. a kol. (J. Clin. Invest. 86, str.1055, 1990), ledvin a jater (Peterson T.C. Hepatology 17, str. 486, 1993) také uvádějí, že PDGF a PDGF-R jsou významné. Například glomerulonefritis je hlavní příčinou selhání ledvin a PDGF byl identifikován jako potenciální mitogen pro mesangiální buňky in vitro, jak to doložil Shulz a kol. (Am. J. Physiol. 255, F674, 1988) a Floege a kol. (Clin. Exp. Immun. 86, str. 334, 1991). Thornton S.C. a kol. (Clin. Exp. Immun 86, str. 79, 1991) uvádějí, že TNF- α a PDGF (získané od pacientů postižených reumatoidní artritidou) jsou hlavními cytokiny podílejícími se na

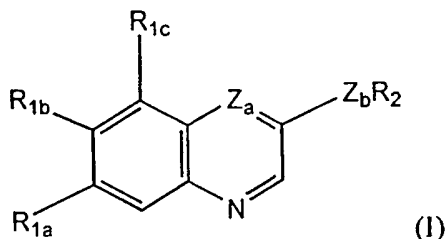
proliferaci synoviálních buněk. Kromě toho jsou identifikovány specifické typy nádorových buněk (Silver B.J., BioFactors 3, str. 217, (1992)), jako glioblastoma a Kaposi sarkom, který přeexpresuje buď protein PDGF nebo receptor, což vede k neřízenému růstu rakovinových buněk autokrinovým nebo parakrinovým mechanismem. Předpokládá se tedy, že inhibitor PDGF tyrosinkinázy by byl k užitku při léčení řady zdánlivě nesouvisejících lidských chorobných stavů, které mohou být charakterizovány zasahováním PDGF a PDGF-R do jejich etiologie.

Úlohu různých nerekceptorových tyrosinkináz, jako je p56^{lck} (dále jen "Lck") v zánětlivých stavech zahrnujících aktivaci a proliferaci T-buněk popsali Hanke a kol. (Inflamm. Res. 44, str. 357, (1995)) a Bolen a Brugge (Ann. Rev. Immunol. 15, str. 371, 1997). Tyto zánětlivé stavy zahrnují alergie, autoimunitní onemocnění, rheumatoidní artritidu a odhojování transplantátů. Jiný nedávný přehled shrnuje různé třídy inhibitorů tyrosinkinázy včetně sloučenin majících inhibiční účinek na Lck (Gronowater a kol. Progress in Medicinal Chemistry 33, str. 233, 1996). Inhibitory tyrosinkinázy Lck zahrnují několik přírodních produktů, které jsou obvykle neselektivními inhibitory tyrosinkinázy, jako jsou staurosporin, genistein, některé flavony a erpstatin. Podle nedávné zprávy je damnacanthol nízký nM inhibitor Lck (Faltynek a kol. Biochemistry 34, str. 12404, 1995). Mezi příklady syntetických inhibitorů Lck patří: řada dihydroxyisochinolinových inhibitorů, o nichž se uvádí, že mají nízkou mikromolární a submikromolární aktivitu (Burke a kol., J. Med. Chem. 36, str. 425, 1993) a o chinolinových derivátech se uvádí, že jsou značně méně aktivní mající Lck IC₅₀ 610 mikromolární. Výzkumem byla také objevena řada 4-substituovaných chinazolinů, které inhibují Lck v mikromolárním a submikromolárním oboru (Myers a kol., světový patentový spis číslo WO 95/15758 a Myers a kol. Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 417, 1997). Výzkum společnosti Pfizer (Hanke a kol. J. Biol. Chem. 271, str. 695, 1996) objevil dva specifické pyrazolopy-

rimidinové inhibitory známé jako PP1 a PP2, které mají nízký nanomolární potenciál proti Lck a Fyn (jiná rodina Src-kináz). Neuvádí se žádná Lck inhibice z hlediska sloučenin na bázi chinolinu a chinoxalinu. Předpokládá se tedy, že inhibitor na bázi chinolinu a chinoxalinu aktivity Lck tyrosinové kinázy by mohl být užitečný při léčení různých zdánlivě nesouvisejících lidských chorobných stavů, které mohou být charakterizovány působením Lck tyrosinové kinázy signalizující jejich etiologii.

Podstata vynálezu

Vynález se týká derivátu chinolinu a chinoxalinu obecného vzorce I

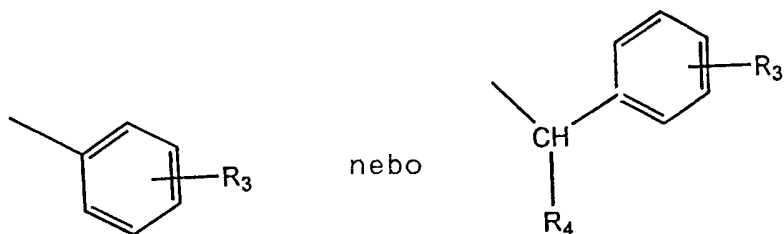


kde znamená

- R_{1a}** popřípadě substituovanou skupinu alkylovou, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou oxaheterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo atom halogenu,
- R_{1b}** atom vodíku, popřípadě substituovanou alkylovou skupinu, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou oxaheterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo atom halogenu,
- R_{1c}** atom vodíku, popřípadě substituovanou alkylovou skupinu, popřípadě substituovanou skupinu aryllovou, popří-

padě substituovanou skupinu heteroarylovou, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou aryloxyskupinu, popřípadě substituovanou heteroaryloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu, atom halogenu, kyanoskupinu, skupinu obecného vzorce R_5R_6N - nebo $acylR_5N$ -,

R₂



R₃ atom vodíku nebo atom fluoru v orto nebo v para poloze, nižší alkylovou skupinu v meta poloze, nižší alkoxyskupinu, atom halogenu nebo karbamoylovou skupinu,

R₄ atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu,

R₅ a R₆ na sobě nezávisle atom vodíku nebo alkylovou skupinu, nebo R₅ a R₆ spolu s atomem dusíku, na který jsou vázány, vytvářejí azaheterocyklylovou skupinu,

Z_a atom dusíku nebo skupinu CH a

Z_b iminoskupinu nebo atom kyslíku nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo sůl za podmínky, že R_{1a} a R_{1b} neznamenaají oba popřípadě substituovanou alkylovou skupinu.

Vynález se také týká farmaceutických prostředků, které

obsahují farmaceuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelný nosič. Vynález se také týká meziproductů pro přípravu sloučenin obecného vzorce I, způsobů přípravy meziproductů a sloučenin obecného vzorce I a použití sloučenin obecného vzorce I pro ošetřování jedinců s poruchami a stavy zahrnujícími buněčnou diferenciaci, proliferaci, produkci extracelulární matrice nebo uvolňováním mediátorů.

Jednotlivé používané výrazy mají následující význam, pokud není uvedeno jinak.

Výrazem "pacient" se vždy míní savec včetně lidí.

Výrazem "účinné množství" se vždy míní množství sloučeniny podle vynálezu účinné k inhibici aktivity PDGF-R tyrosinkinázy a/nebo Lck tyrosinkinázy za dosahování žádaného terapeutického účinku.

Výrazem "alkyl" se vždy míní alifatická uhlovodíková skupina s přímým nebo s rozvětveným řetězcem mající 1 až 10 atomy uhlíku. Výhodnými alkylovými skupinami jsou "nižší alkylové skupiny", což jsou alkylové skupiny s 1 až 3 atomy uhlíku, přičemž výhodnější je skupina methylová. Rozvětvením se míní, že je nižší alkylová skupina, například skupina methylová, ethylová nebo propylová vázaná na lineární alkylový řetězec. Alkylová skupina je také popřípadě substituována skupinou ze souboru zahrnujícího alkoxy skupinu, atom halogenu, karboxy skupinu, hydroxylovou skupinu nebo skupinu obecného vzorce R_5R_6N- (kde znamená R_5 a R_6 na sobě nezávisle atom vodíku nebo alkylovou skupinu nebo R_5 a R_6 spolu s atomem dusíku, na který jsou vázány, vytvářejí azaheterocyklylovou skupinu), výhodněji atom fluoru. Alkylovou skupinou se příkladně míní skupina methylová, fluormethylová, difluormethylová, trifluormethylová, ethylová, n-propylová, isopropylová, butylová, sek.-butylová, terc.-butylová, amylová a hexylová skupina.

Výrazem "cykloalkyl" se vždy míní nearomatická monocyklická skupina mající přibližně 3 až přibližně 7 atomů uhlíku v kruhu. Jakožto výhodné monocyklické cykloalkylové skupiny se uvádějí skupina cyklopentylová, cyklohexylová, cykloheptylová, přičemž jako výhodnější skupina cyklohexylová a cyklopentylová.

Výrazem "aryl" se vždy míní karbocyklická skupina mající přibližně 6 až přibližně 10 atomů uhlíku. Jakožto příkladné arylové skupiny se uvádějí skupina fenylová nebo naftylová nebo fenylová nebo naftylová skupina substituovaná jedním nebo několika substituenty arylových skupin, které jsou stejné nebo různé, přičemž se "substituentem arylových skupin" míní příkladně atom vodíku, skupina hydroxylová, atom halogenu, skupina alkylová, alkoxyskupina, karboxyskupina, alkoxykarbonylová skupina nebo skupina obecného vzorce Y^1Y^2NCO- , kde znamená Y^1 a Y^2 na sobě nezávisle atom vodíku nebo skupinu alkylovou.

Výrazem "heteroaryl" se vždy míní přibližně 5 až přibližně 10 členný aromatický monocyklický nebo polycyklický uhlíkovodíkový cyklický systém, ve kterém je jeden nebo několik atomů uhlíku v kruhu nahrazen jiným atomem, než je atom uhlíku, například atomem dusíku, kyslíku nebo síry. "Heteroaryl" může být také substituován jedním nebo několika substituenty, uvedenými pro arylovou skupinu. Jakožto příkladné heteroarylové skupiny se uvádějí substituovaná skupina pyrazinylová, furanylová, thienylová, pyridylová, pyrimidinylová, isoxazolylová, isothiazolylová, oxazolylová, thiazolylová, pyrazolylová, furazanylová, pyrrolylová, imidazo[2,1-b]thiazolylová, benzofurazanylová, indolylová, azaindolylová, benzimidazolylová, benzothienylová, chinolinylová, imidazolylová a isochinolinylová.

Výrazem "heterocyklyl" se vždy míní přibližně 4- až 7-členný monocyklický kruhový systém, přičemž jeden nebo několik atomů kruhu je jiných než atom uhlíku, přičemž je to například atom dusíku, kyslíku nebo síry. Označením "aza" nebo

"oxa" před výrazem "heterocyklyl" se vždy míní, že jako atom kruhu je obsažen alespoň jeden atom dusíku nebo kyslíku. Jakožto příkladné monocyklické heterocyklylové skupiny se uvádějí skupina piperidylová, pyrrolidinylová, piperazinylová, morfolinylová, thiomorfolinylová, thiazolidinylová, 1,3-dioxolanylová, 1,4-dioxanylová, tetrahydrofuranylová, tetrahydrothiofenylová a tetrahydrothiopyranylová skupina. Jakožto příklady heterocyklylových podílů se uvádějí skupina chinuklidylová, pentamethylensulfidová, tetrahydropyranylová, tetrahydrothiofenylová, pyrrolidinylová, tetrahydrofuranylová nebo 4-piperidinopiperidinová skupina.

Výrazem "heterocyklylkarbonyloxy" se vždy míní heterocyklyl-C(O)O- skupina, přičemž heterocyklyl má shora uvedený význam. Jakožto příkladné heterocyklylkarbonyloxyskupiny se uvádějí [1,4']-bipiperidin-1'-ylkarbonyloxyskupina (4-piperidinopiperid-1-ylkarbonyloxyskupina).

Výrazem "acyl" se vždy míní H-CO- nebo alkylCO- skupina, kde alkyl má shora uvedený význam. Příkladně se jako acylová skupina uvádí skupina formylová, acetylová, propanoylová, 2-methylpropanoylová, butanoylová a kaproylová skupina.

Výrazem "alkoxy" se vždy míní alkyl-O-skupina, kde alkyl má shora uvedený význam. Výhodnou alkoxyskupinou je nižší alkoxyskupina s 1 až 3 atomy uhlíku, výhodnější je methoxyskupina. Alkoxyskupina může být popřípadě substituována jednou nebo několika alkoxyskupinami, skupinami karboxylovými, alkoxykarbonylovými, karboxyarylovými nebo skupinami obecného vzorce R_5R_6N- (kde R_5 a R_6 má shora uvedený význam). Příkladně se jako alkoxyskupina uvádí methoxyskupina, ethoxyskupina, n-propoxyskupina, i-propoxyskupina, n-butoxyskupina, heptoxyskupina, 2-(morfolin-4-yl)ethoxyskupina a 2-(ethoxy)ethoxyskupina.

Výrazem "cykloalkyloxy" se vždy míní cyloalkyl-O-skupina,

kde cykloalkyl má shora uvedený význam. Příkladně se jako cykloalkyloxyskupina uvádí cyklopentyloxyskupina nebo cyklohexyloxyskupina.

Výrazem "heterocyklyloxy" se vždy míní heterocyklyl-O- skupina, kde heterocyklyl má shora uvedený význam. Příkladně se jako heterocyklyloxyskupina uvádí pentamethylensulfidoxyskupina, tetrahydropyranyloxyskupina, tetrahydrothiofenyloxyskupina, pyrrolidinyloxyskupina nebo tetrahydrofuranyloxyskupina.

Výrazem "aryloxy" se vždy míní aryl-O- skupina, kde aryl má shora uvedený význam.

Výrazem "heteroaryloxy" se vždy míní heteroaryl-O- skupina, kde heteroaryl má shora uvedený význam.

