

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

306 434

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07D 473/00 (2006.01)
C07D 473/40 (2006.01)
C07D 473/02 (2006.01)
C07D 473/26 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 15/10 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-608**
(22) Přihlášeno: **26.10.2015**
(40) Zveřejněno: **18.01.2017**
(Věstník č. 3/2017)
(47) Uděleno: **07.12.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **18.01.2017**
(Věstník č. 3/2017)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2 844 576; US 2008/0119467 A1.

(73) Majitel patentu:

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,
Praha 6 - Lysolaje, CZ

(72) Původce:

Mgr. Jiří Voller, Ph.D., Brno - Bystrc, CZ
Mgr. Lenka Zahajská, Ph.D., Praha, CZ
Mgr. Lucie Plíhalová, Ph.D., Olomouc, CZ
Bc. Jana Komárková, Protivanov, CZ
Bc. David Burget, Olomouc - Nemilany, CZ
doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D., Olomouc, CZ
RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D., Šumperk, CZ
Mgr. Karel Doležal, Dr., DSc., Hlubočky, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
CZ
doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D., Praha 11, CZ
doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D., Praha 4, CZ
Andreea Csilla Pataki, Ph.D. MSc., Cluj-Napoca
400322, RO

(74) Zástupce:

INVENTIA s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:

**2,6-disubstituované puriny pro použití jako
léčiva, a farmaceutické přípravky**

(57) Anotace:

Předkládané řešení se týká 2,6-disubstitovaných purinů, způsobů jejich přípravy, farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu onemocnění, v jejichž patogenezi hraje klíčovou úlohu deregulace kináz z rodiny ROCK, JAK a JNK. Přípravky obsahující tyto sloučeniny je možné použít k léčbě nemocí plic, oka, střev, kůže a nervového systému, pro která je typická abnormální migrace buněk, zánět nebo fibróza.

CZ 306434 B6

2,6–disubstituované puriny pro použití jako léčiva, a farmaceutické přípravky

Oblast techniky

5

Tento vynález se týká 2,6–disubstitovaných purinů obecného vzorce I, způsobů jejich přípravy, farmaceutických přípravků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu onemocnění, v jejichž patogenezi hraje klíčovou úlohu deregulace kináz z rodiny ROCK, JAK a JNK. Přípravky obsahující tyto sloučeniny je možné použít zejména k léčení nemocí plic, oka, střev, kůže a nervového systému, pro která je typická abnormální migrace buněk, zánět nebo fibróza.

10

Dosavadní stav techniky

15

Rho – ROCK (Rho – associated, coiled – coil – containing protein kináze) dráha hraje klíčovou roli v organizaci aktinového cytoskeletu a tak reguluje řadu buněčných procesů včetně adheze, kontrakce, motility, proliferace a přežití (Amano, M. et al. 2010, Cytoskeleton Hoboken, N.J., 67(9), 545–54). Podílí se na hojení ran a metastazování nádorů. ROCK stabilizuje aktinový cytoskelet tím, že aktivuje LIM kinázy, které následně fosforylují kofilin. Fosforylace inhibuje jeho schopnost narušovat stabilitu aktinových vláken. Kontraktilita stresových vláken podobně jako kontraktilita aktino–myosinových vláken buněk hladké svaloviny závisí na fosforylaci lehkého řetězce myosinu (MLC). Ta je katalyzována kinázou lehkých řetězců myosinu (MLCK), zpětnou reakci působí příslušná fosfatáza. Rho kinázy inaktivují tuto fosfatázu fosforylací její podjednotky MYPT1 („myosin phosphatase – targeting subunit 1“) na threoninech v pozicích 696 a 853. ROCK2 (stejně jako MLCK) přímo fosforyluje MLC na serinu v pozici 19, což způsobí zvýšení ATPázové aktivity. Regulace MLC Rho kinázou hraje roli také při dělení buňky. ROCK se váže na aktinomyosinový komplex kontraktilního prstence. Kromě Rho ji aktivuje též mitotická kináza PLK1. Další substráty ROCK, které hrají roli v organizaci aktinového cytoskeletu, jsou ezrin/radixin/moesin (ERM), CPI–17, calponin, adducin. Efekt ROCK na proliferaci a na buněčnou polaritu je zprostředkován fosforylací PTEN (Phosphatase and tensin homology).

