

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2163-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 12. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.12.96,
20.03.97, 10.06.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/034288, 97/822373,
97/862925**

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**
(Věstník č. 9/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/23392**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/27098**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁶:

C 07 D 487/04
C 07 D 471/04
C 07 D 213/56
C 07 D 409/04
C 07 D 405/12
C 07 F 9/6561
C 07 F 9/58
A 61 K 31/495

// (C 07 D 487/04,
C 07 D 239:00, C 07 D 237:00),
(C 07 D 471/04, C 07 D 239:00,
C 07 D 221:00)

(71) Přihlašovatel:

**VERTEX PHARMACEUTICALS
INCORPORATED, Cambridge, MA, US;**

(72) Původce:

Bemis Guy W., Arlington, MA, US;
**Salituro Francesco Gerald, Marlborough,
MA, US;**
Duffy John Patrick, Westborough, MA, US;
Cochran John E., Lowell, MA, US;
**Harrington Edmund Martin, Cambridge,
MA, US;**
Murcko Mark, Holliston, MA, US;
Wilson Keith P., Hopkinton, MA, US;
Su Michael, Newton, MA, US;
Galullo Vincent P., Harvard, MA, US;

(74) Zástupce:

**Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Heterocyklické sloučeniny obsahující
dusík a farmaceutický prostředek
obsahující tyto sloučeniny**

(57) Anotace:

Jsou popsány inhibitory p38, savčí proteino-
vá kinasa působící buněčnou proliferaci,
zánik buněk a odezvu na extracelulární sti-
muly. Jsou také popsány způsoby přípravy
těchto inhibitorů. Dále jsou popsány farmace-
utické prostředky obsahující inhibitory podle
vynálezu a způsoby použití těchto prostředků
k ošetřování a prevenci různých chorob.

CZ 2163-99 A3

2162 - 99
18.08.99

177 067/HK

Heterocyklické sloučeniny obsahující dusík a farmaceutický prostředek obsahující tyto sloučeniny

Oblast techniky

Vynález se týká inhibitorů p38, savčí proteinové kinasy působící buněčnou proliferaci, zánik buněk a vyvolávající odezvu na extracelulární stimuly. Vynález se také týká způsobů přípravy těchto inhibitorů. Vynález se dále týká farmaceutických prostředků obsahujících inhibitory podle vynálezu a způsobů použití těchto prostředků pro ošetřování a prevenci různých chorob.

Dosavadní stav techniky

Proteinové kinasy působí různé buněčné odezvy na extracelulární signály. Byla již objevena řada mitogenem aktivovaných proteinových kinas (MAPK). Členy této skupiny jsou Ser/Thr kinasy, které aktivují své substráty fosforylací [B. Stein a j., Ann. Rep. Med. Chem., 31, str. 289 až 298 (1966)]. MAPK jsou samy aktivovány různými signály, včetně růstových faktorů, cytokinů, UV záření a činidel vyvolávajících stres.

Obzvláště zajímavou látkou MAPK je p38. Látka p38 je také známa jako cytokin potlačující protizánětlivá látka vázající protein (CSBP) a RK, a byla izolována z myších pre-B buněk, které byly transfektovány receptorem CD14 lipopolysacharidu (LPS) a indukovány LPS. Látka p38 byla až dosud izolována a byla stanovena její sekvence tak, jak je cDNA zakódována u lidí a myší. Aktivace p38 byla pozorována v buňkách stimulovaných stresy, jako jsou reakce na lipopolysacharidy

15.08.99

(LPS), UV záření, anisomycin nebo osmotický šok, a cytokiny, jako jsou IL-1 a TNF.

Inhibice p38 kinasy vede k bloádě tvorby jak IL-1 tak TNF. IL-1 a TNF stimulují tvorbu ostatních prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-6 a IL-8 a mají za následek akutní a chronická zánětlivá onemocnění a postmenopauzální osteoporosu [R. B. Kimble a j., Endocrinol., 136, str. 3054 až 3061 (1995)].

Na základě toho se předpokládá, že p38 spolu s dalšími MAPK hrají roli při zprostředkování buněčné odezvy na zánětlivé stimuly, jako jsou akumulace leukocytů, aktivace makrofág/monocyt, resorpce tkáně, horečka, akutní fázové odezvy a neutrofilie. Kromě toho MAPK, jako je p38, způsobují rakovinu, thrombinem vyvolanou agreaci destiček, poruchy imunity, autoimunní poruchy, zánik buněk, alergie, osteoporosu a neurodegenerativní choroby. Inhibitory p38 také působí v oblasti léčby bolesti inhibicí vyvolávání prostaglandinové endoperoxid synthasy-2. Další choroby spojené s nadprodukcí IL-1, IL-6, IL-8 nebo TNF jsou uvedeny v WO 96/21654.

Bylo již započato s vývojem léků, které specificky inhibují MAPK. Například PCT publikace WO 95/31451 popisuje sloučeniny pyrazolu, které inhibují MAPK a zejména p38. Avšak účinnost těchto inhibitorů in vivo se stále zkoumá.

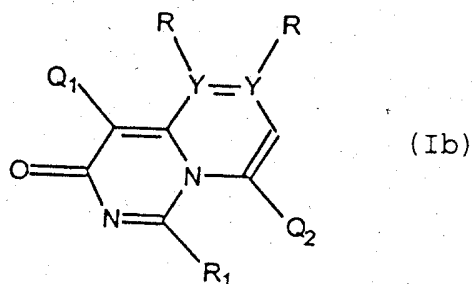
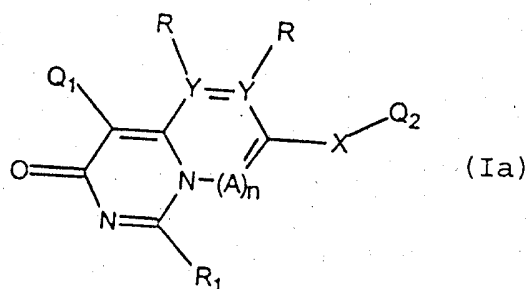
Tedy stále je velká poptávka po vývoji dalších silných p38 specifických inhibitorů, které jsou použitelné při ošetřování různých stavů spojených s aktivací p38.

Podstata vynálezu

Předložený vynález řeší tento problém přípravou sloučenin, které vykazují silnou a specifickou inhibici p38.

Podstatou vynálezu jsou sloučeniny obecných vzorců Ia nebo Ib

15.08.99



kde každý ze substituentů Q_1 a Q_2 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy nebo osmičlenné až desetičlenné bicyklické kruhové systémy obsahující aromatické karbocyklické kruhy, aromatické heterocyklické kruhy nebo kombinaci aromatického karbocyklického kruhu a aromatického heterocyklického kruhu.

Kruhy, které tvoří Q_1 , jsou substituovány 1 až 4 substituenty, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$, nebo $N=C-N(R')_2$.

Kruhy, které tvoří Q_2 , jsou popřípadě substituovány až 4 substituenty, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku s přímým nebo rozvětveným řetězcem, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, R^3 , OR^3 , NR^3 , SR^3 , $C(O)R^3$,

16.08.99

$C(O)N(R')R^3$, $C(O)OR^3$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , $N=C-N(R')_2$, nebo CN .

R' je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku nebo alkinylovou skupinu, fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou 1 až 3 substituenty nezávisle vybranými ze skupiny zahrnující atom halogenu, methoxyskupinu, kyanoskupinu, nitroskupinu, aminoskupinu, hydroxyskupinu, methylovou skupinu nebo ethylovou skupinu.

R^3 je vybráno ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy.

R^4 je alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, popřípadě substituovaná skupinami $N(R')_2$, OR' , CO_2R' , $CON(R')_2$ nebo $SO_2N(R^2)_2$, nebo pětičlenný až šestičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruhový systém, popřípadě substituovaný skupinami $N(R')_2$, OR' , CO_2R' , $CON(R')_2$ nebo $SO_2N(R^2)_2$.

X je vybráno ze skupiny zahrnující $-S-$, $-O-$, $-S(O_2)-$, $-S(O)-$, $-S(O_2)-N(R^2)-$, $-N(R^2)-S(O_2)-$, $-N(R^2)-C(O)O-$, $-O-C(O)-N(R^2)-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-O-C(O)-$, $-C(O)-N(R^2)-$, $-N(R^2)-C(O)-$, $-N(R^2)-$, $-C(R^2)_2-$ nebo $-C(OR^2)_2-$.

Každé R je nezávisle vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, $-R^2$, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-C(O)-N(R^2)_2$, $-S(O_2)-N(R^2)_2$ nebo $-C(O)-OR^2$, přičemž dvě přilehlá R jsou popřípadě vázána jedno na druhé a spolu s každým Y , ke kterým jsou vázána, tvoří čtyřčlenný až osmičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruh,

R^2 je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku nebo alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku, které jsou obě popřípadě substituovány skupinami $-N(R')_2$, $-OR'$, $-SR'$, $-C(O)-N(R')_2$, $-S(O_2)-N(R')_2$, $-C(O)-OR'$, nebo R^3 .

Y je N nebo C ,

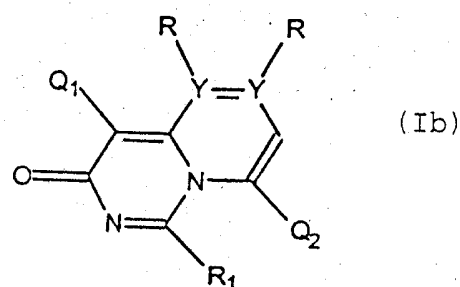
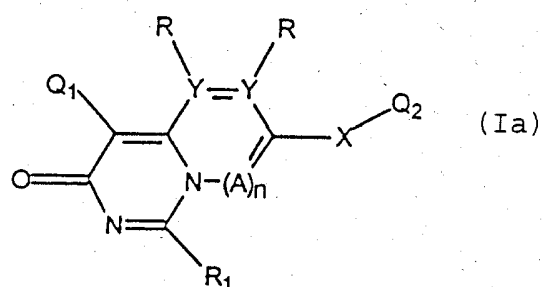
18.08.99

A, je-li přítomno, je N nebo CR',
n je 0 nebo 1,

R₁ je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, OH, nebo -O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku.

Dále jsou podstatou vynálezu farmaceutické prostředky, které obsahují inhibitory p38 podle vynálezu. Tyto prostředky lze použít při léčení nebo prevenci různých onemocnění, jako jsou rakovina, zánětlivá onemocnění, autoimunní onemocnění, destruktivní poruchy kostí, proliferační poruchy, infekční onemocnění, virová onemocnění a neurodegenerativní onemocnění. Tyto prostředky lze také použít pro prevenci zániku buněk a hyperplasie a proto se mohou použít k ošetření nebo prevenci reperfuse nebo ischemie při mrtvici, srdečním záchvatu a hypoxii orgánů. Tyto prostředky lze také použít pro prevenci thrombinem vyvolané agregaci destiček. Všechna tato použití jsou také součástí předloženého vynálezu.

Podstatou vynálezu jsou inhibitory p38 obecných vzorců Ia nebo Ib



kde každý ze substituentů Q₁ a Q₂ je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy nebo osmičlenné až desetičlenné bicyklické kruhové systémy obsahující aromatické karbocyklické kruhy, aromatické heterocyklické kruhy nebo kombinaci aromatického karbocyklického kruhu a aromatického heterocyklického kruhu.

15.05.99

Kruhy, které tvoří Q_1 , jsou substituovány 1 až 4 substituenty, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$, nebo $N=C-N(R')_2$.

Kruhy, které tvoří Q_2 , jsou popřípadě substituovány až 4 substituenty, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku s přímým nebo rozvětveným řetězcem, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, R^3 , OR^3 , NR^3 , SR^3 , $C(O)R^3$, $C(O)N(R')R^3$, $C(O)OR^3$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , $N=C-N(R')_2$, nebo CN .

R' je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku nebo alkinylovou skupinu, fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou 1 až 3 substituenty nezávisle vybranými ze skupiny zahrnující atom halogenu, methoxyskupinu, kyanoskupinu, nitroskupinu, aminoskupinu, hydroxyskupinu, methylovou skupinu nebo ethylovou skupinu.

R^3 je vybráno ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy.

18.08.99

R^1 je alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, popřípadě substituovaná skupinami $N(R^1)_2$, OR^1 , CO_2R^1 , $CON(R^1)_2$ nebo $SO_2N(R^2)_2$, nebo pětičlenný až šestičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruhový systém, popřípadě substituovaný skupinami $N(R^1)_2$, OR^1 , CO_2R^1 , $CON(R^1)_2$ nebo $SO_2N(R^2)_2$.

X je vybráno ze skupiny zahrnující $-S-$, $-O-$, $-S(O_2)-$, $-S(O)-$, $-S(O_2)-N(R^2)-$, $-N(R^2)-S(O_2)-$, $-N(R^2)-C(O)O-$, $-O-C(O)-N(R^2)-$, $-C(O)-$, $-C(O)O-$, $-O-C(O)-$, $-C(O)-N(R^2)-$, $-N(R^2)-C(O)-$, $-N(R^2)-$, $-C(R^2)_2-$ nebo $-C(OR^2)_2-$.

Každé R je nezávisle vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, $-R^2$, $-N(R^2)_2$, $-OR^2$, $-SR^2$, $-C(O)-N(R^2)_2$, $-S(O_2)-N(R^2)_2$ nebo $-C(O)-OR^2$, přičemž dvě přilehlá R jsou popřípadě vázána jedno na druhé a spolu s každým Y, ke kterým jsou vázána, tvoří čtyřčlenný až osmičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruh.

Jestliže obě R tvoří spolu dohromady se skupinami Y, ke kterým jsou připojeny, kruh, je odborníkovi zřejmé, že z každého nekondensovaného R se ztratí atom vodíku. Například, je-li kruhová struktura tvořena vazbou obou R dohromady, kdy jedna je $-NH-CH_3$ a druhá je $-CH_2CH_3$, jeden koncový atom vodíku se z každého R ztratí (je vyznačeno tučně). Proto vzniklá část kruhové struktury má vzorec $-NH-CH_2-CH_2-CH_2-$.

R^2 je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku nebo alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku, přičemž každá tato skupina je popřípadě substituována skupinami $-N(R^1)_2$, $-OR^1$, $-SR^1$, $-C(O)-N(R^1)_2$, $-S(O_2)-N(R^1)_2$, $-C(O)-OR^1$, nebo R^3 .

Y je N nebo C,

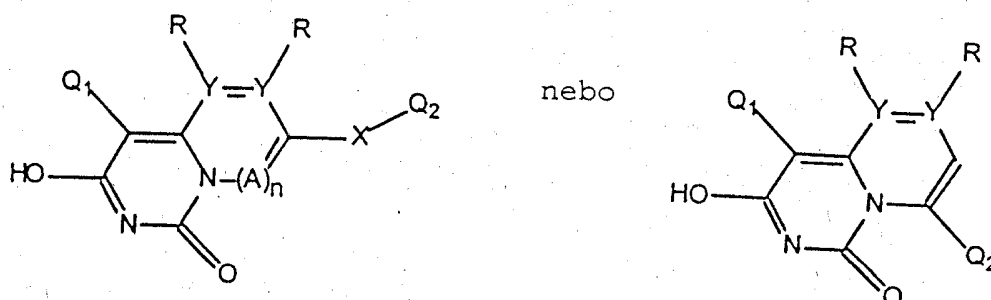
A, je-li přítomno, je N nebo CR^1 ,

n je 0 nebo 1,

R_1 je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, OH, nebo -O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku. Odborníkovi je zřejmé, že

18.08.99

jestliže R_1 je OH, vzniklý inhibitor se může tautomerisovat na sloučeninu vzorce

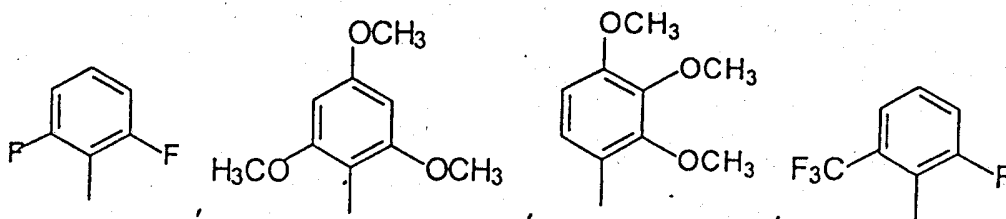


což jsou též inhibitory p38 podle tohoto vynálezu.

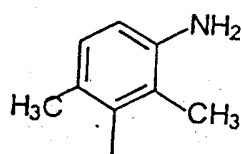
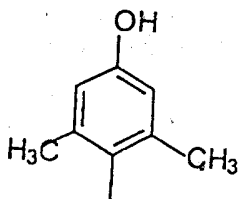
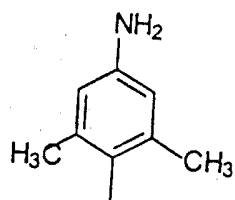
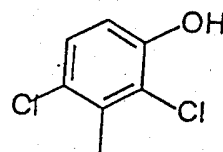
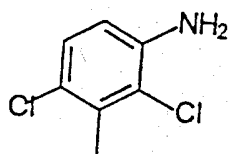
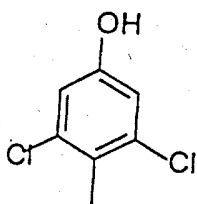
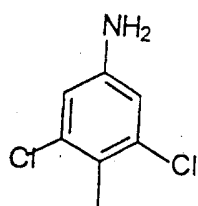
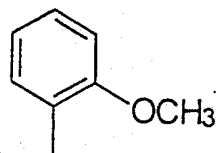
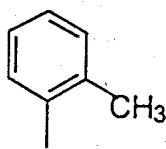
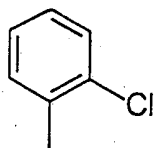
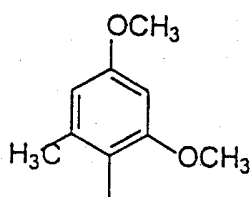
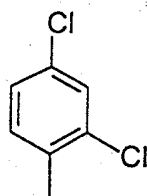
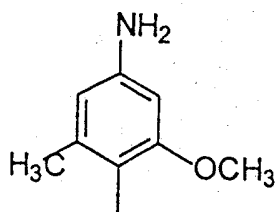
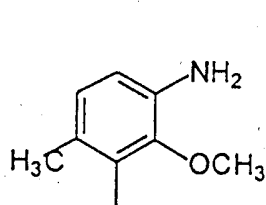
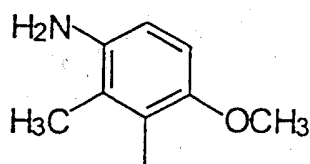
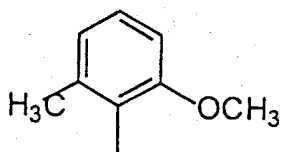
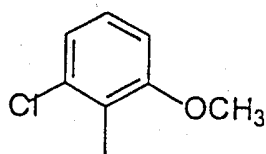
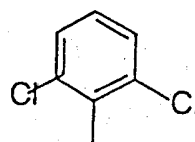
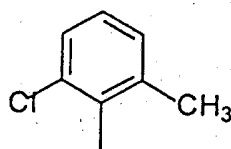
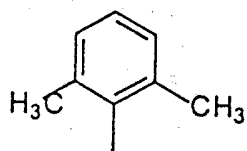
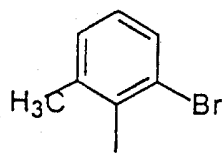
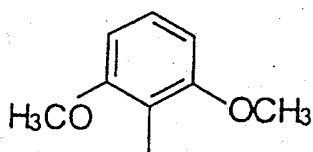
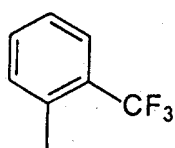
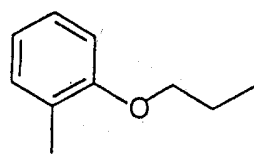
Podle dalšího výhodného provedení vynálezu je Q_1 vybráno ze skupiny zahrnující fenylovou nebo pyridylovou skupinu obsahující 1 až 3 substituenty, kde alespoň jeden z těchto substituentů je v ortho poloze a tyto substituenty jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující atom chloru, atom fluoru, atom bromu, skupiny $-CH_3$, $-OCH_3$, $-OH$, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-O(CH_2)_2CH_3$, NH_2 , 3,4-methylenedioxy skupinu, $-N(CH_3)_2$, $-NH-S(O_2)-$ fenyl, $-NH-C(O)O-CH_2-4$ -pyridin, $-NH-C(O)CH_2$ -morfolin, $-NH-C(O)CH_2-N(CH_3)_2$, $-NH-C(O)CH_2$ -piperazin, $-NH-C(O)CH_2$ -pyrrolidin, $-NH-C(O)C(O)-$ morfolin, $-NH-C(O)C(O)-$ piperazin, $-NH-C(O)C(O)-$ pyrrolidin, $-O-C(O)CH_2-N(CH_3)_2$ nebo $-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$.

Ještě výhodněji Q_1 je fenylová nebo pyridylová skupina obsahující alespoň dva z výše uvedených substituentů, přičemž oba jsou v poloze ortho.

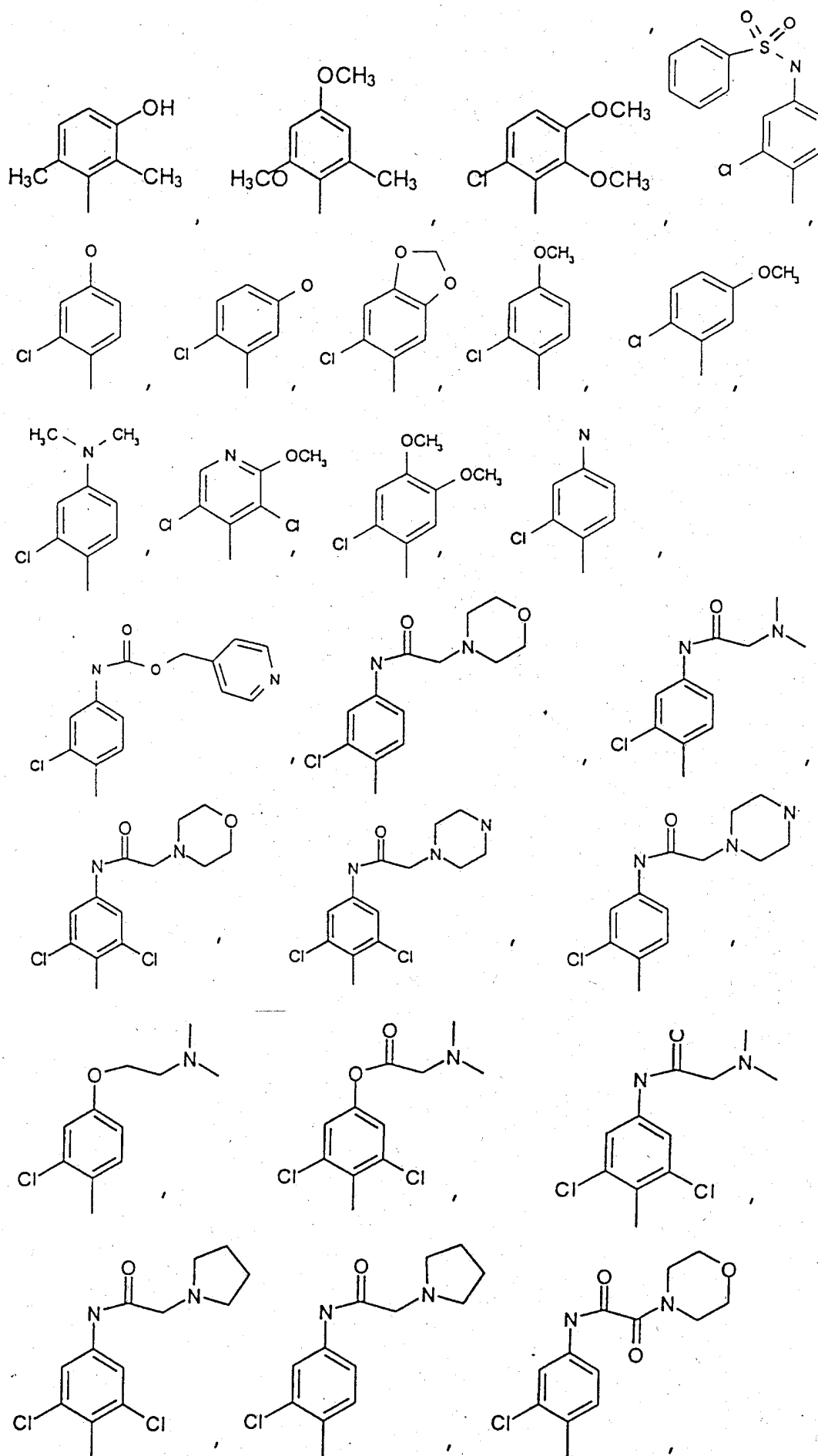
Určitými specifickými příklady výhodného Q_1 jsou:



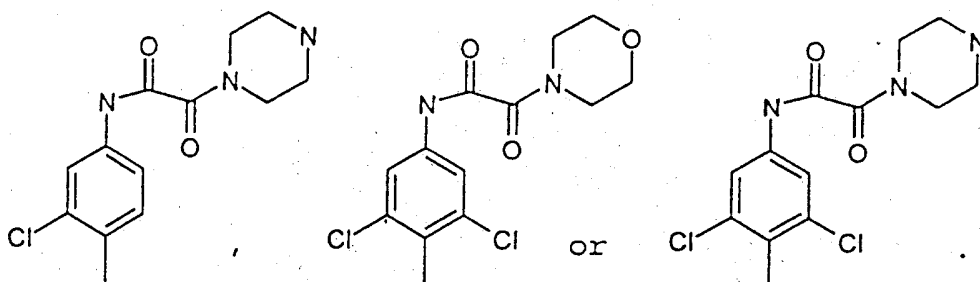
18.08.99



18.08.99



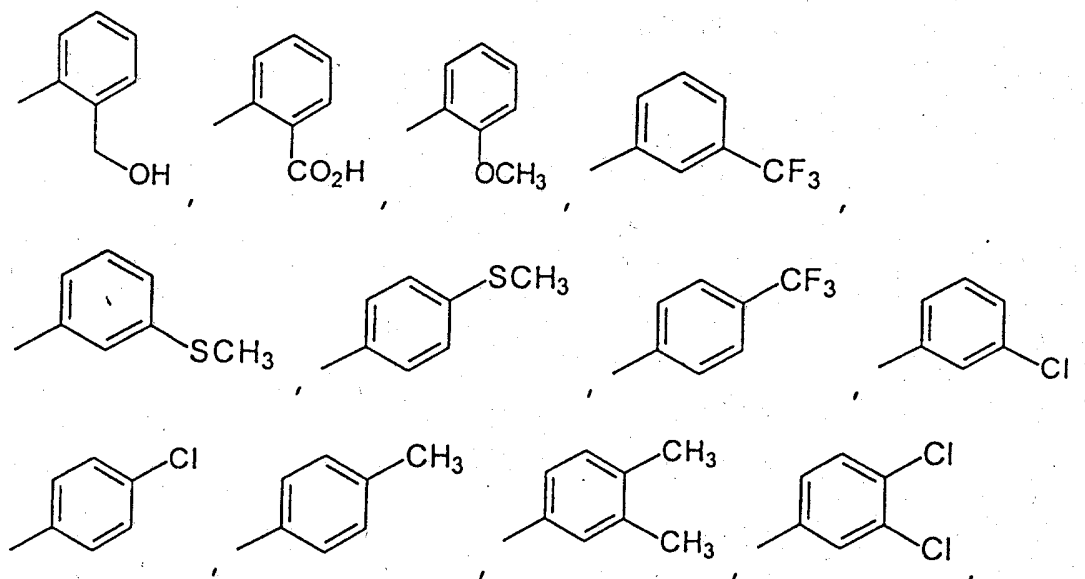
18.08.99



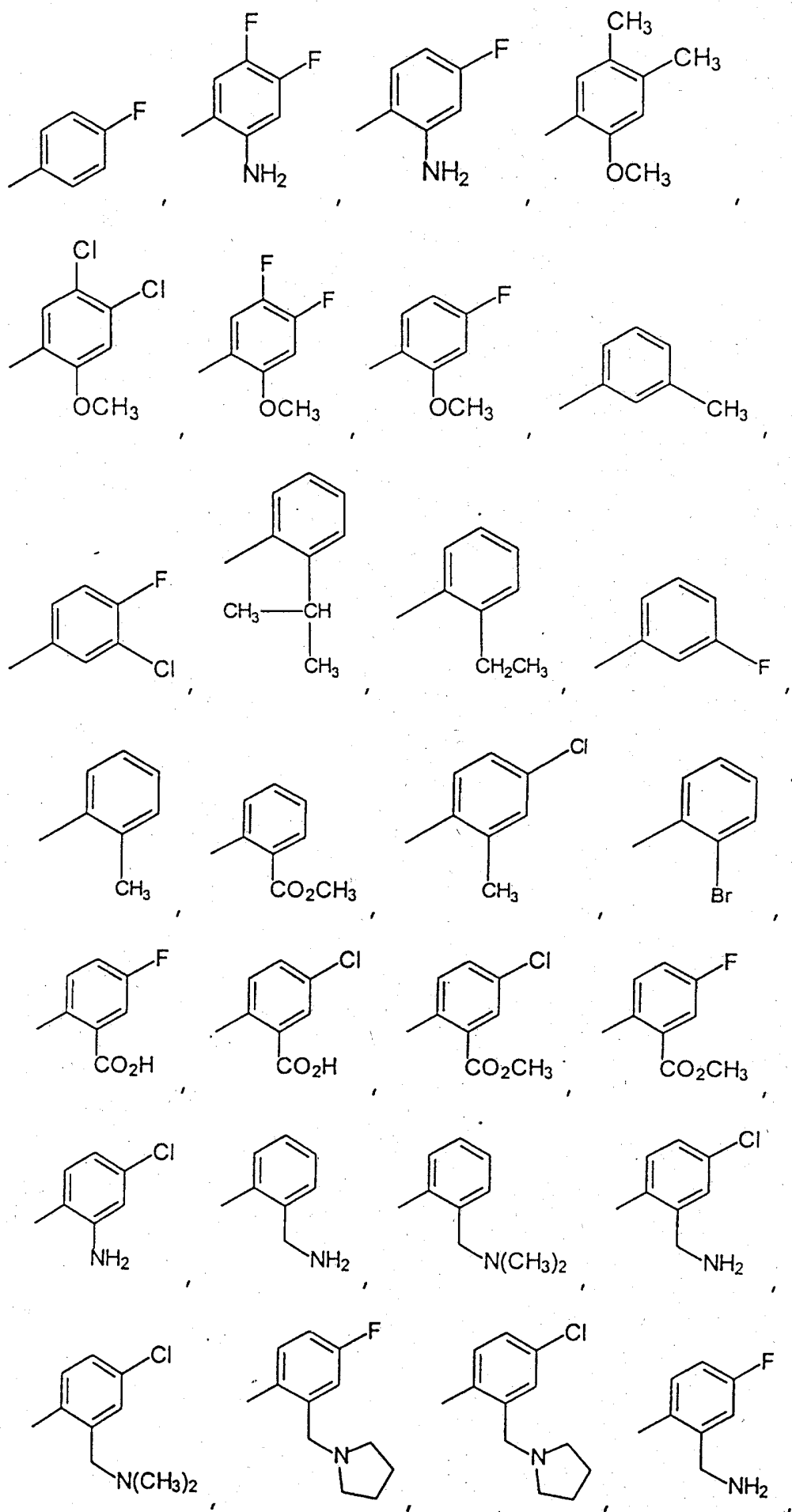
Nejvýhodněji je Q_1 vybráno ze skupiny zahrnující 2-fluor-6-trifluormethylfenyl, 2,6-difluorfenyl, 2,6-dichlorfenyl, 2-chlor-4-hydroxyfenyl, 2-chlor-4-aminofenyl, 2,6-dichlor-4-aminofenyl, 2,6-dichlor-3-aminofenyl, 2,6-dimethyl-4-hydroxyfenyl, 2-methoxy-3,5-dichlor-4-pyridyl, 2-chlor-4,5-methylenedioxyfenyl nebo 2-chlor-4-(N-2-morfolinoacetamido)fenyl.

Podle výhodného provedení vynálezu je Q_2 fenylová nebo pyridylová skupina obsahující 0 až 3 substituenty, kde každý substituent je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom chloru, atom fluoru, atom bromu, methylovou skupinu, ethylovou skupinu, isopropylovou skupinu, skupiny $-OCH_3$, $-OH$, $-NH_2$, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SCH_3$, $-OCH_3$, $-C(O)OH$, $-C(O)OCH_3$, $-CH_2NH_2$, $-N(CH_3)_2$, $-CH_2$ -pyrrolidin a $-CH_2OH$.