Výrazem "acyloxy" se vždy míní acyl-O- skupina, kde acyl má shora uvedený význam.

Výrazem "karboxy" se vždy míní HO(O)C- skupina, (skupina karboxylové kyseliny).

Výrazem " $\text{R}_5\text{R}_6\text{N-}$ " se vždy míní substituovaná nebo nesubstituovaná aminoskupina, kde R_5 a R_6 mají shora uvedený význam. Jakožto příkladně tyto skupiny se uvádějí aminoskupina ($\text{H}_2\text{N-}$), methylaminoskupina, ethylmethylaminoskupina, dimethylaminoskupina a diethylaminoskupina.

Výrazem " $\text{R}_5\text{R}_6\text{NCO-}$ " se vždy míní substituovaná nebo nesubstituovaná karbamoylová skupina, kde R_5 a R_6 mají shora uvedený význam. Jakožto příkladně tyto skupiny se uvádějí skupina karbamoylová ($\text{H}_2\text{NCO-}$) a dimethylaminokarbamoylová skupina ($\text{Me}_2\text{NCO-}$).

Výrazem " $\text{acylR}_5\text{N-}$ " se vždy míní acylaminoskupina, kde R_5 má shora uvedený význam.

Výrazem "halo" nebo "halogen" se vždy míní atom fluoru, chloru, bromu nebo jodu a výhodněji atom fluoru, chloru nebo bromu a nejvýhodněji atom fluoru nebo chloru.

Výrazem "prodroga" se vždy míní forma sloučenin obecného vzorce I, vhodná pro podání ošetřovanému jedinci bez například nepřípustné toxicity, dráždivosti nebo alergické odezvy a účinná pro záměr použití, včetně ketalové, esterové a obojetné iontové formy. Prodroga se in vivo transformuje za získání mateřské sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I, například hydrolýzou v krvi. Podrobně takové prodrogy popsal T.Higuchi a V.Stella, ("Pro-drugs as Novel Delivery Systems", svazek 14 publikace A.C.S. Symposium Series, a Edward B. Roche, vyd., "Bioreversible Carriers in Drug Design", American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987).

Výrazem "solvát" se vždy míní fyzikální spojení sloučeniny podle vynálezu s alespoň jednou molekulou rozpouštědla. Fyzikální spojení zahrnuje různý stupeň iontové a kovalentní vazby včetně vodíkové vazby. V určitých případech je solvát izolovatelný, například v případech, kdy alespoň jedna molekula rozpouštědla je včleněna do krystalové mřížky krystalické pevné látky. Jakožto příkladné solváty se uvádějí ethanoláty a methanoláty. Výrazem "hydrát" se vždy míní solvát, ve kterém je rozpouštědlem alespoň jedna molekula vody.

Výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} popřípadě substituovanou nižší alkoxykupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu; výhodnější jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} popřípadě substituovanou nižší alkoxykupinu nebo popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu; přičemž ještě výhodnější jsou podle vy-

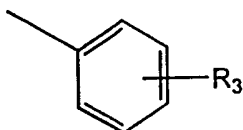
nálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} methoxyskupinu, ethoxyskupinu, 2-(ethoxy)ethoxyskupinu, 2-(4-morfoli-nyl)ethoxyskupinu nebo furanyloxyskupinu.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} atom vodíku, popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu; výhodnější jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} atom vodíku nebo popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu; přičemž ještě výhodnější jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu.

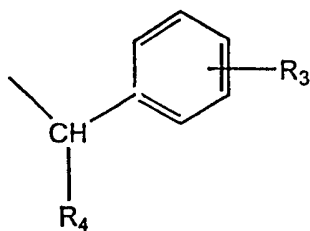
Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} a R_{1b} vždy nižší alkoxyskupinu, přičemž výhodnějšími jsou sloučeniny, kdy nižší alkoxyskupinou je methoxyskupina nebo ethoxyskupina.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1c} atom vodíku nebo popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu; výhodnější jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_{1c} atom vodíku nebo methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_2 skupinu obecného vzorce



Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_2 skupinu obecného vzorce



Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_3 atom vodíku nebo atom fluoru v orto nebo v para poloze, methylovou skupinu v meta poloze, trifluor-methylovou skupinu, methoxyskupinu, atom fluoru, chloru nebo bromu nebo karbamoylovou skupinu.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená R_4 atom vodíku nebo methylovou skupinu.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená Z_a atom dusíku.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená Z_a skupinu CH.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená Z_b iminoskupinu.

Jinými výhodnými jsou podle vynálezu sloučeniny obecného vzorce I, kde znamená Z_b atom kyslíku.

Jakožto výhodné podle vynálezu se uvádějí sloučeniny obecného vzorce I ze souboru zahrnujícího

2-anilin-6-chinoxalinol,

2-((R)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

6-anilino-6-isopropoxychinoxalin,

2-fenoxy-6-methoxychinoxalin,

(3-brombenzyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

2-(3-karbamoylfenylamino)-6-methoxychinoxalin,

2-(2-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

2-(3-trifluormethylfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

fenyl-[6-(tetrahydrofuran-3(R)-yloxy)chinoxalin-2-yl]amin,
benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)amin,
6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin,
2-anilin-6-ethoxychinoxalin,
2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin,
2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin,
2-(3-fluorfenylamino)-(6,7-diethoxychinoxalin,
(3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin a
(3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

Jakožto výhodnější se uvádění následující sloučeniny:

fenyl-[6-tetrahydrofuran-3(R)-yloxy)chinoxalin-2-yl]amin,
benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)amin,
6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin,
6-anilino-6-ethoxychinoxalin,
2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin,
2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin,
2-(3-fluorfenyl)amino)-(6,7-diethoxychinoxalin,
(3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin a
(3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin.,

Výhodnými podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I, které zahrnují kombinace všech shora uvedených výhodných a výhodnějších významů jednotlivých symbolů.

Sloučeniny obecného vzorce I se připravují způsoby z literatury o sobě známými ze známých sloučenin nebo ze snadno připravitelných meziproductů konečných sloučenin. Příklady obecných způsobů přípravy jsou dále uvedeny.

Sloučeniny obecného vzorce I se připravují způsoby objasněnými ve schéma I až VI, přičemž jsou možné obměny těchto způsobů, jak je pracovníkům v oboru známo.

Schéma I

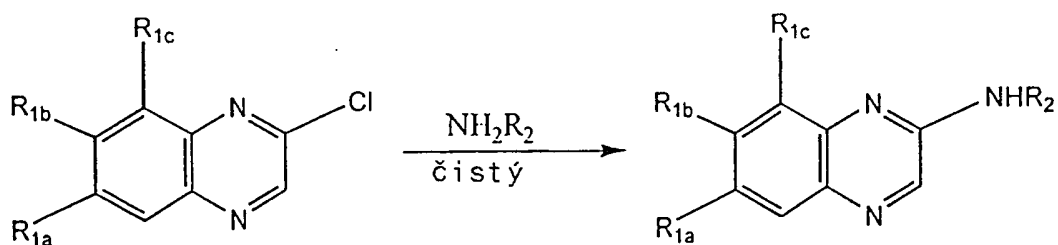


Schéma II

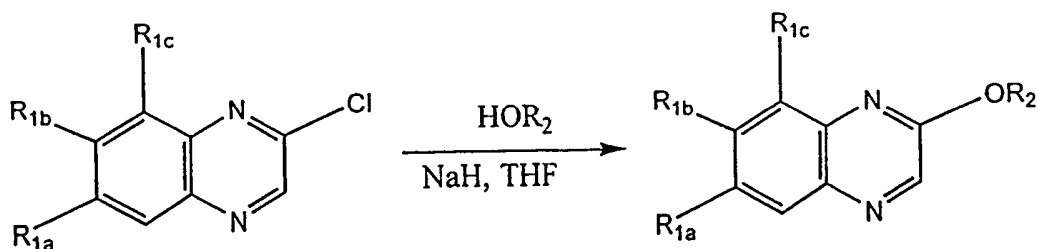


Schéma III

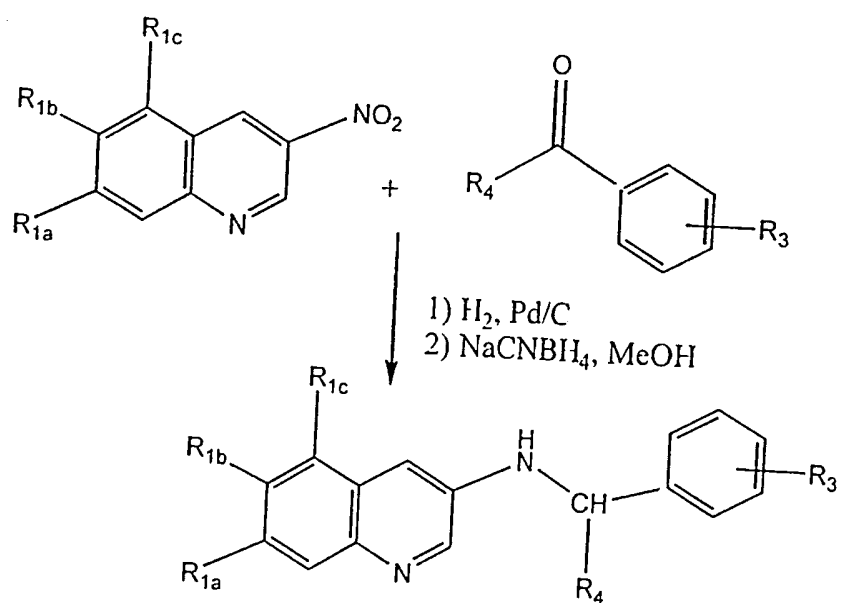


Schéma IV

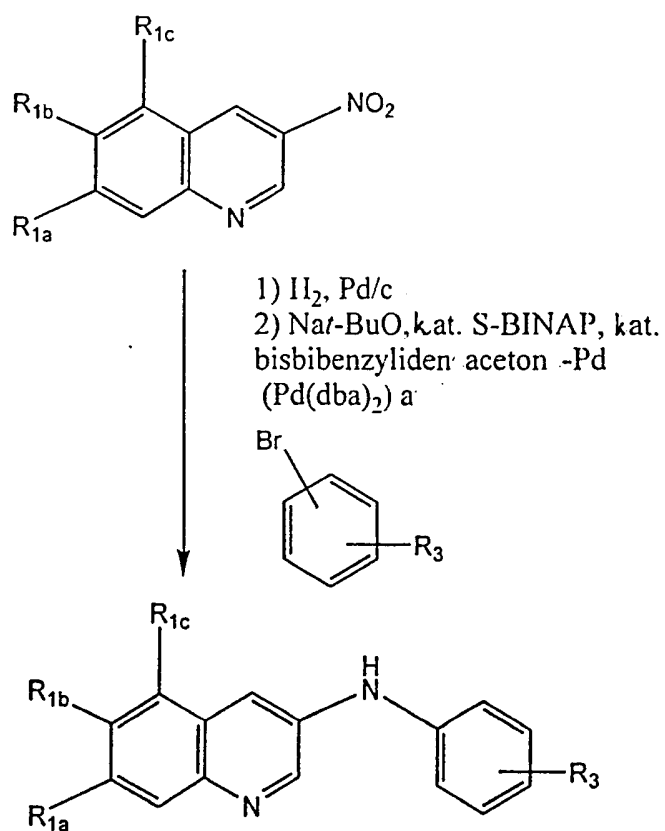


Schéma V

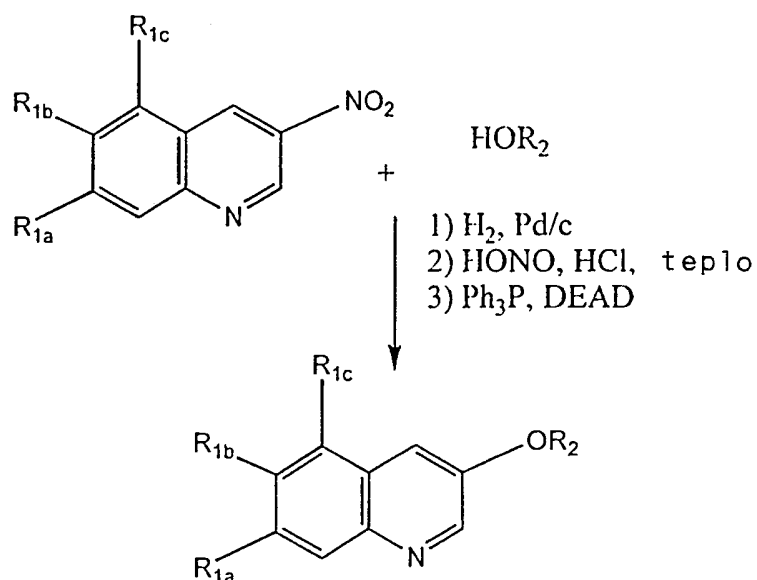
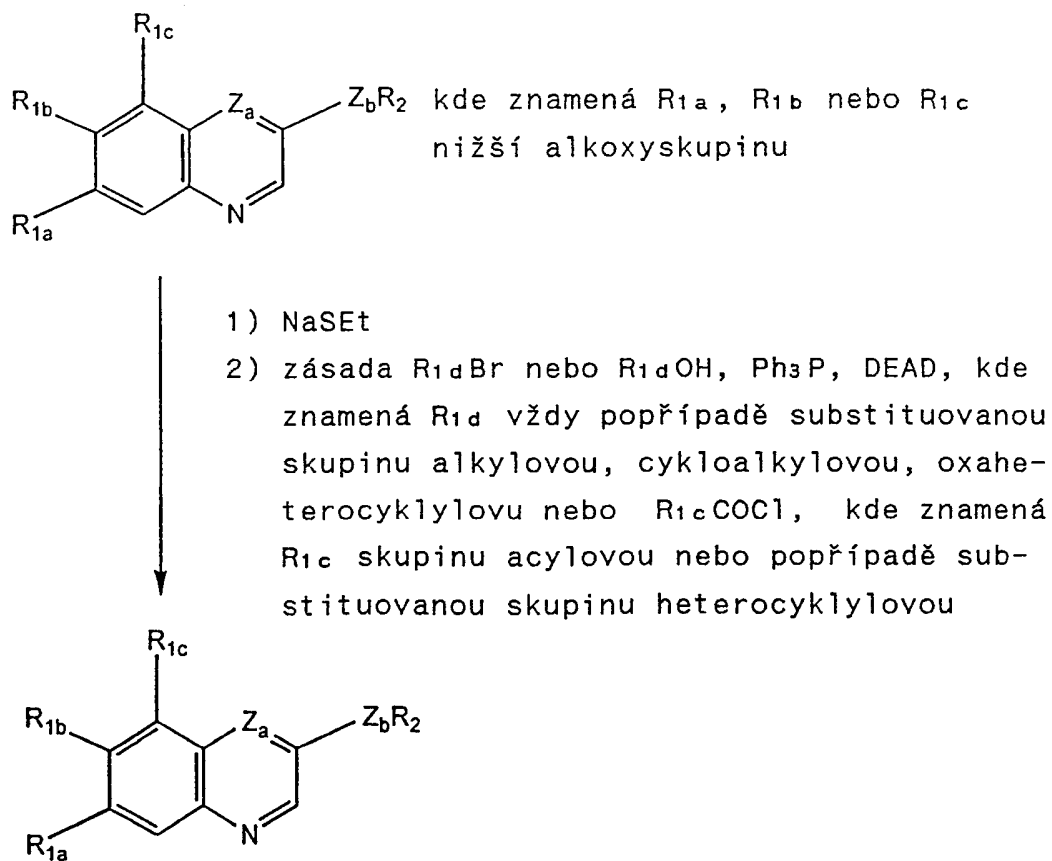