30

Deregulovaná aktivita ROCK se podílí na patogenezi řady onemocnění včetně nádorových onemocnění, nemocí oka, kardiovaskulárního, dýchacího a nervového systému. Ovlivnění Rho–ROCK signalizace má terapeutický efekt v onemocněních osteoporóze a fibrózách nejrůznější etiologie (Hollanders, K. et al. 2015, Invest Ophthal. Vis. Sci. (2), 1335–48). Přípravky působící tímto mechanismem jsou schváleny v Japonsku v terapii glaukomu (ripasudil) a cerebrálního vazospazmu při subarachnoidálním krvácení (fasudil). V klinickém hodnocení se testuje vliv na aterosklerózu a pulmonální hypertenzi. Farmakologická inhibice ROCK mj. reguluje přežití, aktivaci, kontrakci a migraci buněk. Schopnost ovlivnit kontrakci buněk hladkého svalstva vysvětluje pozitivní efekt na krevní tlak a na spasmus dýchacích cest při astmatu a chronické pulmonární obstrukční nemoci. Inhibice migrace v důsledku ovlivnění aktinového cytoskeletu se terapeuticky uplatňuje v rakovinách (inhibice neoangiogeneze a metastazování) fibrotických onemocněních různých systémů (systémové fibrózy typu sklerodermie, fibrózy např. jater, plic, ledvin) a etiologie (mj. idiopatická, chemoterapií a radioterapií indukovaná) ale i dalších nemocech, kde dochází k přestavbě tkáně, jako je astma a chronická obstrukční plicní nemoc. Kromě rakovin (včetně hepatocelulárního a plicního karcinomu, myelomu, melanomu, fibrósarkomu, karcinomu prsu, ledvin a prostaty) má inhibice ROCK dependentní přestavby aktinového cytoskeletu a následné migrace buněk pozitivních efekt i u dalších neovaskularizací jako je makulární degenerace. ROCK inhibice má také příznivý efekt v modelech myelomu, některých leukemií a myeloproliferativních onemocněních.

50

V řadě onemocnění (např. retinální degenerace, diabetická retinopatie, odchlípení sítnice, neurotrauma, chronická obstrukční plicní nemoc, zánětlivá onemocnění střev, lupus, psoriasis) k příznivému efektu ROCK inhibitorů přispívá schopnost ovlivnit několika mechanismy zánětlivou reakci včetně neuroinflammace (inhibice NfκB, suprese exprese prozánětlivých cytokinů, inhibice

55

migrace imunitních buněk, maturace imunitních buněk) a fibrotizaci tkáně (regulace diferenciací fibroblastových prekurzorů, regulace přežití myofibroblastů, regulace aktinového cytoskeletu migrujících fibroblastů a dalších buněk). ROCK kinázy se jeví jako bezpečný terapeutický cíl, přesto výhodné může být lokální podání, což je možné například u onemocnění kůže (korekce jizvení), oka (glaukom, makulární degenerace – zde je možné uvažovat o medikovaných inzer-tech), plic (astma, chronické pulmonární obstrukční nemoci.) a pooperační restenóze cév (medikované stenty). Také v případě onemocnění střev včetně těch s fibrotickou složkou (Crohnova nemoc, ulcerativní kolitida) je výhodné omezit působení léčiv na místní tkáň.

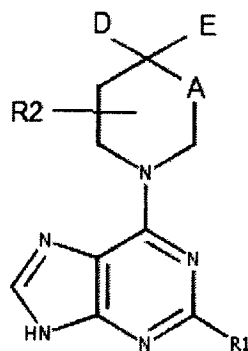
Janusovy kinázy (JAK1, JAK2, JAK3) přenáší signály širokého spektra extracelulárních cytokinů (hormony, interleukiny a interferony), které se vážou na cytokinové receptory typu I a II. Patří mezi ně proinflamatorní IL-6, IL-12, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22 a IL-23 spolu s interferony. Aktivované JAK kinázy pak fosforylují a aktivují transkripční faktory z STAT rodiny (signál transducers and activators of transcription). TNF signalizace je také zprostředkována JAK-STAT drahou za určitých podmínek. Inhibice JAK-STAT dráhy má příznivý efekt na imunitní onemocnění jako je rheumatoidní artritida, psoriatická artritida, ankylosující spondylitida, colitida, ulcerativní colitida, Crohnova nemoc, psoriáza, lupus erythematosus, záněty povrchu oka, syndrom suchého oka, uveitida a alergická reakce. Brání také odmítnutí transplantátu (Ghoreschi et Gadi-na, 2015 doi: 10.1111/exd.12265; O'Shea et al., 2013 10.1136/anerheumidis-2012-202576). Jednoznačnou výhodou nízkomolekulárních inhibitorů JAK ve srovnání s biologiky, která cílí na jednotlivé cytokiny nebo cytokinové receptory, je schopnost ovlivnit signalizaci řízenou několika cytokiny. Na rozdíl od protilátek také mohou být podávány perorálně. Lokální aplikace je ale také možná, s výhodou ji je možné použít např. u onemocnění oka, kůže a dýchacího traktu. Jako obzvláště zajímavá se jeví možnost využít JAK inhibici v terapii vitiliga a alopecia areata. Inhibice JAK také příznivě ovlivňuje fibrotická onemocnění včetně myelofibróz (jako je polycythemia vera, essentiální thrombocytosis a primární myelofibróza) a chemoterapií indukovaných fibróz. Probíhají klinické zkoušky testující JAK inhibitory v terapii nádorů žaludku, plic, pankreatu, jater, prsu, tlustého střeva, kolorekta a prostaty.