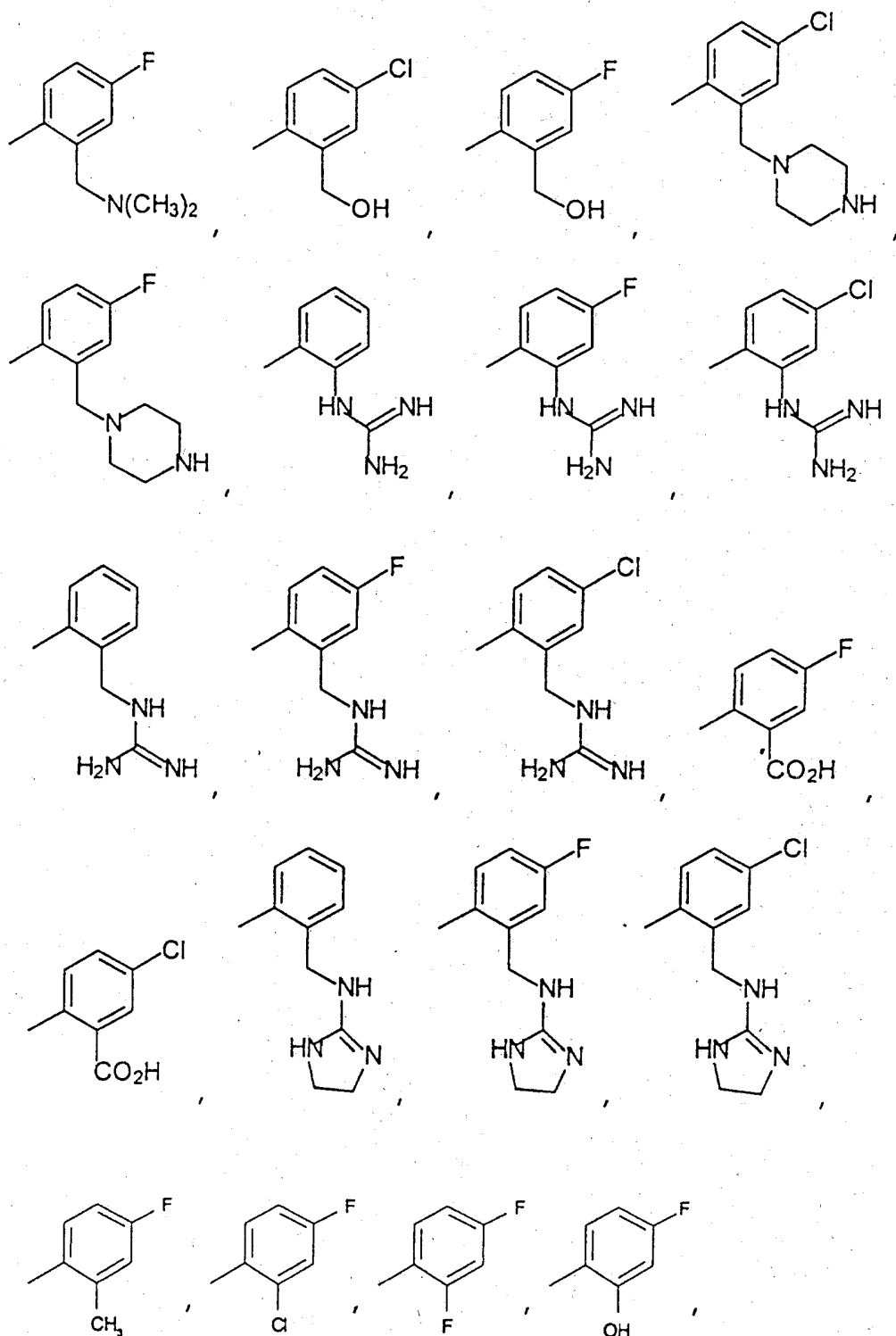
Určitými specifickými příklady výhodného Q_2 jsou:



18-08-99



18.06.99



nesubstituovaný 2-pyridyl nebo nesubstituovaný fenyl.

Nejvýhodnější jsou sloučeniny, kde Q_2 je vybráno ze skupiny zahrnující fenyl, 2-isopropylfenyl, 3,4-dimethylfenyl,

15.06.99

2-ethylfenyl, 3-fluorfenyl, 2-methylfenyl, 3-chlor-4-fluorfenyl, 3-chlorfenyl, 2-methoxykarbonylfenyl, 2-karboxyfenyl, 2-methyl-4-chlorfenyl, 2-bromfenyl, 2-pyridyl, 2-methylenhydroxyfenyl, 4-fluorfenyl, 2-methyl-4-fluorfenyl, 2-chlor-4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-hydroxy-4-fluorfenyl nebo 2-methylenhydroxy-4-fluorfenyl.

Podle dalšího výhodného provedení je X -S-, -O-, -S(O₂)-, -S(O)-, -NR-, -C(R₂)- nebo -C(O)-. Nejvýhodněji je X -S-.

Podle dalšího výhodného provedení je n 1 a A je N.

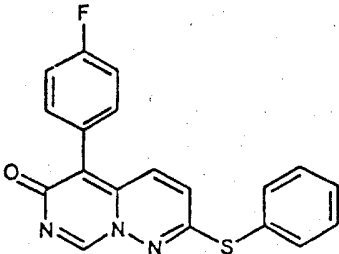
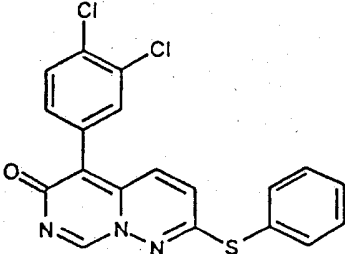
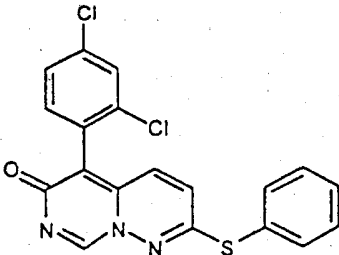
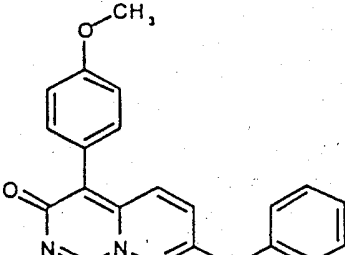
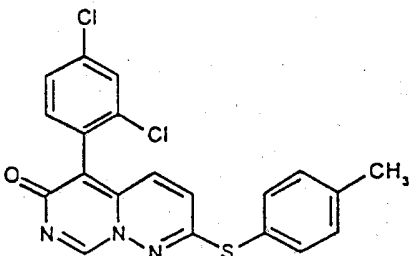
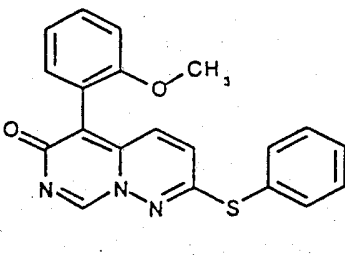
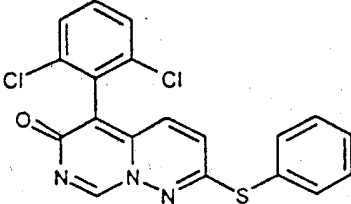
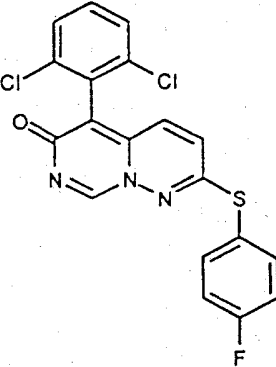
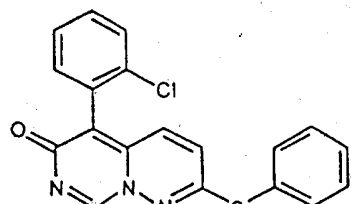
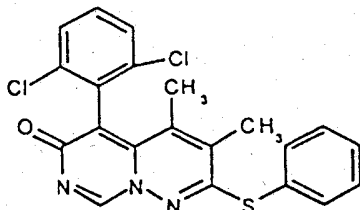
Podle dalšího výhodného provedení je každé Y C.

Podle ještě výhodnějšího provedení je každé Y C a R připojené k těmto skupinám Y je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku nebo methylovou skupinu.

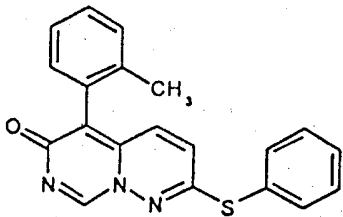
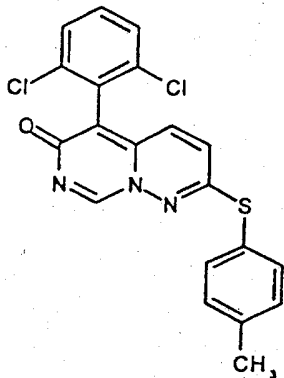
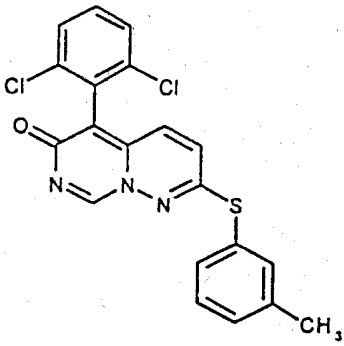
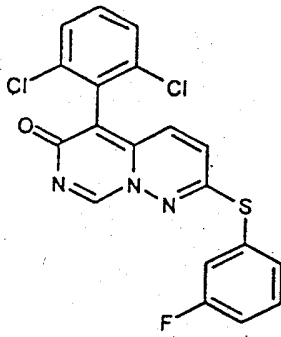
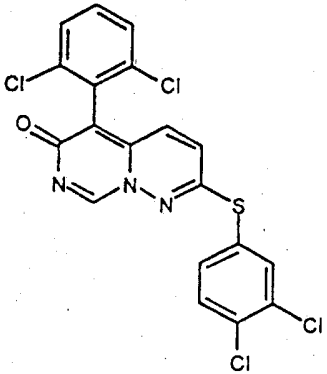
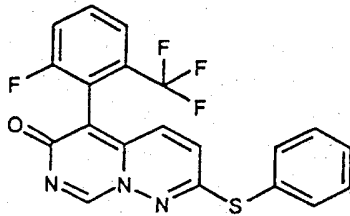
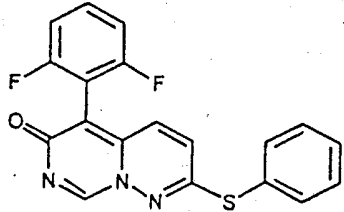
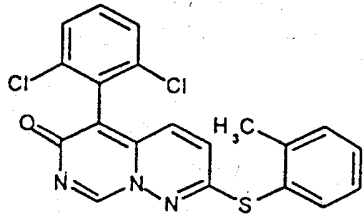
Určité specifické inhibitory podle vynálezu jsou shrnuty v tabulce 1 níže.

18.06.99

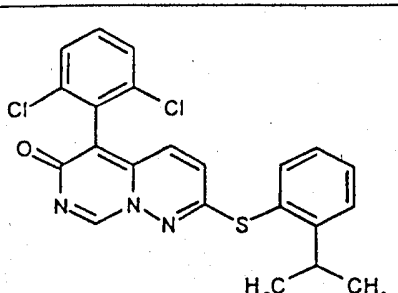
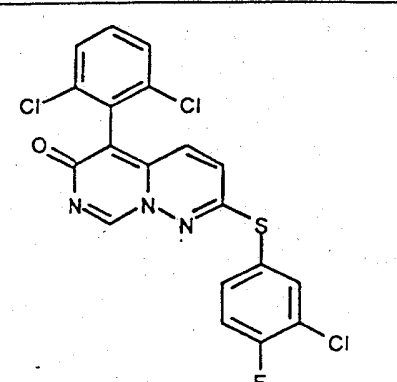
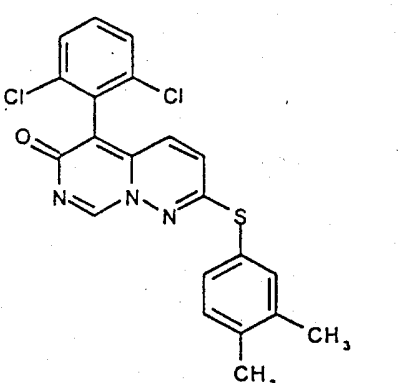
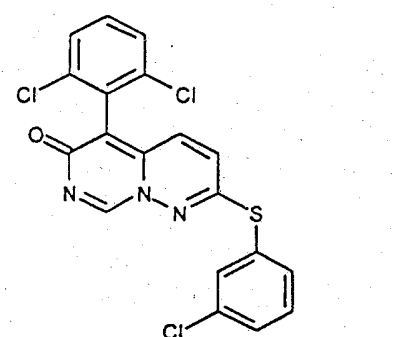
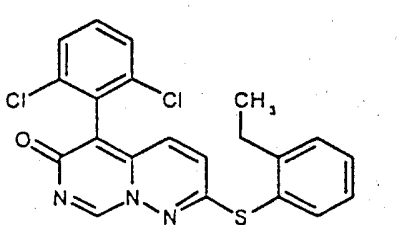
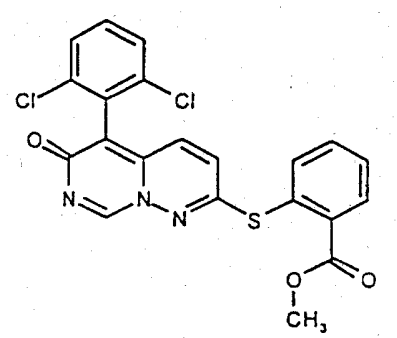
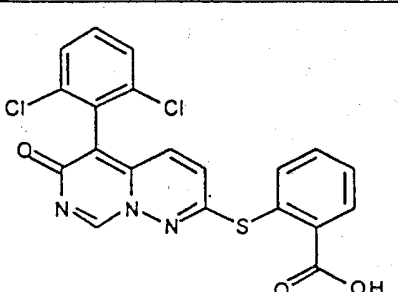
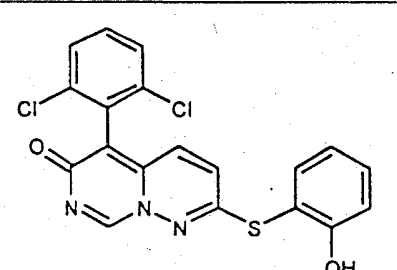
Tabulka 1 Sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib

sl.č.	struktura	sl.č. n	struktura
2		9	
3		10	
5		11	
6		12	
7		13	

18.08.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
8		14	
15		21	
16		22	
17		23	

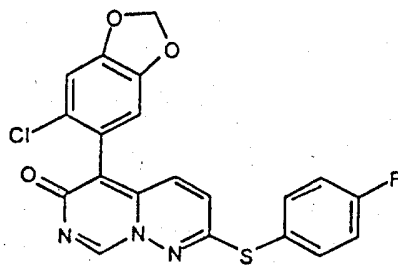
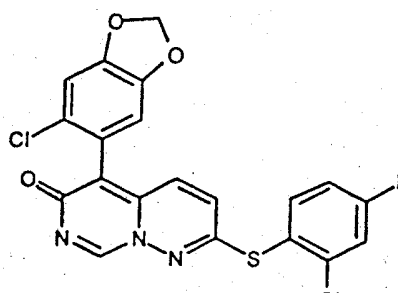
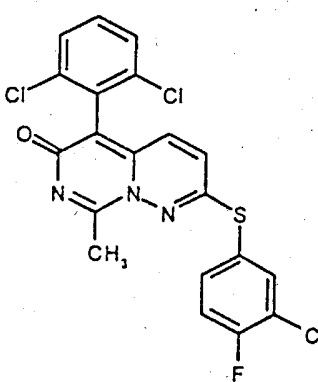
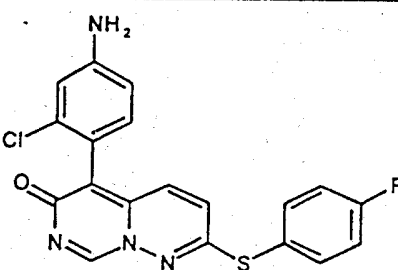
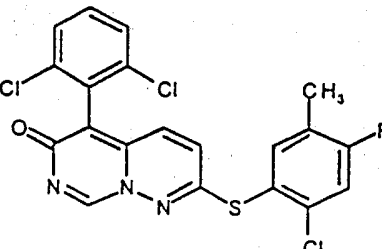
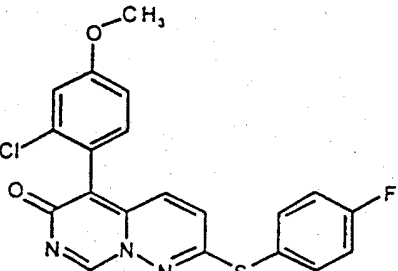
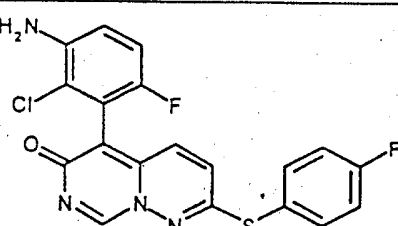
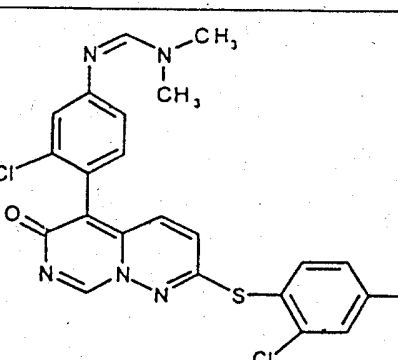
18.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
18		24	
19		25	
20		26	
27		33	

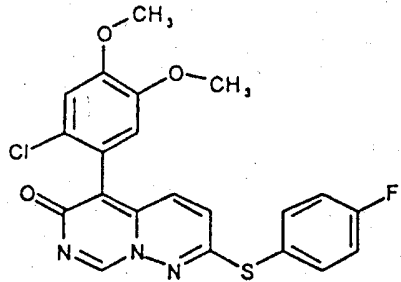
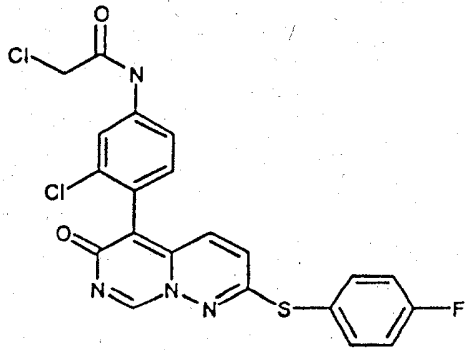
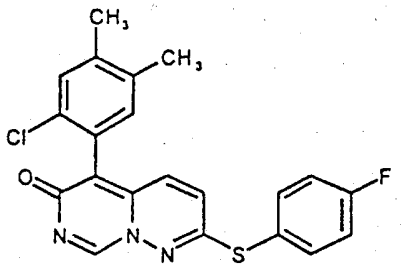
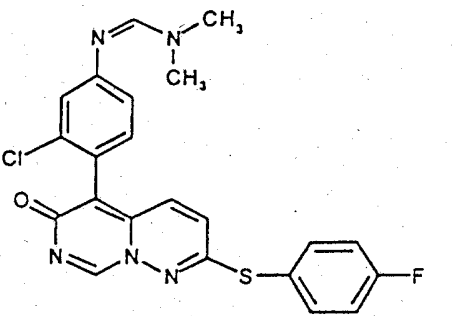
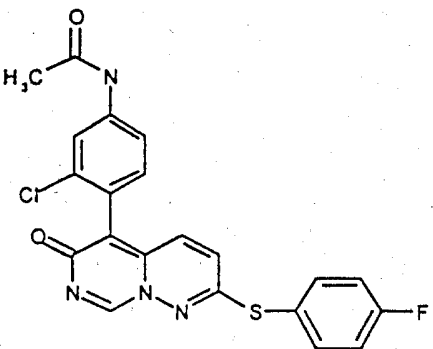
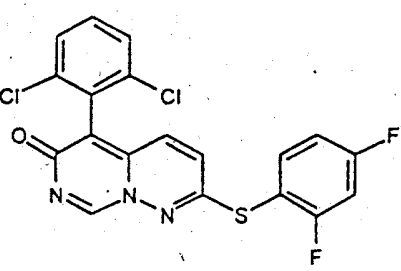
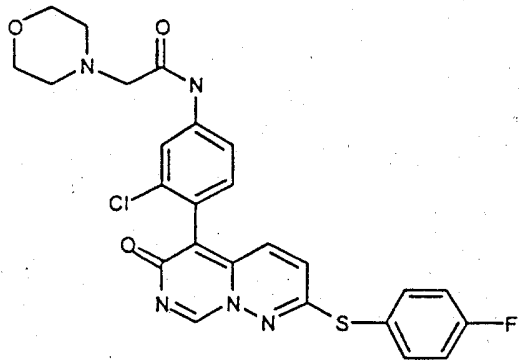
18.05.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
28		34	
29		35	
30		36	
31		37	
32		38	

18.06.99

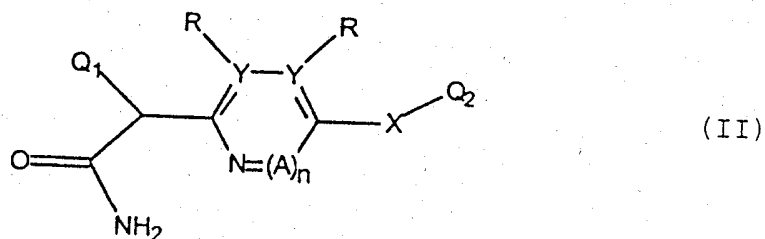
sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
39		45	
40		46	
41		47	
42		48	

18.05.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
43		49	
44		50	
51		53	
52			

16.05.99

Dále jsou podstatou vynálezu způsoby přípravy inhibitorů p38 obecného vzorce Ia, uvedeného výše. Tyto způsoby spočívají v reakci sloučeniny obecného vzorce II



kde každý substituent v tomto vzorci má význam uvedený výše pro inhibitory podle vynálezu, s reakčním činidlem s odstupující skupinou obecného vzorce IIa



kde R' má výše uvedený význam, nebo s reakčním činidlem s odstupující skupinou obecného vzorce IIb



kde každá ze skupin L₁, L₂ a L₃ nezávisle znamená odstupující skupinu.

Činidlo s odstupující skupinou se v této reakci přidává v nadbytku, buď čisté nebo s korozpouštědlem, jako je toluen. Reakce se provádí při teplotě mezi 25 °C a 150 °C.

Jako činidla s odstupující skupinou obecného vzorce IIa, která lze použít při přípravě inhibitorů p38 podle vynálezu, lze uvést dimethylacetal dimethylformamidu, dimethylacetal dimethylacetamidu, trimethylorthoformiát, diethylacetal dimethylformamidu a další příbuzná činidla. Výhodným činidlem s odstupující skupinou obecného vzorce IIa při přípravě inhibitorů podle vynálezu je dimethylacetal dimethylformamidu.

Jako činidla s odstupující skupinou obecného vzorce IIb, která lze použít při přípravě inhibitorů p38 podle vynálezu,

18.05.99

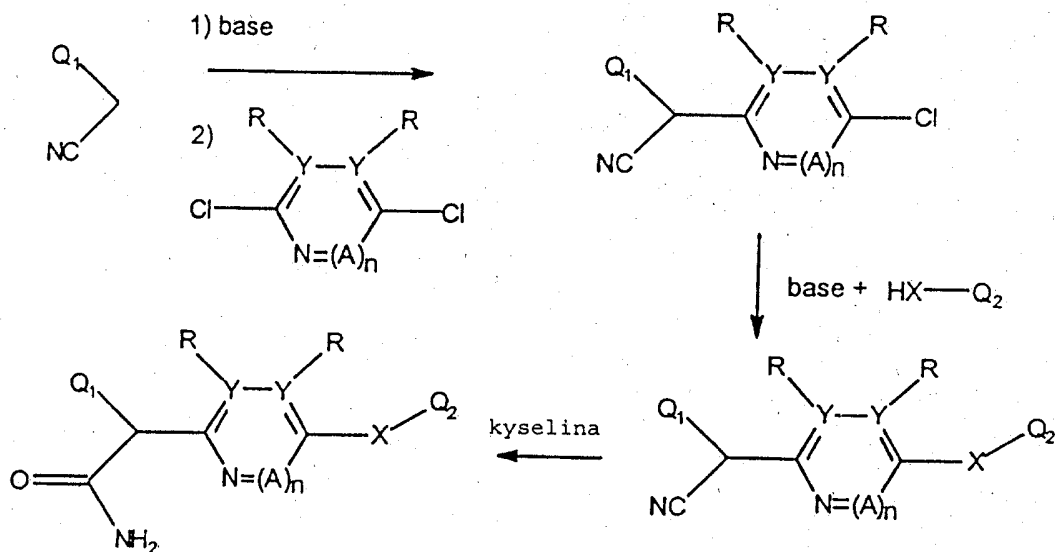
lze uvést fosgen, karbonyldiimidazol, diethylkarbonát a trifosgen.

Ještě výhodnější způsoby přípravy sloučenin podle vynálezu používají sloučeniny obecného vzorce II, kde každý z uvedených substituentů má významy uvedené u výše jmenovaných výhodných a nejvýhodnějších sloučenin podle vynálezu.

Protože zdrojem R_1 je činidlo s odstupující skupinou ($C-R'$ nebo $C=O$), jeho identita samozřejmě závisí na struktuře tohoto činidla. Proto u sloučenin, kde R_1 je OH, musí být tímto činidlem sloučenina vzorce IIb. Podobně, je-li R_1 atom vodíku nebo alkylová skupina s 1 až 3 atomy uhlíku, použitým činidlem musí být sloučenina vzorce IIa. K získání inhibitorů, kde R_1 je O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, se nejdříve připraví sloučenina, kde R_1 je OH a potom se tato hydroxyskupina alkyluje standardními technikami, jako je reakce s hydridem sodným v DMF, s methyljodidem a ethyljodidem.

Bezprostřední předchůdce inhibitorů podle vynálezu obecného vzorce Ia (to je sloučeniny obecného vzorce II) lze připravit podle obou schemat syntesy popsanych níže:

Schema 1



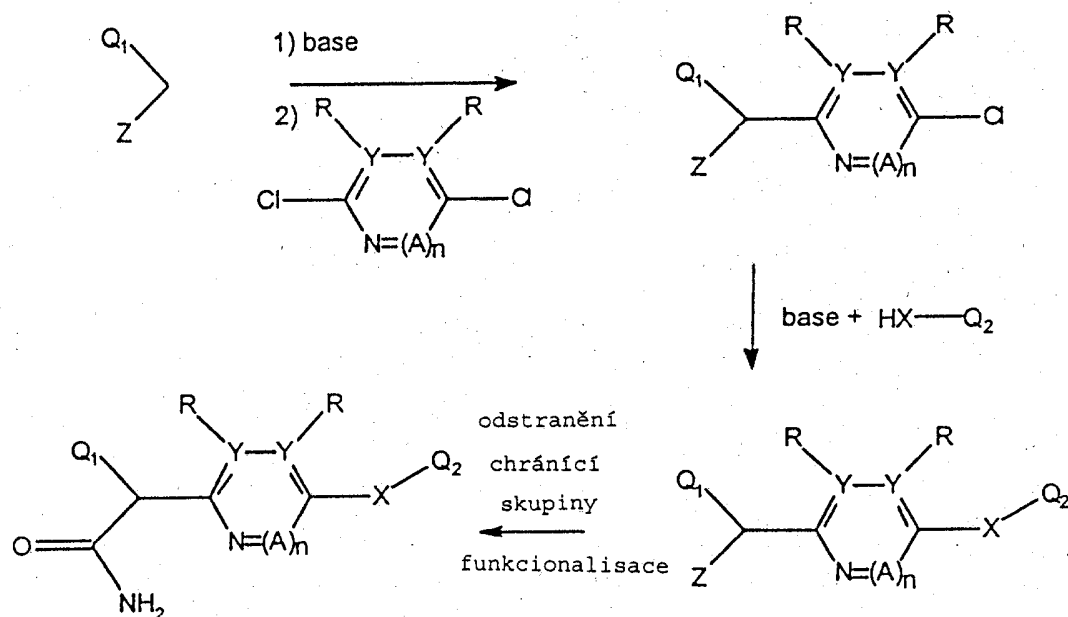
15.05.99

Ve schematu 1 lze pořadí stupňů 1) a 2) obrátit. Také výchozí nitril lze nahradit odpovídající kyselinou nebo esterem. Alternativně lze též použít místo nitrilu jiné známé latentní karboxylové skupiny nebo karboxamidové skupiny (viz schema 2). Do tohoto schematu lze začlenit obměny, jako jsou karboxylové kyseliny, estery karboxylových kyselin, oxazoliny nebo oxazolidinony, za použití následného odstranění chránících skupin a funkcionalisace, což jsou metody známé ze stavu techniky.

Jako base se v prvním stupni schematu 1 (a ve schematu 2 níže) používají hydrid sodný, amid sodný, LDA, lithiumhexamethyldisilazid, hexamethyldisilazid sodný nebo jakákoliv z ostatních nenukleofilních basí, které deprotonují polohu alfa na nitril.

Také přidání $HX-Q_2$ v jednom stupni, jak je výše naznačeno, lze nahradit dvěma stupni - přidáním chráněného nebo nechráněného X derivátu a potom adicí Q_2 derivátu v následujícím stupni.

Schema 2



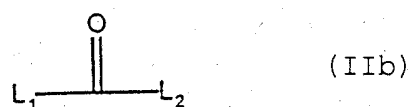
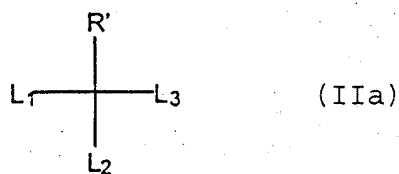
15.06.99

Ve schematu 2 je Z vybráno ze skupiny zahrnující COOH, COOR', CON(R')₂, oxazolin, oxazolidinon nebo CN. R' má s výhodou výše uvedený význam.

Dále se vynález týká způsobů přípravy inhibitorů p38 obecného vzorce Ib, jak je uveden výše. Tyto způsoby spočívají v reakci sloučeniny obecného vzorce III



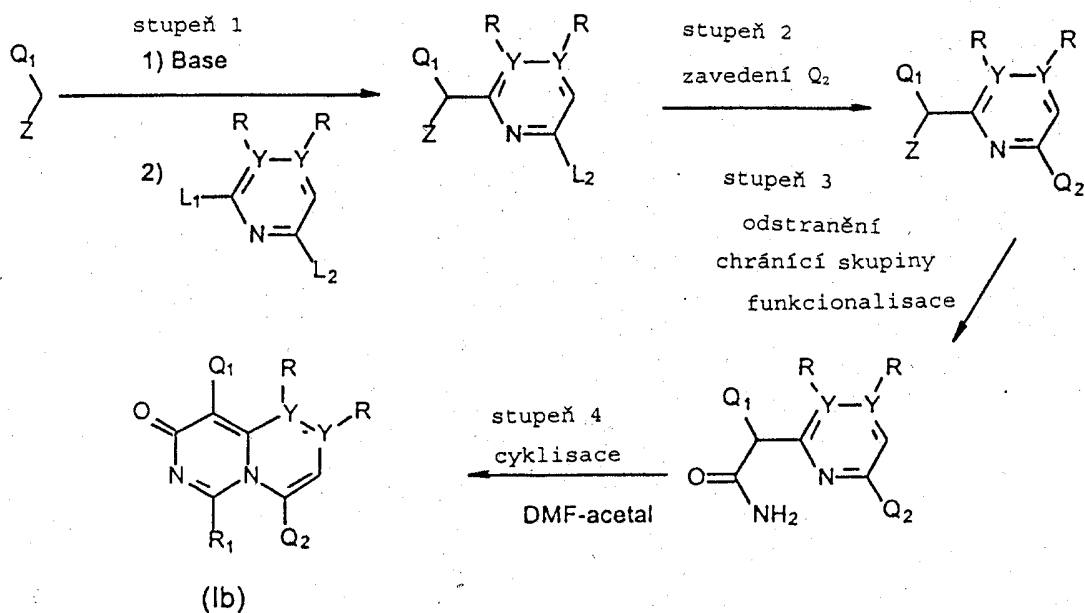
kde různé substituenty mají významy uvedené výše pro inhibitory podle vynálezu, s činidlem obsahujícím odstupující skupinu obecného vzorce IIa nebo IIb



jak jsou popsána výše.

Níže jsou uvedena dvě schemata úplné syntesy inhibitorů p38 obecného vzorce Ib podle vynálezu.

Schema 3



18.08.99

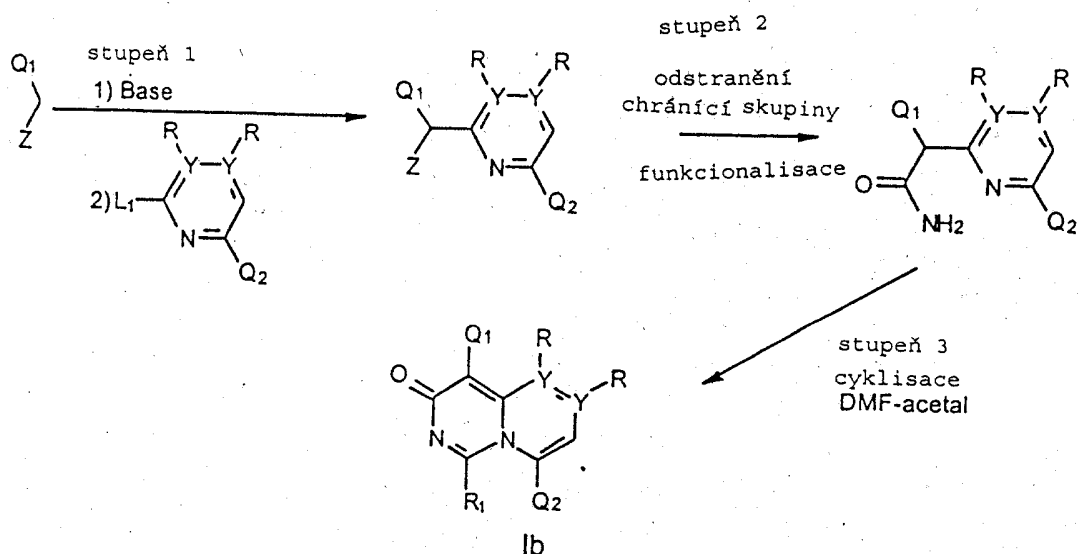
Ve schematu 3 lze Q_1 substituovaný derivát nechat reagovat s basí, jako je hydrid sodný, amid sodný, LDA, lithiumhexamethyldisilazid, hexamethyldisilazid sodný nebo jakákoliv jiná nenukleofilní base, která deprotonuje polohu alfa na Z skupině, což je maskovaná amidová skupina. Alternativně je Z karboxylová kyselina, ester karboxylové kyseliny, oxazolin nebo oxazolidinon. Anion vzniklý z deprotonace se potom uvede ve styk s dusíkatou heterocyklickou sloučeninou, která obsahuje dvě odstupující skupiny nebo latentní odstupující skupiny, v přítomnosti palladiového katalysátoru. Jako příklad takové sloučeniny lze uvést 2,6-dichlorpyridin.

Ve stupni 2 se zavádí Q_2 kruhová část. To lze provádět za použití mnoha reakcí známých ze stavu techniky, které vedou ke tvorbě diarylových sloučenin. Jedním příkladem může být reakce arylové lithiové sloučeniny s pyridinovým meziproduktem vzniklým ve stupni 1. Alternativně se arylkovová sloučenina, jako je arylstannan nebo arylboronová kyselina, nechá reagovat s arylhalogenidovou částí pyridinového meziprojektu v přítomnosti kovového palladiového katalysátoru.

Ve stupni 3 se ze skupiny Z odštěpí chránící skupina a/nebo se tato skupina funkcionalisuje za vzniku amidové sloučeniny. Je-li Z karboxylová kyselina, ester karboxylové kyseliny, oxazolin nebo oxazolidin, lze pro přípravu amidu použít různé způsoby odštěpení chránící skupiny a funkcionalisace, které jsou známe ze stavu techniky. Nakonec se ve stupni 4 amidová sloučenina cyklisuje na konečný produkt za použití reakčních činidel, jako jsou acetal DMF nebo podobná činidla, buď v čisté formě nebo v organickém rozpouštědle.