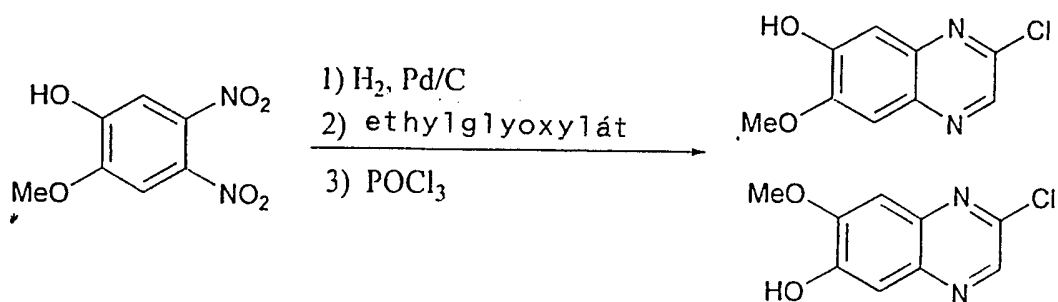
Schéma VI



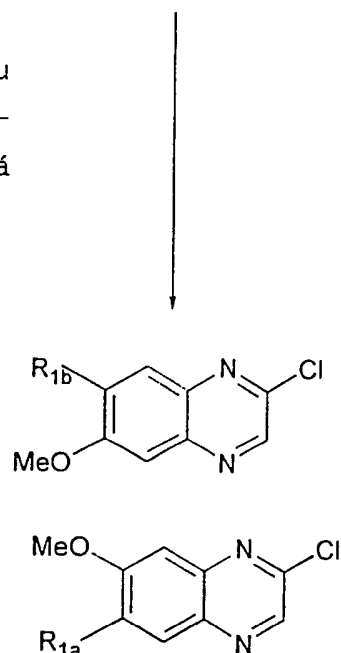
kde R_{1a} , R_{1b} nebo R_{1c} odpovídající shora uvedené nižší alkoxy-

skupině znamená nyní acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu nebo popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu

Schéma VII



zásada R_{1a}Br nebo R_{1a}OH , Ph_3P , DEAD, kde znamená R_{1a} vždy popřípadě substituovanou skupinu alkylovou, cykloalkylovou, oxaheterocyklylovou nebo R_{1c}COCl , kde znamená R_{1c} skupinu acylovou nebo popřípadě substituovanou skupinu heterocyklylovou



kde znamená kde R_{1a} , R_{1b} acyloxyskupinu popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu nebo popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu

I. Obecné způsoby

1. Kopulace v poloze 2 substituovaného chinolinu a aminů nebo anilinů

Směs 2-chlor-6,7-dimethoxychinoxalinu (1 ekv.) a aminu (přibližně 1 až přibližně 5 ekv.) se zahříváním udržuje na teplotě přibližně 160 až přibližně 180 °C po dobu přibližně tří hodin až přes noc. Tmavo hnědý zbytek se rozpustí v systému methanol/methylenchlorid (0 až 10 %) a chromatografuje se na silikagelu za použití jako elučního činidla systému hexan/ethylacetát nebo methanol/methylenchlorid (0 až 100 %), čímž se získá žádaný produkt. Tento produkt se dále čistí překrystalováním z methanolu, z methylenchloridu nebo ze systému methanol/voda.

2. Kopulace v poloze 2 substituovaného chinoxalinu a alkoholů nebo fenolů

Suspenze alkoholu nebo merkaptanu (1 ekv.) a hydridu sodného (přibližně 1 až přibližně 3 ekv.) v bezvodém systému dimethylformamid/tetrahydrofuran (0 až 50 %) se vaří pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny před přidáním 2-chlor-6,7-dimethoxychinoxalinu (1 ekv.). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu přibližně jedné až přibližně čtyř hodin. Suspenze se neutralizuje na hodnotu pH přibližně 5 až 8 a rozdělí se mezi methylenchlorid a solanku. Zbytek se po odstranění methylenchloridu chromatografuje se na silikagelu za použití jako elučního činidla systému hexan/ethylacetát nebo methanol/methylenchlorid (0 až 100 %), čímž se získá žádaný produkt.

3. Redukční aminační reakce aminochinolinů s aldehydy nebo s ketony

Vhodně substituovaný 3-aminochinolin (1 ekv.) se míchá se vhodným aldehydem nebo ketonem (1 ekv.) v methanolu (nebo v jiné vhodné rozpouštědlové směsi tak dlouho, až je podle chromatografie v tenké vrstvě vytvoření iminu ukončeno. Přidá se nadbytek natriumkyanoborhydridu nebo natriumborhydridu nebo jiného vhodného redukčního činidla a reakční směs se míchá tak dlouho, až je podle chromatografie v tenké vrstvě imin jakožto meziprodukt spotřebován. Směs se zkoncentruje a zbytek se chromatografuje se na silikagelu za použití jako elučního činidla systému hexan/ethylacetát (0 až 100 %) nebo chloroform/methanol (0 až 20 %), čímž se získá žádaný produkt.

4. Kopulační reakce v poloze 3 aminoskupinou substituovaných chinolinů a bromfenylových sloučenin

Vhodně substituovaný 3-aminochinolin (1 ekv.) se míchá s přibližně 1,4 ekvivalenty silné zásady, jako je například terc.-butoxid sodný, s 1 ekvivalentem vhodné bromfenylové sloučeniny a s katalytickým množstvím 2,2'-bis(difenylfosfin)-1,1'-binaftylu (S-BINAP) a s bis(dibenzylidenaceton)palladiem ($\text{Pd}(\text{dba})_2$) v inertním organickém rozpouštědle, jako je například toluen, v prostředí inetrního plynu, například argonu, a zahříváním se udržuje na teplotě přibližně 80 °C přes noc. Reakční směs se ochladí, zředí se rozpouštědlem, například etherem, zfiltruje se, zkoncentruje a zbytek se chromatografuje na silikagelu za použití jako elučního činidla systému 50 % ethylacetátu/hexan, čímž se získá žádaný produkt.

5. Vytváření etheru ze v poloze 3 hydroxyskupinou substituovaných chinolinů za podmínek reakce Mitsunobu

Tetrahydrofuranový roztok vhodně substituovaného hydroxichinoxalinu (o teplotě přibližně 0 až přibližně 25 °C) se zpracovává 1 ekvivalentem každého žádaného alkoholu, trifenylfosfinem a nakonec diethylazodikarboxylátem (DEAD) nebo jeho

vhodným ekvivalentem. Postup reakce se monitoruje chromatografií v tenké vrstvě až do ukončení reakce (přibližně 1 až přibližně 24 hodin), reakční směs se zkoncentruje a zbytek se chromatografuje na silikagelu, čímž se získá žádaný produkt.

6. Dealkylace nižší alkoxyskupinou substituovaného chinolinu nebo chinoxalinu a následná alkylace

Vhodně nižší alkoxyskupinou substituovaný chinolin nebo chinoxalin (1 ekv.) v dimethylformamidu se zpracovává nadbytkem natriumethanthiolátu (zpravidla přibližně 2 nebo několik ekvivalentů) a reakční směs se míchá za zahřívání po dobu přibližně 1 až přibližně 24 hodin. Reakční směs se rozdělí mezi vodu a ethylacetát. Extrakcí následovanou popřípadě chromatografií se získá odpovídající hydroxylovou skupinou substituovaný derivát chinolinu nebo chinoxalinu.

Hydroxylovou skupinou substituovaný derivát chinolinu nebo chinoxalinu se může alkylovat za podmínek reakce Mitsunobu, jak shora uvedeno. Nebo se jednoduchou alkylací o sobě známým způsobem s reaktivním alkylhalogenidem nebo benzyhalogenidem za použití hydridu sodného nebo jiné vhodné zásady ve vhodném rozpouštědle získá žádaný alkylovaný produkt.

7. Oxidace dusíku v chinolinu nebo v chinoxalinu za získání odpovídajícího N-oxidu

Iminový podíl (=N-) derivátu chinolinu nebo chinoxalinu obecného vzorce I se může převádět na odpovídající sloučeninu, kde je iminový podíl oxidován na N-oxid, s výhodou reakcí s peroxykyselinou, například s peroxyoctovou kyselinou v kyselíně octové nebo s m-chloperoxybenzoovou kyselinou v inertním rozpouštědle, jako je například dichlormethan, při teplotě odpovídající přibližně teplotě místnosti až teplotě zpětného toku, s výhodou za zvýšené teploty.

Sloučeniny podle vynálezu jsou užitečné ve formě volné zásady nebo kyseliny nebo ve formě farmaceuticky přijatelné soli. Vynález zahrnuje všechny tyto formy.

Jestliže jsou sloučeniny podle vynálezu substituovány zásaditým podílem, vytvářejí adiční soli s kyselinami a jsou jednoduchou a vhodnější formou pro použití: v praxi je použití solí častější než použití volné zásady. Kyseliny, kterých se používá pro přípravu adičních solí s kyselinou, zahrnují s výhodou kyseliny, které vytvářejí se zásadou farmaceuticky přijatelné soli, to znamená soli, jejichž aniony jsou pro pacienta netoxické při podání ve farmaceuticky účinných dávkách, takže mají příznivé inhibiční působení na PDGF příslušející volné zásadě a nevykazují vedlejší působení, které by se připisovalo aniontu. Jakkoliv se dává přednost farmaceuticky přijatelným solím uvedených zásaditých sloučenin podle vynálezu, jsou všechny adiční soli s kyselinou užitečné jakožto zdroj formy volné zásady i když určitá sůl jako taková je žádoucí pouze jakožto meziprodukt například, když se sůl připravuje pouze za účelem čištění a identifikace nebo jestliže se jí používá jakožto meziproduktu při přípravě farmaceuticky přijatelné soli způsobem iontové výměny. Farmaceuticky přijatelnými solemi podle vynálezu jsou soli odvozené od kyselin, kterými jsou minerální kyseliny, jako je například kyselina chlorovodíková, sírová, fosforečná a sulfaminová a organické kyseliny, jako je například kyselina octová, citronová, mléčná, vinná, malonová, methansulfonová, ethansulfonová, benzensulfonová, p-toluensulfonová, cyklohexylsulfamová a chinová kyselina. Jakožto odpovídající soli těchto kyselin se uvádějí příkladně: hydrohalogenidy, například hydrochlorid a hydrobromid, sulfát, fosfát, nitrát, sulfamát, acetát, citrát, laktát, tartrát, malonát, oxalát, salicylát, propionát, sukcinát, fumarát, maleát, methylen-bis- β -hydroxynafthoáty, gentisáty, mesyláty, isethionáty a di-p-toluoyltartrát, methansulfonát, ethansulfonát, benzensulfonát, p-toluensulfonát, cyklohexylsulfamát a chinát.

Vynález se dále týká adičních solí s kyselinami sloučenin podle vynálezu, připravených reakcí volné zásady se vhodnou kyselinou o sobě známými způsoby. Například se adiční soli s kyselinami sloučenin podle vynálezu připravují buď rozpouštěním volné zásady ve vodném nebo ve vodě alkoholickém roztoku nebo v jiném vhodném rozpouštědle obsahujícím příslušnou kyselinu a izolací soli odpařením rozpouštědla nebo reakcí volné zásady a kyseliny v organickém rozpouštědle, přičemž se sůl přímo oddělí nebo se může získat zkoncentrováním roztoku.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou regenerovat ze svých adičních solí s kyselinou použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů. Například se mateřská sloučenina podle vynálezu může regenerovat ze své adiční soli s kyselinou zpracováním alkálií, například vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného nebo vodným roztokem amoniaku.