Zvýšená exprese nebo aktivita JNK kináz (c-JUN N-terminal kinázes) je spojována s neurologickými, srdečními, hepatobiliárními, dýchacími, fibrotickými, zánětlivými a autoimunitními onemocněními. JNK také hrají roli v patogenezi nádorových onemocnění. Nově bylo zjištěno, že dysregulace JNK hraje roli v proteinopatiích jako je amyotrofická laterální skleróza a frontotemporální demence. Zvýšená aktivita JNK kináz přispívá k patogenezi následujících onemocnění (Sabapatha et al., 2014 (doi: 10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4.), Reich et al., 2012 10.1136/anerheumidis-2011-200412, a Gehringer et al., (2015) (doi: 10.1517/13543776.2015-1039984): neurologická onemocnění (Alzheimerova nemoc, frontotemporální demence, Parkinsonova nemoc, polyglutaminová onemocnění, Pickova nemoc, demence různé etiologie, iktus, nemoc (demence) s argyrofilními zrny (AgD), amyotrofická laterální skleróza), kardiovaskulární onemocnění (srdeční selhání, aneurysma abdominální aorty), hepatobiliární onemocnění (chronická infekce HCV, akutní poškození jater, nealkoholická steatosa jater, fibróza jater), zánětlivá onemocnění (zánětlivé onemocnění střev, ulcerativní kolitida, Crohnova nemoc, astma, rheumatoidní artritida, lupus erythematosus, Behcetova nemoc, zánět po chirurgickém zákroku, uveitida, syndrom suchého oka), nádorová onemocnění (retinoblastom, nádory kolorekta, prsu a ovaria), metabolická onemocnění (obezita, diabetes 2. typu), fibrotická onemocnění (systémová fibróza (scleroderma), fibrózy jater, plic a kůže) různé etiologie včetně chemoterapií indukované fibrózy.

Podstata vynálezu

50

Předmětem tohoto vynálezu jsou 2,6-disubstituované puriny obecného vzorce I



(I)

ve kterém

5 **A** je vazba nebo $-Z-(CH_2)_m-$; **Z** je vybrán z S, O, NH, CH₂; **m** je celé číslo v rozmezí 0 až 8;

D a **E** dohromady tvoří cyklus a $-D-E-$ je $-X-(CH_2)_n-Y-$, kde **X** a **Y** jsou nezávisle vybrány z S, O, NH, CH₂, přičemž alespoň jeden z **X** a **Y** jsou S, O, nebo NH, a **n** je celé číslo v rozmezí 2 až 4, a přičemž ve skupině $-(CH_2)_n-$ může popřípadě alespoň jeden vodík být nahrazen substituentem vybraným z halogenu, OH, O(C1–C4)alkylu, hydroxy(C1–C4)alkylu, SH, S(C1–C4)alkylu, merkapto(C1–C4)alkylu, NH₂, NH(C1–C4)alkylu, N((C1–C4)alkyl)₂;

R1 je vybráno ze skupiny zahrnující

- halogen vybraný z F, Cl, Br, I;
- 15 – heterocykloalkyl, což znamená C3–C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;
- 20 – heterocykloalkyl alkyl, což znamená C3–C10 cykloalkyl skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, a která je vázána přes C1–C4 alkylenový můstek, s výhodou přes C2–C3 alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;

–**R'-G**

kde **G** je vybráno ze skupiny–NH– a –N(C1–C8 alkyl), a

30 **R'** je vybráno ze skupiny zahrnující

- C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy a amino substituent, s výhodou jedním hydroxy a/nebo jedním amino substituentem;
- (di)alkylamino)alkyl skupinu, kde alkyl je vybrán nezávisle ze skupiny zahrnující C1–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl;
- 35 – C3–C10 cykloalkyl, což znamená monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 10 uhlíkových atomů, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl a amino substituent;
- 40 – heterocykloalkyl, což znamená C3–C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž

heterocykloalkyl je popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;