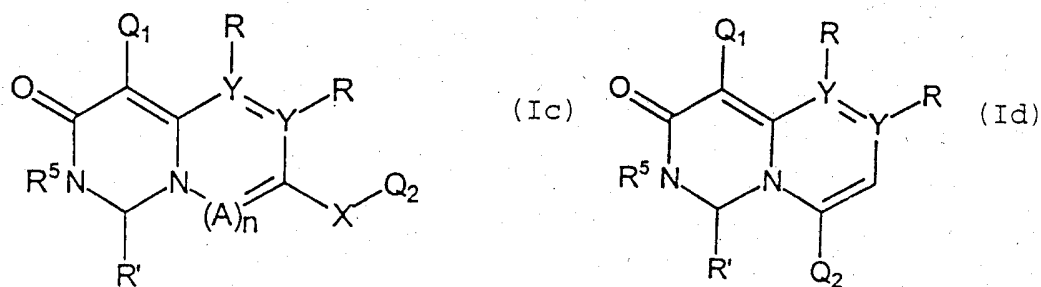
18.08.99

Schema 4



Schema 4 je podobné s výjimkou, že diarylový meziprodukt se nejprve uvolní před reakcí s Q_1 výchozí látkou.

Podstatou vynálezu jsou dále inhibitory p38 podobné inhibitorům obecných vzorců Ia a Ib výše, ale kde $C=N$ v kruhu nesoucím substituent Q_1 je redukována. Tyto inhibitory mají obecné vzorce Ic nebo Id



kde A, Q_1 , Q_2 , R, R' , X, Y a n mají význam uvedený výše pro sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib. Tyto definice platí pro všechna provedení každé z těchto možností (to je pro významy základní, výhodné, výhodnější a nejvýhodnější). R^5 je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, skupiny $-CR'_2OH$, $-C(O)R^4$, $-C(O)OR^4$, $-CR'_2OPO_3H_2$, $-PO_3H_2$ a soli $-PO_3H_2$.

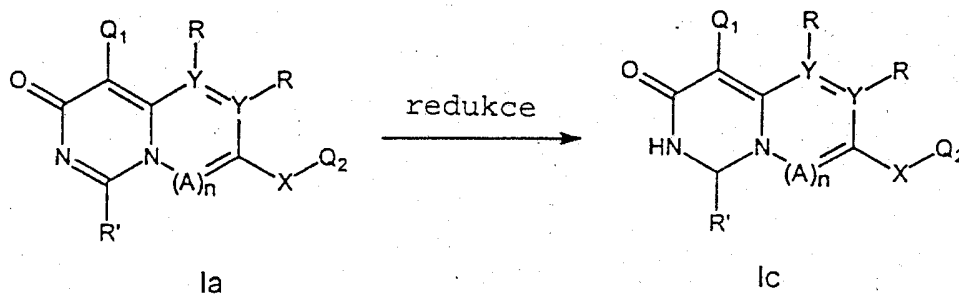
15.05.99

Jestliže R^5 není atom vodíku, očekává se, že vzniklé sloučeniny budou ve formě profarmak, která mohou být štěpena in vivo za vzniku sloučeniny, kde R^5 je atom vodíku.

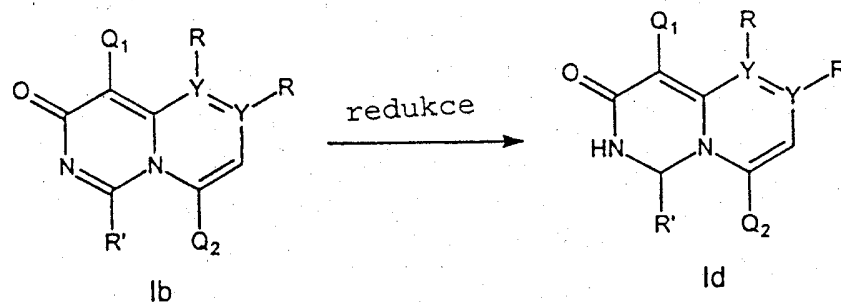
V dalším výhodném provedení ve sloučeninách obecného vzorce Ic je A s výhodou atom dusíku, n je s výhodou 1 a X je s výhodou atom síry. Ve sloučeninách obecného vzorce Ic nebo Id jsou Q_1 a Q_2 s výhodou stejné substituenty uvedené výše u sloučenin obecných vzorců Ia a Ib.

Sloučeniny obecných vzorců Ic a Id lze připravit přímo ze sloučenin obecného vzorce Ia nebo Ib, které obsahují atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku nebo alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku nebo alkinylovou skupinu v poloze substituentu R_1 (to je, kde $R_1 = R'$). Schemata syntesy těchto sloučenin jsou znázorněna ve schématech 5 a 6 níže.

Schema 5



Schema 6



15.08.99

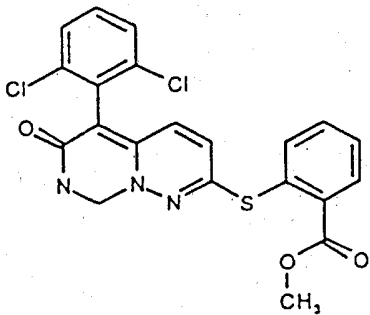
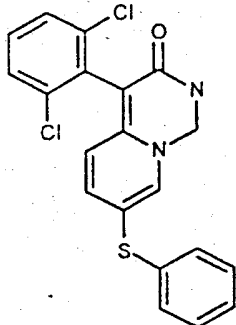
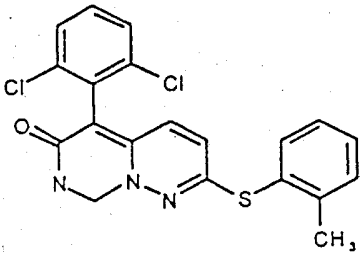
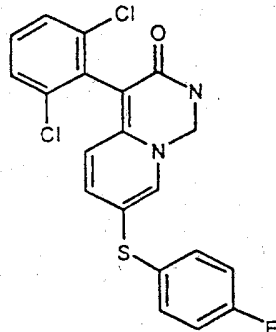
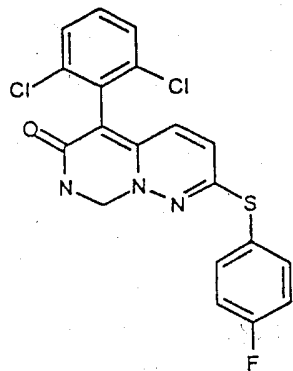
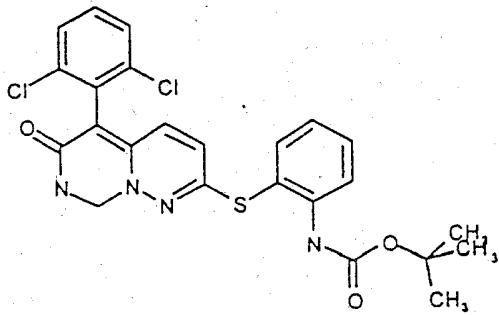
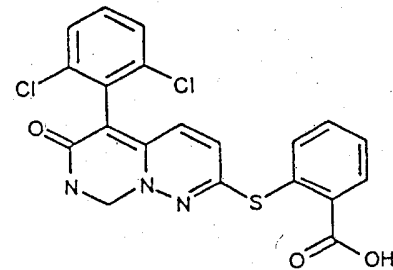
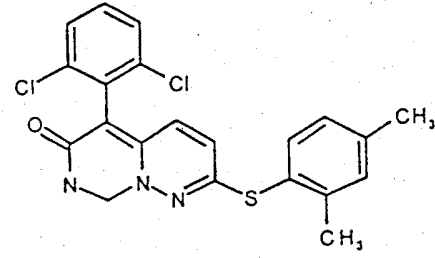
V těchto schemech se sloučeniny obecného vzorce Ia nebo Ib redukuje reakcí s nadbytkem diisobutylaluminiumhydridu nebo s ekvivalentním činidlem, čímž se získá kruhová redukovaná sloučenina obecného vzorce Ic nebo Id.

Zavedení jiné skupiny R^5 než je atom vodíku na kruhový atom dusíku se provádí reakcí sloučenin vzorce Ic nebo Id uvedených výše s příslušným činidlem nebo s příslušnými činidly. Příklady těchto modifikací jsou uvedeny níže v příkladech provedení vynálezu.

Určité specifické inhibitory podle vynálezu obecného vzorce Ic jsou shrnuty v tabulce 2 níže.

18.08.99

Tabulka 2 Sloučeniny obecného vzorce Ic

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
101		110	
102		111	
103		112	
104		113	

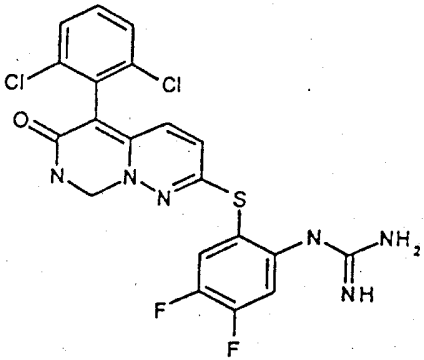
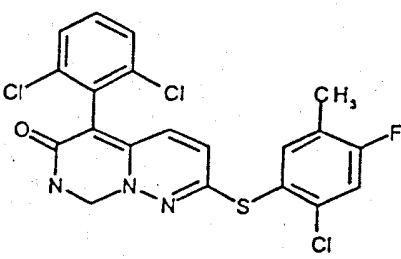
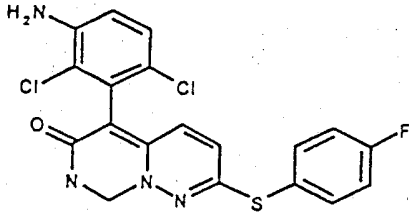
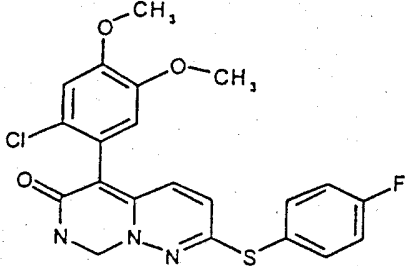
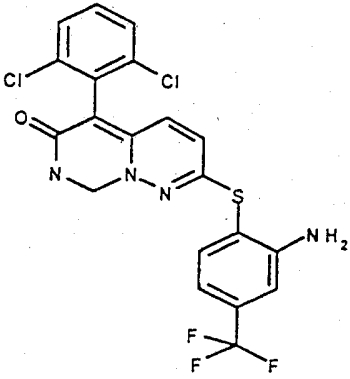
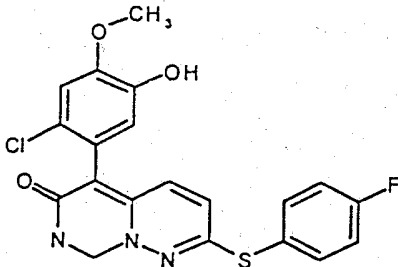
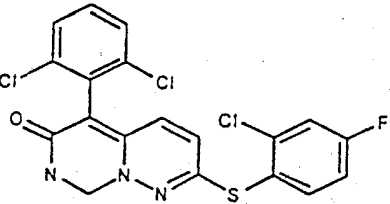
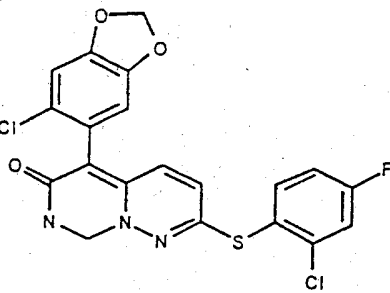
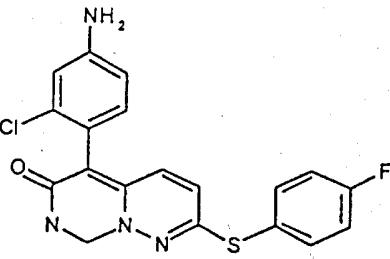
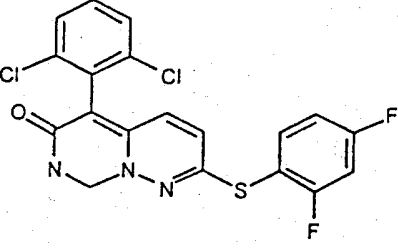
18.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
105		114	
106		115	
107		116	
108		117	
109		118	

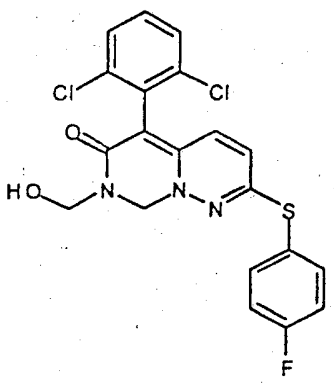
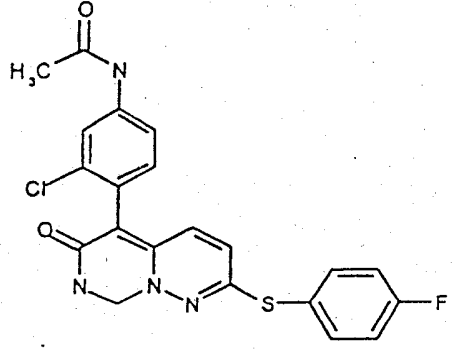
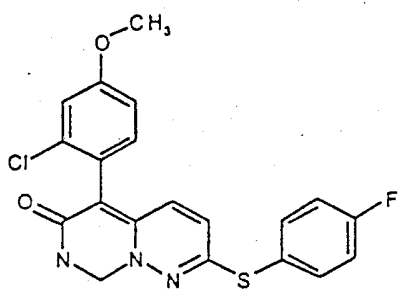
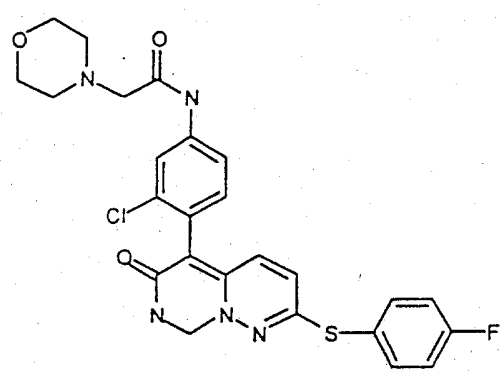
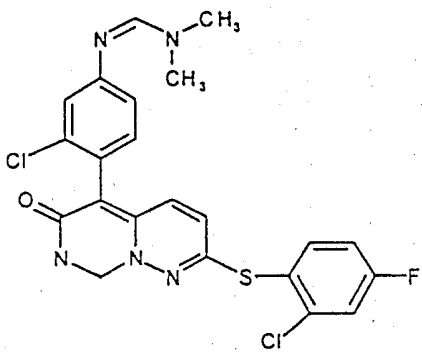
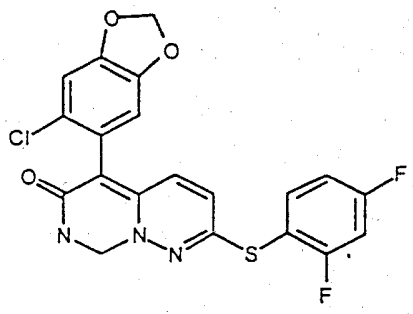
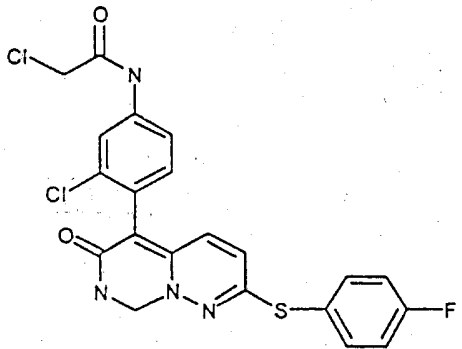
18.08.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
119		128	
120		129	
121		130	
122		131	
123		132	

16.06.99

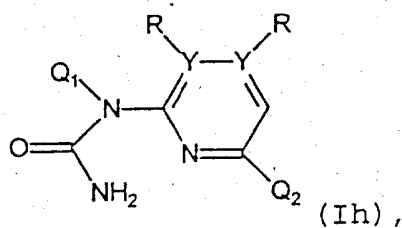
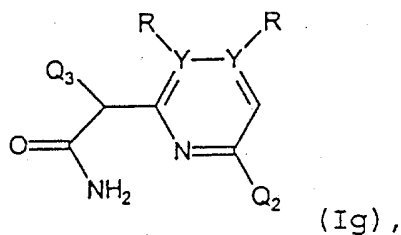
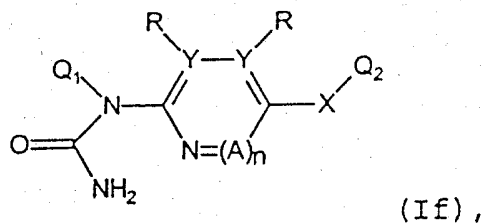
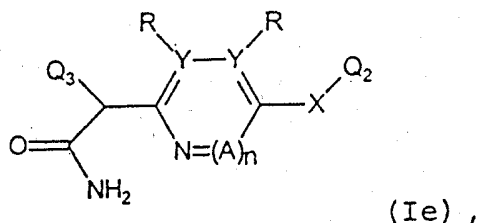
sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
124		133	
125		134	
126		135	
127		136	
137		142	

18.08.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
138		143	
139		144	
140		145	
141			

18.08.99

Podstatou vynálezu jsou dále inhibitory p38 obecných vzorců Ie, If, Ig nebo Ih



kde A, Q₁, Q₂, R, X, Y a n mají význam uvedený výše u obecných vzorců Ia a Ib. Tyto definice platí pro všechna provedení každého z proměnných významů (to je pro základní, výhodné, ještě výhodnější a nejvýhodnější významy). Ještě výhodněji je ve sloučeninách obecného vzorce Ie Q₂ nesubstituovaná fenyllová skupina.

Q₃ je pětičlenný až šestičlenný aromatický karbocyklický nebo heterocyklický kruhový systém nebo osmičlenný až desetičlenný bicyklický kruhový systém obsahující aromatické karbocyklické kruhy, aromatické heterocyklické kruhy nebo kombinaci aromatického karbocyklického kruhu a aromatického heterocyklického kruhu. Kruhy Q₃ jsou substituovány 1 až 4 substituenty, které jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'₂, OR', CO₂R' nebo CONR'₂, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'₂, OR', CO₂R' nebo CONR'₂, dále skupiny NR'₂, OCF₃, CF₃, NO₂, CO₂R', CONR', SR', S(O₂)N(R')₂, SCF₃, CN, N(R')C(O)R⁴, N(R')C(O)OR⁴, N(R')C(O)C(O)R⁴, N(R')S(O₂)R⁴, N(R')R⁴, N(R⁴)₂, OR⁴, OC(O)R⁴, OP(O)₃H₂ nebo N=C-N(R')₂.

18.05.99

Podle jednoho výhodného provedení je Q_3 substituováno 2 až 4 substituenty, kde alespoň jeden z těchto substituentů je přítomen v poloze ortho vzhledem k místu připojení Q_3 na zbytek inhibitoru. Jestliže Q_3 je bicyklický kruh, jsou přítomny dva substituenty v poloze ortho na kruhu, který je nejbližší (to je, který je přímo připojen) ke zbytku molekuly inhibitoru. Další dva případné substituenty mohou být přítomny na každém kruhu. Ještě výhodněji jsou obě ortho polohy substituovány jedním z těchto substituentů.

Podle dalšího výhodného provedení je Q_3 monocyklický karbocyklický kruh, kde každý ortho substituent je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu nebo methylovou skupinu. Podle dalšího výhodného provedení Q_3 obsahuje 1 nebo 2 další substituenty nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující skupiny NR'_2 , OR' , CO_2R' , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$ nebo $N=C-N(R')_2$.

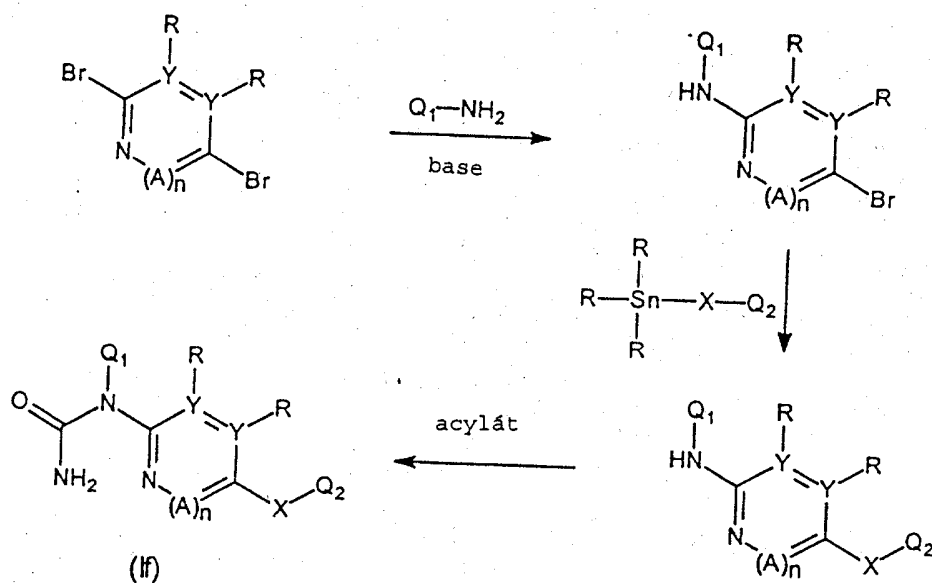
Výhodně je Q_3 vybráno z jakýchkoliv významů Q_3 přítomných ve sloučeninách vzorce Ie shrnutých v tabulce 3 níže nebo z jakýchkoliv významů Q_3 přítomných ve sloučeninách vzorce Ig shrnutých v tabulce 4 níže.

Pracovníkům v oboru je zřejmé, že sloučeniny obecného vzorce Ie jsou přímými prekursory určitých inhibitorů p38 podle vynálezu obecného vzorce Ia a Ic (to je, kde $Q_1 = Q_3$). Dále je též zřejmé, že sloučeniny obecného vzorce Ig jsou prekursory určitých inhibitorů p38 podle vynálezu obecného vzorce Ib a Id (to je, kde $Q_1 = Q_3$). Proto syntesa inhibitorů obecného vzorce Ie je znázorněna výše ve schematech 1 a 2, kde Q_1 se nahradí za Q_3 . Podobně syntesa inhibitorů obecného vzorce Ig je znázorněna ve schematech 3 a 4, kde Q_1 se nahradí ze Q_3 .

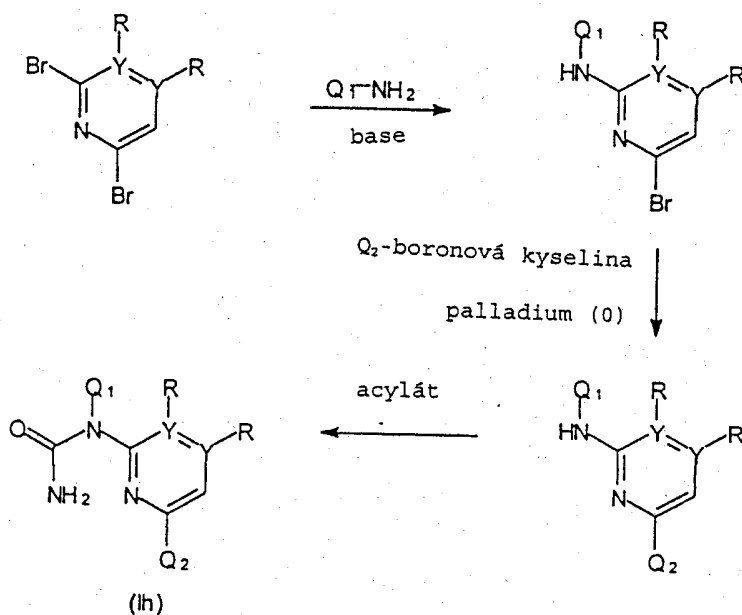
Syntesa inhibitorů obecného vzorce If a Ih je níže znázorněna ve schematech 7 a 8.

18.08.99

Schema 7



Schema 8



Schema 8 zobrazuje syntesu sloučenin typu Ih. Například reakcí výchozího dibromderivátu, jako je 2,6-dibrompyridin, s aminem v přítomnosti base, jako je hydrid sodný, se získá 2-amino-6-bromderivát. Reakcí tohoto meziproductu s analogem fenylboronové kyseliny (Q_2 -boronová kyselina), jako je fenylboronová kyselina, v přítomnosti palladiového katalysátoru se získá disubstituovaný derivát, který se potom

18.08.99

může acylovat na konečný produkt. Pořadí prvních dvou stupňů této syntesy se může obrátit.

Vynálezci předpokládají, aniž by byli vázáni na teorii, že diorthosubstituce v Q_3 kruhu inhibitorů obecných vzorců I_e a I_g a přítomnost dusíku přímo připojeného na Q_1 kruh v inhibitech obecných vzorců I_f a I_h způsobují "zploštění" sloučeniny, což umožňuje účinně inhibovat p38.

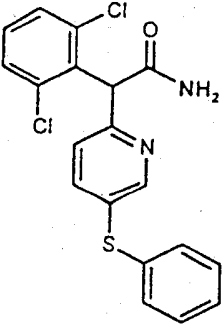
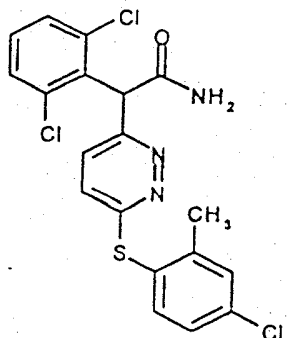
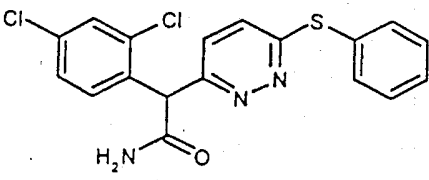
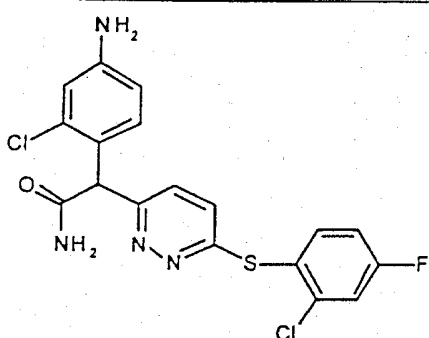
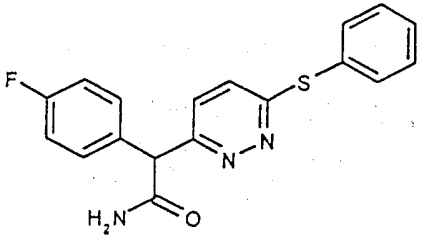
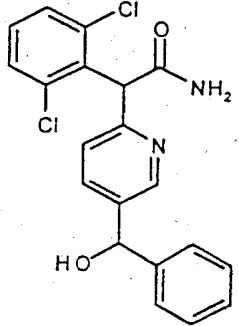
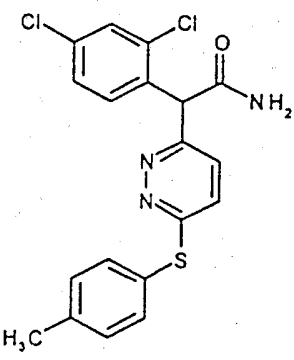
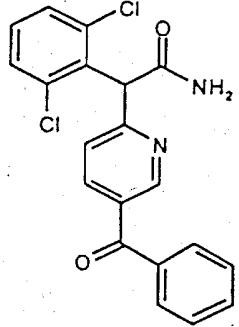
Výhodným inhibitorem podle vynálezu obecného vzorce I_e je sloučenina, kde A je atom uhlíku, n je 1, X je atom síry, každé Y je atom uhlíku, každé R je atom vodíku, Q_3 je 2,6-dichlorfenyl a Q_2 je fenyl, přičemž tato sloučenina je zde označena jako sloučenina 201. Výhodným inhibitorem podle vynálezu obecného vzorce I_g je sloučenina, kde Q_3 je 2,6-dichlorfenyl, Q_2 je fenyl, každé Y je atom uhlíku a každé R je atom vodíku. Tato sloučenina je zde označena jako sloučenina 202. Další výhodné sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I_g jsou shrnuty v tabulce 4 níže.

Výhodné sloučeniny podle vynálezu obecného vzorce I_h jsou shrnuty v tabulce 5 níže. Dalšími výhodnými sloučeninami obecného vzorce I_h jsou sloučeniny, kde Q_1 je fenyl nezávisle substituovaný v polohách 2 a 6 atomem chloru nebo fluoru, každé Y je atom uhlíku, každé R je atom vodíku a Q_2 je 2-methylfenyl, 4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-methylenhydroxy-4-fluorfenyl nebo 2-methyl-4-fluorfenyl.

Určité specifické inhibitory obecných vzorců I_e , I_g a I_h jsou shrnuty v tabulkách níže.

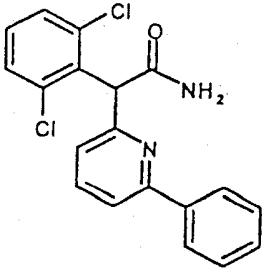
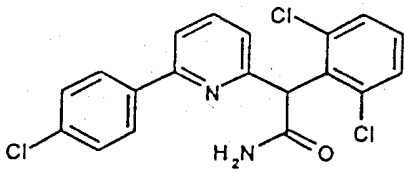
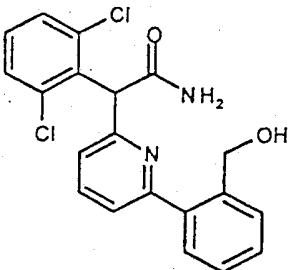
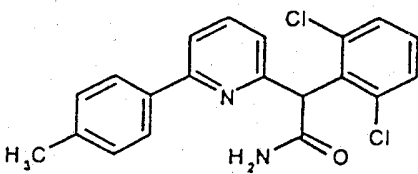
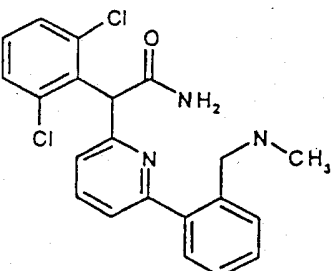
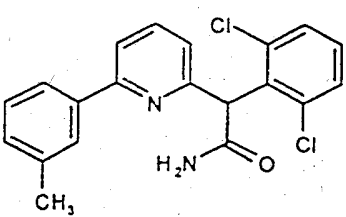
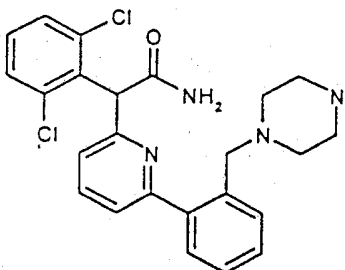
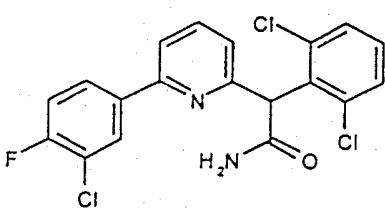
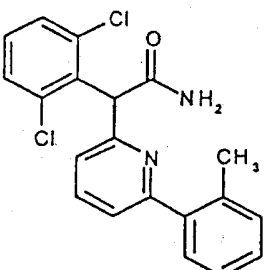
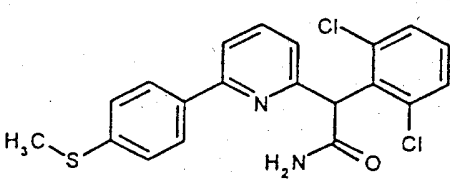
18.06.99

Tabulka 3 Inhibitory obecného vzorce Ie

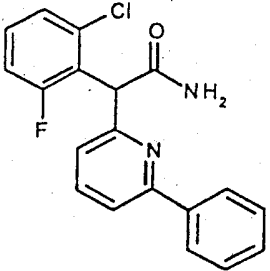
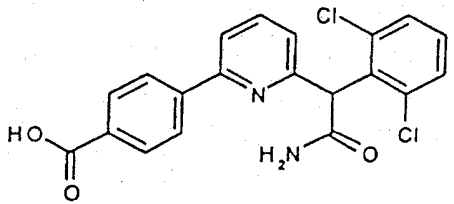
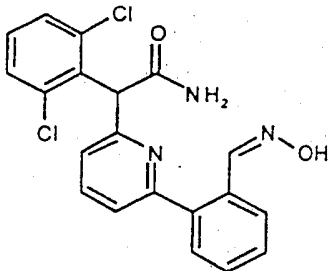
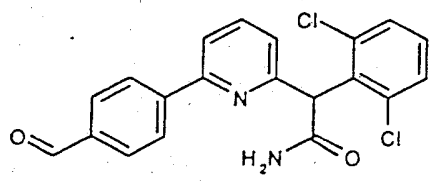
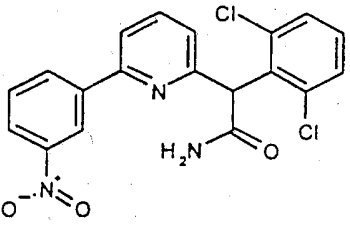
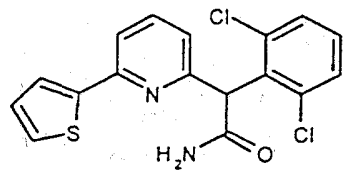
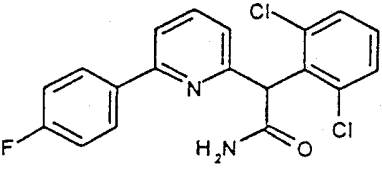
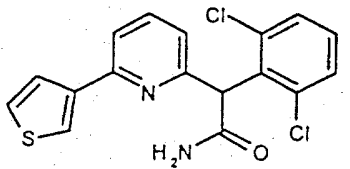
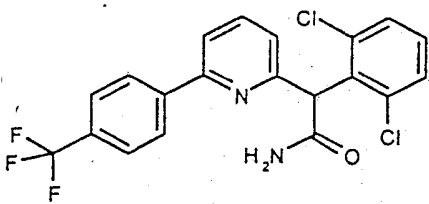
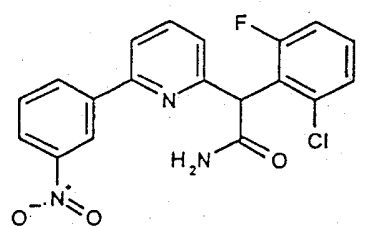
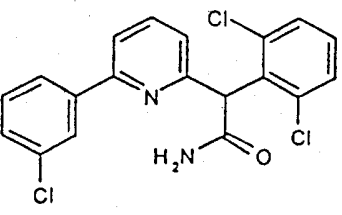
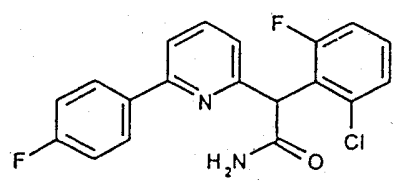
sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
201		206	
203		207	
204		208	
205		209	