Jestliže jsou sloučeniny podle vynálezu substituovány kyselým podílem, vytvářejí adiční soli se zásadami a jsou jednoduchou a vhodnější formou pro použití: v praxi je použití solí častější než použití volné kyseliny. Zásady, kterých se používá pro přípravu adičních solí se zásadou, zahrnují s výhodou zásady, které vytvářejí s kyselinou farmaceuticky přijatelné soli, to znamená soli, jejichž kationty jsou pro živočišný organismus netoxické při podání ve farmaceuticky účinných dávkách solí, takže mají příznivé inhibiční působení na PDGF příslušející volné kyselině a nevykazují vedlejší působení, které by se připisovalo kationtu. Farmaceuticky přijatelnými solemi včetně například solí s alkalickými kovy nebo s kovy alkalických zemin, podle vynálezu jsou soli odvozené od zásad, kterými jsou například hydrid sodný, hydroxid sodný, draselný, vápenatý, hlinitý, lithný, hořečnatý a hydroxid zinečnatý, amoniak, trimethylamonium, triethylamonium, ethylendiamin, n-methylglukamin, lysin, arginin, ornithin, cholin, N,N'-dibenzylethylendiamin, chlorprokain, diethanolamin, prokain, n-benzyl-

fenethylamin, diethylamin, piperazin, tris(hydroxymethyl)aminomethan a tetramethylamoniumhydroxid.

Kovové soli sloučenin podle vynálezu se mohou získat uváděním do styku hydridu, hydroxidu, uhličitanu nebo podobných sloučenin zvoleného kovu ve vodném nebo v organickém rozpouštědle se sloučeninou podle vynálezu ve formě volné kyseliny. Používaným vodným rozpouštědlem může být voda nebo to může být směs vody s organickým rozpouštědlem, s výhodou ze souboru zahrnujícího alkohol, například methanol nebo ethanol, keton, například aceton, alifatický ether, například tetrahydrofuran a ester, například ethylacetát. Takové reakce se zpravidla provádějí při teplotě okolí, mohou se však popřípadě provádět za zahřívání.

Aminové soli sloučenin podle vynálezu se mohou připravovat uváděním do styku aminu ve vodném nebo v organickém rozpouštědle se sloučeninou podle vynálezu ve formě volné kyseliny. Vhodnými vodnými rozpouštědly jsou voda a směsi vody s organickými rozpouštědly, jako jsou alkoholy, například methanol a ethanol, ethery, například tetrahydrofuran, nitrily, například acetonitril, a ketony, například aceton. Podobně se mohou připravovat soli aminokyselin.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou regenerovat ze svých adičních solí se zásadami použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů. Například se mateřská sloučenina podle vynálezu může regenerovat ze své adiční soli se zásadou zpracováním kyselinou, například kyselinou chlorovodíkovou.

Jakkoliv jsou soli sloučenin podle vynálezu užitečné jako takové, jsou soli užitečné také pro čištění sloučenin podle vynálezu například za využití rozdílu rozpustnosti solí a mateřských sloučenin, vedlejších produktů a/nebo výchozích látek o sobě známými způsoby.

Sloučeniny podle vynálezu mohou mít asymetrická centra. Tato asymetrická centra mohou mít na sobě nezávisle R nebo S konfiguraci. Pracovníkům v oboru je rovněž zřejmé, že určité sloučeniny obecného vzorce I mohou vykazovat geometrický izomerismus. Geometrické izoméry zahrnují cis a trans formy sloučenin podle vynálezu například sloučenin majících alkenylové podíly nebo substituenty na kruhu. Kromě toho bicyklické kruhové systémy zahrnují endo a exo izoméry. Vynález zahrnuje jednotlivé geometrické izoméry, stereoizoméry, enantioméry a jejich směsi.

Takové izoméry se mohou izolovat ze svých směsí použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů, například chromatografickými způsoby a překrystalováním nebo se připravují jednotlivě ze vhodných izomérů svých meziproductů, například použitím nebo přizpůsobením zde popsaných způsobů.

Výchozí látky a meziproducty se mohou připravovat použitím nebo přizpůsobením o sobě známých způsobů, například způsoby podle dále uvedených příkladů nebo jejich zřejmými ekvivalenty.

Vynález blíže objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení. Procenta jsou míněna vždy hmotnostně, pokud není uvedeno jinak.

Příklady provedení

I. Způsoby přípravy konečného produktu

Příklad 1

2-(3-Fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin

Do 0,25 g (0,989 mmol) 2-chlor-6,7-diethoxychinoxalinu se

přidají 2 ml m-fluoranilinu. Reakční směs se zahříváním přes noc v prostředí dusíku udržuje na teplotě 120 °C. Získaná směs se chromatografuje (30:1 dichlormethan/ethanol), čímž se získá částečně vyčištěný produkt. Tato získaná pevná látka se trituje s ethalacetátem, čímž se získá 0,175 g produktu v podobě hnědožluté pevné látky v 54,1% výtěžku (o teplotě tání 193 °C).

Analýza pro $C_{18}H_{18}N_3O_2F \cdot 0,25 H_2O$

vypočteno: C 65,15 H 5,62 N 12,66

nalezeno: C 65,30 H 5,30 N 12,41

Příklad 2

2-Anilino-6-methoxychinoxalinhydrochlorid

Do 2-chlor-6-methoxychinoxalinu (0,93 g, 4,8 mmol) se v prostředí argonu přidá anilin (1,3 ml, 14,3 mmol). Reakční směs se zahříváním udržuje na teplotě 120 °C po dobu dvou hodin a na teplotě 150 °C po dobu 1,5 hodin. Reakční směs se ochladí a přidá se dichlormethan. Získaná suspenze se míchá, oranžová pevná látka se odfiltruje, promyje se směsí dichlormethanu a diethyletheru a intenzivně se míchá ve vodě po dobu 40 minut, zfiltruje se a promyje se diethyletherem, čímž se získá jasně žlutá pevná látka.

Následující sloučeniny se připraví podobným způsobem ze vhodných výchozích látek:

2-(3-karbamoylfenylamino)-6-methoxychinoxalin,
teplota tání 247 °C,

analýza pro $C_{16}H_{14}N_4O_2 \cdot 0,25 H_2O$

vypočteno: C 64,31 H 4,89 N 18,75

nalezeno: C 64,24 H 5,04 N 18,75;

2-(2-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
teplota tání 184 °C,

analýza pro $C_{18}H_{18}FN_3O_2$

vypočteno: C 66,04 H 5,54 F 5,80 N 12,84
nalezeno: C 65,75 H 5,61 N 12,68;

2-(3-trifluormethylfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
teplota tání 158 °C,

analýza pro $C_{19}H_{18}N_4O_2F_3$

vypočteno: C 60,47 H 4,81 F 15,10 N 11,14
nalezeno: C 60,27 H 4,84 N 10,97;

(6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)amin,
teplota tání 133 až 135 °C,

analýza pro $C_{16}H_{15}N_3O$

vypočteno: C 72,43 H 5,70 N 15,84
nalezeno: C 72,43 H 5,79 N 15,77;

6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin,
teplota tání 152 až 153 °C,

analýza pro $C_{15}H_{13}N_3O$

vypočteno: C 71,70 H 5,21 N 16,72
nalezeno: C 71,70 H 5,16 N 16,80;

2-anilin-6-ethoxychinoxalin,
teplota tání 118 až 120 °C,

analýza pro $C_{16}H_{15}N_3O \cdot 0,63 H_2O$

vypočteno: C 69,48 H 5,92 N 15,19
nalezeno: C 69,24 H 5,97 N 15,14;

2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
teplota tání 173 °C,

analýza pro $C_{19}H_{21}N_3O_3$

vypočteno: C 67,24 H 6,24 N 12,38
nalezeno: C 67,02 H 6,23 N 12,21;

2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
teplota tání 242 °C,

analýza pro $C_{18}H_{18}N_3O_2F \cdot 0,5 H_2O$

vypočteno: C 64,27 H 5,69 N 12,49

nalezeno: C 64,21 H 5,39 N 12,24;

2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin,

teplota tání 239 °C,

(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin,

teplota tání 99 až 100 °C,

analýza pro $C_{16}H_{14}N_3O_2F$

vypočteno: C 64,21 H 4,71 F 6,35 N 14,04

nalezeno: C 64,35 H 4,61 N 13,84;

2-(3-fluorfenylamino)-(6,7-diethoxychinoxalin,

teplota tání 193 °C,

analýza pro $C_{18}H_{18}N_3O_2F \cdot 0,25 H_2O$

vypočteno: C 65,15 H 5,62 N 12,66

nalezeno: C 65,30 H 5,30 N 12,41;

(3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

teplota tání 197 až 198 °C,

analýza pro $C_{16}H_{14}BrN_3O_2$

vypočteno: C 53,35 H 3,92 Br 22,18 N 11,67

nalezeno: C 53,39 H 3,82 N 11,64;

6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin a

teplota tání 88 až 90 °C,

analýza pro $C_{16}H_{15}N_3O_2$

vypočteno: C 68,31 H 5,37 N 14,94

nalezeno: C 68,02 H 5,52 N 14,91;

(3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

teplota tání 187 až 188 °C,

analýza pro $C_{18}H_{14}ClN_3O_2$

vypočteno: C 60,86 H 4,47 Cl 11,23 N 13,31

nalezeno: C 60,85 H 4,59 N 13,26.

Příklad 3

2-Benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,

Do 0,3 g (1,19 mmol) 2-chlor-6,7-diethoxychinoxalinu se přidají 2 ml benzylaminu. Reakční směs se zahříváním přes noc udržuje v prostředí dusíku na teplotě 120 °C. Získaná směs se rozdělí mezi dichlormethan a nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného. Organická vrstva se zkoncentruje a zbytek se chromatografuje (30:1 dichlormethan/ethanol), čímž se získá 0,337 g produktu v podobě žluté pevné látky v 87,6% výtěžku (o teplotě tání 136 °C).

Analýza pro $C_{19}H_{21}N_3O_2$

vypočteno: C 70,57 H 6,54 N 12,99

nalezeno: C 70,54 H 6,66 N 12,80

Následující sloučeniny se připraví podobným způsobem ze vhodných výchozích látek:

(3-brombenzyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

teplota tání 199 až 206 °C,

analýza pro $C_{17}H_{16}BrN_3O_2$

vypočteno: C 54,56 H 4,31 Br 21,35 N 11,23

nalezeno: C 49,90 H 4,00 N 10,14;

benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,

teplota tání 210 až 214 °C,

analýza pro $C_{17}H_{17}N_3O_2$

vypočteno: C 69,14 H 5,80 N 14,23

nalezeno: C 61,78 H 5,47 N 12,64;

2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,

teplota tání 136 °C,

analýza pro $C_{19}H_{21}N_3O_2$

vypočteno: C 70,57 H 6,55 N 12,99

nalezeno: C 70,54 H 6,66 N 12,80.

Příklad 4

2-((R)- α -Methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

Do 0,3 g (1,19 mmol) 2-chlor-6,7-diethoxychinoxalinu se přidají 2 ml (R)-(+)- α -methylbenzylaminu. Reakční směs se zahříváním udržuje po dobu tří dnů v prostředí dusíku na teplotě 120 °C. Získaná směs se rozdělí mezi trichlormethan a nasycený roztok hydrogenuhličitanu sodného. Organická vrstva se koncentruje a zbytek se chromatografuje (30:1 dichlormethan/ethanol), čímž se získá 0,118 g produktu v podobě žluté pevné látky ve 29,4% výtěžku (o teplotě tání 53 až 56 °C).

Analýza pro $C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot 0,25 H_2O$

vypočteno: C 70,26 H 6,93 N 12,29

nalezeno: C 70,56 H 6,80 N 12,35

Následující sloučenina se připraví podobným způsobem ze vhodných výchozích látek:

2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
teplota tání 55 až 58 °C.

Analýza pro $C_{20}H_{23}N_3O_2 \cdot 0,25 H_2O$

vypočteno: C 70,26 H 6,93 N 12,29

nalezeno: C 70,49 H 6,89 N 12,23

Příklad 5

2,7-Bis-cyklohexyloxy-6-methoxychinoxalin

Do dimethylformamidového roztoku (5 ml) hydridu sodného (0,32 g, 8 mmol) v prostředí argonu se přidá po kapkách cyklohexanol (0,7 ml, 6,7 mmol). Směs se míchá po dobu 25 minut při teplotě místnosti a po částech se přidá 2-chlor-6,7-dimethoxychinoxalin. Reakční směs se míchá po dobu 15 minut při teplotě místnosti, při teplotě 90 °C po dobu dvou hodin a při teplotě

110 °C po dobu jedné hodiny. Reakční směs se ochladí, přidá se voda a směs se rozdělí mezi ethylacetát a vodu. Organická vrstva se promyje vodou a solankou, vysuší se síranem hořečnatým a zbytek se chromatografuje (10 % ethylacetátu/hexany), čímž se získá voskovitá bílá pevná látka (o teplotě tání 75 až 78 °C).

Analýza pro $C_{21}H_{28}N_2O_3$

vypočteno: C 70,76 H 7,92 N 7,86

nalezeno: C 70,81 H 7,79 N 7,70

Následující sloučeniny se připraví podobným způsobem ze vhodných výchozích látek:

2-fenoxy-6-methoxychinoxalin,
teplota tání 79 až 81 °C;

6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin,
teplota tání 130 až 131 °C.

Analýza pro $C_{18}H_{18}N_2O_3$

vypočteno: C 69,66 H 5,85 N 9,03

nalezeno: C 69,53 H 5,82 N 8,91

Příklad 6

Cyklohexyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-ylmethyl)amin

Do 0,067 M roztoku 6,7-dimethoxy-2-chinoxalinkarboxaldehydu ve směsi 2:1 methanolu a 1,2-dichlorethanu (7,5 ml, 0,5 mmol) se přidá cyklohexylamin (0,11 ml, 0,9 mmol). Reakční směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, přidá se natriumborhydrid (0,038 g, 1 mmol) a reakční směs se míchá přes noc. Reakční směs se zkoncentruje a zbytek se chromatografuje (50 % ethylacetátu/hexany až přibližně 5 % methanolu v systému 50 % ethylacetátu/hexany). Získaný olej se rozpustí ve směsi ethylacetátu a hexanů a zpracuje se chlorovodíkem v ethanolu.