– heterocykloalkyl alkyl, což znamená C3–C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, která je vázána přes C1–C4 alkylenový můstek, s výhodou přes C2–C3 alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkyl alkyl skupina je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;

– benzylová skupina, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující fluoro, chloro, hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl a amino substituent;

R2 může nebo nemusí být přítomen, a představuje jeden nebo více substituentů vázaných v libovolné poloze kruhu, nezávisle vybraných z =O, –OH, –C(O)–(CH₂)_p–O–(H nebo C1–C4 alkyl), kde p je celé číslo v rozmezí 0 až 4, aryl, arylalkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, –S(O)₂–aryl, –C(O)–aryl, –C(O)–heteroaryl, –C(O)–heterocyklyl, přičemž aryl, arylalkyl, heteroaryl, heterocyklyl mohou být substituované jedním nebo více substituenty vybranými z halogenu, OH, O(C1–C4)alkylu, hydroxy(C1–C4)alkylu, SH, S(C1–C4)alkylu, merkapto(C1–C4)alkylu, NH₂, NH(C1–C4)alkylu, N((C1–C4)alkyl)₂,

ve kterém

aryl je C6–C10 skupina obsahující alespoň jedno aromatické jádro, a s výhodou je arylem fenyl nebo naftyl;

arylalkyl je skupina obsahující C6–C10 skupinu obsahující alespoň jedno aromatické jádro a C1–C4 alkylen, a s výhodou je arylalkylem benzyl;

heteroaryl je C5–C10 skupina, kde alespoň jeden uhlík je nahrazen heteroatomem vybraným z O, S, N, a s výhodou je heteroaryl vybrán ze skupiny zahrnující furan, thiofen, pyrrol, pyrrolazol; heterocyklyl je C4–C10 skupina, kde alespoň jeden uhlík je nahrazen heteroatomem vybraným z O, S, N.

Vzorec I zahrnuje i farmaceuticky přijatelné soli látek nesoucích výše uvedené substituenty, zejména s alkalickými kovy, amoniakem či aminy, nebo jejich adiční soli s kyselinami.

S výhodou je alespoň jeden z X a Y vybrán z S, O, NH, výhodněji z S a O.

S výhodou je C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl vybrán ze skupiny zahrnující propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tert-butyl, pentyl, isopentyl, hexyl, heptyl, oktyl, a nonyl.

Ve výhodném provedení je C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný hydroxy skupinou vybrán ze skupiny zahrnující 2–hydroxyethyl, 2(RS, R nebo S)–hydroxypropyl, 3–hydroxypropyl, 4–hydroxybut–2(RS, R, nebo S)–yl, 2–hydroxy–2–methylpropyl, 3–hydroxy–3–methylbutyl, 2,3–dihydroxypropyl, 1–hydroxy–3–methylbut–2–yl a (3RS)–2–hydroxypent–3–yl.

Ve výhodném provedení je C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný amino skupinou vybrán ze skupiny zahrnující 2–aminoethyl, 3–aminopropyl, 4–aminobutyl, 5–aminopentyl, 6–aminohexyl.

V dalším výhodném provedení je C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl substituovaný amino a hydroxy skupinou 3–amino–2–hydroxypropyl.

S výhodou je (dialkylamino)alkyl skupina vybrána ze skupiny zahrnující (dimethylamino)methyl, 2–(dimethylamino)ethyl, 3–(dimethylamino)propyl, 3–(dimethylamino)butyl, (diethylamino)methyl, 2–(diethylamino)ethyl, 3–(diethylamino)propyl a 4–(diethylamino)butyl.

Ve výhodném provedení je C3–C10 cykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklohexyl a cyklohexyl.

5 Ve výhodném provedení je C3–C10 cykloalkyl substituovaný amino skupinou vybrán ze skupiny zahrnující *trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-4-aminocyklohexyl, *cis,trans*-4-aminocyklohexyl, *cis*-2-aminocyklohexyl, *trans*-2-aminocyklohexyl, *cis,trans*-2-aminocyklohexyl, 3-aminocyklohexyl a *cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl.

10 V dalším výhodném provedení je heterocykloalkyl vybrán ze skupiny zahrnující N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thio-morfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl.

15 Substituovaný benzyl je s výhodou vybrán ze skupiny zahrnující 2-methoxybenzyl, 3-methoxybenzyl, 4-methoxybenzyl, 3,5-dimethoxybenzyl, 2,6-dimethoxybenzyl, 2,4,6-trimethoxybenzyl, 3,4,5-trimethoxybenzyl, 2-fluorbenzyl, 3-fluorbenzyl, 4-fluorbenzyl, 2-chlorbenzyl, 3-chlorbenzyl a 4-chlorbenzyl.