18.08.99

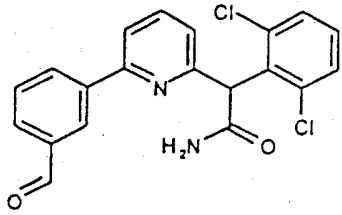
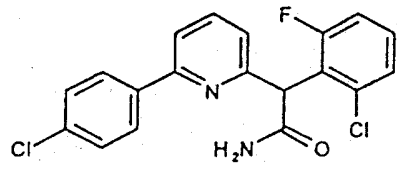
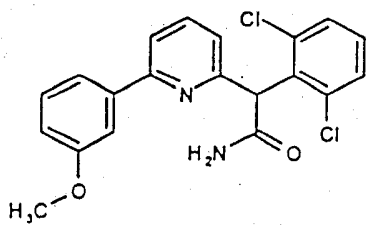
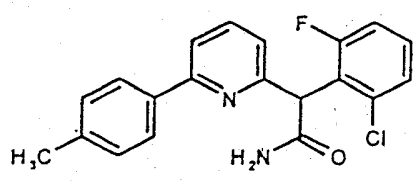
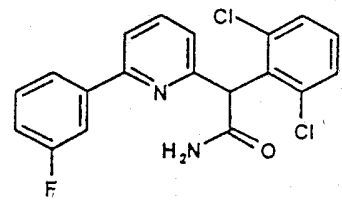
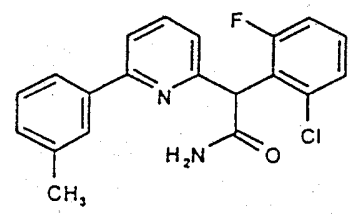
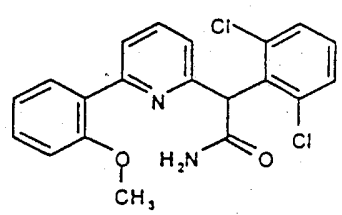
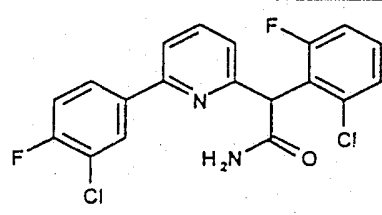
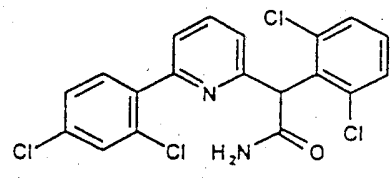
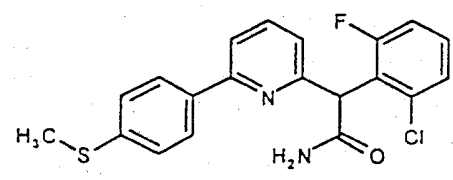
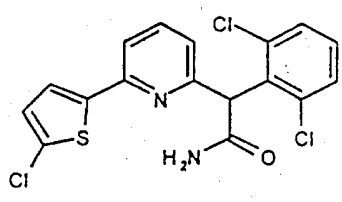
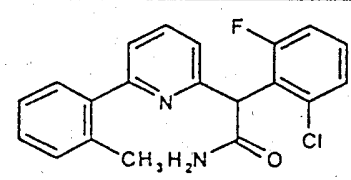
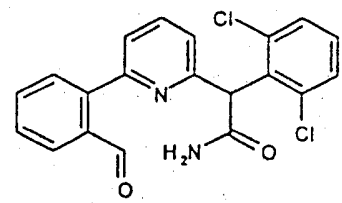
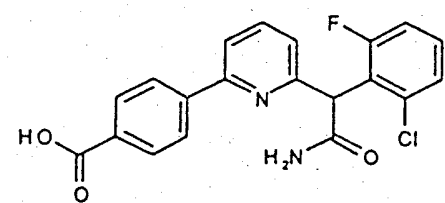
Tabulka 4 Inhibitory obecného vzorce Ig

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
202/ 301		310	
302		311	
303		312	
304		313	
305		314	

18.08.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
306		315	
307		316	
308		317	
309		318	
319		328	
320		329	

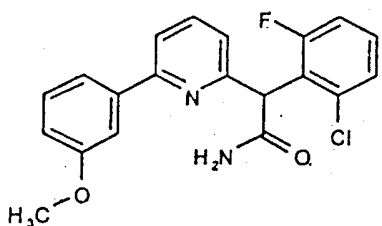
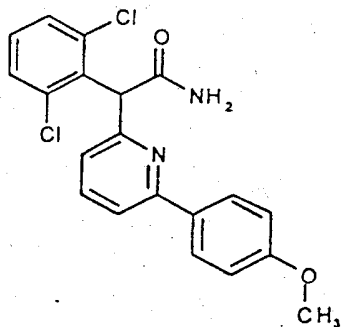
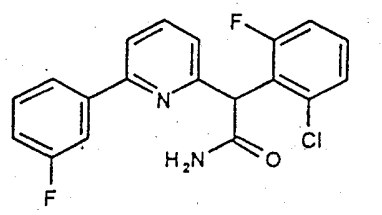
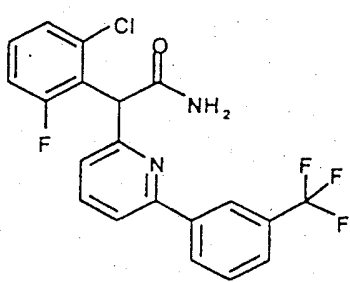
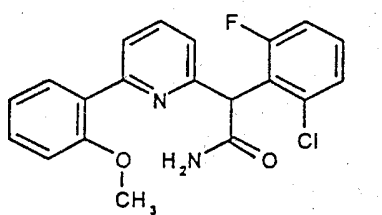
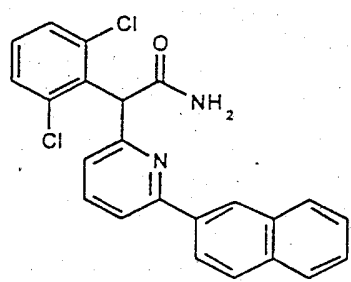
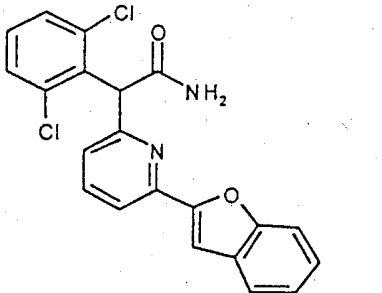
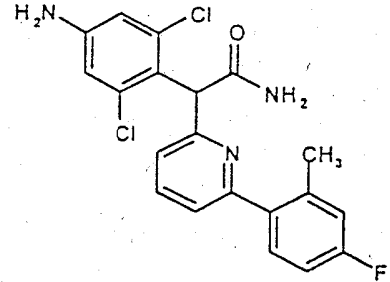
18.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
321		330	
322		331	
323		332	
324		333	
325		334	
326		335	
327		336	

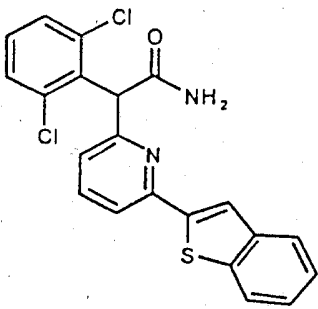
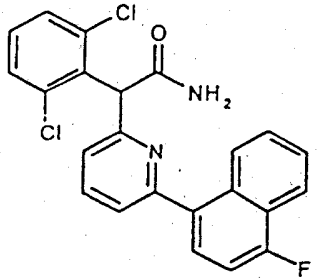
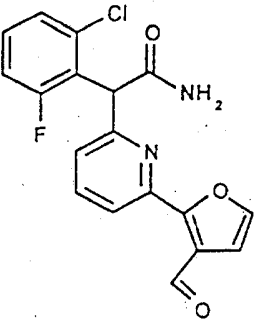
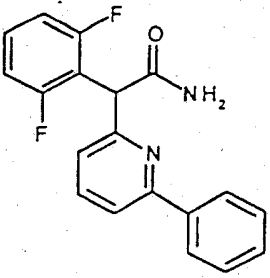
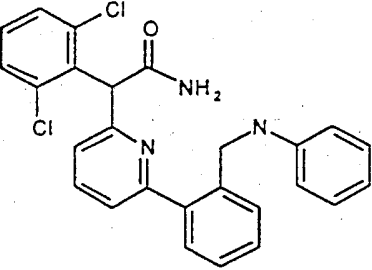
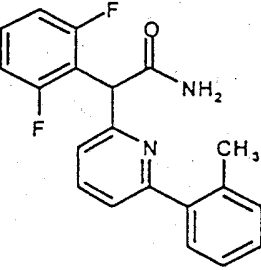
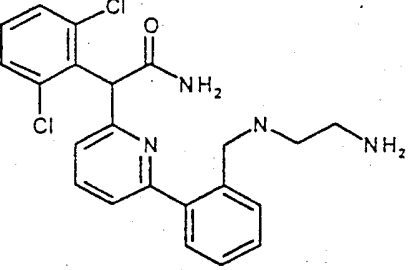
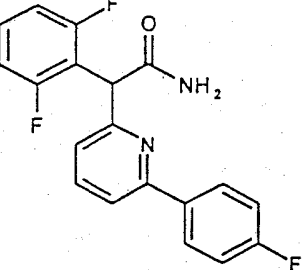
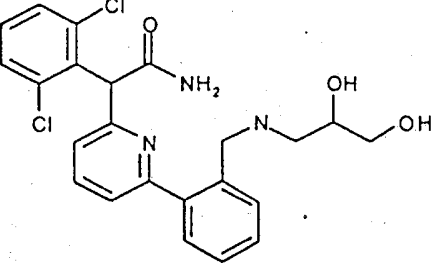
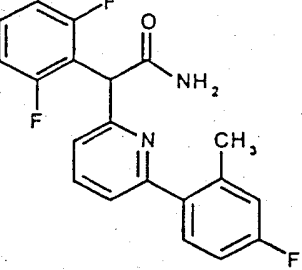
16.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
337		346	
338		347	
339		348	
340		349	
341		350	
342		351	

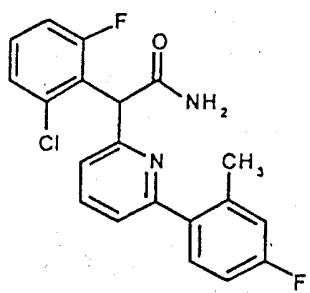
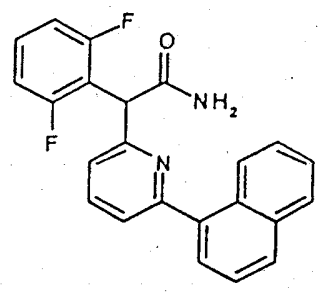
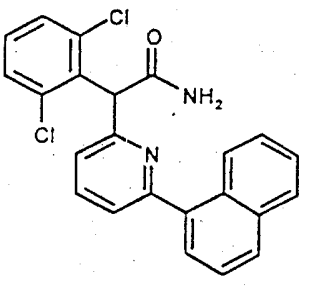
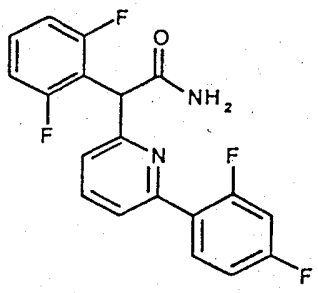
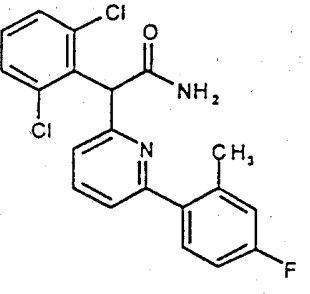
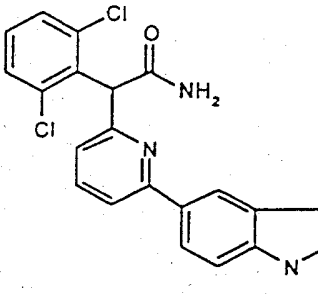
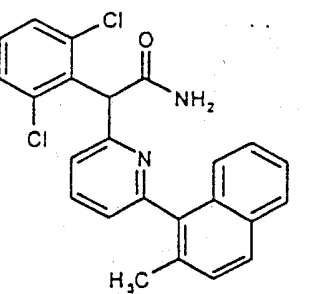
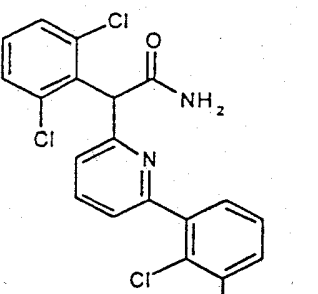
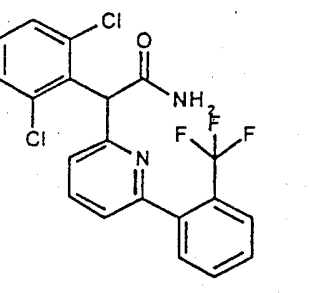
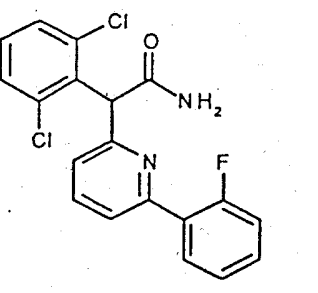
15.05.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
343		352	
344		353	
345		354	
355		364	

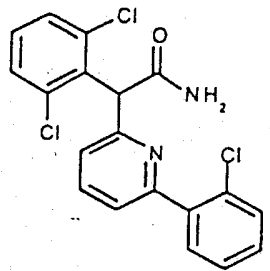
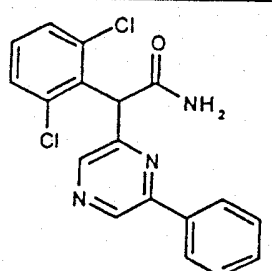
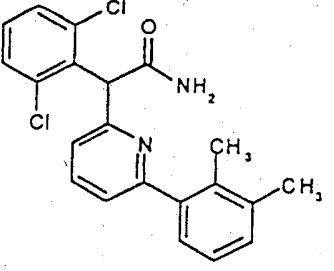
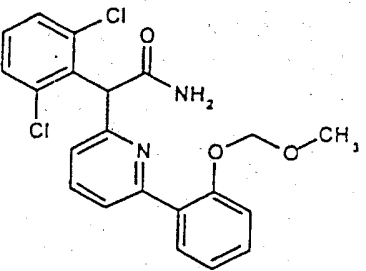
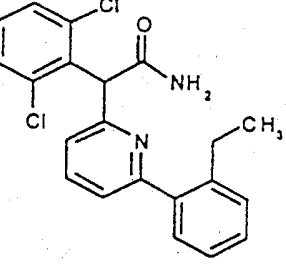
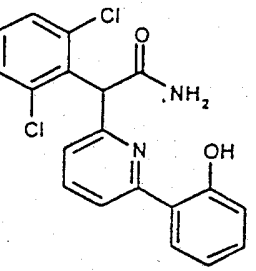
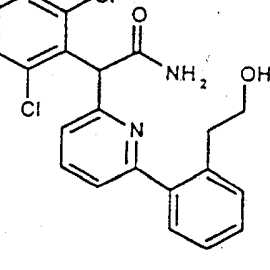
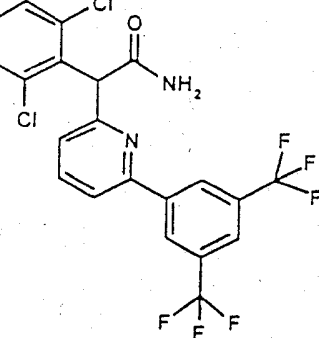
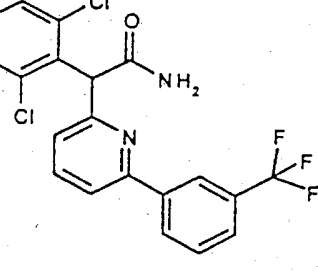
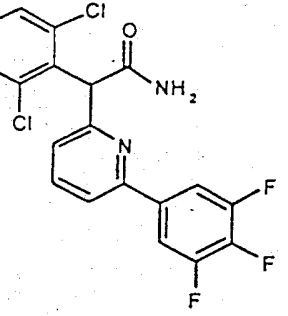
18.08.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
356		365	
357		366	
358		367	
359		368	
360		369	

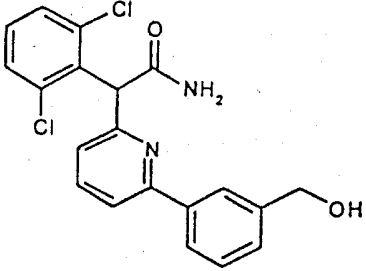
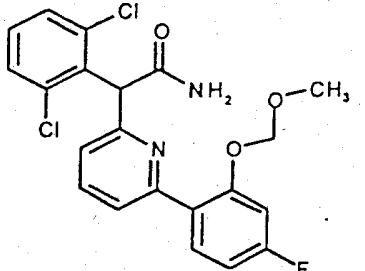
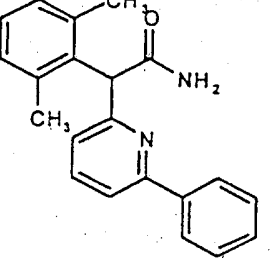
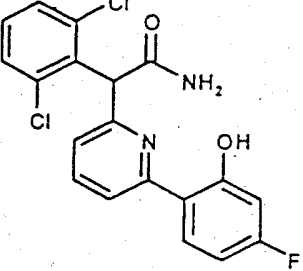
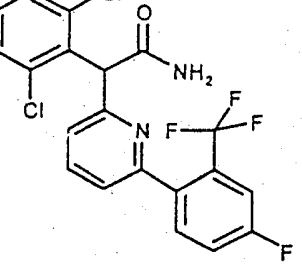
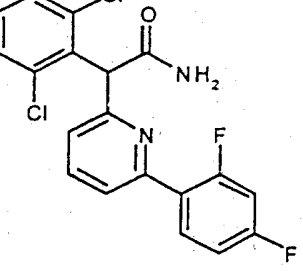
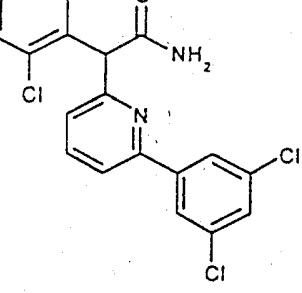
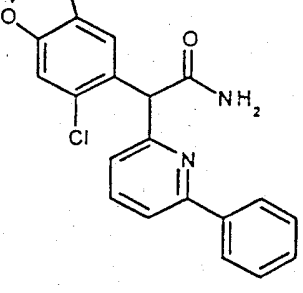
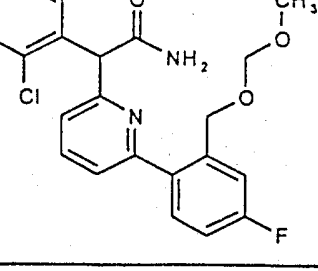
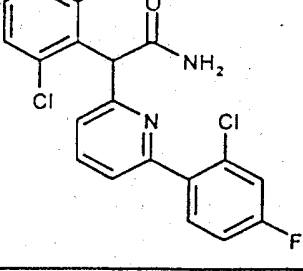
18.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
361		370	
362		371	
363		372	
373		382	
374		383	

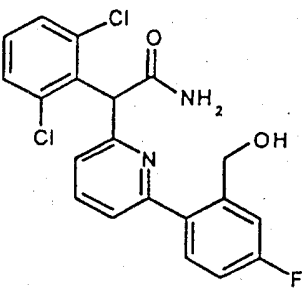
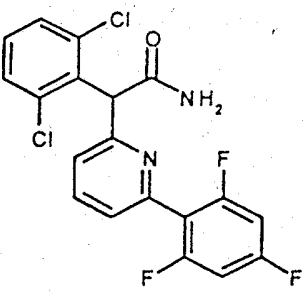
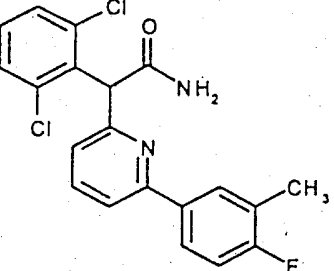
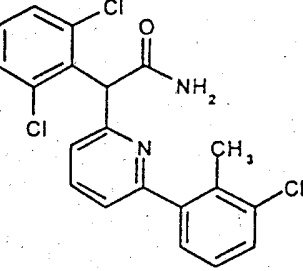
16.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
375		384	
376		385	
377		386	
378		387	
379		388	

18.06.99

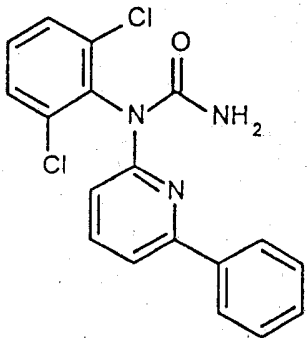
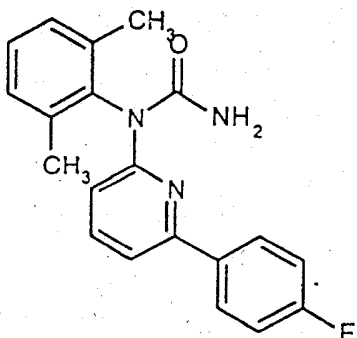
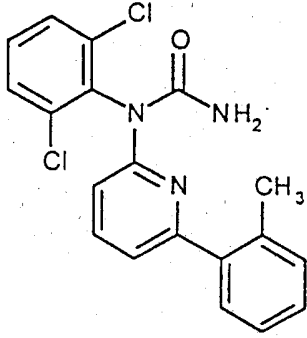
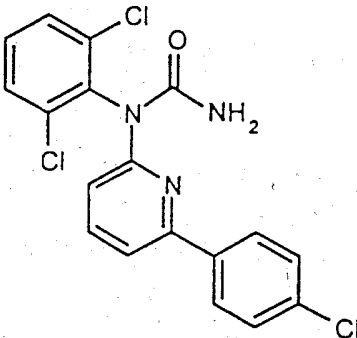
sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
380		389	
381		390	
391		396	
392		397	
393		398	

18.06.99

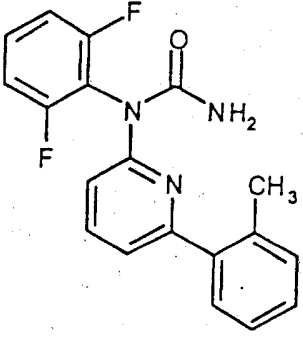
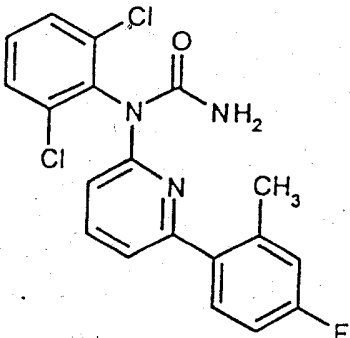
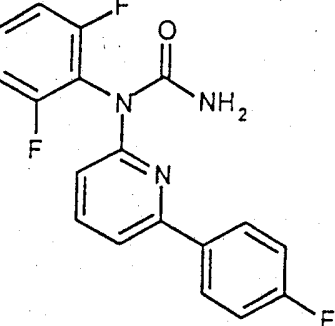
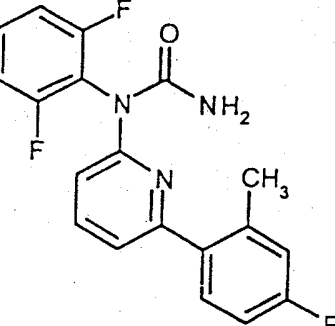
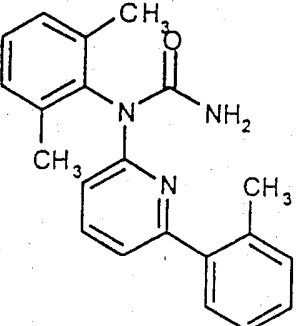
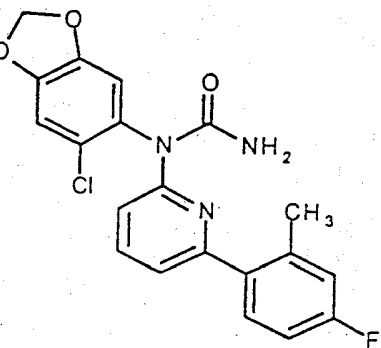
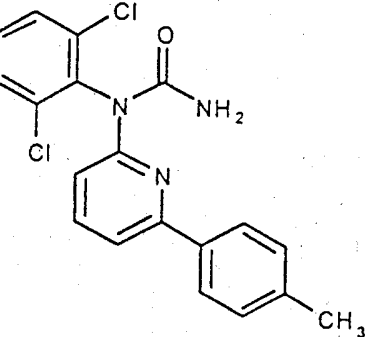
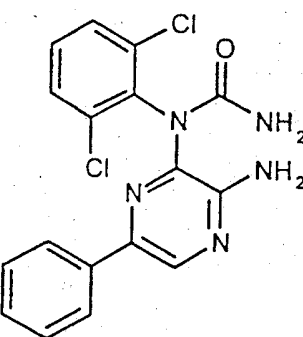
sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
394		399	
395		1301	

16.05.99

Tabulka 5 Inhibitory obecného vzorce I_h

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
401		407	
402		408	

18.06.99

sl.č.	struktura	sl.č.	struktura
403		409	
404		410	
405		411	
406		412	

15.06.99

Účinnost inhibitorů p38 podle vynálezu byla zkoušena in vitro, in vivo nebo v buněčné linii. Testy in vitro zahrnují testy, které stanoví inhibici buď účinnosti kinasy nebo účinnosti ATPasy aktivovaného p38. Alternativně testy in vitro stanovují schopnost inhibitoru vázat se na p38 a lze to měřit buď radioaktivním značením inhibitoru před vázáním, izolováním komplexu inhibitor/p38 a stanovením množství radioznačené vazby, nebo provedením pokusu, kdy se nové inhibitory inkubují s p38 vazbou na známé radioligandy.

Testy buněčné kultury na inhibiční účinnost sloučenin podle vynálezu mohou stanovit množství TNF, IL-1, IL-6 nebo IL-8 produkované v čisté krvi nebo v jejích buněčných frakcích v buňkách ošetřených inhibitorem ve srovnání s buňkami ošetřenými negativními kontrolami. Hladina těchto cytokinů se může stanovit použitím komerčně dostupných látek ELISA.

In vivo testem použitelným pro stanovení inhibiční účinnosti inhibitorů p38 podle vynálezu je potlačení otoku zadní tlapy u krys u arthritidy vyvolané pomocnou látkou *Mycobacterium butyricum*. To je popsáno v práci J. C. Boehm a j., J. Med. Chem., 39, str. 3929 až 3937 (1996), což je zde uváděno jako odkaz. Inhibitory p38 podle vynálezu lze také testovat na zvířecích modelech arthritidy, resorpce kostí, endotoxinového šoku a funkce imunity, jak je popsáno v práci A. M. Badger a j., J. Pharmacol. Experimental Therapeutics, 279, str. 1453 až 1461 (1996), což je zde uváděno jako odkaz.

Inhibitory p38 nebo jejich farmaceutické soli lze formulovat do farmaceutických prostředků pro podávání zvířatům nebo lidem. Tyto farmaceutické prostředky, které obsahují množství inhibitoru p38 účinné k ošetření nebo prevenci stavu způsobeného p38 a farmaceuticky přijatelný nosič, tvoří též součást předloženého vynálezu.

Výraz "stav způsobený p38", jak je zde používán, znamená jakékoliv onemocnění nebo jiný škodlivý stav, o kterém je známo, že při něm p38 hraje roli. Jedná se o stavy, o nichž je

18.08.99

známo, že jsou způsobeny nadprodukcí IL-1, THF, IL-6 nebo IL-8. Těmito stavy jsou, bez omezení, zánětlivá onemocnění, autoimunní onemocnění, destruktivní choroby kostí, proliferativní onemocnění, infekční onemocnění, neurodegenerativní onemocnění, alergie, reperfuze/ischemie u mrtvice, srdeční záchvaty, angiogenní onemocnění, hypoxie orgánů, vaskulární hyperplasie, srdeční hypertrofie, thrombinem vyvolané agregace destiček a stavy spojené s prostaglandinovou endoperoxidasou-2.

Jako zánětlivá onemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést akutní pankreatitidu, chronickou pankreatitidu, astma, alergie a syndrom respirační úzkosti u dospělých.

Jako autoimunní onemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést glomerulonefritidu, revmatickou artritidu, systemický lupus erythematosus, sklerodermii, chronickou thyreoiditidu, Gravesovo onemocnění, autoimunní gastritidu, diabetes, autoimunní hemolytickou anemii, autoimunní neutropenii, trombocytopenii, atopickou dermatitidu, chronickou aktivní hepatitidu, těžkou myasthenii, sklerosu multiplex, zánětlivé střevní onemocnění, vředovou kolitidu, Crohnovo onemocnění, psoriasis nebo onemocnění způsobené reakcí štěp - hostitel.

Jako destruktivní poruchy kostí, které lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést osteoporosu, osteoartritidu a mnohočetný myelom způsobený poruchou kostí.

Jako proliferativní onemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést akutní myelogenní leukemii, chronickou myelogenní leukemii, metastatický melanom, Kaposiho sarkom a mnohočetný myelom.

16.06.99

Jako angiogenní nemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, lze uvést pevné nádory, oční neovaskulitidu, infantilní hemangiomy.

Jako infekční nemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést sepsi, septický šok a Shigellosu.

Jako virová nemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými lze se chránit, aniž by však to bylo omezeno pouze na ně, lze uvést akutní hepatitidovou infekci (včetně hepatitidy A, hepatitidy B a hepatitidy C), HIV infekci a CMV retinitidu.

Jako neurodegenerativní onemocnění, která lze ošetřovat nebo před kterými se lze pomocí sloučenin podle vynálezu chránit, aniž by to však bylo omezeno pouze na ně, lze uvést Alzheimerovo onemocnění, Parkinsonovo onemocnění, cerebrální ischemie nebo neurodegenerativní onemocnění způsobené traumatickým poraněním.

"Stavy způsobené p38" také zahrnují ischemii/reperfusi u mrtvice, srdeční záchvaty, myokardiální ischemii, hypoxii orgánů, vaskulární hyperplasii, kardiální hypertrofii a thrombinem vyvolanou agregaci destiček.

Kromě toho jsou inhibitory p38 podle vynálezu také schopny inhibovat expresi vyvolanou prozánětlivými proteiny, jako je prostaglandinová endoperoxid synthasa-2 (PGHS-2), také označovaná jako cyklooxygenasa-2 (COX-2). Proto dalšími "stavy způsobenými p38" jsou otoky, analgesie, horečka a bolesti, jako jsou neuromuskulární bolesti, bolesti hlavy, rakovinové bolesti, bolesti zubů a bolesti při arthritidě.

Onemocnění, která lze ošetřovat nebo proti kterým se lze bránit inhibitory p38 podle vynálezu, lze také vhodně zařadit do skupiny cytokinů (IL-1, TNF, IL-6, IL-8), o kterých se předpokládá, že způsobují tato onemocnění.

Tak onemocnění nebo stavy způsobené IL-1 zahrnují revmatickou arthritidu, osteoartritu, mrtvici, syndrom endotoxemie a/nebo toxického šoku, zánětlivou reakci vyvolanou

15.06.99

endotoxinem, zánětlivé střevní onemocnění, tuberkulosu, atherosklerosu, degeneraci svalů, kachexii, psoriatickou arthritidu, Reiterův syndrom, dnu, traumatickou arthritidu, rubeolovou arthritidu, akutní synovitidu, diabetes, pankreatické onemocnění β -buněk a Alzheimerovo onemocnění.

Onemocnění nebo stavy způsobené TNF zahrnují revmatickou arthritidu, rhevmatickou spondylitidu, osteoarthritis, dnovou arthritidu a další arthritické stavy, sepsi, septický šok, endotoxický šok, gramnegativní sepsi, toxický šokový syndrom, syndrom respiračních chorob dospělých, cerebrální malarii, chronická pulmonární zánětlivá onemocnění, silikosu, pulmonární sarkoidosu, choroby resorpce kostí, reperfusní poranění, reakce štěp - hostitel, odmítání aloimplantátu, horečku a myalgii způsobenou infekcí, kachexii sekundární na infekci, AIDS, ARC nebo zhoubné bujení, keloidní formace, tvorbu zjizvené tkáně, Crohnovo onemocnění, ulcerativní kolitidu nebo pyrexii. Onemocnění způsobená TNF také zahrnují virové infekce, jako je HIV, CMV, chřipka a herpes, a veterinární virové infekce, jako jsou lentivirové infekce, včetně, avšak nikoliv pouze, koňského infekčního viru anemie, viru kozlí arthritidy, viru visna nebo viru maedi, nebo retrovirové infekce, včetně viru kočičího deficitu imunity, viru hovězího deficitu imunity nebo viru psího deficitu imunity.

Onemocnění a stavy způsobené IL-8 zahrnují onemocnění charakterizovaná masivní neurofilní infiltrací, jako je psoriasis, zánětlivé střevní onemocnění, astma, srdeční a ledvinová reperfusní poranění, syndrom respiračních chorob dospělých, thrombosa a glomerulonefritida.

Kromě toho lze sloučeniny podle vynálezu použít topicky k ošetření nebo k prevenci stavů způsobených nebo exacerbovaných IL-1 nebo TNF. Těmito stavy jsou zanícené klouby, ekzém, psoriasis, zánětlivé stavy kůže, jako je spálení sluncem,

15.05.99

zánětlivé oční stavy, jako je konjunktivitida, pyrexie, bolest a další stavy spojené se zánětem.

Kromě toho lze také sloučeniny podle vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelné soli použít v prostředcích pro ošetřování nebo prevenci výše uvedených onemocnění.