Získaný roztok se zkoncentruje a pevná látka se trituruje s isopropanolem, čímž se po vysušení ve vakuu při teplotě 60 °C získá bílá pevná látka (o teplotě tání 185 až 190 °C).

Analýza pro $C_{17}H_{23}N_3O_2 \cdot HCl$

vypočteno: C 60,44 H 7,16 N 12,44

nalezeno: C 60,48 H 6,88 N 12,07

Příklad 7

Cyklohexyl-(6-methoxy-7-morfolin-4-ylchinoxalin-2-yl)amin

Tato příprava je založena na upraveném způsobu, který popsal Buchwald a kol. (J. Am. Chem. Soc. 118, str. 7215, 1996). Do toluenového roztoku 2-cyklohexylamino-6-methoxy-7-bromchinoxalinu (0,1 g, 0,3 mmol) v prostředí argonu se přidá morfolin (0,1 g, 0,3 mmol), terc.-butoxid sodný (0,04 g, 0,42 mmol), S-(–)-BINAP (katalyzátor, 0,001 g) a $Pd(dba)_2$ (katalyzátor, 0,001 g). Reakční směs se zahříváním udržuje na teplotě 80 °C přes noc. Reakční směs se ochladí, zředí se diethyletherem, zfiltruje se, zkoncentruje a zbytek se chromatografuje (50 % ethylacetátu/hexany až přibližně 5 % methanolu v systému 50 % ethylacetátu/hexany). Produkt se překrystaluje ze směsi ethylacetátu a hexanů, čímž se ve dvou dávkách získá žlutá pevná látka (o teplotě tání 194 až 196 °C).

Analýza pro $C_{19}H_{26}N_4O_2$

vypočteno: C 66,64 H 7,65 N 16,36

nalezeno: C 66,60 H 7,60 N 16,51

Příklad 8

3-Cyklohexyloxy-6,7-dimethoxychinolin

Do tetrahydrofuranového roztoku (30 ml) o teplotě 0 °C se vnese 3-hydroxy-6,7-dimethoxychinolin (0,237 g, 1,15 mmol), cyklohexanol (0,347 g, 3,46 mmol), trifenylfosfin (Ph_3P) (0,908 g, 3,46 mmol). Po částech se přidává diethylazodikarboxylát až do chvíle, kdy si roztok podržuje temně červené za-

barvení (0,663 g, 3,81 mmol). Po čtyřech hodinách se reakční směs zkoncentruje a zbytek se chromatografuje (50 % ethylacetátu/hexany). Produkt se překrystaluje ze směsi isopropanolu a hexanů v podobě hydrochloridové soli, čímž se získá bílá pevná látka (o teplotě tání 229 až 232 °C za rozkladu).

Příklad 9

2-Anilino-6-chinoxalino1

Způsobem, který popsal Feutrill G.I a Mirrington R.N. (Tet. Lett. str. 1327, 1970) se převádí arylmethylether na fenolový derivát. Do 2-anilino-6-methoxychinoxalinu (0,27 g, 1,07 mmol) v prostředí argonu v dimethylformamidu se přidá sodná sůl ethanthiolu (0,19 g, 2 mmol). Reakční směs se zahříváním udržuje přes noc na teplotě 110 °C. Získaná směs se zkoncentruje a rozdělí se mezi ethylacetát a vodu obsahující 5 % kyseliny vinné, takže hodnota pH vodné vrstvy je přibližně 4. Organická vrstva se promyje vodou (4 x) a pak 2,5% roztokem hydroxidu sodného (4x). Zásadité vrstvy se spojí, promyjí se ethylacetátem (2x), znovu se okyselí 5% kyselinou vinnou a promyjí se opakovanými dávkami ethylacetátu. Organické vrstvy se spojí, promyjí se solankou, vysuší se (síranem sodným) a zkoncentrují se. Získaná pevná látka se chromatografuje (50 % ethylacetátu/hexany). Analytický vzorek se získá triturováním produktu s diethyletherem jako žlutý prášek (o teplotě tání 211 až 213 °C).

Analýza pro $C_{14}H_{11}N_3O$

vypočteno:	C	70,88	H	4,67	N	17,71
nalezeno:	C	70,64	H	4,85	N	17,58

Příklad 10

Fenyl-[6-(tetrahydrofuran)-3-(R)-yloxy)chinoxalin-2-yl]amin

Do tetrahydrofuranového roztoku o teplotě 0 °C v prostře-

dí argonu se vnese 2-anilino-6-chinoxalino1 (0,23 g, 0,97 mmol), (S)-(+)-3-hydroxytetrahydrofuran (0,086 ml, 1,3 mmol) a trifenylfosfin (0,31 g, 1,2 mmol). Po částech se přidá DEAD (0,18 ml, 1,2 mmol). Reakční směs se nechá ohřát na teplotu místnosti a míchá se po dobu 1,5 hodin. Získaná směs se rozdělí mezi ethylacetát a vodu. Organická vrstva se promyje vodou, solankou, vysuší se (síranem sodným) a zkoncentruje se. Získaný žlutý olej se chromatografuje (50 % ethylacetátu/hexany) a vyjme se do systému diethylether/isopropanol (IPA). Po kapkách se přidá roztok chlorovodíkové kyseliny v diethyletheru a získaný červenooranžový prášek se vysuší ve vakuu. Prášek se převádí na volnou zásadu mícháním v methanolu a promytím (3x vodou a 5x methanolem) zásaditou ionexovou pryskyřicí. Směs se míchá po dobu 30 minut, zfiltruje se, zkoncentruje a překrystaluje se ze směsi ethylacetátu a hexanů, čímž se získá ve dvou dávkách produkt (o teplotě tání 173 až 175 °C).

Analýza pro $C_{18}H_{17}N_3O_2$

vypočteno: C 70,35 H 5,57 N 13,67

nalezeno: C 70,19 H 5,60 N 13,66

Příklad 11

2-Anilino-6-isopropoxychinoxalinhydrochlorid

Do hydridu sodného (0,033 g, 0,84 mmol) v prostředí argonu se přidá 1 ml dimethylformamidu. 2-Anilino-6-chinoxalino1 (0,1 g, 0,42 mmol) v 1,5 ml dimethylformamidu se přidá po částech. Po 30 minutách se přidá po kapkách 2-brompropan a roztok se udržuje zahříváním na teplotě 50 °C po dobu 1,5 hodin. Do ochlazené reakční směsi se přidá voda a směs se rozdělí mezi ethylacetát a vodu, promyje se vodou (3x), solankou, vysuší se (síranem sodným) a zkoncentruje se. Zbytek se chromatografuje (30 % ethylacetátu/hexany), čímž se získá 0,05 g dialkylovaného produktu a 0,1 g 2-anilino-6-isopropoxychinoxalinu. Analytický vzorek hydrochloridové soli se získá přidáním systému

IPA/HCl do diethyletherisopropanolového roztoku volné zásady za získání hydrochloridové soli (o teplotě tání 205 až 210 °C za rozkladu).

Analýza pro $C_{17}H_{17}N_3O \cdot HCl$

vypočteno: C 64,65 H 5,74 N 13,31

nalezeno: C 64,51 H 5,90 N 13,09

Příklad 12

3-Cyklohexyloxy-6,7-dimethoxychinoxalin-1-oxid

Směs 2-cyklohexyloxy-6,7-dimethoxychinoxalinu (110 mg, 0,38 mmol) a meta-chlorbenzoové peroxykyseliny (70%, 113 mg, 0,46 mmol), v 10 ml methylenchloridu se míchá při teplotě místnosti po dobu jednoho dne. Roztok se zfiltruje a zkoncentruje a zbytek se chromatografuje na silikagelu (20 % ethylacetátu/hexan) za získání žádaného produktu (o teplotě tání 167 až 169 °C). Podobně se připraví trans-4-(6,7-dimethoxy-4-oxychinoxalin-2-ylamino)cyklohexanol (o teplotě tání 220 až 222 °C).

Analýza pro $C_{16}H_{21}N_3O_4 \cdot 0,2 H_2O$

vypočteno: C 59,42 H 6,69 N 12,99

nalezeno: C 59,43 H 6,64 N 12,95

II. Způsob přípravy meziproduktů

Příklad 1

4-Brom-5-methoxybenzen-1,2-diamindihydrochlorid

Do roztoku 5-brom-4-methoxy-2-nitrofenylaminu (2,5 g, 10 mmol) v ethylacetátu (50 ml) v prostředí argonu se přidá 5% palladium na uhlí (0,5 g). Reakční směs se hydrogenuje za tlaku 345 kPa po dobu jedné hodiny. Reakční směs se zfiltruje přes Celite do systému kyselina chlorovodíková/isopropanol/et-

hylacetát a vrstva se promyje přidavným ethylacetátem. Sraženina se odfiltruje, čímž se získá bílá pevná látka.

Příklad 2

7-Brom-6-methoxychinoxalin-2-ol a 6-brom-7-methoxychinoxalin-2-ol

Do methanolu (15 ml) v prostředí argonu se přidají rozpráškové pelety hydroxidu sodného (0,86 g, 21 mmol) a 4-brom-5-methoxybenzen-1,2-diamindihydrochlorid (2,7 g, 9,3 mmol). Reakční směs se míchá po dobu 10 minut a po částech se přidá roztok 45 % ethylglyoxylátu v toluenu (2,7 g, 12 mmol). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny a ochladí se. Přidá se voda a suspenze se zfiltruje. Získaná pevná látka se postupně promyje vodou, methanolem, isopropanolem a diethyletherem, čímž se získá žlutý prášek.

Příklad 3

7-Brom-2-chlor-6-methoxychinoxalin a 6-brom-2-chlor-7-methoxychinoxalin

Do směsi 7-brom-6-methoxychinoxalin-2-olu a 6-brom-7-methoxychinoxalin-2-olu (1 g, 3,9 mmol) se přidá oxychlorid fosforečný (5 ml). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny, vlije se do ledové vody, zfiltruje se, promyje se vodou za získání světle tříslově zbarvené pevné látky. Poměr 7-brom-2-chlor-6-methoxychinoxalinu ke 6-brom-2-chlor-7-methoxychinoxalinu je přibližně 7:1 podle ^1H NMR.

Příklad 4

5-Chlor-4-methoxy-2-nitroanilin

Do roztoku N-(5-chlor-4-methoxy-2-nitrofenyl)acetamidu

(2 g, 8,2 mmol) v 5N kyselině chlorovodíkové (20 ml) se přidá 1,4-dioxan (10 ml) a směs se míchá při teplotě 60 °C po dobu 1,5 hodin. Reakční směs se zkoncentruje a rozdělí se mezi ethylacetát a 2N roztok hydroxidu sodného. Vodné vrstvy se promyjí ethylacetátem (3x), solankou, vysuší se (síranem sodným), adsorbují se na silikagelu a chromatografují se (70 % ethylacetátu/hexany), čímž se získá oranžový prášek.

Příklad 5

4-Chlor-5-methoxybenzen-1,2-diamindihydrochlorid

Do roztoku ethylacetátu (25 ml) a 5-chlor-4-methoxy-2-nitrofenylaminu (1,6 g, 7,9 mmol) se v prostředí argonu přidá 5% palladium na uhlí (0,5 g). Reakční směs se hydrogenuje za tlaku 345 kPa po dobu jedné hodiny. Reakční směs se zfiltruje v prostředí dusíku přes Celite do systému 1N kyselina chlorovodíková/diethylether v ethylacetátu a vrstva se promyje přídatným ethylacetátem. Sraženina se odfiltruje, čímž se získá bílá pevná látka.

Příklad 6

7-Chlor-6-methoxychinoxalin-2-ol a 6-chlor-7-methoxychinoxalin-2-ol

Do roztoku 4-chlor-5-methoxybenzen-1,2-diamindihydrochloridu (1,8 g, 7,2 mmol) v ethanolu (15 ml) v prostředí argonu se přidá TEA (2,5 ml, 18 mmol) o teplotě 0 °C. Reakční směs se míchá po dobu 20 minut a po částech se přidá roztok 45 % ethylglyoxalátu v toluenu (2,1 g, 9,3 mmol). Reakční směs se nechá ohřát na teplotu místnosti, vaří se pod zpětným chladičem po dobu 1,5 hodin a ochladí se, přidá se voda a suspenze se zfiltruje. Získaná pevná látka se postupně promyje vodou, isopropanolem a diethyletherem, čímž se získá lehce žlutý prášek.

Produkt se několikrát azeotropicky destiluje s toluenem a před použitím se vysuší ve vakuu.

Příklad 7

2,7-Dichlor-6-methoxychinoxalin a 2,6-dichlor-7-methoxychinoxalin

Do směsi 7-chlor-6-methoxychinoxalin-2-olu a 6-chlor-7-methoxychinoxalin-2-olu (1 g, 4,7 mmol) se v přítomnosti trubičky s chloridem vápenatým přidá oxychlorid fosforečný (5 ml). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu 30 minut, vlije se do studeného nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, zfiltruje se, promyje se vodou za získání pevné látky. Poměr 2,7-dichlor-6-methoxychinoxalinu ke 2,6-dichlor-7-methoxychinoxalinu je přibližně 6:1 podle ^1H NMR.