Farmaceuticky přijatelnými solemi sloučenin podle vynálezu jsou soli odvozené od farmaceuticky přijatelných anorganických a organických kyselin a basí. Jako příklady vhodných solí s kyselinami lze uvést acetát, adipát, alginát, aspartát, benzoát, benzensulfonát, hydrogensíran, butyrát, citrát, kafrát, kafrsulfonát, cyklopentanpropionát, diglukonát, dodecylsulfát, ethansulfonát, formiát, fumarát, glukohoheptanoát, glycerofosfát, glukolát, hemisulfát, heptanoát, hexanoát, hydrochlorid, hydrobromid, hydrojodid, 2-hydroxyethansulfonát, laktát, maleinát, malonát, methansulfonát, 2-naftalensulfonát, nikotinát, nitrát, oxalát, palmoát, pektinát, persulfát, 3-fenylpropionát, fosfát, pikrát, pivalát, propionát, salicylát, sukcinát, sulfát, tartarát, thiokyanát, tosylát a undekanoát. Další kyseliny, jako je kyselina oxalová, byt nejsou samy o sobě farmaceuticky přijatelné, lze použít při přípravě solí použitelných jako meziprodukty pro přípravu sloučenin podle vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelných solí s kyselinami. Soli odvozené od příslušných basí zahrnují soli s alkalickými kovy (například sodné a draselné), s kovy alkalických zemin (například hořečnaté) a amoniové soli a soli $N-(alkyl)^{4+}$ soli, kde alkylové části mají 1 až 4 atomy uhlíku. Vynález také předpokládá kvarternisaci jakýchkoliv basických dusík obsahujících skupin v popsanych sloučeninách. Touto kvarternisací lze získat ve vodě nebo v oleji rozpustné nebo dispergovatelné produkty.

Jako farmaceuticky přijatelné nosiče, které se mohou použít v těchto farmaceutických prostředcích, lze uvést, aniž by to znamenalo omezení pouze na ně, iontoměniče, oxid

15.06.99

hlinitý, stearát hlinitý, lecithin, sérové proteiny, jako je albumin lidského séra, pufrovací látky, jako jsou fosfáty, glycin, kyselinu sorbovou, sorbát draselný, směsi parciálních glyceridů nasycených rostlinných mastných kyselin, vodu, soli nebo elektrolyty, jako je protaminsulfát, sekundární hydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan draselný, chlorid sodný, soli zinku, koloidní oxid křemičitý, trisilikát hořečnatý, polyvinylpyrrolidon, látky na bázi celulosy, polyethylenglykol, sodnou sůl karboxymethylcelulosy, polyakryláty, vosky, blokové polymery polyethylenu a polyoxypropylenu, polyethylenglykol a tuk z vlny.

Prostředky podle vynálezu se mohou podávat orálně, parenterálně, inhalováním spreje, topicky, rektálně, nasálně, bukálně, vaginálně nebo přes implantovaný rezervoár. Výrazem "parenterálně" se míní podkožní, intravenosní, intramuskulární, intraartikulární, intrasynoviální, intrasternální, intratekální, intrahepatální, intralesionální a intrakraniální injekce nebo infuse. Výhodně se prostředky podle vynálezu podávají orálně, intraperitoneálně nebo intravenosně.

Sterilními injikovatelnými formami prostředků podle vynálezu mohou být vodné nebo olejovité suspence. Tyto suspence lze připravovat známými způsoby za použití vhodných dispergačních nebo smáčecích činidel a suspenčních činidel. Sterilními injikovatelnými přípravky mohou být také sterilní injikovatelné roztoky nebo suspence v netoxickém parenterálně přijatelném ředidle nebo rozpouštědle, například jako roztok v 1,3-butandiolu. Z těchto přijatelných nosičů a rozpouštědel, která lze používat, lze uvést vodu, Ringerův roztok a isotonický roztok chloridu sodného. Kromě toho se běžně používají sterilní stálé oleje jako rozpouštědlové nebo suspenční prostředí. Pro tento účel lze použít jakýkoliv nedráždivý stálý olej, včetně syntetických monoglyceridů nebo diglyceridů. Při přípravě injikovatelných přípravků, jako jsou přírodní farmaceuticky přijatelné oleje, jako je olivový olej

15.06.99

nebo ricinový olej, zejména v jejich polyoxyethylovaných formách, lze použít mastné kyseliny, jako je kyselina olejová a její glyceridové deriváty. Tyto olejové roztoky nebo suspence mohou také obsahovat ředidlo nebo dispergační činidlo s dlouhým alkoholovým řetězcem, jako je karboxymethylcelulosa nebo podobná dispergační činidla, která se běžně používají při přípravě farmaceuticky přijatelných dávkových forem, včetně emulsí nebo suspensí. Pro účely přípravy těchto prostředků lze také použít další běžně používané povrchově aktivní látky, jako jsou Tweeny, Spany a jiná emulgační činidla nebo činidla zvyšující biologickou snášitelnost běžně používaná při přípravě farmaceuticky přijatelných pevných, kapalných nebo jiných dávkových forem.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu lze podávat orálně v jakékoliv orálně přijatelné formě, včetně, avšak nikoliv pouze takto, kapslí, tablet, vodných suspensí nebo roztoků. V případě tablet pro orální použití se jako nosiče obvykle používají laktosa a kukuřičný škrob. Typicky se také přidávají mazadla, jako je stearát hořečnatý. Pro orální podávání ve formě kapslí jsou použitelnými ředidly laktosa a vysušený kukuřičný škrob. Jsou-li pro orální podávání požadovány vodné suspence, účinná látka se kombinuje s emulgačními nebo suspendačními činidly. V případě potřeby lze také přidávat určitá sladící, chuťová nebo barvicí činidla.

Alternativně lze podávat farmaceutické prostředky podle vynálezu ve formě čípků pro rektální podávání. Čípky lze připravit smísením účinné látky s vhodnou nedráždivou pomocnou látkou, která je pevná při teplotě místnosti, ale je kapalná při rektální teplotě a proto taje v konečníku, čímž se uvolňuje léčivá látka. Pomocnými látkami mohou být kakaové máslo, včelí vosk a polyethylenglykoly.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu lze také podávat topicky, zejména jestliže jsou plochy nebo orgány vyžadující toto ošetření přístupné topickou aplikací, včetně onemocnění

15.08.99

očí, kůže nebo nižšího intestinálního traktu. Pro každou z těchto ploch nebo pro každý orgán se vhodné topické přípravky připraví snadno.

Topická aplikace na nižší intestinální trakt se provádí pomocí rektálních čípkových přípravků (viz výše) nebo vhodným přípravkem ve formě střevního nálevu. Lze také použít topické transdermální náplasti.

Pro topické aplikace se farmaceutické prostředky mohou formulovat ve formě vhodné masti, která obsahuje účinnou složku suspendovanou nebo rozpuštěnou v jednom nebo více nosičích. Nosiče pro topické podávání sloučenin podle vynálezu zahrnují, avšak nejsou omezeny pouze na ně, minerální olej, kapalnou technickou vaselinu, bílou vaselinu, propylenglykol, polyoxyethylen, polyoxypropylenovou sloučeninu, emulgační vosk a vodu. Alternativně lze farmaceutické prostředky formulovat ve vhodné tekuté lékové formě nebo ve formě krému, které obsahují účinnou složku suspendovanou nebo rozpuštěnou v jednom nebo více farmaceuticky přijatelných nosičích. Vhodné nosiče zahrnují, avšak nejsou omezeny pouze na ně, minerální olej, sorbitanmonostearát, polysorbát 60, voskové cetylestery, cetearylalkohol, 2-oktyldodekanol, benzylalkohol a vodu.

Pro oftalmické použití se farmaceutické prostředky mohou formulovat jako mikronisované suspence v isotonickém sterilním solném roztoku s upraveným pH nebo s výhodou jako roztoky v isotonickém solném roztoku s upraveným pH, buď s ochrannými látkami, jako je benzylalkoniumchlorid, nebo bez nich. Alternativně se pro oftalmické použití mohou farmaceutické prostředky formulovat ve formě mastí, jako je vaselina.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu lze také podávat formou nasálního aerosolu nebo inhalací. Tyto prostředky se připravují podle známých technik přípravy farmaceutických přípravků a lze je připravit jako roztoky v solném roztoku, za použití benzylalkoholu nebo jiných vhodných ochranných přísad, absorpčních promotorů ke zvyšování biosnášitelnosti,

15.08.99

fluorovaných uhlovodíků a/nebo dalších běžných solubilizačních nebo dispergačních činidel.

Množství inhibitoru p38, které se má spojit s nosičovými materiály za vzniku jednotkové dávkové formy, se mění v závislosti na ošetřovaném hostiteli a na zvláštním způsobu podávání. S výhodou tyto prostředky se formulují tak, že se pacientovi, který přijímá tyto přípravky, podává dávka inhibitoru mezi 0,01 a 100 mg/kg tělesné hmotnosti na den.

Je samozřejmé, že specifická dávka a ošetřovací režim pro jednotlivé pacienty závisí na mnoha faktorech, včetně účinnosti specifické podávané sloučeniny, na věku, tělesné hmotnosti, celkovém zdravotním stavu, pohlaví, dietě, době podávání, rychlosti vylučování, kombinaci léčiv a na názoru ošetřujícího lékaře a na vážnosti konkrétního onemocnění, které má být ošetřeno. Množství inhibitoru také závisí na specifické sloučenině v prostředku.

Dále se vynález týká způsobů ošetřování nebo prevence stavů způsobených p38, který spočívá v tom, že se pacientovi podává jeden z výše popsaných farmaceutických prostředků. Výrazem "pacient" se zde míní živočich, s výhodou člověk.

S výhodou se tohoto způsobu používá k ošetřování nebo k prevenci stavů zahrnujících zánětlivá onemocnění, autoimunní onemocnění, destruktivní poruchy kostí, proliferální poruchy, infekční onemocnění, degenerativní onemocnění, alergie, reperfusi/ischemii u mrtvice, srdeční záchvaty, angiogenní poruchy, hypoxii orgánů, vaskulární hyperplasii, srdeční hypertrofii a thrombinem vyvolanou agregaci destiček.

Dále se vynález týká inhibitorů podle vynálezu pro použití k ošetřování nebo k prevenci onemocnění a stavů způsobených IL-1, IL-6, IL-8 nebo TNF. Tyto stavy jsou popsány výše.

V závislosti na jednotlivých stavech zprostředkovaných p38, které mají být ošetřeny nebo kterým má být předcházeno, lze obvykle podávat další léčiva, která se obvykle podávají

15.05.99

při ošetřování nebo prevenci těchto stavů, spolu s inhibitory podle vynálezu. Například pro ošetřování proliferčních onemocnění lze kombinovat chemoterapeutické látky nebo další antiproliferační látky s inhibitory p38 podle vynálezu.

Tyto další látky lze podávat odděleně od prostředků obsahujících inhibitory p38 jako součást smíšeného dávkového režimu. Alternativně mohou být tyto látky součástí jednotlivých dávkových forem smíšených s inhibitorem p38 do jednoho prostředku.

Pro objasnění vynálezu slouží následující příklady provedení vynálezu. Tyto příklady slouží pouze pro ilustraci předloženého vynálezu a ne pro jakékoliv jeho omezení.

15.08.99

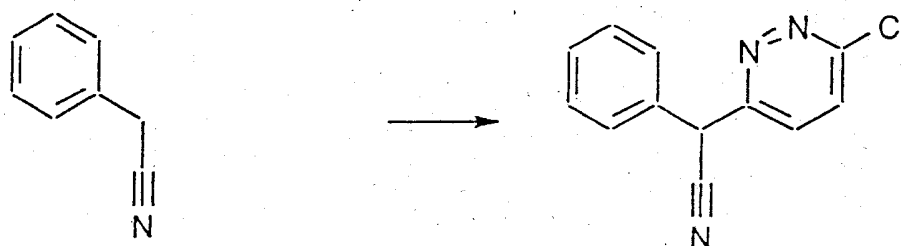
Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 1

Příklady přípravy několika sloučenin obecného vzorce Ia jsou uvedeny dále v následujících 4 příkladech.

A.

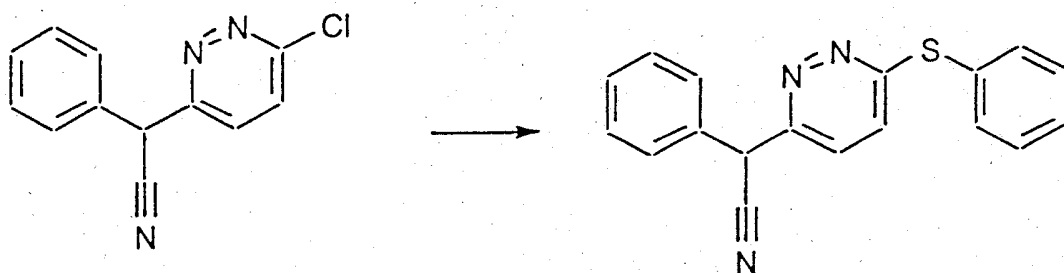


K suspensi amidu sodného, 90% (1,17 g, 30 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (20 ml) se při teplotě místnosti přidá roztok benzylnitrilu (2,92 g, 25,0 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (10 ml). Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 30 minut. K reakční směsi se přidá roztok 3,6-dichlorpyridazinu (3,70 g, 25,0 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (10 ml). Reakční směs se míchá po dobu 30 minut a potom se zředí nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Potom se reakční směs extrahuje ethylacetátem. Vrstvy se oddělí a organická vrstva se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým, přefiltruje se a zahustí se za sníženého tlaku.

Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: 30% ethylacetát v n-hexanu), čímž se získá 3,71 g (16,20 mmol ~ 54 %) produktu ve formě bílé pevné látky.

18.08.99

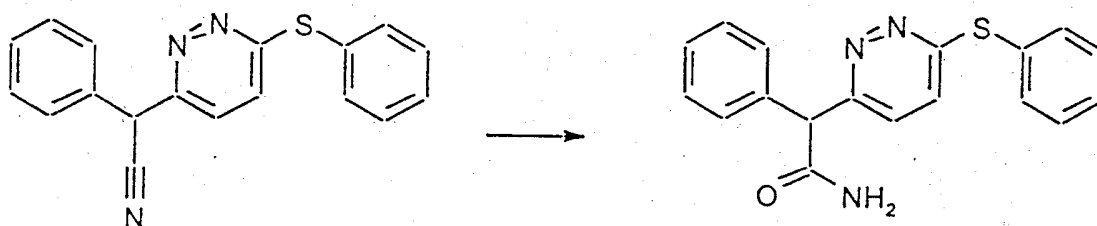
B.



K suspensi hydridu sodného, 95% (0,14 g, 6,0 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (10 ml) se při teplotě místnosti přidá thiofenol (0,66 g, 6,0 ml). Reakční směs se potom míchá po dobu 10 minut. K reakční směsi se přidá roztok produktu ze stupně A (1,31 g, 5,72 mmol) v absolutním ethanolu (20 ml). Reakční směs se potom zahřívá a míchá pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Ochlazená reakční směs se zahustí za sníženého tlaku. Zbytek se zředí roztokem 1 N hydroxidu sodného (10 ml), potom se extrahuje methylenchloridem. Organická fáze se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku.

Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu (eluční činidlo: 20% ethylacetát v n-hexanu), čímž se získá 0,66 g (2,19 mmol ~ 40 %) produktu ve formě bílé pevné látky.

C.

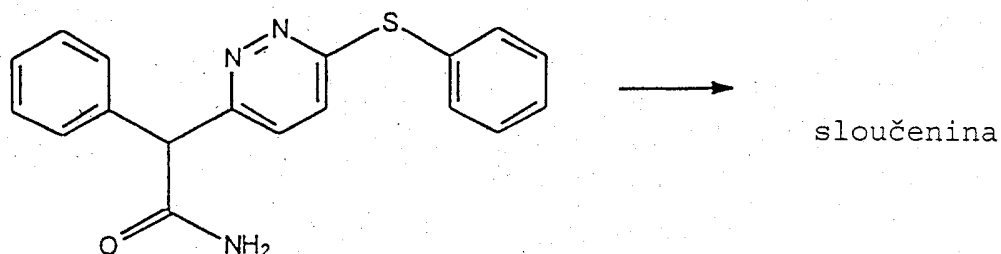


prekursor sloučeniny 1

15.05.99

Směs produktu ze stupně B (0,17 g, 0,69 mmol) a koncentrované kyseliny sírové (5 ml) se zahřívá na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Roztok se ochladí a upraví se na pH 8 nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Reakční směs se extrahuje methylenchloridem. Organická vrstva se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku, čímž se získá 0,22 g (0,69 mmol ~ 100 %) prekursoru sloučeniny 1 ve formě oranžového oleje. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,7 (d), 7,5 (d), 7,4 (m), 7,3-7,2 (m).

D.



prekursor sloučeniny 1

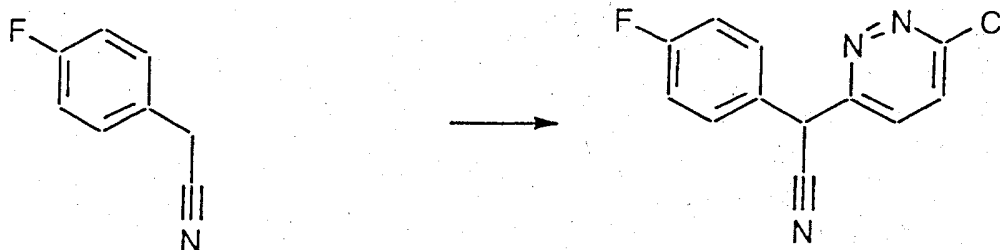
Roztok prekursoru sloučeniny 1 ze stupně C (0,22 g, 0,69 mmol) a dimethylacetalu N,N-dimethylformamidu (0,18 g, 1,5 mmol) v toluenu (5 ml) se zahřívá na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení se vzniklá pevná látka odfiltruje a rozpustí se v teplém ethylacetátu. Produkt se vysráží přidáváním diethyletheru po kapkách. Potom se produkt odfiltruje a promyje se diethyletherem, čímž se získá 0,038 g sloučeniny 1 (která je uvedena v tabulce 1) ve formě žluté pevné látky. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (s), 7,63-7,21 (m), 6,44 (d).

18.08.99

Příklad 2

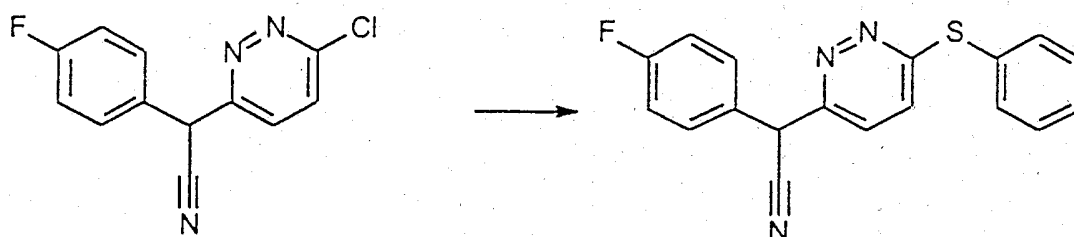
Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 2

A.



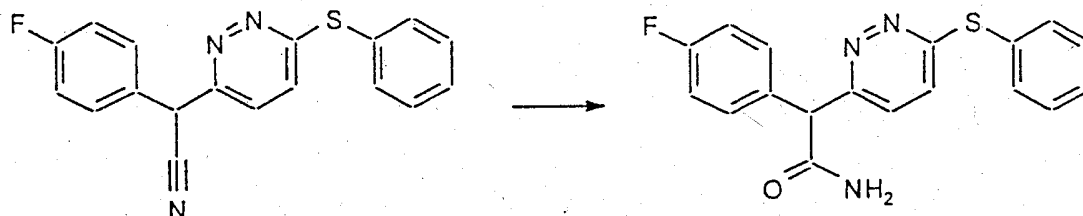
První meziprodukt uvedený výše se připraví podobným způsobem jako v příkladu 1A za použití 4-fluorfenyl-acetonitrilu, čímž se získá 1,4 g (5,7 mmol, ~ 15 %) produktu.

B.



Výše uvedený meziprodukt se připraví podobným způsobem jako v příkladu 1B. Získá se 0,49 g (1,5 mmol, 56 %) produktu.

C.

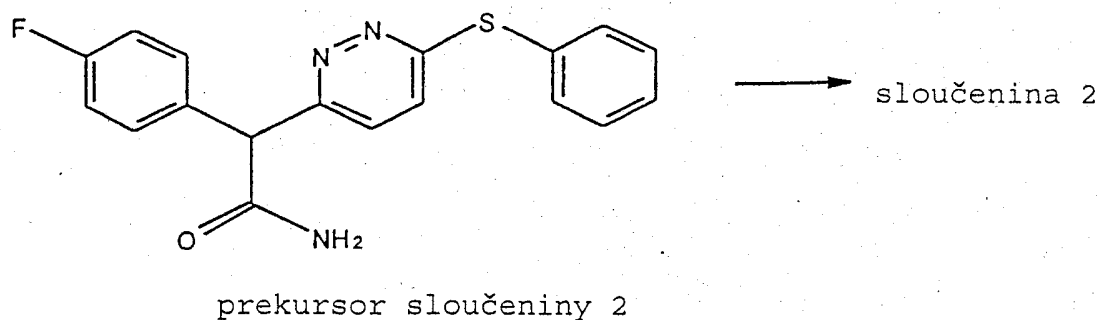


prekursor sloučeniny 2

15.08.99

Výše uvedený meziprodukt se připraví podobným způsobem jako v příkladu 1C. Získá se 0,10 g (0,29 mmol, 45 %) prekursoru sloučeniny 2. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) d 7,65-7,48 (m), 7,47-7,30 (m), 7,29-7,11 (m), 7,06-6,91 (m), 5,85 (s, široký).

D.

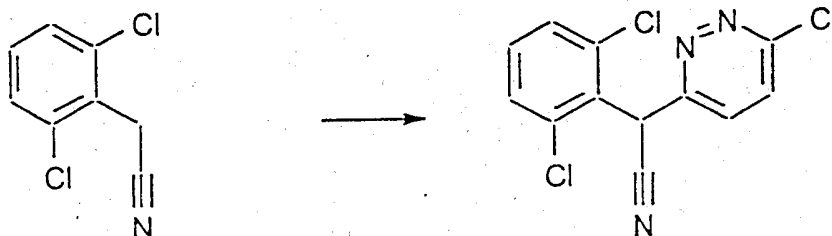


Sloučenina 2 (která je uvedena v tabulce 1) se připraví z prekursoru sloučeniny 2 podobným způsobem jako v příkladu 1D. Získá se 0,066 g produktu. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) d 8,60 (s), 7,62-7,03 (m), 6,44 (d).

Příklad 3

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 6

A.

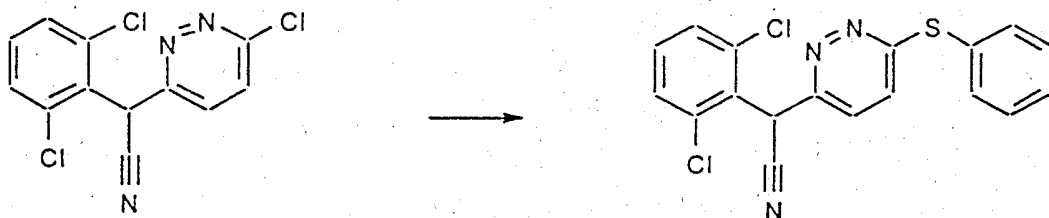


První meziprodukt při přípravě sloučeniny 6 se připraví podobným způsobem, jak je popsáno v příkladu 1A, za použití

15.06.99

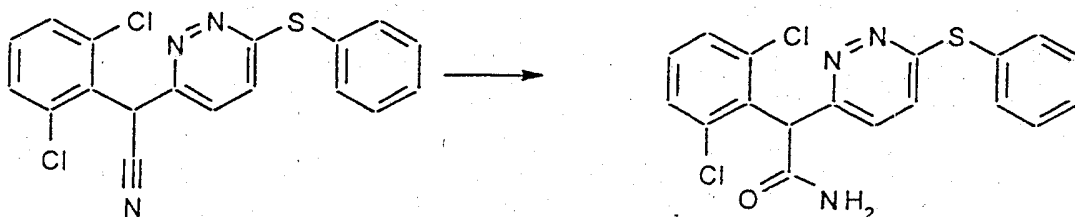
2,6-dichlorfenylacetonitrilu, čímž se získá 2,49 g (8,38 mmol, 28 %) produktu.

B.



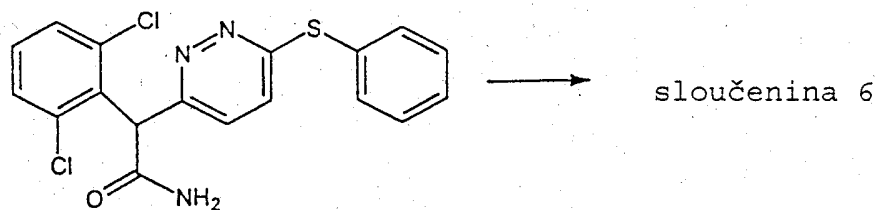
Následující stupeň přípravy sloučeniny 6 se provádí podobným způsobem, jak je popsáno v příkladu 1B. Získá se 2,82 g (7,6 mmol, 91 %) produktu.

C.



Konečný meziprodukt, prekursor sloučeniny 6, se připraví podobným způsobem, jak je popsáno v příkladu 1C. Získá se 0,89 g (2,3 mmol, 85 %) produktu. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7,5-7,4 (dd), 7,4 (m), 7,3 (d), 7,2 (m), 7,05 (d).

D.



prekursor sloučeniny 6

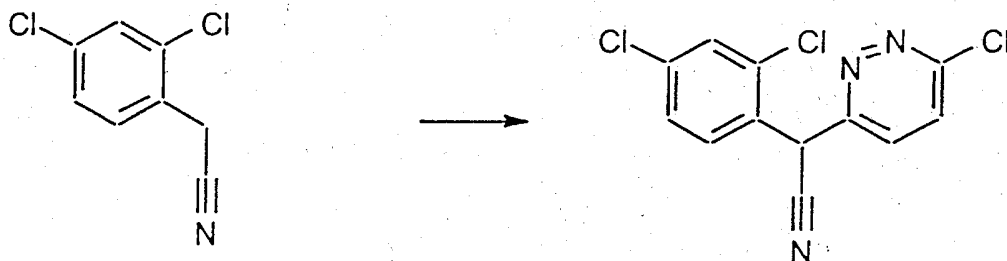
18.06.99

Konečný stupeň přípravy sloučeniny 6 (která je uvedena v tabulce 1) se provádí podobně, jak je popsáno v příkladu 1D. Získá se 0,06 g produktu. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,69 (s), 7,65-7,59 (d), 7,58-7,36 (m), 7,32-7,22 (m), 6,79 (d), 6,53 (d).

Příklad 4

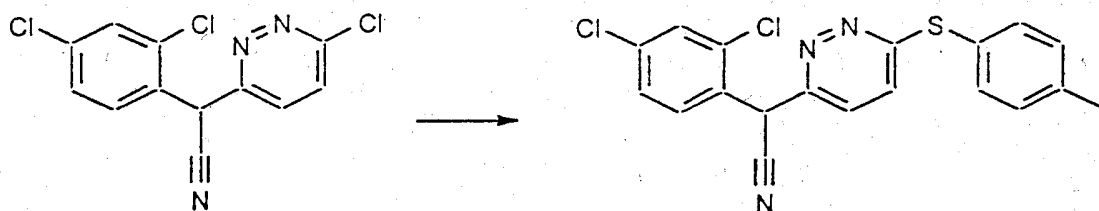
Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 5

A.



První meziprodukt při přípravě sloučeniny 5 se připraví podobným způsobem, jak je popsán v příkladu 1A, za použití 2,4-dichlorofenylacetonitrilu, čímž se získá 3,67 g (12,36 mmol, 49 %) produktu.

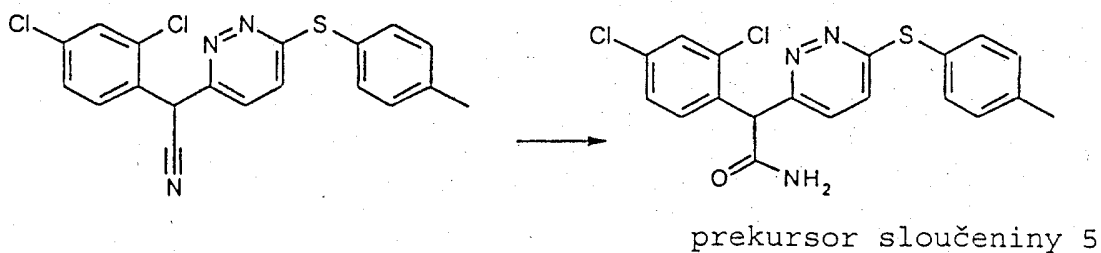
B.



Druhý meziprodukt se připraví podobným způsobem, jak je popsán v příkladu 1B. Získá se 3,82 g (9,92 mmol, 92 %) produktu.

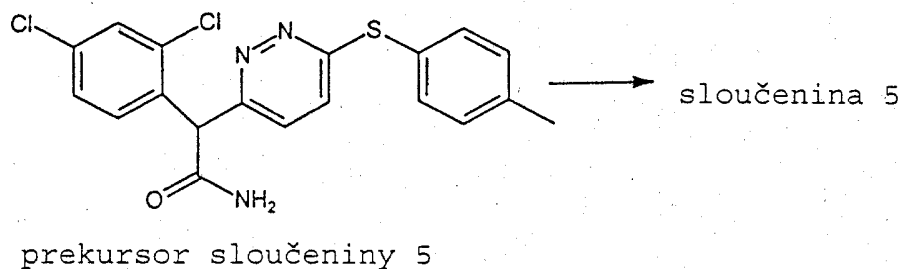
15.06.99

C.



Konečný meziprodukt, prekursor sloučeniny 5, se připraví podobným způsobem, jak je popsán v příkladu 1C. Získá se 0,10 g (0,24 mmol, 92 %) produktu. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) d 7,9 (d), 7,7 (d), 7,6-7,5 (dd), 7,4-7,3 (m), 2,4 (s).

D.



Konečný stupeň při přípravě sloučeniny 5 (která je uvedena v tabulce 1) se provádí podobným způsobem, jak je popsán v příkladu 1D. Získá se 0,06 g produktu. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) d 8,64 (s), 7,51-7,42 (m), 7,32-7,21 (m), 6,85 (d), 6,51 (d), 2,42 (s).

Další sloučeniny obecného vzorce Ia podle vynálezu se mohou připravit podobným způsobem za použití příslušných výchozích sloučenin.

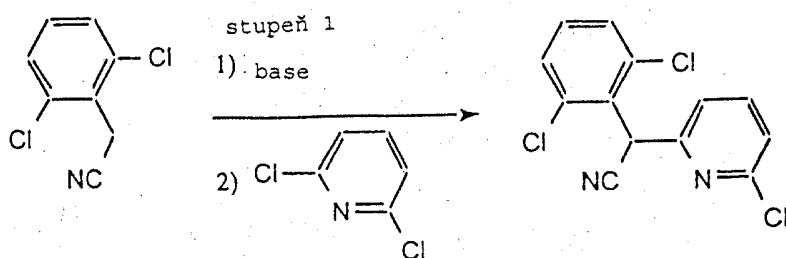
Příklad 5

Příprava inhibitoru A p38 - sloučeniny obecného vzorce Ib

Příklad přípravy inhibitoru p38 podle vynálezu obecného vzorce Ib je uveden níže.

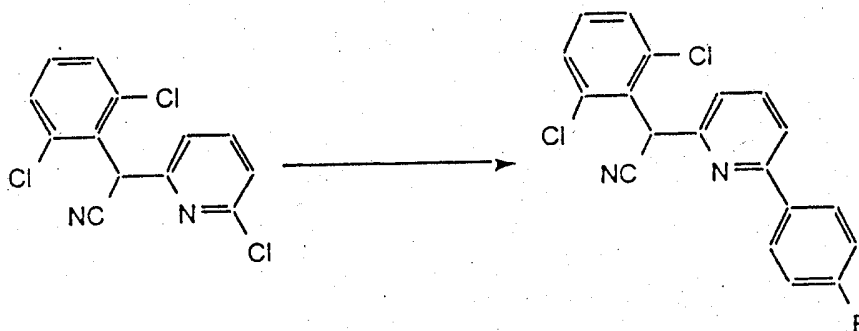
18.08.99

A.



K suspensi amidu sodného, 90% (1,1 ekv) v bezvodém tetrahydrofuranu se při teplotě místnosti přidá roztok 2,6-dichlorbenzylkyanidu (1,0 ekv) v bezvodém tetrahydrofuranu. Směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 30 minut. K reakční směsi se přidá roztok 2,6-dichlorpyridinu (1 ekv) v bezvodém tetrahydrofuranu. Reakce se monitoruje pomocí TLC a jakmile je skončena, reakční směs se zředí nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného. Potom se reakční směs extrahuje ethylacetátem. Vrstvy se oddělí a organická vrstva se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým, přefiltruje se a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se čistí chromatografií na silikagelu, čímž se získá čistý produkt.

B.

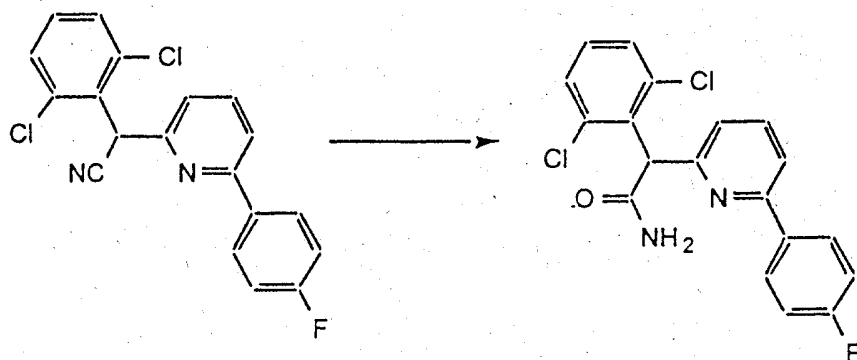


K roztoku 4-fluorobrombenzenu (1 ekv) v bezvodém tetrahydrofuranu se při teplotě -78°C přidá terc.butyl-lithium (2 ekv, roztok v hexanech). Reakční směs se potom

18.06.99

míchá po dobu 30 minut. K reakční směsi se přidá roztok produktu ze stupně A (1 ekv) v bezvodém THF. Reakční směs se potom monitoruje a pomalu se nechá ohřát na teplotu místnosti. Reakční směs se ochladí vodou a potom se extrahuje methylenchloridem. Organická fáze se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se chromatografuje na silikagelu, čímž se získá produkt.

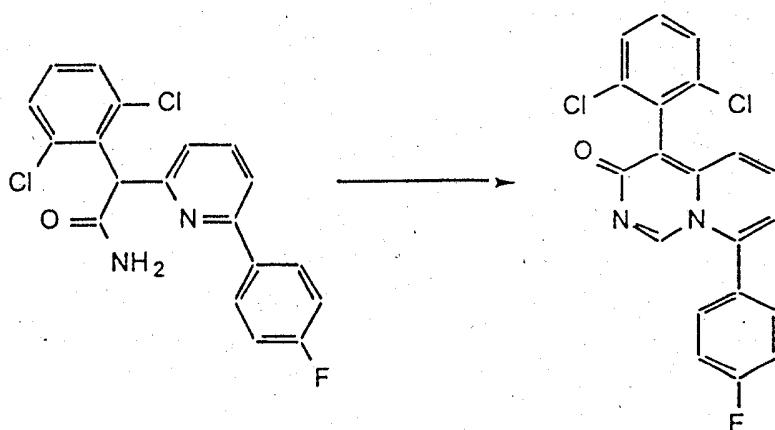
C.



Směs produktu ze stupně B a koncentrované kyseliny sírové se zahřívá na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Roztok se ochladí a upraví se na pH 8 nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Reakční směs se extrahuje methylenchloridem. Organická vrstva se promyje vodou, roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým a zahustí se za sníženého tlaku, čímž se získá produkt. Konečný produkt se čistí rychlou chromatografií na silikagelu.

18.08.99

D.



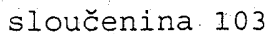
inhibitor p38

Roztok produktu ze stupně C (1 ekv) a dimethylacetalu N,N-dimethylformamidu (2 ekv) v toluenu se zahřívá na teplotu 100 °C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení se vzniklá směs přefiltruje a rozpustí se v teplém ethylacetátu. Produkt se vysráží přidáváním diethyletheru po kapkách. Produkt se potom odfiltruje a promyje se diethyletherem, čímž se získá inhibitor p38 obecného vzorce Ib. Konečný produkt se čistí chromatografií na silikagelu.

Další sloučeniny obecného vzorce Ib podle vynálezu se mohou připravit podobným způsobem za použití příslušných výchozích sloučenin.

Příklad 6

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 103



A.

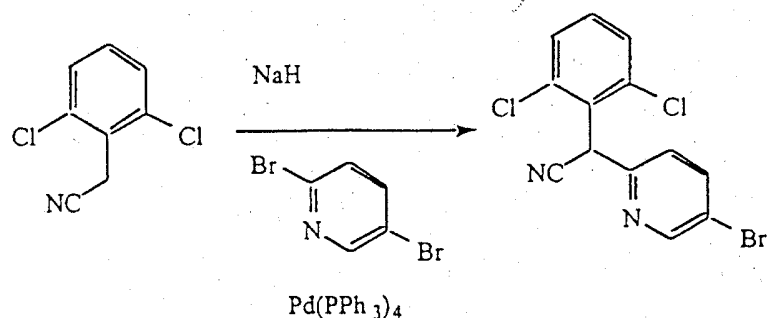
B.

Příklad 7

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 201

15.08.99

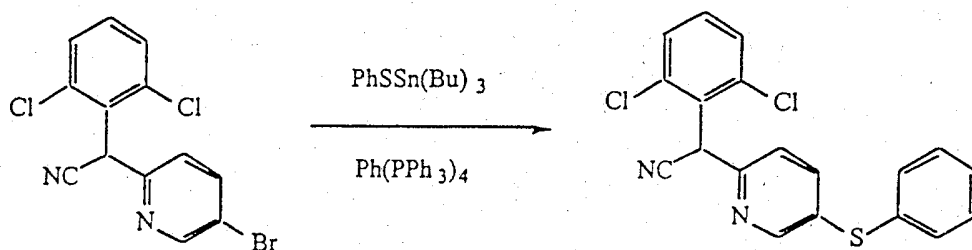
A.



Ph = fenyl

Výchozí nitril uvedený výše (5,9 g, 31,8 mmol) se rozpustí při teplotě místnosti v DMF (20 ml). Potom se přidá hydrid sodný (763 mg, 31,8 mmol) a vznikne světle žlutě zbarvený roztok. Po 15 minutách se přidá roztok 2,5-dibrompyridinu (5,0 g, 21,1 mmol) v DMF (10 ml) a potom palladium-tetrakis(trifenylfosfin) (3 mmol). Roztok se potom zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Reakční směs se ochladí na teplotu místnosti a zředí se ethylacetátem. Organická vrstva se potom isoluje, promyje se vodou a potom roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým, přefiltruje se a odpaří se za sníženého tlaku na surový olej. Rychlou chromatografií na koloně se 10% ethylacetátem v hexanu eluuje požadovaný produkt (5,8 g, 84 %) ve formě špinavě bílé pevné látky.

B.

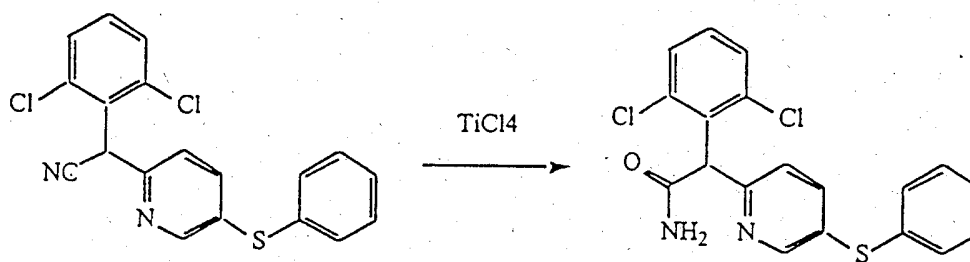


Bromid připravený ve stupni A (194,8 mg, 0,57 mmol) se rozpustí v xylenu (15 ml). K tomuto roztoku se přidá

15.08.99

thiofenylstannan (200 μ l, 587 mmol) a palladiumtetrakis(tri-fenylfosfin) (25 mg). Roztok se zahřívá k varu pod zpětným chladičem přes noc, ochladí se, přefiltruje se a odpaří za sníženého tlaku. Surový produkt se chromatografuje na silikagelu a eluuje se methylenchloridem, čímž se získá čistý produkt (152 mg, 72 %) ve formě žlutého oleje.

C.



sloučenina 201

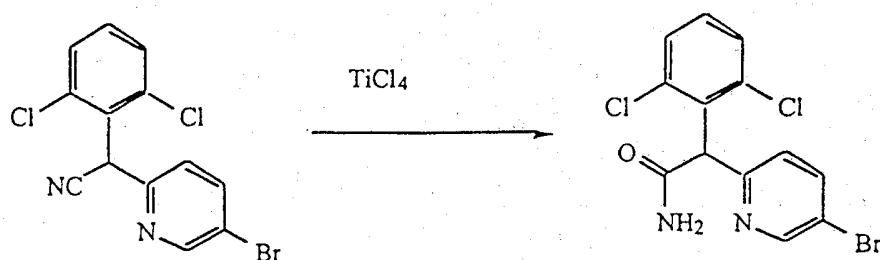
Nitril připravený ve stupni B (1,2 g, 3,37 mmol) se rozpustí v ledové kyselině octové (30 ml). K tomuto roztoku se přidá voda (120 μ l, 6,67 mmol) a potom chlorid titaničitý (760 μ l, 6,91 mmol), čímž se směs stane exotermní. Roztok se potom zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin, ochladí se a naleje se do 1 N HCl. Vodná vrstva se extrahuje methylenchloridem. Organická vrstva se znovu promyje 1 N NaOH, vysuší se nad síranem hořečnatým a přefiltruje se přes ucpávku silikagelu. Ucpávka se nejprve eluuje methylenchloridem, čímž se odstraní nezreagovaná výchozí látka, a potom ethylacetátem, čímž se získá sloučenina 201. Ethylacetát se odpaří, čímž se získá čistá sloučenina 201 (1,0 g, 77 %).

Příklad 8

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 110

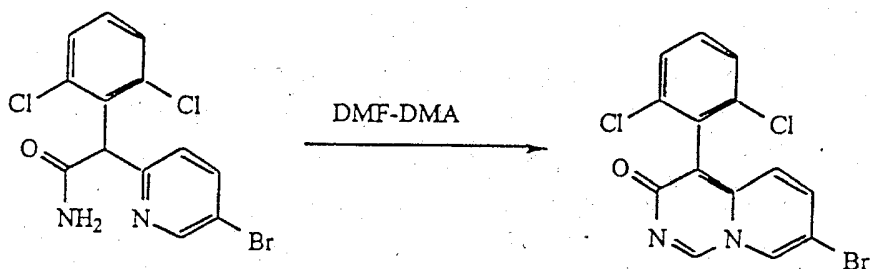
18.06.99

A.



Výchozí nitril (3,76 g, 11,1 mmol) se nejprve rozpustí v ledové kyselině octové (20 ml). K tomuto roztoku se přidá chlorid titaničitý (22,2 mmol) a voda (22,2 mmol) a směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Reakční směs se potom ochladí a zředí se směsí vody a ethylacetátu. Organická vrstva se potom izoluje, promyje se roztokem chloridu sodného a vysuší se nad síranem hořečnatým. Organická vrstva se potom odfiltruje a odpaří se za sníženého tlaku. Vzniklý surový produkt se chromatografuje na silikagelu a eluuje se 5% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá čistý produkt ve formě žluté pěny (2,77 g, 70 %).

B.

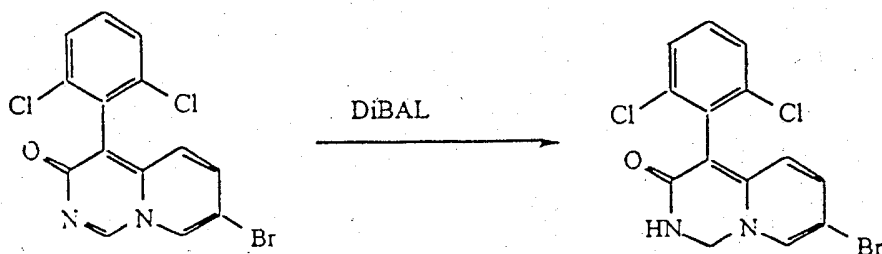


Amid připravený ve stupni A (1,54 g, 4,3 mmol) se rozpustí v toluenu (20 ml). Potom se přidá dimethylacetal N,N-dimethylformamidu (1,53 g, 12,9 mmol), vzniklý roztok se zahřívá po dobu 10 minut, načež se nechá ochladit na teplotu místnosti. Reakční směs se potom odpaří za sníženého tlaku a zbytek se chromatografuje na silikagelu a eluuje se 2 až 5% methanolem v methylenchloridu. Získaná látka se potom rozpustí v horkém ethylacetátu. Roztok se nechá vychladnout, čímž

15.05.99

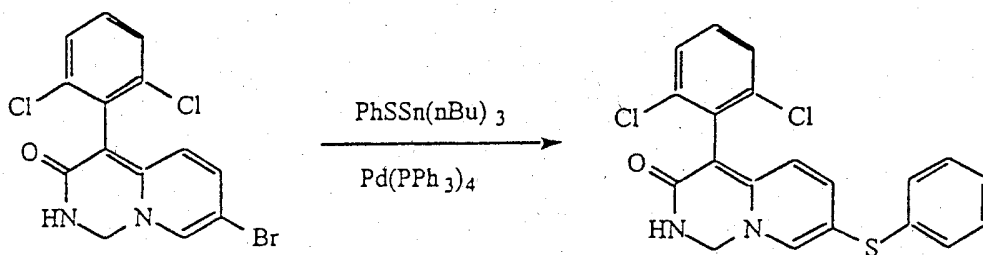
vykrystaluje čistý produkt ve formě žluté pevné látky (600 mg, 40 %). Další produkt (~800 mg) se získá z matečného louhu.

C.



Bromid ze stupně B (369 mg, 1 mmol) se rozpustí v THF (10 ml). Potom se přidá diisobutylaluminiumhydrid (1,0 M roztok, 4 mmol), reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 10 minut a potom se směs ochladí methanolem (1 ml). Pak se přidá nasycený roztok Rochellovy soli a směs se extrahuje ethylacetátem. Organická vrstva se izoluje, vysuší se nad síranem hořečnatým, odpaří se a zbytek se chromatografuje na silikagelu a eluuje se 1 až 3% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá jasně oranžová pevná látka (85 mg, výtěžek 23 %).

D.



sloučenina 110

Bromid připravený ve stupni C (35,2 mg, 0,1 mmol) se rozpustí v xylenu (12 ml). K tomuto roztoku se přidá thiofenol (0,19 mmol) a potom tributylcínmethoxid (0,19 mmol). Vzniklý roztok se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 10 minut, načež se přidá palladiumtetrakis(trifenylfosfin) (0,020

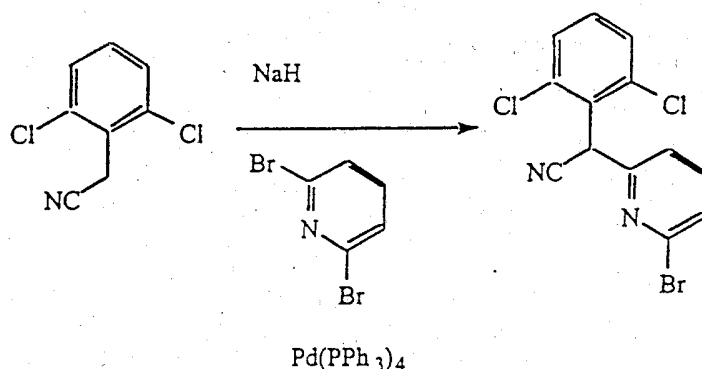
15.06.99

mmol). Reakční směs se zahřívá a monitoruje se na vymizení bromidové výchozí látky. Potom se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a proleje se ucpávkou silikagelu. Ucpávka se eluuje nejprve methylenchloridem, čímž se odstraní nadbytek cínového reakčního činidla a potom 5% methanolem v ethylacetátu, čímž se eluuje inhibitor p38. Filtrát se zahustí a potom se znovu chromatografuje na silikagelu za použití 5% methanolu v ethylacetátu jako elučního činidla, čímž se získá čistá sloučenina 110 (20 mg, 52 %).

Příklad 9

Příprava inhibitoru p38 - sloučeniny 202

A.

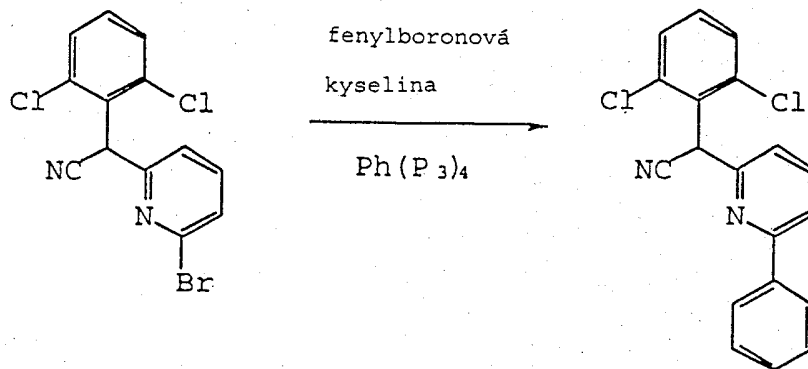


Výchozí nitril (2,32 g, 12 mmol) se při teplotě místnosti rozpustí v DMF (10 ml). Potom se přidá hydrid sodný (12 mmol) a vznikne jasně žlutě zbarvený roztok. Po 15 minutách se přidá roztok 2,6-dibrompyridinu (2,36 g, 10 mmol) v DMF (5 ml) a potom palladiumtetrakis(trifenylfosfin) (1,0 mmol). Rostok se potom zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Pak se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a zředí se ethylacetátem. Organická vrstva se isoluje, promyje se vodou a roztokem chloridu sodného, vysuší se nad síranem hořečnatým,

15.05.99

přefiltruje se a odpaří se za sníženého tlaku, čímž se získá surový olej. Rychlou chromatografií na koloně se eluuje 10% ethylacetátem v hexanu produkt (1,45 g, 42 %) ve formě bílé pevné látky.

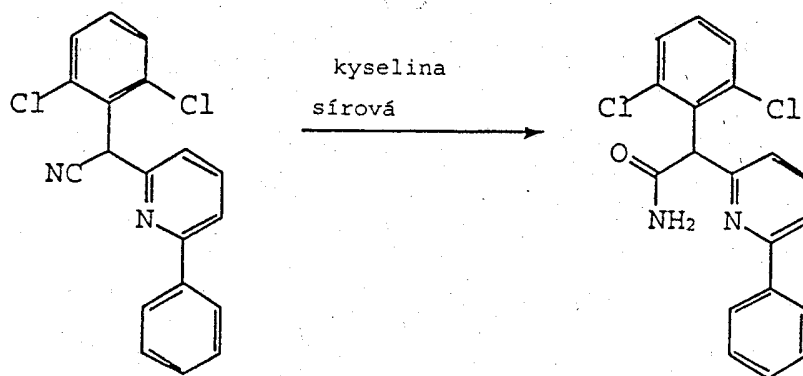
B.



Bromová sloučenina připravená ve stupni A (1,77 g, 5,2 mmol) se rozpustí v toluenu (20 ml) a vzniklý roztok se odplyní. V atmosféře dusíku se přidá roztok fenylboronové kyseliny (950 mg, 7,8 mmol) v ethanolu (4 ml) a roztok uhličitanu sodného (1,73 g, 14 mmol) ve vodě (4 ml). Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny a potom se ochladí na teplotu místnosti. Reakční směs se zředí ethylacetátem a promyje se vodou a roztokem chloridu sodného. Organická vrstva se potom vysuší síranem hořečnatým, přefiltruje se a zahustí se za sníženého tlaku. Zbytek se čistí na silikagelu a eluuje se 30% ethylacetátem v hexanu, čímž se získá produkt ve formě bílé pevné látky (1,56 g, 88 %).

16.06.99

C.



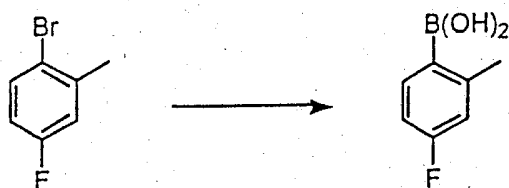
sloučenina 202

Nitril ze stupně B (700 mg, 2,07 mmol) se rozpustí v koncentrované kyselině sírové (10 ml) a zahřívá se na teplotu 80 °C po dobu 1 hodiny. Reakční směs se potom ochladí na teplotu místnosti a pH se upraví na 8 za použití 6 N hydroxidu sodného. Směs se pak extrahuje ethylacetátem. Organická vrstva se isoluje, vysuší se síranem hořečnatým a odpaří se za sníženého tlaku, čímž se získá sloučenina 202 ve formě žluté pěny (618 mg, 84 %).

Příklad 10

Příprava sloučeniny 410

A.

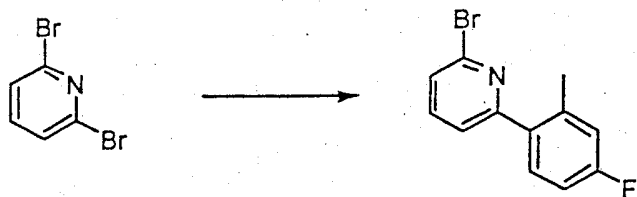


Plamenem vysušená 100 ml baňka s kulatým dnem se naplní 2,28 g (93,8 mmol) kousků hořčíku a 50 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Přidá se jeden krystal jodu, čímž vznikne světle hnědé zabarvení. K tomuto roztoku se přidá 1,5 ml z 10,0 ml (79,1 mmol) vzorku 2-brom-5-fluortoluenu. Roztok se zahřívá k varu pod zpětným chladičem. Hnědé zabarvení zeslábně a var se udržuje až se vnější zdroj tepla odstraní, což ukazuje tvorbu Grignardova činidla. Když var skončí, přidá se

18.06.99

další 1,0 až 1,5 ml dávka bromidu, čímž vznikne prudký var. Postup se opakuje, až se přidá všechen bromid. Olivově zelený roztok se zvnějšku zahřívá k varu po dobu 1 hodiny, čímž se zajistí ukončení reakce. Roztok se ochladí v lázni s ledem a injekční stříkačkou se k němu přidá 9,3 ml (81,9 mmol) trimethylborátu ve 100 ml tetrahydrofuranu při teplotě -78°C . Po přidání Grinardova činidla se baňka odstraní z chladicí lázně a roztok se míchá přes noc při teplotě místnosti. Šedobílá suspence se naleje do 300 ml vody a těkavé látky se odpaří za sníženého tlaku. Přidá se HCl (400 ml 2 N roztoku) a mléčně bílá směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Vysráží se bílá pevná látka. Směs se extrahuje diethyletherem a organický extrakt se vysuší (MgSO_4) a odpaří se za sníženého tlaku, čímž se získá 11,44 g (94 %) boronové kyseliny ve formě bílé pevné látky.

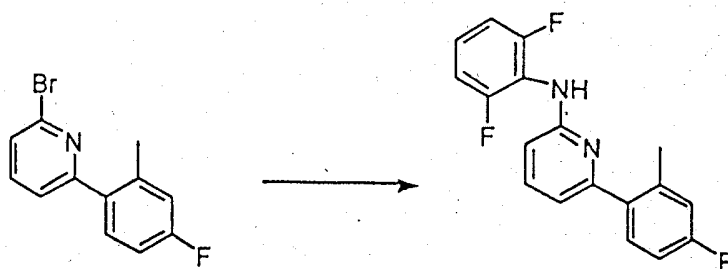
B.



Ve 100 ml baňce s kulatým dnem se rozpustí 7,92 g (33,4 mmol) 2,6-dibrompyridinu v 50 ml bezvodého toluenu, čímž vznikne čirý bezbarvý roztok. Přidá se 4-fluor-2-methylbenzen-boronová kyselina (5,09 g, 33,1 mmol) připravená ve stupni A, čímž vznikne bílá suspence. Pak se přidá uhličitan thalia (17,45 g, 37,2 mmol) a potom katalytické množství (150 mg) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem přes noc, ochladí se a přefiltruje se přes sloupec silikagelu. Silikagel se promyje CH_2Cl_2 a filtrát se odpaří, čímž se získá bílá pevná látka. Ta se rozpustí v minimálním množství 50% CH_2Cl_2 v hexanu a chromatografuje se na krátké koloně silikagelu za použití 30% CH_2Cl_2 v hexanu, čímž se získá 6,55 g (74 %) 2-brom-6-(4-fluor-2-methylfenyl)pyridinu ve formě bílé pevné látky.

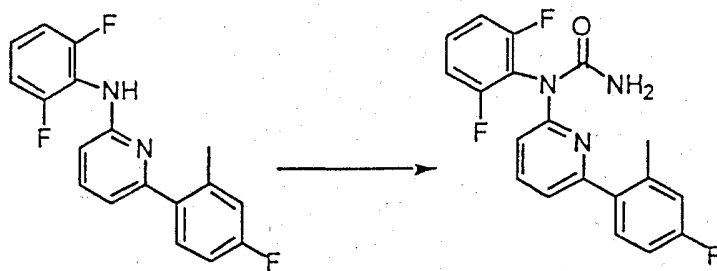
18.06.99

C.



V 50 ml baňce s kulatým dnem se rozpustí 550 mg (2,07 mmol) 2-brom-6-(4-fluor-2-methylfenyl)pyridinu připraveného ve stupni B v 30 ml bezvodého tetrahydrofuranu, přičemž se vytvoří čirý bezbarvý roztok. Přidá se 2,6-difluoranilin (2,14 ml, 2,14 mmol) a potom 112 mg (2,79 mmol) 60% NaH suspence v minerálním oleji. Během mírně exotermní reakce se pozoruje vývin plynu. Roztok se zahřívá k varu pod zpětným chladičem přes noc a potom se ochladí. Reakční směs se naleje do 10% NH_4Cl a extrahuje se CH_2Cl_2 . Organický extrakt se vysuší (MgSO_4) a odpaří se za sníženého tlaku, čímž se získá hnědý olej, který je směsí produktu a výchozí látky. Směs se chromatografuje na krátké koloně silikagelu za použití 50% CH_2Cl_2 v hexanu, čímž se získá 262 mg (40 %) 2-(2,6-difluorfenyl)-6-(4-fluor-2-methylfenyl)pyridinu ve formě bezbarvého oleje.

D.



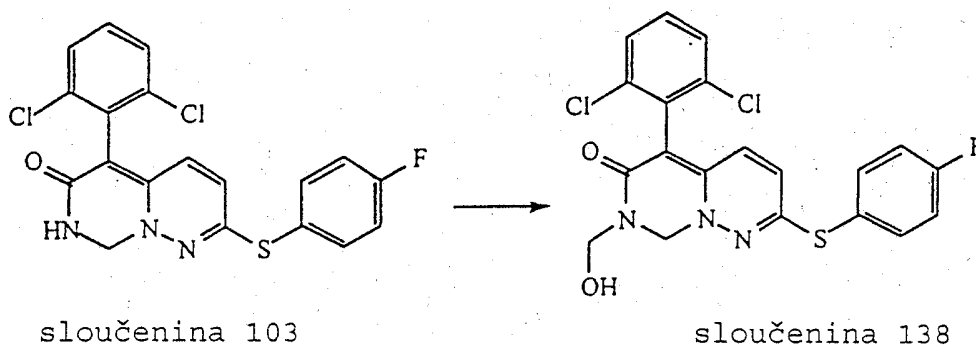
V 100 ml baňce s kulatým dnem se rozpustí 262 mg (834 mmol) 2-(2,6-difluorfenyl)-6-(4-fluor-2-methylfenyl)pyridinu připraveného ve stupni C v 30 ml bezvodého CHCl_3 a vznikne čirý bezbarvý roztok. Přidá se chlorsulfonylisokyanát (1,0 ml, 11,5

15.05.99

mmol) a světle žlutý roztok se míchá při teplotě místnosti přes noc. Přidá se voda (~30 ml), čímž se reakce stane mírně exotermní a vyvíjí se intensivně plyn. Po míchání přes noc se organická vrstva oddělí, vysuší se (MgSO_4) a odpaří se za sníženého tlaku, čímž se získá hnědý olej, který je směsí produktu a výchozí látky. Tato směs se chromatografuje na krátké koloně silikagelu za použití 10% EtOAc v CH_2Cl_2 . Isolovaná výchozí látka se znovu podrobí reakčním podmínkám a vyčistí se stejným způsobem, čímž se získá celkově 205 mg (69 %) močoviny ve formě bílé pevné látky.

Příklad 11

Příprava sloučeniny 138



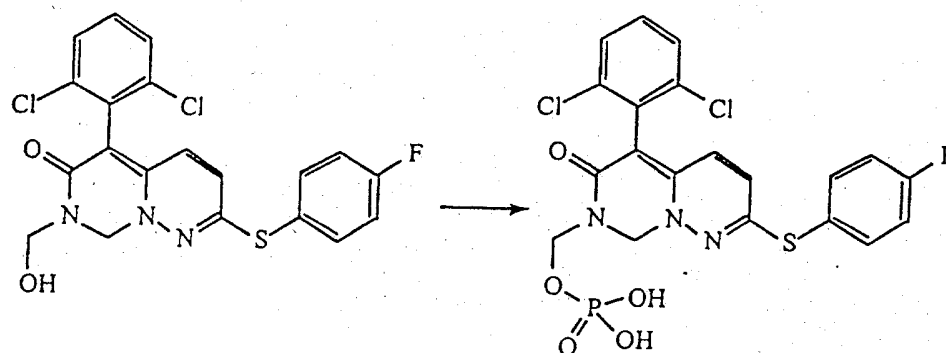
Sloučenina 103 (106 mg, 0,25 mmol) se rozpustí v THF (0,5 ml) a k tomuto roztoku se přidá triethylamin (35 μl , 0,25 mmol) a potom nadbytek formaldehydu (37% vodný roztok, 45 mg). Reakční směs se nechá míchat při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs se potom odpaří v rotačním odpařováku za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v methylenchloridu a aplikuje se na rychlou kolonu se silikagelem. Kolona se eluuje 2% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá čistý produkt (78 mg, výtěžek 70 %).

15.06.99

Příklad 12

Příprava profarmaka sloučeniny 103

A.



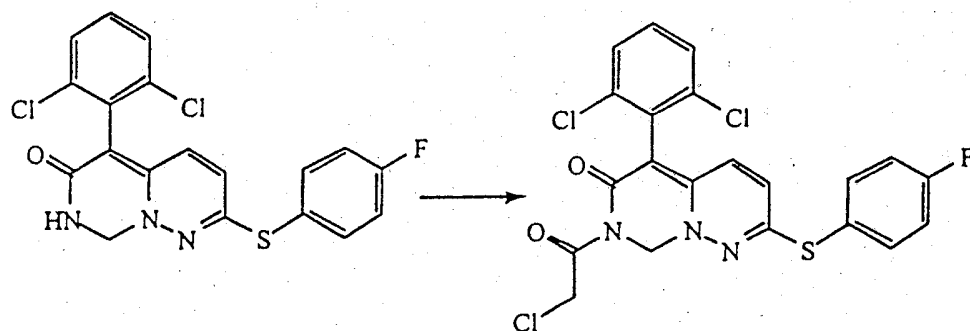
sloučenina 138

fosfátové profarmakum
sloučeniny 103

Sloučenina 138 (1 ekvivalent) se rozpustí v methylenchloridu a k roztoku se přidá triethylamin (1 ekvivalent) a potom dibenzylfosfonylchlorid (1 ekvivalent). Roztok se míchá při teplotě místnosti a monitoruje se pomocí TLC na spotřebu výchozí látky. Methylenchloridová vrstva se potom zředí ethylacetátem a promyje se 1 N HCl, nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem NaCl. Organická vrstva se potom vysuší, odpaří se v rotačním odpařováku a surový produkt se čistí na silikagelu. Čistý produkt se potom rozpustí v methanolu a dibenzylesterové chránicí skupiny se odstraní 10% palladiem na uhlí v atmosféře vodíku. Když je reakce skončena, katalysátor se odfiltruje přes celit a filtrát se odpaří, čímž se získá fosfátový produkt.

18.06.99

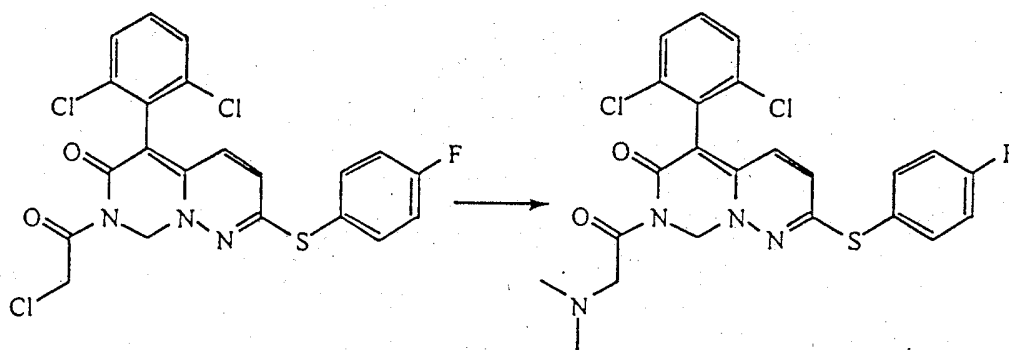
B.



sloučenina 103

Sloučenina 103 (210 mg, 1,05 mmol) se rozpustí v THF (2 ml) a ochladí se v atmosféře dusíku na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. K tomuto roztoku se přidá lithiumhexamethyldisilazan (1,1 mmol) a potom chloracetylchlorid (1,13 mmol). Reakční směs se odstraní z chladicí lázně a nechá se ohřát na teplotu místnosti, načež se zředí ethylacetátem a ochladí se vodou. Organická vrstva se promyje roztokem chloridu sodného, vysuší se a odpaří se v rotačním odpařováku k suchu. Surový produkt se čistí rychlou chromatografií na silikagelu za použití 25% ethylacetátu v hexanu jako elučního činidla, čímž se získá 172 mg (70 %) čistého požadovaného produktu, který se použije takový, jaký je, v následujících reakcích.

C.

dimethylaminoacetalové
profarmakum sloučeniny 103

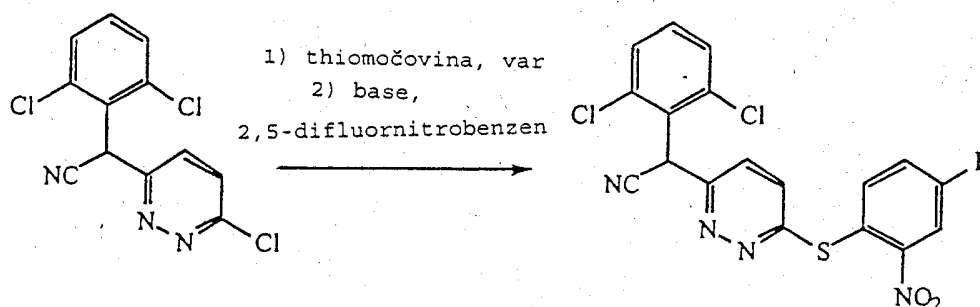
18.06.99

Chloracetylová sloučenina se rozpustí v methylenchloridu a nechá se reagovat s nadbytkem dimethylaminu. Reakce se monitoruje pomocí TLC a jakmile je skončena, všechny těkavé látky se odstraní, čímž se získá požadovaný produkt.

Příklad 13

Příprava sloučenin 34 a 117

A.

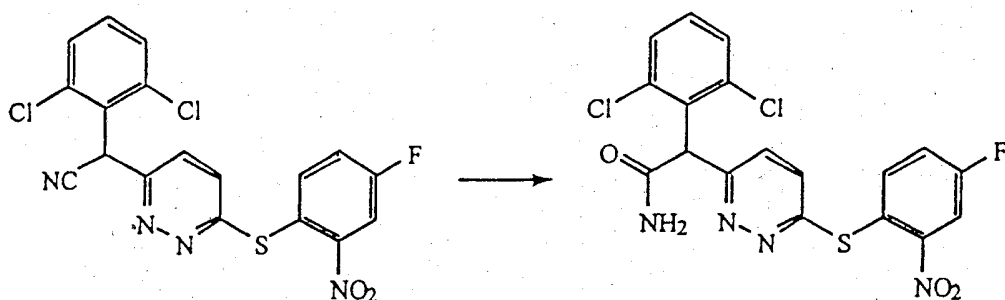


Nitril z příkladu 5 stupně A (300 mg, 1,0 mmol) se rozpustí v ethanolu (10 ml) a k tomuto roztoku se přidá thiomočovina (80,3 mg, 1,05 mmol). Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 4 hodin a potom TLC ukazuje, že veškerá výchozí látka je spotřebována. Reakční směs se ochladí a všechny těkavé látky se odstraní za sníženého tlaku a zbytek se rozpustí v acetonu (10 ml).