Shora popsané sloučeniny obecného vzorce I inhibují proliferaci buněk a/nebo vytváření buněčné matrice a/nebo pohyb buněk (chemotaxis) tím, že inhibují aktivitu PDGF-R tyrosinkinázy. Velký počet chorobných stavů je způsobován buď neřízenou reprodukcí buněk nebo nadprodukcí matrice nebo špatně řízenou programovanou smrtí buněk (apoptosis). Tyto chorobné stavy zahrnují různé typy buněk a zahrnují poruchy, jako jsou leukémie, rakovina, glioblastom, lupénka, zánětlivá onemocnění, nemoci kostí, fibrotická onemocnění, ateroskleróza, ke kterým dochází následně po angioplastii koronárních, femorálních nebo ledvinových arterií nebo po fibroproliferativních nemocech, jako jsou artritida, fibróza plic, ledvin a jater. Zvláště PDGF a PDGF-R se uvádějí jako problémy ve specifických typech rakovin a nádorů, jako jsou rakovina mozku, vaječníků, tlustého střeva, prostaty, plic, Laposi sarkom a maligní melanom. Kromě toho dochází k podmínkám deregulované buněčné proliferace po chirurgii koronárního bypassu. Inhibice aktivity tyrosinkinázy je pravděpodobně užitečná ke kontrole nekontrolované reproduk-

ce buněk nebo nadprodukce matrice nebo špatně řízené programované smrti buněk (apoptosis).

Vynález se týká modulace a/nebo inhibice signalizace buněk, proliferace buněk a/nebo produkce buněčné matrice a/nebo pohybu buněk (chemotaxis), řízení abnormálního růstu buněk a zánětlivé odezvy. Zvláště se vynález týká použití substituovaných chinolinových a chinoxalinových sloučenin, které vykazují selektivní inhibici diferenciaci a proliferaci buněk, produkci buněčné matrice, pohybu buněk (chemotaxis) nebo mediátorového uvolňování efektivní inhibicí od destiček odvozeného růstového faktorové receptorové (PDGF-R) tyrosinkinázové aktivity.

Iniciace autofosforylace to je fosforylace růstového faktorového receptoru jako taková a fosforylace hostujících intracelulárních substrátů jsou některými biochemickými jevy zahrnutými v signalizaci buněk, v proliferaci buněk, v produkci buněčné matrice, v pohybu buněk (chemotaxis) a v uvolňování mediátoru.

Pro efektivní inhibici aktivity Lck tyrosinkinázy jsou sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu užitečné pro ošetřování odporu k transplantaci a autoimunních nemocí, jako jsou rheumatoidní artritida, roztroušená skleróza a systémový lupus erythematosus, odmítání transplantátů, nemoci způsobené vztahem štěpu a hostitele, hyperproliferativní poruchy, například nádory a lupénka a nemoci, při kterých buňky přijímají prozánětlivé signály jako jsou asthma, zánětlivá nemoc střev a pankreatitida. Při ošetřování resistance k transplantátům se sloučeniny obecného podle vynálezu mohou používat buď profylakticky nebo v odezvě na nepříznivou reakci lidského subjektu k transplantovanému orgánu nebo tkáni. Při profylaktickém používání se sloučenina podle vynálezu podává pacientovi nebo tkáni nebo orgánu, které se mají transplantovat, před transplantací operací. Profylaktické ošetření může také zahrnovat

podávání léku po transplantační operaci avšak dříve, než dojde k signálům nepříznivé reakce na transplantaci. Při podání za odezvy na odmítací reakci se sloučenina podle vynálezu podává přímo pacientovi k ošetření resistance na transplantaci po výskytu signálů resistance.

Vynález se dále týká způsobu ošetřování pacientů trpících stavy, které se mohou zmírnit nebo kterým se může předcházet podáním inhibitoru aktivity PDGF-R tyrosinkinázy a/nebo aktivity Lak tyrosinkinázy, například stavů shora popsaných, přičemž se pacientům podává účinné množství sloučeniny podle vynálezu nebo prostředku, který obsahuje sloučeninu podle vynálezu nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl. Způsobem ošetřování se vždy míní jak profylaktická terapie tak ošetřování již vyvolaných stavů.

Vynález se rovněž týká farmaceutických prostředků, které obsahují farmaceuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem, například s pomocným činidlem, s ředidlem, s povlakem a s excipientem.

Sloučeniny nebo prostředky podle vynálezu se mohou podávat jakýmkoliv vhodným způsobem například inhalací, topicky, parenterálně, rektálně nebo orálně, výhodněji orálně. Specifičtější cesty zahrnují podání intravenózní, intramuskulární, subkutánní, intraokulární, intrasynoviální, prostřednictvím střev, peritoneální, transepitheliální včetně transdermálního, oftalmického, sublinguálního, bukalního, dermálního, okulárního, nosální inhalací vdechováním a aerosolového.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou mít formu umožňující podání nejvhodnější cestou a vynález zahrnuje farmaceutické prostředky obsahující alespoň jednu sloučeninu podle vynálezu, která je vhodná jako léčivo pro pacienta. Tyto prostředky se mohou připravovat o sobě známými způsoby za použití alespoň

jedné farmaceuticky přijatelné pomocné látky a excipientu. Jakožto tato pomocná činidla se příkladně uvádějí ředidla, sterilní vodné prostředí a různá netoxická organická rozpouštědla. Farmaceutické prostředky mohou mít formu tablet, pilulek, prášků, vodných roztoků nebo suspenzí, vstřikovatelných roztoků, elixírů nebo sirupů a mohou obsahovat pro získání farmaceuticky vhodného prostředku jedno nebo několik činidel ze souboru zahrnujícího sladidla například sacharózu, laktózu, fruktózu, sacharin nebo Nutrasweet[®], ochucovací přísady například pepermintový olej, libavku položenou nebo aroma šery nebo aroma pomerančové, barviva, stabilizátory jako methylparaben nebo ethylparaben.

Volba nosiče a farmaceuticky účinné látky v nosiči se obecně řídí rozpustností a chemickými vlastnostmi produktu, zvláště způsobem podávání a účelem farmaceutické praxe. Například excipienty jako laktóza, citrát sodný, uhličitán vápenatý, dikalciumfosfát a rozptylovací činidla jako škrob, alginové kyseliny a určité komplexy silikagelu v kombinaci s mazadly, jako se stearátem hořečnatým, s natriumlaurylsulfátem a s mastkem se mohou používat například pro přípravu tablet, pastilek a kapslí. Pro přípravu kapslí je výhodné používat laktózu a kapalné nosiče, jako jsou vysokomolekulární polyethylenglykoly. Fyzikální forma dávkovací jednotky může obsahovat různé jiné materiály, jako jsou povlaky nebo jiné látky, které dávkovací jednotku modifikují. Například se tablety, pilulky nebo kapsle mohou povlékat šelakem a/nebo cukrem. Pokud se používá vodných suspenzí mohou tyto suspenze obsahovat emulgační činidla nebo činidla usnadňující suspendování. Mohou se také používat ředidla, například sacharóza, ethanol, polyol jako polyethylenglykol, propylenglykol a glycerol a chloroform nebo jejich směsi. Kromě toho se účinná látka může zapracovávat do prostředků s trvalým uvolňováním účinné látky.

Pro orální podání se účinná látka může podávat například

s inertním ředidlem nebo s asimilovatelným požitelným nosičem nebo se může zapouzdřit do tvrdých nebo do měkkých želatinových kapslí, nebo se může slisovávat na tablety, nebo se přímo může vnášet do potraviny nebo se může vnášet do excipientu a používat ve formě stravitelných tablet, buklálních tablet, pilulek, kapslí, elixírů, suspenzí, sirupů a oplatek.

Pro parenterální podání se používá emulzí, suspenzí nebo roztoků sloučenin podle vynálezu v rostlinném oleji, například v oleji sezamovém, pozemnicovém nebo olivovém nebo vodně organických roztoků, jako jsou voda nebo propylenglykol, vstřikovatelné organické estery, například ethyloléat, jakož také sterilních vodných roztoků farmaceuticky přijatelných solí. Vstřikovatelné roztoky musí být tekuté do té míry, aby se snadno vstřikovaly a vhodná tekutost se může udržovat například použitím povlaků, jako je lecithin, udržováním vhodné velikosti částic v případě disperzí a použitím povrchově aktivních činidel. Prodloužené absorpce vstřikovatelných prostředků se může dosahovat použitím činidel zpomalujících absorpci, například monostearátu hlinitého a želatiny. Roztoky solí sloučenin podle vynálezu jsou zvláště užitečné pro podání intramuskulárním nebo subkutánním vstřikováním. Roztoky účinné látky ve formě volné zásady nebo ve formě farmaceuticky přijatelné soli se mohou připravovat ve vodě vhodně míšením s povrchově aktivním činidlem, jako je hydroxypropylcelulóza. Disperze se může připravovat v glycerolu v kapalných polyethylenglykolech a v jejich směsích a v olejích. Vodné roztoky, zahrnující také roztoky solí v čisté destilované vodě, se mohou používat pro intravenózní podávání za podmínky, aby hodnota pH byla vhodně nastavena, takže se pufrují a dodává se jím isotonicita dostatečným množstvím glukózy nebo chloridu sodného a sterilují se zahřátím, ozářením, mikrofiltrací a/nebo různými antibakteriálními a antifugálními činidly například parabeny, chlorbutanolem, fenolem, kyselinou sorbovou a thimerosalem.

Sterilní vstřikovatelné roztoky se připravují začleňováním aktivní sloučeniny podle vynálezu v požadovaném množství do vhodného rozpouštědla s různými jinými složkami, shora uvedenými, filtrací a sterilací. Obecně se disperze připravují včleňováním sterilizovaných aktivních složek do sterilního nosiče, který obsahuje bázecké disperní prostředí a požadované jiné složky, shora uvedené. V případě sterilních prášků pro přípravu sterilních vstřikovatelných roztoků je výhodným způsobem přípravy vakuové sušení a vymrazovací sušení, přičemž se získá prášek účinné látky plus jakékoliv další žádané složky z předem sterilně zfiltrovaného roztoku.

Pro topické podávání se mohou používat gely (na vodné nebo alkoholové bázi), krémy, masti obsahující sloučeniny podle vynálezu. Sloučeniny podle vynálezu se také mohou začleňovat do gelu nebo matrice pro náplasti, které umožňují řízené uvolňování sloučeniny podle vynálezu transdermální bariérou.

Pro podání inhalací se sloučeniny podle vynálezu mohou rozpouštět nebo suspendovat ve vhodném nosiči pro použití jako aerosolové mlhy nebo suspenze nebo roztoky nebo se mohou absorbovat nebo adsorbovat na vhodném pevném nosiči pro použití v inhalátoru suchých prášků.

Pevné prostředky pro rektální podání zahrnují čípky, vyráběné o sobě známým způsobem, a obsahující alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu se také mohou formulovat tak, aby odolávaly rychlému uvolňování z vaskulárních (arteriálních nebo venozních) stěn vedením nebo difuzí a tím se prodloužila doba působení na viry v žádaném místě. Nahodilé depotní místo uložení sloučeniny podle vynálezu se může volit pro prostředky s trvalým působením. Takovým užitečným depotním místem pro podávání sloučeniny podle vynálezu může

být kopolymerní matrice, jako například polyethylenvinylacetátový nebo polyvinylalkoholový gel opláštěný Silasticem. Nebo se sloučenina podle vynálezu může uvolňovat lokálně z silikonového polymeru nahodile implantovaného.

Alternativním přístupem pro minimalizaci vymývání sloučenin podle vynálezu v průběhu perkutanního nebo transvaskulárního uvolňování je použití nedifuzovatelných mikročástic uvolňujících účinnou látku. Mikročástice mohou obsahovat nejrůznější syntetické polyméry, jako jsou například přírodní látky včetně proteinů a polysacharidů. Takové mikročástice umožňují strategickou manipulaci faktorů, jako jsou celková dávka drogy a kinetika jejího uvolňování. Mikročástice se mohou účinně vstříkovat do arteriové nebo venózní stěny prostřednictvím porézního balónkového katetheru nebo balónkového stentu a zůstávají ve venózní stěně a v nahodilé tkáni po dobu alespoň dvou týdnů. Farmaceutické prostředky a metodiku místního, intravaskulárního, pro místo specifického uvolňování terapeutického činidla popsal Reissen a kol. (J. Am. Coll. Cardiol. 23, str. 1234 až 1244, 1994).

Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou také obsahovat hydrogel, který se připravuje z jakéhokoliv biokompatibilního nebo netoxického (homo nebo hetero)polymeru, jako je například hydrofilní polymerní polyakrylová kyselina, která působí jako absorpční houba. Takové polymery jsou popsány například ve světovém patentovém spise číslo WO 93/08845. Obchodně jsou výhodné určité takové polymery zvláště polymery na bázi ethylenoxidu a/nebo propylenoxidu.

Při použití sloučenin podle vynálezu pro ošetřování patologických stavů, které souvisejí s hyperproliferativními poruchami, se sloučeniny podle vynálezu mohou podávat různými způsoby. Například při ošetřování restenózy se sloučeniny podle vynálezu podávají přímo do stěny krevních cév angioplasto-

vým balónkem, který je povlečený hydrofilním filmem (například hydrogelem), který je nasycen sloučeninou podle vynálezu nebo jakýmkoliv jiným katheterem obsahujícím infuzní komoru pro sloučeninu podle vynálezu, která se tak aplikuje přesným způsobem na místo, které se má ošetřovat za umožnění, aby se sloučenina podle vynálezu uvolňovala lokálně a účinně na místě ošetřovaných buněk. Způsob tohoto podávání umožňuje uvádět sloučeniny podle vynálezu rychle do styku s buňkami, které se mají ošetřovat.

Způsob podle vynálezu je s výhodou založen na zavádění sloučeniny podle vynálezu na ošetřované místo. Například se hydrogel, obsahující sloučeniny podle vynálezu, může zavádět přímo na povrch ošetřované tkáně, například při chirurgickém zásahu. S výhodou se hydrogel zavádí na žádané intravaskulární místo povlečením katheteru, například balónkového katetheru a uvolňováním do cévní stěny s výhodou při angioplastce. Obzvláště s výhodou se nasycený hydrogel zavádí na ošetřované místo balónkovým katheterem. Balónek může být opatřen ochranným obalem když se katheter blíží k cílové cévě, aby se minimalizovalo vymývání drogy po zavedení balónku do krevního řečiště.