K roztoku se potom přidá 2,5-difluornitrobenzen (110 μ l, 1,01 mmol) a pak uhličitán draselný (200 mg, 1,45 mmol) a voda (400 μ l). Reakční směs se nechá míchat při teplotě místnosti přes noc. Potom se reakční směs zředí methylenchloridem (25 ml) a přefiltruje se přes vatovou ucpávku. Všechny těkavé látky se odstraní za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií na silikagelu elucí gradientem od 10% až 25% ethylacetátu v hexanu, čímž se získá požadovaný produkt (142 mg, 33 %).

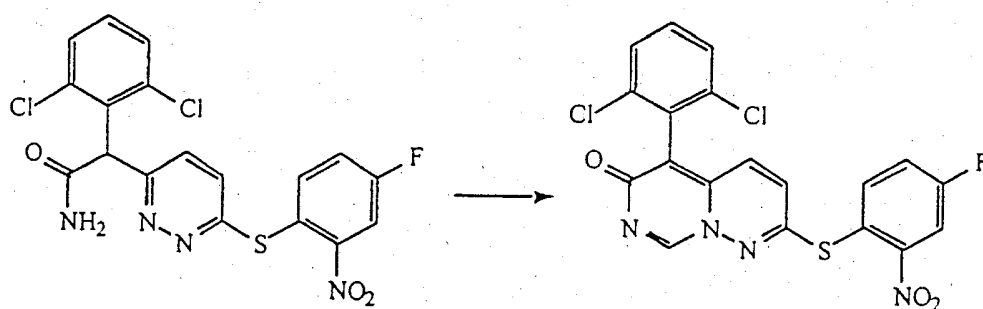
18.06.99

B.



Nitrilový produkt ze stupně A (142 mg, 0,33 mmol) se smísí s koncentrovanou kyselinou sírovou (2 ml), zahřívá se k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny a potom se nechá ochladit na teplotu místnosti. Potom se směs zředí ethylacetátem a opatrně se neutralisuje nasyceným vodným roztokem uhličitanu draselného. Vrstvy se rozdělí a organická vrstva se promyje vodou, roztokem chloridu sodného a vysuší se nad síranem hořečnatým. Směs se přefiltruje a odpaří se k suchu. Zbytek se použije v následujícím stupni bez dalšího čištění (127 mg, výtěžek 85 %).

C.



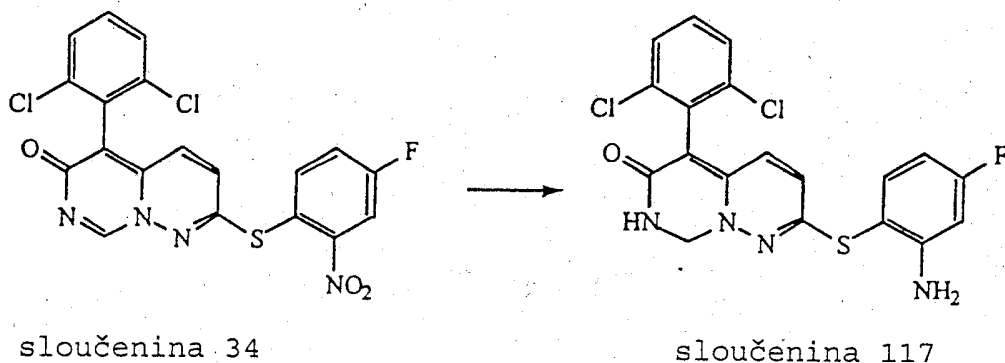
sloučenina 34

Amid ze stupně B (127 mg, 0,28 mmol) se rozpustí v THF (3 ml) a k tomuto roztoku se přidá dimethylacetal dimethylformamidu (110 μ l, 0,83 mmol). Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 5 minut a potom se ochladí na

15.05.99

teplotu místnosti. Všechny těkavé látky se odstraní za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií na silikagelu elucí 2,5% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá čistá požadovaná sloučenina 34 (118 mg, 92 %).

D.

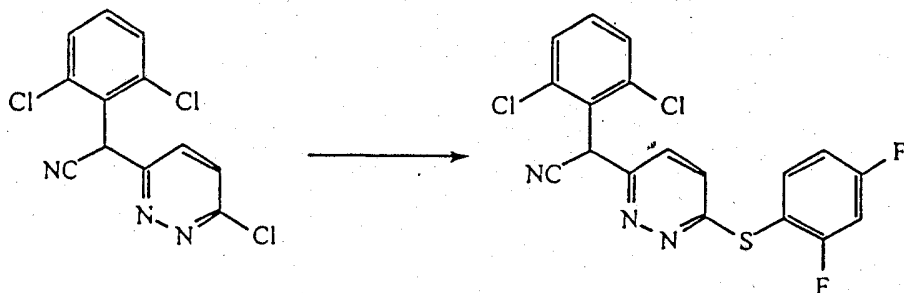


K roztoku sloučeniny 34 (100,8 mg, 0,22 mmol) v benzenu (3,4 ml) se přidá roztok chloridu nikelnatého hexahydrátu (103 mg, 0,44 mmol) ve směsi benzenu a methanolu (0,84 ml/0,84 ml) a vzniklý roztok se ochladí na 0 °C. K tomuto roztoku se potom přidá borohydrid sodný (49 mg, 1,3 mmol). Reakční směs se míchá, přičemž se nechá ohřát na teplotu místnosti. Potom se reakční směs odpaří za sníženého tlaku a zbytek se čistí rychlou chromatografií elucí 2% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá čistý požadovaný produkt, sloučenina 117, (21 mg, výtěžek 25 %).

Příklad 14

Příprava sloučenin 53 a 142

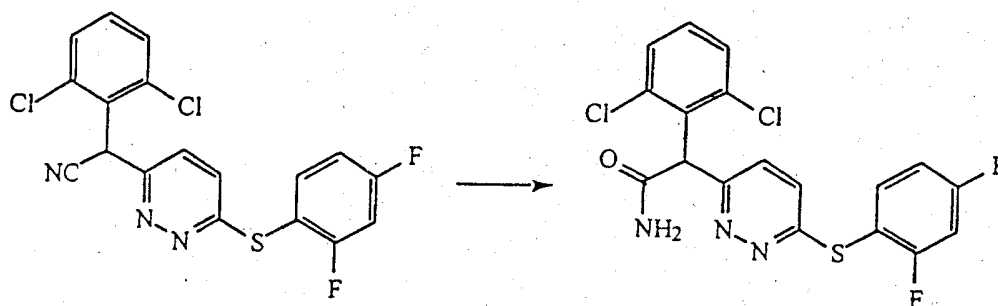
A.



16.06.99

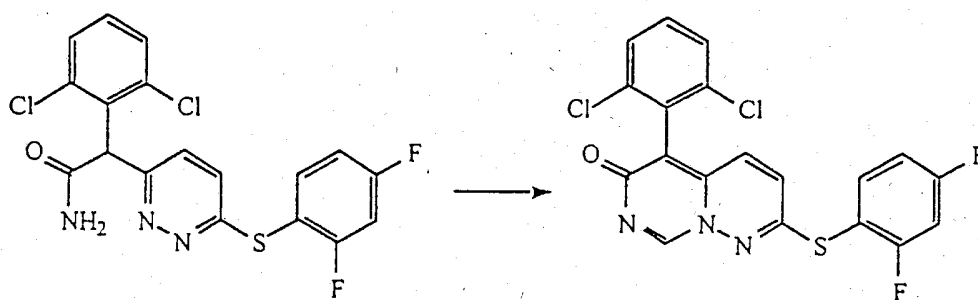
Produkt naznačený ve výše uvedené reakci se syntetisuje za použití postupu podle příkladu 1 stupně B za použití chlorpyridazinu (359 mg, 1,21 mmol) a 2,4-difluorthiofenolu (176 mg, 1,21 mmol). Produkt se získá po rychlé chromatografii na silikagelu (451 mg, 92 %).

B.



Výše uvedená reakce se provádí postupem popsaným v příkladu 1 stupni C za použití 451 mg výchozí látky a 5 ml koncentrované kyseliny sírové, čímž se získá uvedený produkt (425 mg, 90 %).

C.

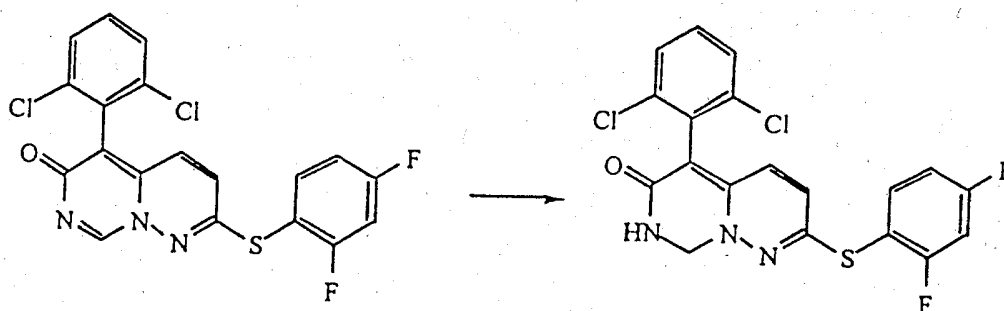


sloučenina 53

Výše uvedená reakce se provádí postupem popsaným v příkladu 1 stupni D za použití výchozího amidu (410 mg, 0,96 mmol) a dimethylacetalu dimethylformamidu (3 mmol). Reakční směs se zahřívá na teplotu 50 °C po dobu 30 minut a pak se zpracuje dříve popsaným způsobem. Získá se sloučenina 53 (313 mg, 75 %).

18.08.99

D.



sloučenina 53

sloučenina 142

Sloučenina 34 (213 mg, 0,49 mmol) se rozpustí v THF (10 ml), ochladí se na 0 °C a k tomuto roztoku se přidá boran v THF (1 M, 0,6 mmol). Reakční směs se míchá po dobu 30 minut, potom se ochladí vodou a zředí se ethylacetátem. Organická vrstva se promyje vodou a roztokem chloridu sodného, vysuší se a odpaří se v rotačním odpařováku. Zbytek se čistí na silikagelu elucí gradientem 1% až 5% methanolem v methylenchloridu, čímž se získá sloučenina 142 (125 mg, 57 %).

Příklad 15

Klonování p38 kinasy v hmyzích buňkách

Byly identifikovány dvě spojené varianty lidské p38 kinasy, CSBP1 a CSBP2. Pro zesílení kódování oblasti CSBP2 cDNA za použití HeLa buňkové sbírky (Strategene) jako matrice byly použity specifické oligonukleotidové iniciátory. Reakční produkt řetězové polymerasy byl klonován na pET-15b vektor (Novagen). Baculovirový přenosový vektor, pVL-(His)6-p38 byl zhotoven subklonováním *Xba*I-*Bam*HI fragmetnu pET15b-(His)6-p38 na komplementární místa v plasmidu pVL1392 (Pharmingen).

Plasmid pVL-(His)6-p38 směřoval syntesu rekombinantního proteinu sestávajícího ze 23-zbytku peptidu (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLE, kde LVPRGS znamená štěpicí místo thrombinu) kondensovaného do konstrukce na N-konec p38, jak

15.06.99

bylo potvrzeno DNA sekvencí a N-koncovou sekvencí exprimovaného proteinu. Monovrstvová kultura *Spodoptera frugiperda* (Sf9) hmyzích buněk (ATCC) byla udržována v TNM-FH prostředí (Gibco BRL) doplněném 10% fetálním hovězím sérem v T-baňce při teplotě 27 °C. Buňky Sf9 v log fázi byly ko-transfektovány s lineární virovou DNA nukleárního mnohostěnného viru *Autographa californica* (Pharming) a přenosovým vektorem pVL-(His)6-p38 za použití Lipofectinu (Invitrogen). Jednotlivé rekombinantní baculovirové klony byly čištěny plakovým testem za použití 1% nízkotající agarosy.

Příklad 16

Expres a čištění rekombinantní p38 kinasy

Buňky *Trichoplusia ni* (Tn-368) High-Five™ (Invitrogen) se pěstují v suspensi v Excel-405 mediu prostém proteinů (JRH Bioscience) v třepací baňce při teplotě 27 °C. Buňky při hustotě $1,5 \times 10^6$ buněk/ml se infikují rekombinantním baculovirem popsaným výše při multiplicitě infekce 5. Expresní hladina rekombinantu p38 se monitoruje imunoznačením za použití králičí antilátky anti-p38 (Santa Cruz Biotechnology). Hmota buněk se sklídí za 72 hodin po infekci, kdy expresní hladina p38 dosáhne svého maxima.

Zmrazená pasta buněk z buněk exprimujících (His)₆-značený p38 se rozmrazí v 5 objemech pufru A (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 200 mM NaCl, 2 mM β-merkapt ethanol, 10% glycerol a 0,2 mM PMSF). Po mechanickém rozbití buněk v mikrofluidiséru se lysát centrifuguje při 30 000 x g po dobu 30 minut. Supernatant se inkubuje po dávkách po dobu 3 až 5 hodin při teplotě 4 °C Talon™ (Clontech) pryskyřicí s afinitou na kov v poměru 1 ml pryskyřice na 2 až 4 mg očekávaného p38. Pryskyřice sedimentuje centrifugací při 500 x g po dobu 5 minut a jemně se promyje po dávkách pufr A. Pryskyřice se suspenduje a

15.06.99

naleje se na kolonu (přibližně 2,6 x 5,0 cm) a promyje se pufrem A + 5 mM imidazolem.

(His)₆-p38 se eluuje pufrem A + 100 mM imidazolem a následně se dialysuje přes noc při teplotě 4 °C proti 2 litrům pufru B (50 mM HEPES, pH 7,5, 25 mM β-glycerofosfát, 5% glycerol, 2 mM DTT). His₆ značení se odstraní přidáním 1,5 jednotek thrombinu (Calbiochem) na mg p38 a inkubací při teplotě 20 °C po dobu 2 až 3 hodin. Thrombin se ochladí přidáním 0,2 mM PMSF a potom se celý vzorek naplní do 2 ml benzamidinagarosové (American International Chemical) kolony.

Průběžná průtoková frakce se naplní do 2,6 x 5,0 cm kolony Q-Sepharose (Pharmacia) předem ekvilibrované v pufru B + 0,2 mM PMSF. p38 se eluuje lineárním gradientem 20 kolonovým objemem na 0,6 M NaCl v pufru B. Eluovaný proteinový pík se spojí a dialysuje se přes noc při teplotě 4 °C proti pufru C (50 mM HEPES pH 7,5, 5% glycerol, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,2 mM PMSF).

Dialysovaný protein se zahustí v Centriprep (Amicon) na 3 až 4 ml a aplikuje se na 2,6 x 100 cm kolonu Sephacryl S-100HR (Pharmacia). Protein se eluuje rychlostí 35 ml/hodina. Hlavní pík se spojí, upraví se na 20 mM DTT, zahustí se na 10 až 80 mg/ml a zmrazí se na alikvotní podíly při teplotě -70 °C nebo se ihned použije.

Příklad 17

Aktivace p38

P38 se aktivuje slučováním 0,5 mg/ml p38 s 0,005 mg/ml DD-dvojitý mutant MKK6 v pufru B + 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM Na₂VO₄ po dobu 30 minut při teplotě 20 °C. Aktivační směs se potom naplní do 1,0 x 10 cm MonoQ kolony (Pharmacia) a eluuje se lineárním gradientem 20 kolonovým objemem na 1,0 M NaCl v pufru B. Aktivovaný p38 se eluuje po ADP a ATP. Aktivovaný pík p38 se spojí a dialysuje se proti pufru B + 0,2 mM Na₂VO₄, čímž

15.06.99

se odstraní NaCl. Dialysovaný protein se upraví na koncentraci 1,1 M fosforečnanu draselného přidáním 4,0 M zásobního roztoku a naplní se do 1,0 x 10 cm HIC kolony (Rainin Hydropore) předem ekvilibrované v pufru D (10% glycerol, 20 mM β -glycerofosfát, 2,0 mM DTT) + 1,1 M K_2HPO_4 . Protein se eluuje lineárním gradientem 20 kolonovým objemem na pufr D + 50 mM K_2HPO_4 . Dvojitě fosforylovaný p38 se eluuje jako hlavní pík a spojí se pro dialysu proti pufru B + 0,2 mM Na_2VO_4 . Aktivovaný p38 se skladuje při teplotě -70 °C.

Příklad 18

Testy inhibice p38

A. Inhibice fosforylace EGF peptidového receptoru

Test se provádí v přítomnosti 10 mM $MgCl_2$, 25 mM β -glycerofosfátu, 10% glycerolu a 100 mM HEPES pufru při pH 7,6. Pro typické stanovení IC_{50} se připraví zásobní roztok obsahující všechny výše uvedené složky a aktivovaný p38 (5 nM). Alikvotní podíly zásobního roztoku se naplní do lahviček. Do každé lahvičky se vloží stanovený objem DMSO nebo inhibitoru v DMSO (konečná koncentrace DMSO při reakci je 5 %), smísí se a inkubuje se při teplotě místnosti po dobu 15 minut. Do každé lahvičky se přidá EGF peptidový receptor, KRELVEPLTPSGEAPNQALLR, fosforylový akceptor reakce p38 katalysované kinasy (1), na konečnou koncentraci 200 μ M. Reakce kinasy se iniciuje ATP (100 μ M) a lahvičky se inkubují při teplotě 30 °C. Po 30 minutách se reakce zastaví stejným objemem 10% trifluoroctové kyseliny (TFA).

Fosforylovaný peptid se stanoví HPLC analysou. Oddělení fosforylovaného peptidu od nefosforylovaného peptidu se provádí na koloně s obrácenými fázemi (Deltapak, 5 μ m, C18 100D, díl č. 011795) s binárním gradientem vody a acetonitrilu, každý s obsahem 0,1 % TFA. IC_{50} (koncentrace

15.06.99

inhibitoru poskytující 50% inhibici) se stanoví vynesemím % zbylé účinnosti proti koncentraci inhibitoru.

B. Inhibice účinnosti ATPasy

Tento test se provádí v přítomnosti 10 mM MgCl_2 , 25 mM β -glycerofosfátu, 10% glycerolu a 100 mM HEPES pufru při pH 7,6. Pro typické stanovení K_i , se K_m pro ATP účinnosti ATPasy aktivované reakcí p38 stanoví bez přítomnosti inhibitoru a v přítomnosti dvou koncentrací inhibitoru. Připraví se zásobní roztok obsahující všechny výše uvedené složky a aktivovaný p38 (60 nM). Alikvotní podíly zásobního roztoku se naplní do lahvíček. Do každé lahvíčky se vloží stanovený objem DMSO nebo inhibitoru v DMSO (konečná koncentrace DMSO při reakci je 2,5 %), smísí se a inkubuje se při teplotě místnosti po dobu 15 minut. Reakce se iniciuje přidáním různých koncentrací ATP a potom se inkubuje při teplotě 30 °C. Po 30 minutách se reakce zastaví 50 μl EDTA (0,1 M, konečná koncentrace), pH 8,0. Produkt působení p38 ATPasy, ADP, se stanoví HPLC analysou.

Oddělení ADP od ATP se provádí na koloně s obrácenými fázemi (Supelcosil, LC-18, 3 μm , díl č. 5-8985) za použití binárního rozpouštědlového gradientu následujícího složení: rozpouštědlo A - 0,1 M fosfátový pufr obsahující 8 mM tetrabutylamoniumhydrogensíran (Sigma Chemical Co., katalog č. T-7158), rozpouštědlo B - rozpouštědlo A s 30 % methanolu.

K_i se stanoví z rychlostních údajů jako funkce inhibitoru a koncentrací ATP. Výsledky pro několik inhibitorů podle vynálezu jsou shrnuty v tabulce 6 níže.

Tabulka 6

sloučenina	K_i (μM)
1	>20
2	15
3	5
5	2,9
6	0,4

15.05.99

Další inhibitory p38 podle vynálezu také inhibují účinnost ATPasy p38.

C. Inhibice IL-1, TNF, IL-6 a IL-8

Produkce v LPS-stimulovaných PBMC

Inhibitory se seriově zředí v DMSO z 20 mM zásobního roztoku. Připraví se alespoň 6 seriových zředění. Potom se připraví 4x inhibitorové zásobní roztoky přidáním 4 μ l inhibitorového zředění na 1 ml RPMI1640 media/10% fetální hovězí sérum. 4x inhibitorové zásobní roztoky obsahují inhibitor v koncentracích 80 μ M, 32 μ M, 12,8 μ M, 5,12 μ M, 2,048 μ M, 0,819 μ M, 0,328 μ M, 0,131 μ M, 0,052 μ M, 0,021 μ M atd. 4x inhibitorové zásobní roztoky se před použitím předejdejší na 37 °C.

Buňky ze sražených leukocytů z lidské čerstvé krve se oddělí od ostatních buněk ve Vacutaineru CPT od firmy Becton & Dickinson (obsahující 4 ml krve a dostatek DPBS bez Mg^{2+}/Ca^{2+} k naplnění trubice) centrifugací při 1500 x g po dobu 15 minut. Periferní krevní mononukleární buňky (PBMC) umístěné na vrcholu gradientu ve Vacutaineru se odstraní a promyjí se dvakrát RPMI1640 mediem/10% fetálním hovězím sérem. PBMC se shromáždí centrifugací při 500 x g po dobu 10 minut. Celkový počet buněk se stanoví za použití Neubauerovy komory buněk a buňky se upraví na koncentraci $4,8 \times 10^6$ buněk/ml v mediu kultury buněk (RPMI1640 doplněném 10% fetálním hovězím sérem).

Alternativně se při testu použije přímo celá krev obsahující antikoagulační činidlo.

Do každé jamky 96-jamkové desky pro buněčnou kulturu se umístí 100 μ l buněčné suspence nebo celá krev. Potom se k buňkám přidá 50 μ l 4x inhibitorového zásobního roztoku. Nakonec se přidá 50 μ l lipopolysacharidového (LPS) pracovního zásobního roztoku (16 ng/ml v mediu buněčné kultury), čímž se získá konečná koncentrace 4 ng/ml LPS v testu. Celkový testovací objem nosičové kontroly se tak upraví na 200 μ l přidáním 50 μ l media buněčné kultury. PBMC buňky nebo celá

15.08.99

krv se potom inkubuje přes noc (po dobu 12 až 15 hodin) při teplotě 37 °C s 5 % CO₂ ve vlhké atmosféře.

Následující den se buňky mísí v třepačce po dobu 3 až 5 minut před centrifugací při 500 x g po dobu 5 minut. Sklidí se supernatanty buněčné kultury a analyšují se pomocí ELISA pro hladiny IL-1b (R & D Systems, Quantikine kits, #DBL50), THN- α (BioSource, #KHC3012), IL-6 (Endogen, #EH2-IL6) a IL-8 (Endogen, #EH2-IL8) podle instrukcí výrobce. ELISA údaje se použijí pro vytvoření křivek dávka-odezva, z nichž se odvodí hodnoty IC₅₀.

Výsledky pro test kinasy ("kinasa", pododstavec A výše), IL-1 a TNF v LPS-stimulovaných PBMC ("buňky") a IL-1, TNF a IL-6 v celé krvi ("WB") pro různé p38 inhibitory podle vynálezu jsou uvedeny v tabulce 7 níže:

Tabulka 7

sl.	kinasa	buňka IL-1	buňka TNF	WB IL-1	WB TNF	WB IL-6
č.	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
2	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
3	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
6	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
7	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
8	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
9	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
10	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
12	++	++	++	+	+	+
13	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
14	+	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
15	+	++	++	N.D.	N.D.	N.D.

15.06.99

sl.	kinasa	buňka IL-1	buňka TNF	WB IL-1	WB TNF	WB IL-6
č.	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
16	++	+	++	N.D.	N.D.	N.D.
17	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
18	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
19	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
20	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
21	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
22	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
23	++	++	+	+	+	+
24	++	++	++	+	+	N.D.
25	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
26	+	+++	++	+	+	+
27	++	+	+	+	+	+
28	++	++	++	N.D.	N.D.	N.D.
29	++	++	++	N.D.	N.D.	N.D.
30	+	+	+	+	N.D.	N.D.
31	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
32	++	+	++	+	+	+
33	++	++	++	+	+	+
34	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
35	++	++	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+
37	++	++	+	+	+	+
38	+++	+++	++	++	++	++
39	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
40	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
41	+++	+++	+++	N.D.	N.D.	N.D.
42	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
43	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
44	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
45	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
46	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.

16.08.99

sl. kinasa buňka IL-1 buňka TNF WB IL-1 WB TNF WB IL-6
 č. IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀

47	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
48	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
49	++	+++	+	+	+	+
50	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
51	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
52	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
53	+++	+++	+++	+++	+++	+++
101	++	+++	+++	+	+	++
102	+++	+++	+++	+	++	++
103	+++	+++	+++	+	++	++
104	++	++	++	+	+	+
105	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
106	+++	+++	+++	+	++	++
107	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
109	+++	+++	+++	+	+	++
108	+++	++	+++	++	+++	+++
110	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
111	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
112	++	++	+	+	+	+
113	+++	+++	++	+	+	+
114	+++	+++	+++	++	++	+++
115	+++	+++	+++	+	+	+
116	+++	+++	++	+	+	+
117	+++	+++	+++	++	++	+++
118	++	++	++	+	+	+
119	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
120	N.D.	++	+	+	+	+
121	+++	+++	++	+	+	+
122	++	++	+	+	+	+
123	++	++	++	+	+	+

15.05.99

sl. kinasa buňka IL-1 buňka TNF WB IL-1 WB TNF WB IL-6

č.	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
124	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
125	+++	+++	+++	+	+	+
126	+	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
127	+++	+++	+++	++	++	+++
128	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
129	+++	+++	+++	++	+	++
130	+++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
131	+++	+++	+++	N.D.	N.D.	N.D.
132	+++	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.
133	+++	+++	+++	N.D.	N.D.	N.D.
134	+++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
135	+++	++	+	+	+	+
136	+++	+++	+++	+	+	++
137	+++	+++	++	+	+	++
138	++	+++	++	+	+	+++
139	+++	+++	+	+	+	+
140	+++	+++	+++	++	+	++
141	+++	+++	+++	+	+	+
142	+++	+++	+++	+++	+++	+++
143	+++	+++	++	+	+	+
144	+++	+++	++	+	+	++
145	+++	+++	+++	+++	+++	+++
201	++	+	+	+	+++	+
203	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
204	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
205	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
206	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
207	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
208	N.D.	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
209	N.D.	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
202/	+++	++	++	+	+	+

15.05.99

sl. kinasu buňka IL-1 buňka TNF WB IL-1 WB TNF WB IL-6
 č. IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀

301						
302	+++	+++	++	+	+	+
303	+	+	+	+	+	+
304	+	+	+	+	+	+
305	+++	+++	+	+	+	+
306	++	++	+	+	+	+
307	+++	++	+	+	+	+
308	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
309	++	++	++	+	+	+
310	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
311	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
312	+++	++	+	+	+	+
313	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
314	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
315	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
316	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
317	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
318	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
319	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
320	+++	++	++	N.D.	N.D.	N.D.
321	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
322	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
323	++	++	++	N.D.	N.D.	N.D.
324	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
325	+++	+++	++	+	+	+
326	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
327	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
328	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
329	++	++	+	+	+	+
330	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
331	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

15.08.99

sl.	kinasa	buňka IL-1	buňka TNF	WB IL-1	WB TNF	WB IL-6
č.	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀
332	++	++	+	+	+	+
333	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
334	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
335	++	+	+	+	+	+
336	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
337	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
338	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
339	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
340	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
341	++	++	++	N.D.	N.D.	N.D.
342	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
343	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
344	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
345	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
346	++	+	+	+	+	+
347	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
348	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
349	+	++	+	+	+	+
350	+	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
351	+	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
352	+	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
353	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
354	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
355	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
356	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
357	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
358	++	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
359	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
360	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

15.05.99

sl. kinasa buňka IL-1 buňka TNF WB IL-1 WB TNF WB IL-6

č. IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀

361	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
362	+++	++	++	+	+	+
363	+++	+++	++	+	+	+
364	+++	+++	++	+	+	+
365	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
366	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
367	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
368	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
369	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
370	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
371	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
372	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
373	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
374	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
375	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
376	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
377	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
378	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
379	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
380	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
381	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
382	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
383	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
384	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
385	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
386	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
387	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
388	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
389	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
390	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

15.05.99

sl. kinasa buňka IL-1 buňka TNF WB IL-1 WB TNF WB IL-6
č. IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀ IC₅₀

391	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
392	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
393	++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
394	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
395	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
396	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
397	+	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
398	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
399	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1301	+++	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
401	+++	++	++	+	+	+
402	+++	+++	+++	+	+	+
403	+++	+++	+++	+	+	++
404	+++	+++	+++	+	+	+
405	+++	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.
406	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
407	++	++	+	N.D.	N.D.	N.D.
408	+++	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.
409	+++	+++	+++	+	+	++
410	+++	+++	+++	++	++	++
411	+++	+++	+++	+	+	+
412	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

16.05.99

IC₅₀ hodnoty pro kinasu, "+++" znamená <0,1 µM, "++" znamená mezi 0,1 a 1,0 µM a "+" znamená >1,0 µM. Pro buněčný IL-1 a TNF hodnoty, "+++" znamená <0,1 µM, "++" znamená mezi 0,1 a 0,5 µM a "+" znamená >0,5 µM. Pro celou krev (WB) hodnoty, "+++" znamená <0,25 µM, "++" znamená mezi 0,25 a 0,5 µM a "+" znamená >0,5 µM. Ve všech testech uvedených v tabulce níže "N.D." znamená, že hodnoty nebyly stanoveny.

Další p38 inhibitory podle vynálezu také inhibují fosforylaci EGF peptidového receptoru a produkci IL-1, TNF a IL-6, jakož i IL-8 v LPS-stimulovaných PBMC nebo v celé krvi.

D. Inhibice IL-6 a IL-8

Produkce v IL-1-stimulovaných PBMC

Tento test se provádí na PBMC přesně takových, jak bylo uvedeno výše, kromě toho, že se k testu přidá 50 µl IL-1b pracovního zásobního roztoku (2 ng/ml media buněčné kultury) místo LPS pracovního zásobního roztoku.

Supernatanty buněčné kultury se sklídí, jak je popsáno výše, a analyzují se pomocí ELISA na hladiny IL-6 (Endogen, #EH2-IL6), a IL-8 (Endogen, #EH2-IL8) podle instrukcí výrobce. ELISA údaje se použijí pro vytvoření křivek dávka-odezva, z nichž se odvodí hodnoty IC₅₀.

Výsledky p38 inhibitoru, sloučeniny 6, jsou uvedeny v tabulce 8 níže:

Tabulka 8

testovaný cytokin	IC ₅₀ (µM)
IL-6	0,6
IL-8	0,85

E. Inhibice LPS vyvolané prostaglandinové endoperoxid syntasy-2 (PGHS-2 nebo COX-2) Indukce PBMS

Lidské periferní mononukleární buňky se izolují ze sražených leukocytů čerstvé lidské krve centrifugací ve Vacutaíner CPT (Becton & Dickinson). 15 x 10⁶ buněk se naočkuje

18.05.99

do 6-jamkové desky pro tkáňovou kulturu obsahující RPMI 1640 doplněný 10% fetálním hovězím sérem, 50 U/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu a 2 mM L-glutaminem. Přidá se sloučenina 6 (výše) na 0,2, 2,0 a 20 µM konečné koncentrace v DMSO. Potom se přidá LPS na konečnou koncentraci 4 ng/ml, čímž se vyvolá exprese enzymu. Konečný objem kultury je 10 ml na jamku.

Po inkubaci při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ přes noc se sklídí buňky seškrábáním a následnou centrifugací, potom se odstraní supernatant a buňky se promyjí dvakrát ledově studeným DPBS (Dulbecco fosfátem pufrovaný solný roztok, BioWhittaker). Buňky se lysují na ledu po dobu 10 minut v 50 µl studeného lysového pufru (20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 1% deoxycholová kyselina, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 2% aprotinin (Sigma), 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml leupeptin, 2 mM PMSF, 1mM benzamidin, 1 mM DTT) obsahujícím 1 µl Benzonasy (DNAasa od firmy Merck). Koncentrace proteinu v každém vzorku se stanoví za použití BCA testu (Pierce) a albuminu hovězího séra jako standardu. Potom se koncentrace proteinu v každém vzorku upraví na 1 mg/ml studeným lysovým pufrem. Ke 100 µl lysátu se přidá stejný objem 2xSDS PAGE pufru a vzorek se vaří po dobu 5 minut. Proteiny (30 mg/proužek) se frakcionují podle velikosti na 4 až 20% SDS PAGE gradientových gelech (Novex) a potom se elektroforeticky přenášejí na nitrocelulosovou membránu po dobu 2 hodin při 100 mA v Towbinově přenosovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin) obsahujícím 20 % methanolu. Membrána se předem zpracovává po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti blokovacím pufrem (5% netučné sušené mléko v DPBS doplněné 0,1% Tweenem-20) a promyje se třikrát v DPBS/0,1% Tween-20. Membrána se inkubuje přes noc při teplotě 4 °C s 1:250 ředěnou monoklonální protilátkou anti-COX-2 (Transduction Laboratories) v blokovacím pufru. Po 3 promytích v DPBS/0,1% Tween-20 se membrána inkubuje 1:1000 ředěnou křenuvou peroxidasou spojenou s ovčím antisérem na myši Ig (Amersham) v blokovacím pufru po

15.05.99

dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Potom se membrána promyje třikrát v DPBS/0,1% Tween-20 a pro stanovení hladiny exprese COX-2 se použije ECL detekční systém (SuperSignal™ CL-HRP Substrate System, Pierce).

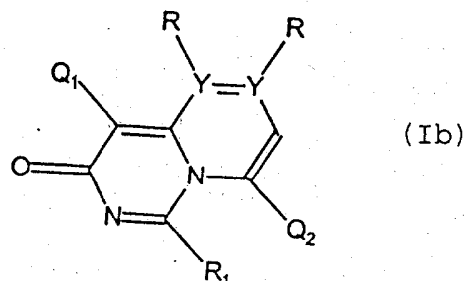
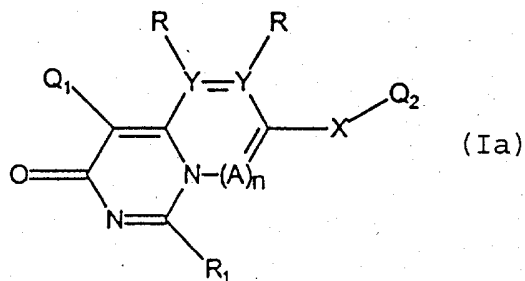
Výsledky výše uvedeného testu naznačují, že sloučenina 6 inhibuje LPS vyvolanou PGHS-2 expresi v PBMC.

I když je zde uvedena řada provedení podle vynálezu, je samzřejmé, že základní smysl lze měnit, čímž se získají další provedení použitelná při způsobu podle vynálezu.

2163-99
15.05.99

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina obecného vzorce Ia nebo Ib



kde

každý ze substituentů Q_1 a Q_2 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy nebo osmičlenné až desetičlenné bicyklické kruhové systémy obsahující aromatické karbocyklické kruhy, aromatické heterocyklické kruhy nebo kombinaci aromatického karbocyklického kruhu a aromatického heterocyklického kruhu,

Q_1 je substituováno 1 až 4 substituenty nezávisle vybranými ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$, nebo $N=C-N(R')_2$ a

Q_2 je popřípadě substituováno až 4 substituenty nezávisle vybranými ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku s přímým nebo rozvětveným řetězcem, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' , $S(O_2)N(R')_2$, $N=C-N(R')_2$, R^3 nebo

15.05.99

CONR', dále skupiny NR', OCF₃, CF₃, NO₂, CO₂R', CONR', R³, OR³, NR³, SR³, C(O)R³, C(O)N(R')R³, C(O)OR³, SR', S(O₂)N(R')₂, SCF₃, N=C-N(R')₂, nebo CN,

kde R' je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku nebo alkinylovou skupinu, fenylovou skupinu nebo fenylovou skupinu substituovanou 1 až 3 substituenty nezávisle vybranými ze skupiny zahrnující atom halogenu, methoxyskupinu, kyanoskupinu, nitroskupinu, aminoskupinu, hydroxyskupinu, methylovou skupinu nebo ethylovou skupinu,

R³ je vybráno ze skupiny zahrnující pětičlenné až šestičlenné aromatické karbocyklické nebo heterocyklické kruhové systémy, a

R⁴ je alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku, popřípadě substituovaná skupinami N(R')₂, OR', CO₂R', CON(R')₂ nebo SO₂N(R²)₂, nebo pětičlenný až šestičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruhový systém, popřípadě substituovaný skupinami N(R')₂, OR', CO₂R', CON(R')₂ nebo SO₂N(R²)₂,

X je vybráno ze skupiny zahrnující -S-, -O-, -S(O₂)-, -S(O)-, -S(O₂)-N(R²)-, -N(R²)-S(O₂)-, -N(R²)-C(O)O-, -O-C(O)-N(R²)-, -C(O)-, -C(O)O-, -O-C(O)-, -C(O)-N(R²)-, -N(R²)-C(O)-, -N(R²)-, -C(R²)₂- nebo -C(OR²)₂-,

každé R je nezávisle vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, -R², -N(R²)₂, -OR², -SR², -C(O)-N(R²)₂, -S(O₂)-N(R²)₂ nebo -C(O)-OR², přičemž dvě přilehlá R jsou popřípadě vázána jedno na druhé a spolu s každým Y, ke kterým jsou vázána, tvoří čtyřčlenný až osmičlenný karbocyklický nebo heterocyklický kruh,

R² je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku nebo alkenylovou skupinu se 2 až 3 atomy uhlíku, které jsou obě popřípadě substituovány skupinami -N(R')₂, -OR', -SR', -C(O)-N(R')₂, -S(O₂)-N(R')₂, -C(O)-OR', nebo R³,

18.06.99

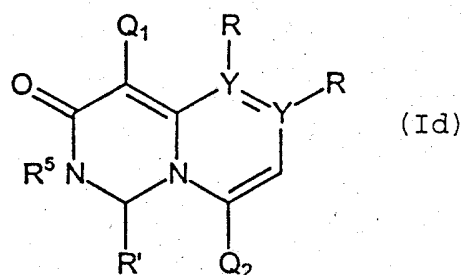
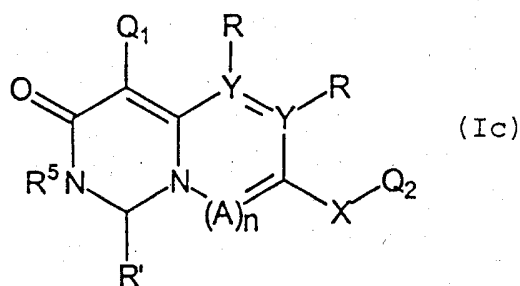
Y je N nebo C,

A, je-li přítomno, je N nebo CR',

n je 0 nebo 1, a

R₁ je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, OH, nebo -O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku.

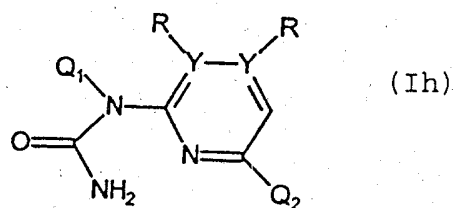
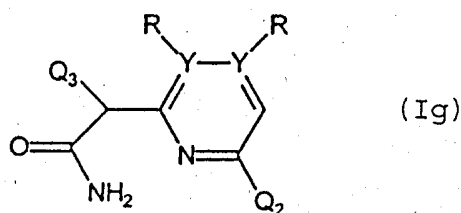
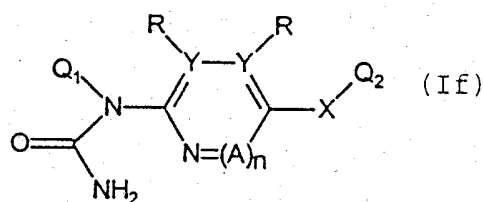
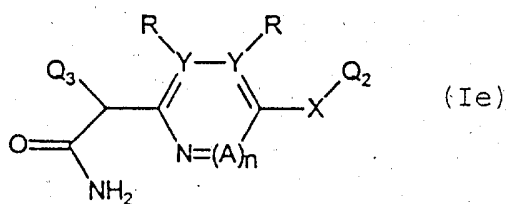
2. Sloučenina obecného vzorce Ic nebo Id



kde A, Q₁, Q₂, R, R', X, Y a n mají význam uvedený pro sloučeniny obecných vzorců Ia a Ib, a

R⁵ je vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku, skupiny -CR'₂OH, -C(O)R⁴, -C(O)OR⁴, -CR'₂OPO₃H₂ a -PO₃H₂.

3. Sloučenina obecného vzorce Ie, If, Ig nebo Ih



15.05.99

kde

Q_3 je pětičlenný až šestičlenný aromatický karbocyklický nebo heterocyklický kruhový systém, nebo osmičlenný až desetičlenný bicyklický kruhový systém obsahující aromatické karbocyklické kruhy, aromatické heterocyklické kruhy nebo kombinaci aromatického karbocyklického kruhu a aromatického heterocyklického kruhu, kde Q_3 je substituováno 1 až 4 substituenty, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu, alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, skupinu O-alkyl, kde alkylová část má 1 až 3 atomy uhlíku, popřípadě substituovanou skupinami NR'_2 , OR' , CO_2R' nebo $CONR'_2$, dále skupiny NR'_2 , OCF_3 , CF_3 , NO_2 , CO_2R' , $CONR'$, SR' , $S(O_2)N(R')_2$, SCF_3 , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$, nebo $N=C-N(R')_2$ a

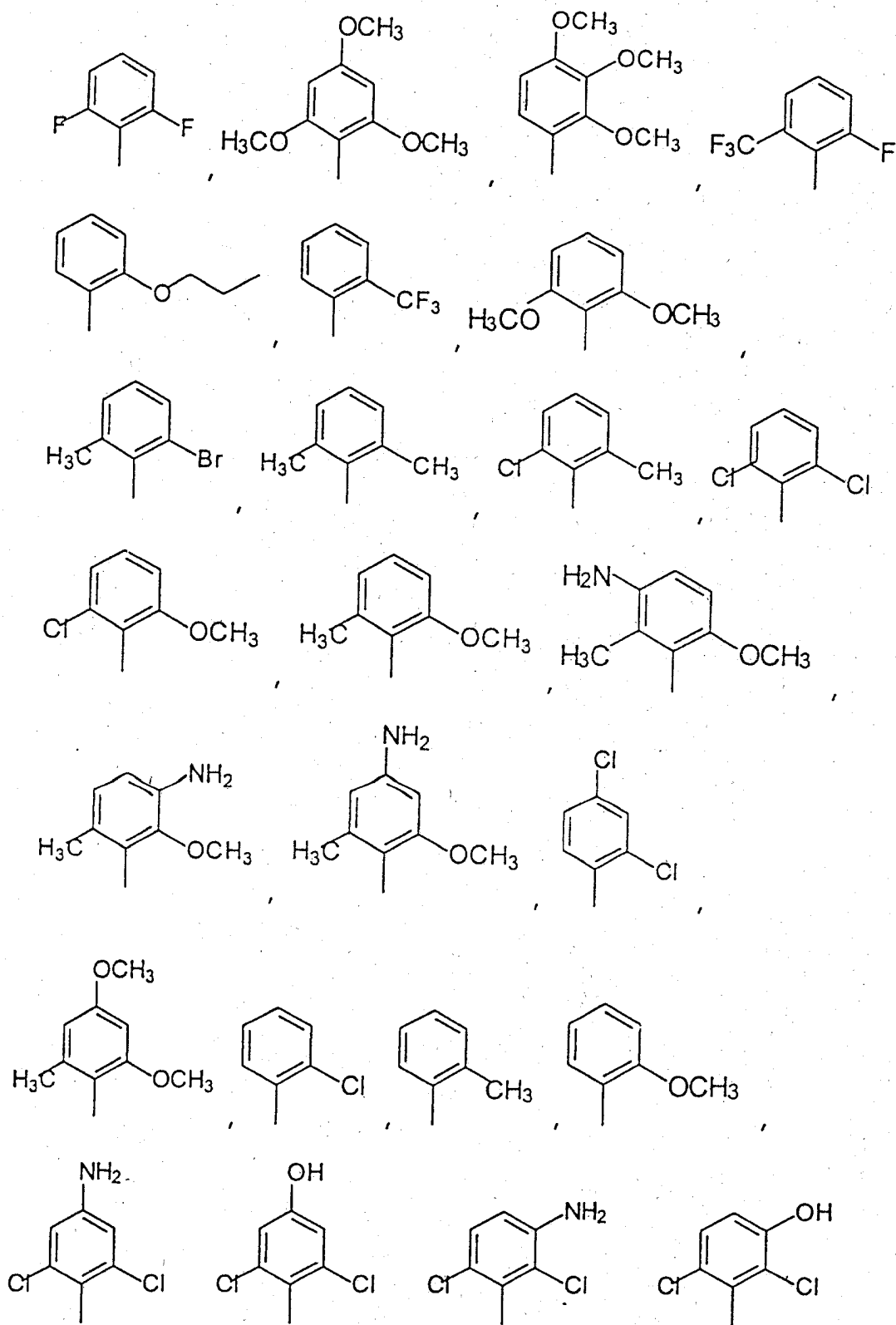
A, Q_1 , Q_2 , R, R' , X, Y a n mají význam uvedený v nároku 1.

4. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde Q_1 je vybráno ze skupiny zahrnující fenylovou nebo pyridylovou skupinu obsahující 1 až 3 substituenty nezávisle vybrané ze skupiny zahrnující atom chloru, atom fluoru, atom bromu, $-CH_3$, $-OCH_3$, $-OH$, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-O(CH_2)_2CH_3$, $-NH_2$, 3,4-methylen-dioxyskupinu, $-N(CH_3)_2$, $-NH-S(O_2)$ -fenyl, $-NH-C(O)O-CH_2$ -4-pyridin, $-NH-C(O)CH_2$ -morfolin, $-NH-C(O)CH_2-N(CH_3)_2$, $-NH-C(O)CH_2$ -piperazin, $-NH-C(O)CH_2$ -pyrrolidin, $-NH-C(O)C(O)$ -morfolin, $-NH-C(O)C(O)$ -piperazin, $-NH-C(O)C(O)$ -pyrrolidin, $-O-C(O)CH_2-N(CH_3)_2$ nebo $-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ a kde alespoň jeden z těchto substituentů je v poloze ortho.

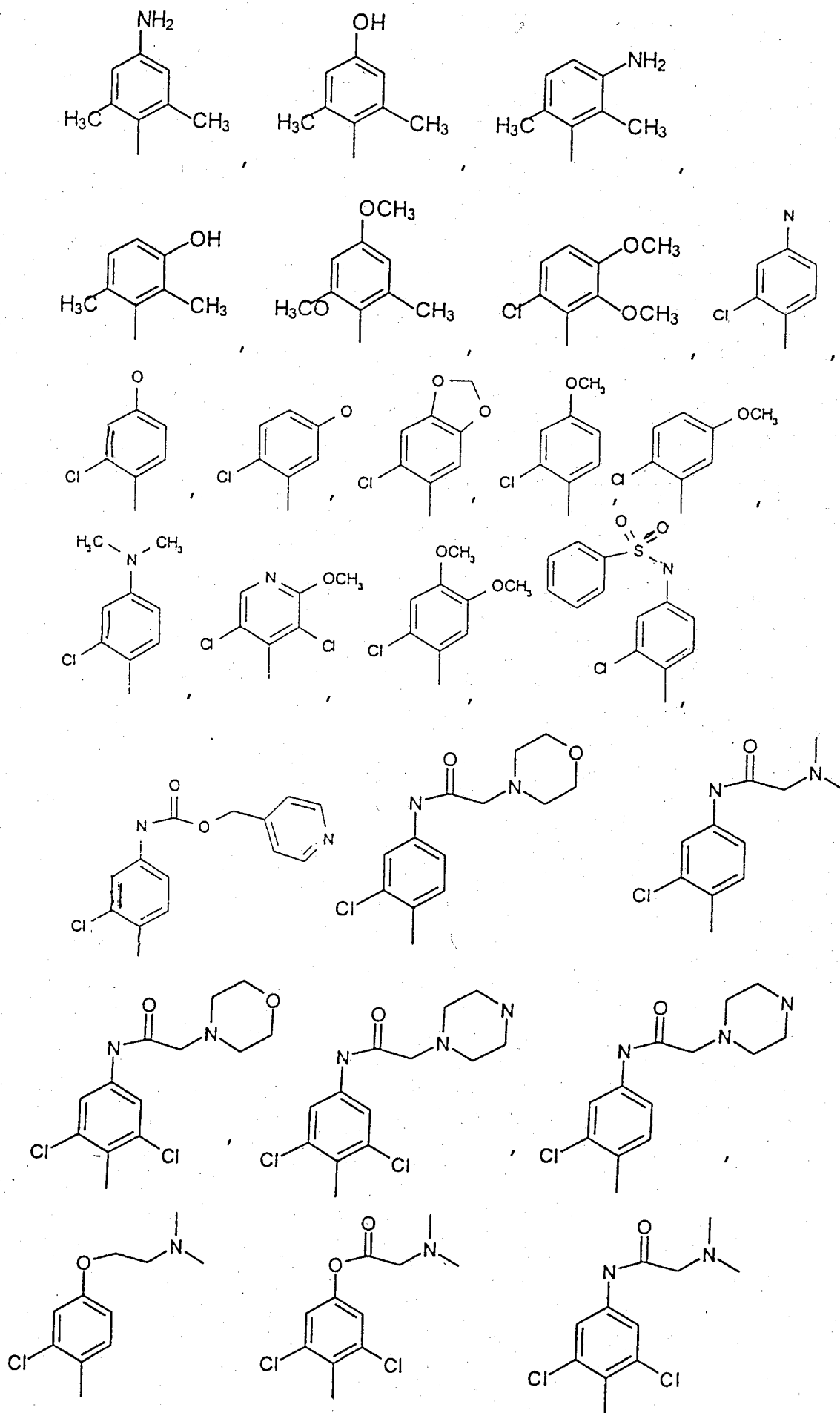
5. Sloučenina podle nároku 4, kde Q_1 obsahuje alespoň dva substituenty, přičemž oba jsou v poloze ortho.

15.06.99

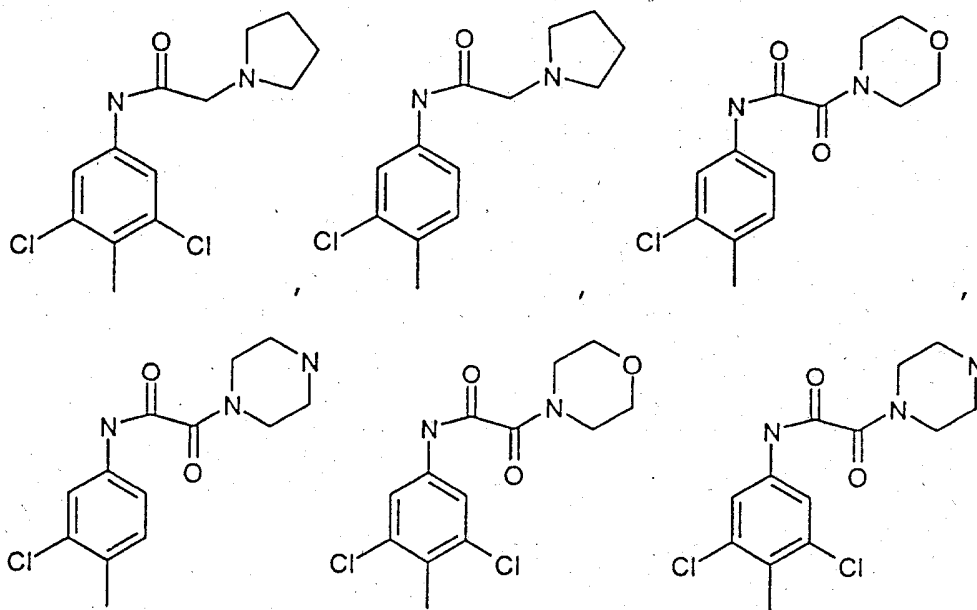
6. Sloučenina podle nároku 4, kde Q_1 je vybráno ze skupiny zahrnující:



18.06.99



18.08.99

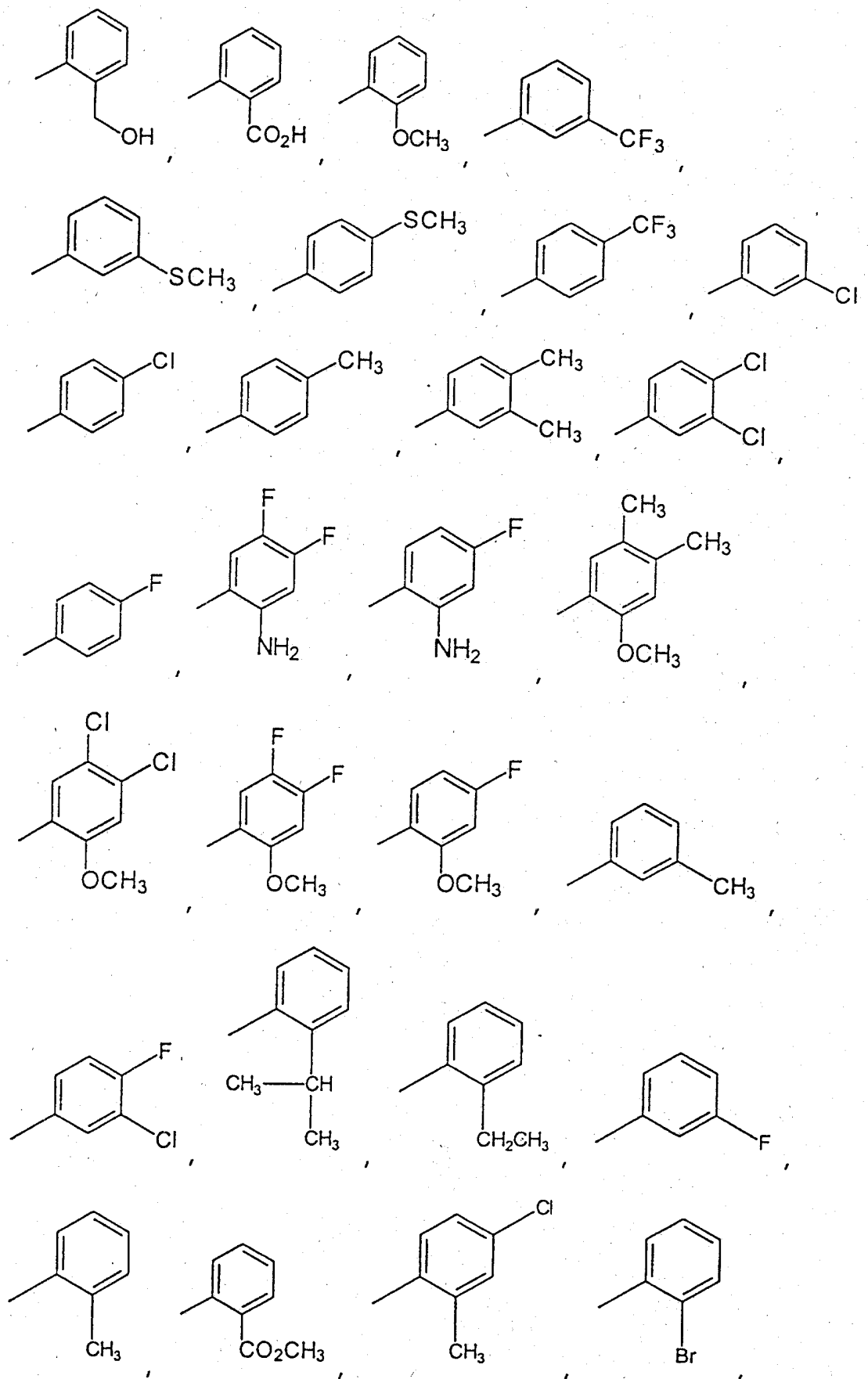


7. Sloučenina podle nároku 6, kde Q_1 je vybráno ze skupiny zahrnující 2-fluor-6-trifluormethylfenyl, 2,6-difluorfenyl, 2,6-dichlorfenyl, 2-chlor-4-hydroxyfenyl, 2-chlor-4-aminofenyl, 2,6-dichlor-4-aminofenyl, 2,6-dichlor-3-aminofenyl, 2,6-dimethyl-4-hydroxyfenyl, 2-methoxy-3,5-dichlor-4-pyridyl, 2-chlor-4,5-methylenedioxyfenyl nebo 2-chlor-4-(N-2-morfolinoacetamido)fenyl.

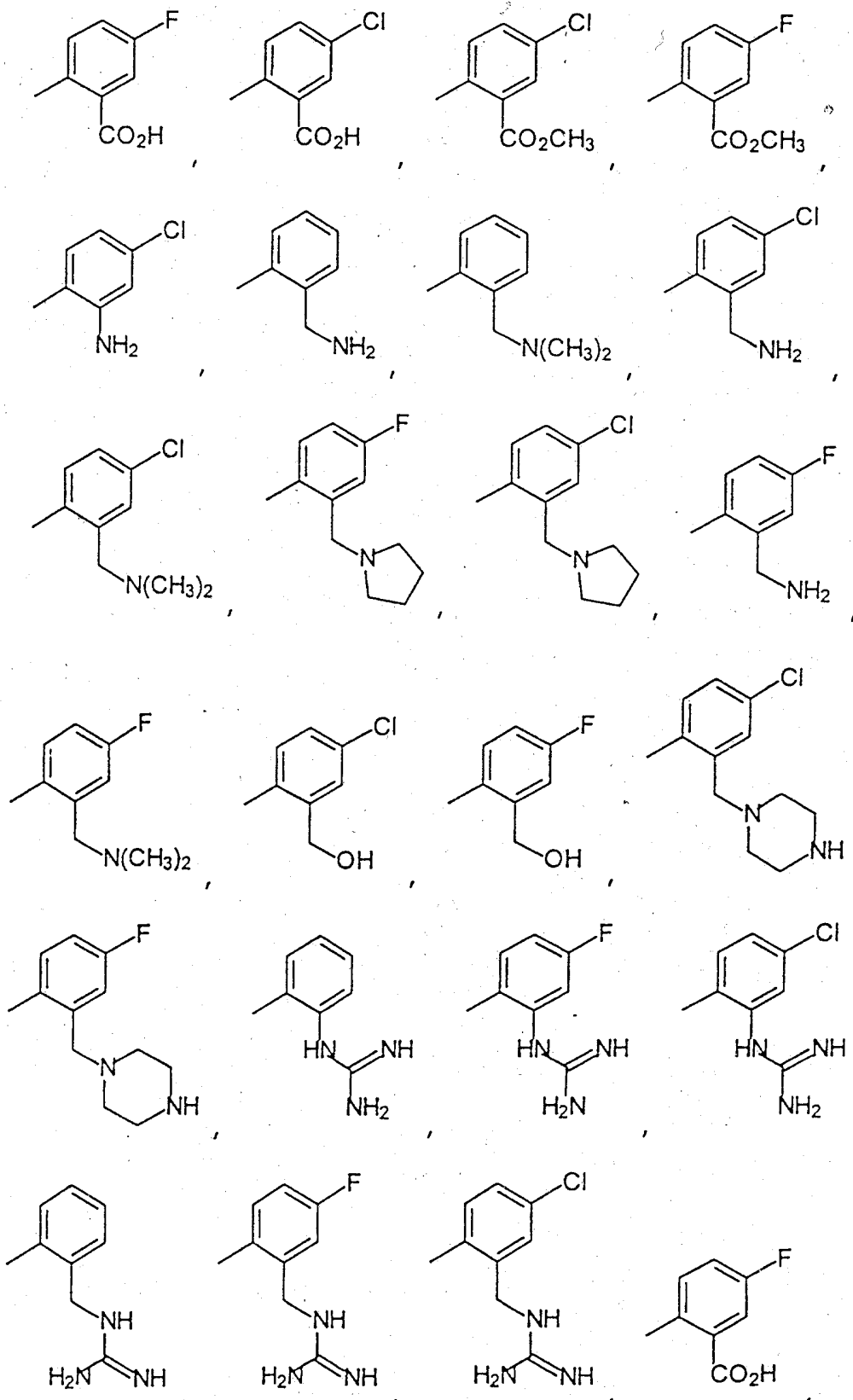
8. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde Q_2 je vybráno ze skupiny zahrnující fenylovou nebo pyridylovou skupinu a kde Q_2 popřípadě obsahuje až do 3 substituentů, z nichž každý je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom chloru, atom fluoru, atom bromu, methylovou skupinu, ethylovou skupinu, isopropylovou skupinu, $-OCH_3$, $-OH$, $-NH_2$, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SCH_3$, $-OCH_3$, $-C(O)OH$, $-C(O)OCH_3$, $-CH_2NH_2$, $-N(CH_3)_2$, $-CH_2$ -pyrrolidin a $-CH_2OH$.

18.08.99

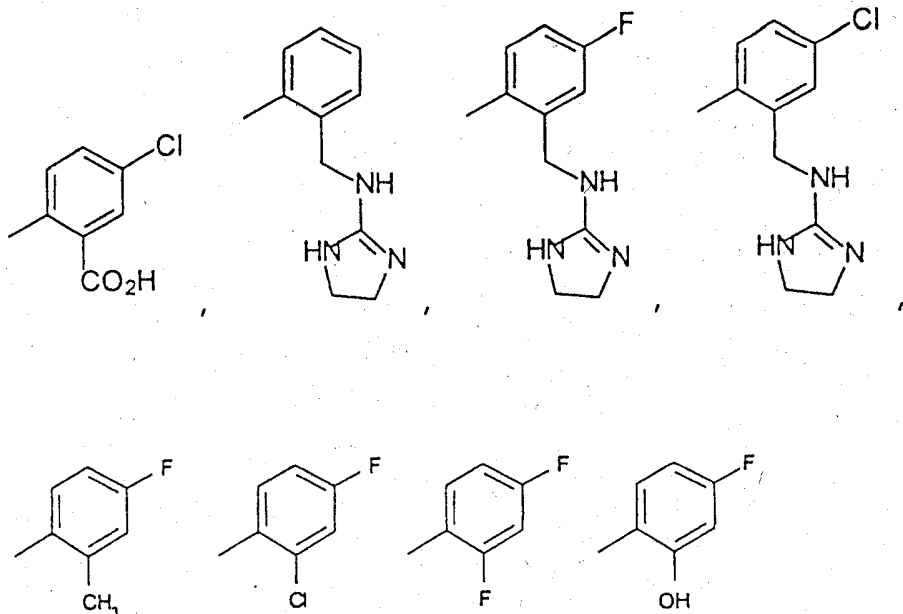
9. Sloučenina podle nároku 8, kde Q₂ je vybráno ze skupiny zahrnující:



16.06.99



18.08.99



nesubstituovanou 2-pyridylovou skupinu nebo nesubstituovanou fenylovou skupinu..

10. Sloučenina podle nároku 9, kde Q_2 je vybráno ze skupiny zahrnující fenyl, 2-isopropylfenyl, 3,4-dimethylfenyl, 2-ethylfenyl, 3-fluorfenyl, 2-methylfenyl, 3-chlor-4-fluorfenyl, 3-chlorfenyl, 2-methoxykarbonylfenyl, 2-karboxyfenyl, 2-methyl-4-chlorfenyl, 2-bromfenyl, 2-pyridyl, 2-methylenhydroxyfenyl, 4-fluorfenyl, 2-methyl-4-fluorfenyl, 2-chlor-4-fluorfenyl, 2,4-difluorfenyl, 2-hydroxy-4-fluorfenyl nebo 2-methylenhydroxy-4-fluorfenyl.

11. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde X je vybráno ze skupiny zahrnující -S-, -O-, -S(O₂)-, -S(O)-, -NR-, -C(R₂-) nebo -C(O)-.

12. Sloučenina podle nároku 10, kde X je S.

13. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde n je 1 a A je N.

16.06.99

14. Sloučenina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, kde každé Y je C.

15. Sloučenina podle nároku 14, kde každé R připojené k Y je nezávisle vybráno ze skupiny zahrnující atom vodíku nebo methylovou skupinu.

16. Sloučenina podle nároku 1, kde sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující kteroukoliv ze sloučenin 2 až 3 nebo 5 až 53, jak jsou uvedeny v tabulce 1.

17. Sloučenina podle nároku 2, kde sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující kteroukoliv ze sloučenin 101 až 145, jak jsou uvedeny v tabulce 2.

18. Sloučenina podle nároku 3, kde Q_3 je substituováno 2 až 4 substituenty, přičemž alespoň jeden z těchto substituentů je přítomen v poloze ortho vzhledem v místu připojení Q_3 na zbytek inhibitoru.

19. Sloučenina podle nároku 18, kde obě polohy ortho jsou obsazeny jedním z uvedených nezávisle vybraných substituentů.

20. Sloučenina podle nároku 19, kde Q_3 je monocyklický karbocyklický kruh a každý z uvedených orthosubstituentů na Q_3 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující atom halogenu nebo methylovou skupinu.

21. Sloučenina podle nároku 19, kde Q_3 obsahuje 1 až 2 substituenty kromě uvedených orthosubstituentů, přičemž tyto další substituenty jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující NR'_2 , OR' , CO_2R' , CN , $N(R')C(O)R^4$, $N(R')C(O)OR^4$, $N(R')C(O)C(O)R^4$, $N(R')S(O_2)R^4$, $N(R')R^4$, $N(R^4)_2$, OR^4 , $OC(O)R^4$, $OP(O)_3H_2$, nebo $N=C-N(R')_2$.

15.08.99

22. Sloučenina podle nároku 3, kde touto sloučeninou je sloučenina obecného vzorce Ie a je vybrána z jakékoliv sloučeniny 201 nebo 203 až 209, jak jsou uvedeny v tabulce 3.

23. Sloučenina podle nároku 3, kde touto sloučeninou je sloučenina obecného vzorce Ig a je vybrána z jakékoliv sloučeniny 202/301, 302 až 399 nebo 1301, jako jsou uvedeny v tabulce 4.

24. Sloučenina podle nároku 3, kde touto sloučeninou je sloučenina obecného vzorce Ih a je vybrána z jakékoliv sloučeniny 401 až 412, jak jsou uvedeny v tabulce 5.

25. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje množství sloučeniny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, které účinně inhibuje p38, a farmaceuticky přijatelný nosič.

26. Způsob ošetřování nebo prevence zánětlivých onemocnění, autoimunních onemocnění, destruktivních poruch kostí, proliferčních poruch, infekčních onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, alergií, reperfuse/ischemie při mrtvici, srdečních záchvatů, angiogenních poruch, hypoxie orgánů, vaskulární hyperplasie, srdeční hypertrofie, thrombinem vyvolané agregace destiček nebo stavů spojených s prostaglandinovou endoperixidasa syntasou-2 u pacientů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se těmto pacientům podává prostředek podle nároku 25.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá pro ošetřování nebo prevenci zánětlivých onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující akutní pankreatitidu, chronickou pankreatitidu, astma, alergie nebo syndrom respirační úzkosti u dospělých.

15.05.99

28. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci autoimunních onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující glomerulonefritidu, revmatickou arthritidu, systemický lupus erythematodes, sklerodermii, chronickou thyroditidu, Gravesovo onemocnění, autoimunní gastritidu, diabetes, autoimunní hemolytickou anemii, autoimunní neutropenii, thrombocytopenii, atopickou dermatitidu, chronickou aktivní hepatitidu, myastenii gravis, roztroušenou sklerosu, zánětlivé střevní onemocnění, vředovou kolitidu, Crohnovo onemocnění, psoriasis nebo onemocnění štěp versus hostitel.

29. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci destruktivních chorob kostí vybraných ze skupiny zahrnující osteoarthritis, osteoporosu nebo mnohočetný myelom spojený s kostmi.

30. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci proliferčních onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující akutní myelogenní leukemii, chronickou myelogenní leukemii, metastatický melanom, Kaposiho sarkom nebo mnohočetný myelom.

31. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci infekčních chorob vybraných ze skupiny zahrnující sepsi, septický šok nebo Shigellosu.

32. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci virových onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující akutní hepatitickou infekci, HIV infekci nebo CMV retinitidu.

15.06.99

33. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci neurodegenerativních chorob vybraných ze skupiny zahrnující Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, cerebrální ischemii nebo neurodegeneraticní poruchy způsobené traumatickým poraněním.

34. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci ischemie/reperfuse u mrtvice nebo myokardiální ischemie, renální ischemie, srdečních záchvatů, hypoxie orgánů nebo thrombinem vyvolané agregace destiček.

35. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci stavů spojených s prostaglandinovou endoperoxid syntasou-2 vybraných ze skupiny zahrnující otok, horečku, analgesii nebo bolest.

36. Způsob podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m , že touto bolestí je bolest vybraná ze skupiny zahrnující neuromuskulární bolest, bolest hlavy, bolest při rakovině, bolest zubů nebo bolest při arthritidě.

37. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tento způsob se používá k ošetřování nebo prevenci angiogeních onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující pevné nádory, oční neovaskulisaci nebo infantilní hemangiomy.