Jiné provedení vynálezu zahrnuje podávání sloučeniny podle vynálezu perfuzními balónky. Perfuzní balónky, které umožňují udržovat krevní řečiště a tak snižovat nebezpečí ischemie myokardu, na základě inflace balónku, také umožňují, aby se sloučenina podle vynálezu uvolňovala místně za normálního tlaku po poměrně dlouhou dobu, delší než 20 minut, což je nutné pro optimální působení. Nebo se může používat kanálkového balónkového katheteru ("channelled balloon catheter", Mansfield Medical, Boston Scientific Corp., Watertown, MA). Kanálkový balónkový katheter sestává z běžného balónku pokrytého vrstvou 24 perforovaných kanálků, které jsou perfundovány prostřednictvím na sobě nezávislých lumenů přídavným infuzním otvorem. Různé typy balónkových katheterů, například zdvojené balónky,

porézní balónky, mikroporézní balónky, kanálkové balónky, balónky přes stent a hydrogelový katheter se mohou používat podle vynálezu a popsal je Reissen a kol. (J. Am. Coll. Cardiol. 23, str. 1234 až 1244, 1994).

Použití perfuzního balónkového katheteru je obzvláště výhodné, jelikož se udržuje balónek nafouknutý po delší dobu, přičemž se současně dosahuje snadnost pohybu a specifické umístění hydrogelu.

Vynález se rovněž týká farmaceutického prostředku obsahujícího sloučeninu podle vynálezu a poloxamer, například Poloxamer 407, což je netoxický biokompatibilní polyol obchodně dostupný (BASF, Parsippany, NJ).

Poloxamer, napuštěný sloučeninou podle vynálezu, se může ukládat přímo na povrch ošetřované tkáně, například při chirurgickém zásahu. Poloxamer má v podstatě stejné výhody jako hydrogel, přičemž má nižší viskozitu.

Použití kanálkového balónkového katheteru s poloxamérem napuštěným sloučeninou podle vynálezu je obzvláště výhodné, jelikož se udržuje balónek nafouknutý po delší dobu, přičemž se současně dosahuje snadnost pohybu a specifické umístění poloxaméru.

Procentový obsah sloučeniny podle vynálezu ve farmaceutickém prostředku se může měnit pro vhodné dávkování. Je samozřejmé, že různé dávkovací formy se mohou podávat v přibližně stejné době. Používanou dávku stanovuje lékař nebo kvalifikovaný zdravotnický personál a tato dávka závisí na žádaném terapeutickém působení, na cestě podání, na délce ošetřování a na stavu pacienta. V případě dospělých jedinců je dávkou obecně přibližně 0,001 až přibližně 50, s výhodou přibližně 0,001 až přibližně 5 mg/kg tělesné hmotnosti za den pro inhalování,

přibližně 0,01 až přibližně 100, s výhodou přibližně 0,1 až přibližně 70 a především 0,5 až 10 mg/kg tělesné hmotnosti za den pro orální podání a přibližně 0,001 až přibližně 10, s výhodou přibližně 0,01 až přibližně 10 mg/kg tělesné hmotnosti za den pro intravenozní podání. V každém jednotlivém případě se dávka stanovuje podle charakteristik ošetřovaného pacienta, jako je jeho věk, hmotnost, obecný zdravotní stav a další faktory, které mohou být ovlivňovány sloučeninou podle vynálezu.

Sloučeniny a farmaceutické prostředky podle vynálezu se mohou podávat tak často, jak je potřebné k dosažení žádaného terapeutického působení. Někteří pacienti vykazují rychlou odezvu na vyšší nebo nižší dávky a mohou pro ně být přiměřené nižší dávky. Pro jiné pacienty může být nutné dlouhodobé ošetřování jednou až čtyřmi dávkami za den podle fyziologických potřeb určitého pacienta. Obecně se účinná látka může podávat orálně jednou až čtyřikrát denně. Pro jiné pacienty stačí jedna nebo dvě dávky za den.

Sloučeniny podle vynálezu se také mohou formulovat spolu s jinými účinnými látkami nebo zároveň s terapeutickými technikami zaměřenými na farmakologický stav, který se má zmírňovat podáním sloučeniny podle vynálezu, jak je dále podrobně vysvětleno.

Sloučeniny podle vynálezu se používají pro ošetřování restenózy po angioplastice za použití zařízení, jako je balóněk, ablací nebo laserovou technikou. Sloučeniny podle vynálezu se používají pro ošetřování restenózy po zavedení stentu do vaskulatury buď jako 1) primární ošetření vaskulárního bloku nebo 2) v případě, kdy se při angioplastice používá jakéhokoli zařízení selhávajícího v poskytnutí arterie. Sloučeniny podle vynálezu se mohou podávat buď orálně, parenterálně nebo topicky za použití speciálních zařízení nebo vhodně formulovaného povlaku na stentu.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou používat pro ošetřování restenózy spolu s jakýmkoliv antikoagulantem, činidlem proti destičkám, antithrombotikem nebo profibrinolytickým činidlem. Pacienti se často současně ošetřují před intervenčními zásahy, v jejich průběhu nebo po nich činidly uvedených tříd buď pro bezpečné provedení intervenčního zásahu nebo pro předcházení nepříznivého vytváření thrombu. Jakožto některé příklady antikoagulantů, činidel proti destičkám, antithrombotik nebo profibrinolytických činidel se uvádějí jakékoliv formulace heparinu, nízkomolekulárních heparinů, pentasacharidů, fibrinogenových receptorových antagonistů, thrombinových inhibitorů, inhibitorů faktoru Xa nebo inhibitorů faktoru VIIa.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou používat s jakýmikoliv činidly proti vysokému tlaku nebo s činidly regulujícími cholesterol nebo lipid při ošetřování restenózy nebo atherosklerózy, současně s ošetřováním vysokého krevního tlaku nebo atherosklerózy. Jakožto některé prostředky užitečné pro ošetřování vysokého krevního tlaku se uvádějí sloučeniny následujících tříd: β -blokátory, ACE inhibitory, antagonisty vápníkových kanálků a α -receptorové antagonisty. Jakožto některé prostředky užitečné pro ošetřování zvýšených hladin cholesterolu nebo pro řízení hladin lipidů se uvádějí sloučeniny známé jako HMGCoA reduktázové inhibitory a sloučeniny fibrátové třídy.

Sloučeniny podle vynález se mohou používat pro ošetřování různých forem rakoviny jak samotné tak spolu se sloučeninami známými pro ošetřování rakoviny.

Vynález zahrnuje takové kombinace sloučenin podle vynálezu s alespoň jednou shora zmíněnou účinnou látkou.

Sloučeniny podle vynálezu vykazují výrazné terapeutické působení podle testů, popsaných v literatuře, přičemž vykazují farmakologickou aktivitu pro lidi i jiné savce. Následně se u-

vádějí výsledky testů in vitro a in vivo pro charakteristické sloučeniny podle vynálezu.

Příprava farmaceutických prostředků a farmakologické testy

Sloučeniny podle vynálezu vykazují významnou aktivitu jako proteinové tyrosinkinázové inhibitory a mají terapeutickou hodnotu jako činidla bránící proliferaci buněk pro ošetřování určitých stavů jako je lupénka, atheroskleróza a potíže při restenóze. Sloučeniny podle vynálezu modulují a/nebo inhibují podněty a/nebo proliferaci buněk a/nebo produkci matrice a/nebo chemotaxi a/nebo zánětlivou odezvu buněk a může se jich používat pro prevenci nebo oddálení výskytu nebo návrat takových stavů nebo pro jiná ošetřování.

Ke stanovení účinnosti sloučenin podle vynálezu se používají farmakologické testy dále popsané, které jsou v oboru zavedeny a jsou vhodné pro porovnávání farmakologické aktivity v případě savců. Sloučeniny podle vynálezu se podrobují různým testům a výsledky se porovnávají se zřetelem na mediátorovou aktivitu se zřetelem na diferenciaci buněk. Výsledky testů pracovníkům v oboru poskytují dostatečné informace o farmakologických a medicínálně chemických vlastnostech pro stanovení parametrů použití studovaných sloučenin pro terapeutické účely.

1. PDGF-R tyrosinkinázový autofosforylační ELISA test

Zkouška se provádí způsobem, který popsal Dolle a kol. (J. Med. Chem. 37, str. 2627, 1994) avšak za použití buněčných lysátů odvozených od buněk lidského aortového hladkého svalstva (HAMSC), jak dále popsáno.

2. Obecný postup testu mitogenéze

a) Buněčná kultura

Buňky lidského aortového hladkého svalstva (pasáž 4 až 9) se vnesou do 96 důlkové destičky v růstovém prostředí v množství 6000 buněk/důlek a nechají se růst dva až tři dny. Při přibližně 85% slinutí se růst buněk zastaví prostředím prostým séra (SFM).

b) Test mitogenéze

Prostředí se odstraní 24 hodin po odebrání séra a nahradí se systémem testovaná sloučenina/nosič v SEM (200 μ l/důlek). Sloučeniny se solubilizují v buněčné kultuře DMSO ve množství 10 mM a další ředění se provede v SFM.

Po 30 minutách předinkubace se sloučeninou se buňky stimulují PDGF v množství 10 ng/ml. Stanovení se provede duplicitně se stimulovanými a s nestimulovanými důlky pro každou koncentraci sloučeniny. Po čtyřech hodinách se přidá 1 μ Ci³H thimidinu na důlek.

Kultivace se ukončí 24 hodin po přidání růstového faktoru. Buňky se ošetří trypsinem a shromáždí se na filtrační vrstvě za použití automatizovaného zařízení pro oddělení buněk (Wallac MachII96). Filtrační vrstva se čítá na scintilačním čítači (Wallac Betaplate) ke stanovení značené začleněné DNA.

3. Testy chemotaxe

Buňky lidského aortového hladkého svalstva (HASMC) z počátečních pasáží se získají z TTCC. Buňky se nechávají růst v Clonetics SmGM 3 SingleQuots (používají se prostředí a buňky z pasáže 4 až 10). Při 80% slinutí se do prostředí přidá fluorescentní sonda, calcein AM (5mM, molekulární sonda) a buňky se inkubují po dobu 30 minut. Po promytí HEPES pufovanou solankou se buňky zpracují trypsinem a neutralizují se MCDB 131 puforem (Gibco) a 0,1 % BSA, 10 mM glutaminu a 10% zárodečným

hovězím sérem. Po odstředění se buňky promyjí několikrát a znova se suspendují v témže pufru bez hovězího zárodečného séra za 30000 buněk/50 ml. Buňky se inkubují s různými koncentracemi sloučenin podle vynálezu (konečná DMSO koncentrace je 1%) po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Pro testování chemotaxe se používá 96 důlkové destičky s modifikovanými komůrkami (Neuroprobe Inc.) a polykarbonátová membrána s průměrem pórů 8 mm (Poretics, CA). Membrána je povlečena kolagenem (Sigma C3657, 0,1 mg/ml). PDGF-ββ (3 ng/ml) v pufru se sloučeninou obecného vzorce I a bez ní se umístí do nižší komůrky. Buňky (30000) s inhibitorem a bez inhibitoru se umístí do horní komůrky. Buňky se inkubují po dobu čtyř hodin. Filtrační membrána se odstraní a buňky na horní straně membrány se odstraní. Po usušení se stanovuje fluorescence za použití zařízení Cytofluor II (Millipore) při excitační/emisní délce vln 485/530 nm. Při každém testu se posuzuje střední migrace buněk ze šesti pokusů. Procentová inhibice se stanovuje z DMSO zpracovaných kontrolních hodnot. Z pěti bodů inhibice závislé na koncentraci se vypočte hodnota IC₅₀. Výsledky se udávají jako střed pěti zkoušek ± SEM.

4. Čištění EGF receptoru

Čištění EGF receptoru je založeno na způsobu, který popsal Yarden a Schlessinger. Buňky A431 se nechají růst v baňkách 80 cm² do slnutí (2 x 10⁷ buněk na baňku). Buňky se promyjí dvakrát PBS a shromáždí se s PBS obsahujícím 11,0 mmol EDTA (jedna hodina při teplotě 37 °C) a odstřeďují se při 600 g po dobu 10 minut. Buňky se solubilizují v 1 ml (na 2 x 10⁷ buněk) studeného solubilizačního pufru (50 mmol, pufr Hepes, hodnota pH 7,6, 1 % Triton X-100, 150 mmol chloridu sodného, 5 mmol EGTA, 1 mmol PNSF, 50 mg/ml aprotininu, 25 mmol benzamidu, 5 mg/ml leupepticu a 10 mg/ml sojového trypsinového inhibitoru) po dobu 20 minut při teplotě 4 °C. Odstřeďuje se při 100000 g po dobu 30 minut, supernatant se vnese na WGA-agaró-

zový sloupec (100 ml náplňové pryskyřice na 2×10^7 buněk) a protřepává se po dobu dvou hodin při teplotě 4 °C. Neabsorbovaný materiál se odstraní a pryskyřice se promyje dvakrát pufr^{em} HTN (50 mmol Hepes, hodnota pH 7,6, 1 % Triton X-100, 150 mmol chloridu sodného), dvakrát pufr^{em} HTN obsahujícím 1M chlorid sodný a dvakrát pufr^{em} HTNG (50 mmol Hepes, hodnota pH 7,6, 1 % Triton X-100, 150 mmol chloridu sodného a 10 % glycerolu). Receptor EGF se eluuje po částech s pufr^{em} HTNG obsahujícím 0,5 M A-acetyl-D-glukosaminu (200 ml na 2×10^7 buněk). Eluovaný materiál se uloží v podílech při teplotě -70 °C a zřěduje se před použitím pufr^{em} TMTNG (50 mmol Tris-Mes pufru, hodnota pH 7,6, 1 % Triton X-100, 150 mmol chloridu sodného, 10 % glycerolu).

5. Inhibice EGF-R autofosforylace

Buňky A431 se nechají růst do slinutí ve tkáňových kulturačních miskách povlečených lidským fibronectinem. Promyjí se dvakrát ledově chladným PBS, buňky se lyzují přidáním 500 ml/miska lýzového pufru (50 mmol pufru Hepes, hodnota pH 7,5, 150 mmol chloridu sodného, 1,5 mmol chloridu hořečnatého, 1 mmol EGTA, 10 % glycerolu, 1 % Triton X-100, 1 mmol PNSF, 1 mg/ml aprotininu, 1 mg/ml leupeptinu) a inkubují se po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Po stimulaci EGF (500 mg/ml, 10 minut při teplotě 37 °C) se provede imunoprecipitační reakce s EGF-R (Ab 108) a autofosforylační reakce vzorku (50 ml podíly, 3 mCi [g - ^{33}P]ATP) v přítomnosti 2 nebo 10 mM sloučeniny podle vynálezu po dobu dvou minut při teplotě 4 °C. Reakce se ukončí přidáním horkého elektroforézního vzorkového pufru. Analýza SDA-PAGE (7,5 % els) je následovaná autoradiografií a reakce se kvantifikuje densitricky na rentgenovém filmu.

a. Buněčná kultura

Buňky označované HER 14 a K721A se připravují transfek-

továním NIH3T3 buněk (klon 2.2) (společnosti C. Fryling, NCI, NIH), které jsou prosty endogenních EGF-receptorů s cDNA konstrukty divokého typu EGF-receptoru nebo mutantu EGF-receptoru prostého tyrosinkinázové aktivity (přičemž Lys 721 v místě vazby ATP je nahrazen zbytkem Ala). Všechny buňky se nechávají růst v DMEM s 10 % telecího zárodečného séra (Hyclone, Logan, Utah).

6. Selektivita se zřetelem na PKA a PKC se stanovuje za použití obchodních kitů

a. Pierce kolorimetrický PKA testovací kit, Spinzyne Format

Návod:

PKA enzym (hovězí srdce) 1 J/zkušební zkumavka

substrátový peptid Kemptid (značený barvivem)

45 minut @ 30 °C

absorbance při 570 nm

b. Pierce kolorimetrický PKC testovací kit, Spinzyne Format

Návod:

PKC enzym (kryší mozek) 1 J/zkušební zkumavka

substrátový peptid Neurogranin (značený barvivem)

30 minut @ 30 °C

absorbance při 570 nm

7. Měření inhibiční aktivity P56^{lck} tyrosinkinázy

Stanovuje se inhibiční aktivita P56^{lck} tyrosinkinázy způsobem podle amerického patentového spisu číslo 5 714493.

Nebo se stanovuje se inhibiční aktivita P56^{lck} tyrosinkinázy následujícím způsobem:

Substrát (tyrosin obsahující substrát. Biot-(β Ala)₃-Lys-Val-Glu-Lys-Ile-Gly-Glu-Gly-Thr-Tyr-Glu-Val-Val-Tyr-Lys(NH₂) poznávaný p56^{lck}, 1 μ M) se nejdříve fosforyluje v přítomnosti nebo v nepřítomnosti dané koncentrace sloučeniny podle vynálezu daným množstvím enzymu (enzym se produkuje expresí P56^{lck} genem v kvasnicovém konstruktu), zbavuje se klonovaných kvasnic (čištění enzymu se provádí o sobě známými způsoby) v přítomnosti ATP (10 μ M), chloridu hořečnatého (2,5 mM), chloridu manganatého (2,5 mM), chloridu sodného (25 mM), DTT (0,4 mM) v Hepes 50 mM, hodnota pH 7,5, po dobu 10 minut při teplotě okolí. Reakční objem je celkem 50 μ l a reakce se provádí v černé 96 důlkové fluorodestičce. Reakce se ukončí přidáním 150 μ l ukončovacího pufru (100 mM Hepes, hodnota pH 7,5, fluorid draselný 400 mM, EDTA 133 mM, BSA 1g/l) obsahujícím selektovanou antityrosinovou protilátku značenou Europium kryptátem (PY20-K) v množství 0,8 μ g/ml a streptavidinem značeným allopyrocyaninem (XL665) v množství 4 μ g/ml. Značení streptavidinu a antityrosinové protilátky provádí společnost Cis-Bio International (Francie). Směs se čítá za použití čítače Packard Discovery, který je schopen měřit časový homogenní fluorescenční transfer (excitace při 337 nm, odečet při 620 nm a 665 nm). Poměr 665 nm signál/620 nm signál je mírou koncentrace fosforylovaného tyrosinu. Slepá zkouška se provádí za náhrady enzymu puforem. Specifický signál je rozdíl mezi poměrem získaným bez inhibitoru a poměrem získaným při slepé zkoušce. Vypočte se procento specifického signálu. Hodnota IC₅₀ se vypočte s 10 koncentracemi inhibitoru v duplicitní zkoušce za použití Xifit soft. Referenční sloučeninou je staurosporin (Sigma), který vykazuje inhibici IC₅₀ 30 $\pm$ 6nM (n=20).

Výsledky, získané podle shora uvedených způsobů dokládají, že sloučeniny podle vynálezu mají PDGF receptorové proteintyrosinkinásové inhibiční vlastnosti nebo P56^{lck} tyrosinkinásové inhibiční vlastnosti a jsou proto terapeuticky hodnotné. Shora uvedené farmakologické testy se mohou použít ke sta-

novení dávky a způsobu podávání pro určité terapeutické zásahy.

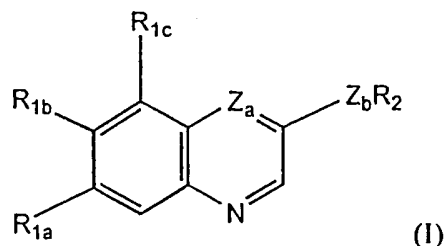
Průmyslová využitelnost

Derivát chinolinu a chinoxalinu, který inhibuje od destiček odvozený růstový faktor a/nebo P56^{lck} tyrosinkinázu je vhodný pro výrobu farmaceutických prostředků.

PETR KALENSKY
ATTORNEY AT LAW

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Derivát chinolinu a chinoxalinu obecného vzorce I



kde znamená

- R_{1a}** popřípadě substituovanou skupinu alkylovou, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou oxaheterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo atom halogenu,
- R_{1b}** atom vodíku, popřípadě substituovanou alkylovou skupinu, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou oxaheterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu nebo atom halogenu,
- R_{1c}** atom vodíku, popřípadě substituovanou alkylovou skupinu, popřípadě substituovanou skupinu arylovou, popřípadě substituovanou skupinu heteroarylovou, hydroxylovou skupinu, acyloxyskupinu, popřípadě substituovanou alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklyloxyskupinu, popřípadě substituovanou aryloxyskupinu, popřípadě substituovanou heteroaryloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxyskupinu, atom halogenu, kyanoskupinu, skupinu obecného vzorce R₅R₆N- nebo acylR₅N-,

R₂

R₃ atom vodíku nebo atom fluoru v orto nebo v para poloze, nižší alkylovou skupinu v meta poloze, nižší alkoxy skupinu, atom halogenu nebo karbamoylovou skupinu,

R₄ atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu,

R₅ a R₆ na sobě nezávisle atom vodíku nebo alkylovou skupinu, nebo R₅ a R₆ spolu s atomem dusíku, na který jsou vázány, vytvářejí azaheterocyklylovou skupinu,

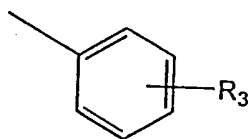
Z_a atom dusíku nebo skupinu CH a

Z_b iminoskupinu nebo atom kyslíku nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo sůl za podmínky, že R_{1a} a R_{1b} neznamenaí oba popřípadě substituovanou alkylovou skupinu.

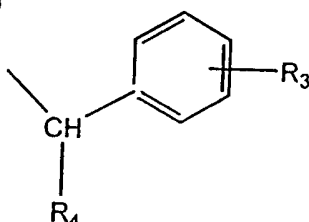
2. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} popřípadě substituovanou nižší alkoxy skupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou cykloalkyloxy skupinu, popřípadě substituovanou heterocyklylkarbonyloxy skupinu nebo popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxy skupinu.

3. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 2 obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} popřípadě substituovanou nižší alkoxy skupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxy skupinu.

4. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 3 obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} methoxyskupinu, ethoxyskupinu, 2-(ethoxy)ethoxyskupinu, 2-(4-morfolinyl)ethoxyskupinu nebo furanyloxyskupinu.
5. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} atom vodíku, popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu, popřípadě substituovanou monocyklickou cykloalkyloxyskupinu, popřípadě substituovanou heterocyklyl-karbonyloxyskupinu nebo atom popřípadě substituovanou monocyklickou oxaheterocyklyloxyskupinu.
6. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 5 obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} atom vodíku nebo popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu.
7. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 6 obecného vzorce I, kde znamená R_{1b} methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu.
8. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} a R_{1b} nižší alkoxyskupinu.
9. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 8 obecného vzorce I, kde znamená R_{1a} a R_{1b} methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu.
10. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_{1c} atom vodíku nebo popřípadě substituovanou nižší alkoxyskupinu.
11. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 10 obecného vzorce I, kde znamená R_{1c} atom vodíku nebo methoxyskupinu nebo ethoxyskupinu.
12. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_2 skupinu obecného vzorce



13. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_2 skupinu obecného vzorce



14. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_3 atom vodíku nebo atom fluoru v orto nebo v para poloze, methylovou skupinu v meta poloze, skupinu trifluormethylovou, methoxyskupinu, atom fluoru, chloru nebo bromu nebo karbamoylovou skupinu.

15. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená R_4 atom vodíku nebo methylovou skupinu.

16. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená Z_a atom dusíku.

17. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená Z_a skupinu CH .

18. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená Z_b iminoskupinu.

19. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kde znamená Z_b atom kyslíku.

20. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, vybraný ze souboru zahrnujícího
2-anilin-6-chinoxalinol,
2-((R)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

6-anilino-6-isopropoxychinoxalin,
2-fenoxy-6-methoxychinoxalin,
(3-brombenzyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
2-(3-karbamoylfenylamino)-6-methoxychinoxalin,
2-(2-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-(3-trifluormethylfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
fenyl-[6-(tetrahydrofuran-3(R)-yloxy)chinoxalin-2-yl]amin,
benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)amin,
6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin,
2-anilin-6-ethoxychinoxalin,
2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin,
2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin,
2-(3-fluorfenylamino)-(6,7-diethoxychinoxalin,
(3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin a
(3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky
přijetelná sůl.

21. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, vybraný ze souboru zahrnujícího
fenyl-[6-tetrahydrofuran-3(R)-yloxy)chinoxalin-2-yl]amin,
benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)amin,
6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin,
2-anilino-6-ethoxychinoxalin,
2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,

2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin,
6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin,
2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin,
2-(3-fluorfenyl)amino)-(6,7-diethoxychinoxalin,
(3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin a
(3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin,
nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky
přijetelná sůl.

22. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, kterým je fenyl-[6-tetrahydrofuran-3(R)-yloxy)chino-
xalin-2-yl]amin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga ne-
bo farmaceuticky přijatelná sůl.

23. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, kterým je benzyl-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl]amin
nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky
přijetelná sůl.

24. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, kterým je 2-((S)- α -methylbenzylamino)-6,7-diethoxy-
chinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo
farmaceuticky přijatelná sůl.

25. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, kterým je 2-benzylamino-6,7-diethoxychinoxalin nebo
jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky při-
jetelná sůl.

26. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného
vzorce I, kterým je (6-methoxychinoxalin-2-yl)-(3-methylfenyl)
amin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceu-
ticky přijatelná sůl.

27. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 6-methoxy-2-fenylaminochinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

28. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 2-anilino-6-ethoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

29. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 2-(3-methoxyfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

30. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 2-(4-fluorfenylamino)-6,7-diethoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

31. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 6,7-diethoxy-2-fenoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

32. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 2-fenylamino-6,7-diethoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

33. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je (6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)-(3-fluorfenyl)amin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

34. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je 2-(3-fluorfenyl)amino)-(6,7-diethoxychinoxalin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

35. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je (3-bromfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

36. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je (6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)fenylamin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

37. Derivát chinolinu a chinoxalinu podle nároku 1 obecného vzorce I, kterým je (3-chlorfenyl)-(6,7-dimethoxychinoxalin-2-yl)amin nebo jeho N-oxid, hydrát, solvát, prodroga nebo farmaceuticky přijatelná sůl.

38. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný nosič.

39. Způsob inhibice aktivity PDGF tyrosinkinázy, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvádí do skyku sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 se sloučeninou obsahující PDGF tyrosinkinázu.

40. Způsob inhibice aktivity Lck tyrosinkinázy, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se uvádí do skyku sloučenina obecného vzorce I podle nároku 1 se sloučeninou obsahující Lck tyrosinkinázu.

41. Způsob inhibice buněčné proliferace, diferenciace nebo

uvolňování mediátoru v případě jedinců s poruchami buněčné proliferace a/nebo diferenciace a/nebo uvolňování mediátoru, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedincům podává farmaceuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

42. Způsob ošetřování jedinců s patologií spojenou s hyperproliferativní poruchou, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedincům podává farmaceuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

43. Způsob podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetřovanou poruchou je restenóza.

44. Způsob ošetřování zánětu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se jedincům podává farmaceuticky účinné množství sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 nebo její farmaceuticky přijatelné soli.

PETR KALENSKÝ
ATTORNEY AT LAW