20 Ve výhodném provedení je heterocykloalkyl alkyl vybrán ze skupiny zahrnující (aziridin-1-yl)ethyl, (azetidín-1-yl)ethyl, (azolidín-1-yl)ethyl, (piperidin-1-yl)ethyl, (aziridin-1-yl)propyl, (azetidín-1-yl)propyl, (azolidín-1-yl)propyl a (piperidin-1-yl)propyl.

25 V případě, že sloučeniny podle předloženého vynálezu mají chirální centrum, vynález zahrnuje všechny opticky aktivní isomery, jejich směsi i racemáty. Tedy sloučeniny obecného vzorce I, nezávisle na (R) nebo (S) konfiguraci na chirálních centrech, jsou zahrnuty v tomto vynálezu.

30 2,6-Disubstitované puriny obecného vzorce I jsou vhodné pro použití jako léčiva. Týká se to zejména jejich použití v terapii onemocnění, kde inhibice jedné nebo více kináz vybraných z kinázových rodin ROCK (ROCK1, ROCK2), JAK (JAK1, JAK2, JAK3) a JNK (JNK1, JNK2, JNK3) vede k terapeutickému efektu.

35 Současná inhibice alespoň dvou kináz z rodin ROCK, JNK a JAK je zejména vhodná pro uplatnění v terapii fibróz, zánětlivých a neurodegenerativních onemocnění i nádorových onemocnění. Příslušné signální dráhy hrají roli ve výše zmíněných onemocněních, přičemž jsou v podstatě nezávislé. Jejich současná farmakologická inhibice má synergický efekt. Látky podle předkládaného vynálezu, které inhibují alespoň dvě z těchto drah, je možné podávat v nižších koncentracích než lék inhibující jen dráhu jednu.

40 Látky podle předkládaného vynálezu jsou inhibitory kináz z rodin ROCK, JAK a/nebo JNK, a tedy jsou zejména vhodné pro léčbu chorob vybraných ze skupiny zahrnující choroby dýchacího systému, kardiovaskulárního systému, oka, střev, kůže a nervového systému, jejichž patologie zahrnuje abnormální migraci buněk, zánět nebo fibrózu, hepatobiliární onemocnění, zánětlivých onemocnění, neovaskularizací, neurodegenerativních a metastatických nádorových onemocnění, onemocněních ve kterých hraje role vazokonstrikce nebo bronchokonstrikce.

45 Konkrétněji jsou látky podle předkládaného vynálezu vhodné pro léčbu systémové fibrózy, fibróz jednotlivých orgánů, zejména jater, ledvin, plic a kůže, myelofibrózy, fibrózy po radio a chemoterapii, Crohnovy nemoci, kolitidy, ulcerativní kolitidy, Behcetovy nemoci, chronická obstrukční plicní nemoci, metastatického melanomu, zánětů po operačních výkonech, zánětu povrchu oka, uveitidy, retinitidy, makulární degenerace, syndromu suchého oka, alergické rinitis, alergického astmatu, astmatu bronchiale, sclerosis multiplex, systémové sklerózy, chronické infekce HCV, akutního poškození jater, nealkoholické steatohepatitis, rheumatoidní artritidy, psoriatické artritidy, ankylozní spondylitidy, psoriázy, lupus erythematosus, alopecia areata, vitiliga, cerebrálního vazospazmu, amyotrofické laterální sklerózy, frontotemporální demence, Alzheimerovy nemoci, Parkinsonovy nemoci, polyglutaminových onemocnění, Pickovy nemoci, demencí, iktu, nemoci s argyrofilními zrny (AgD), srdečního selhání, aneurysmatu abdominalní aorty, retinoblastomu,

55

nádorů kolorekta, prsu a ovaria, obezity, diabetu 2. typu, aterosklerózy, hypertenzní nemoci, pulmonární hypertenze, erektilní dysfunkce, restenózy po vaskulární nebo srdeční chirurgii, benigní neoplasií, neovaskulárního glaukomu, diabetické retinopatie, okulární neovaskularizace, diabetické nefropatie, hemorhagické teleangiektasie, prevenci rejekce transplantátu, korekci jizvení kůže.

Vynález také zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující 2,6-disubstitutedované puriny obecného vzorce I a farmaceuticky přijatelné nosiče.

Mimořádně výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou deriváty obecného vzorce I, které nesou substituent **R1** vybraný ze skupiny zahrnující: N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazinyl, (R)-(2-hydroxymethylpyrrolidine-1-yl), ethylamino, propylamino, butylamino, (2-hydroxyethyl)amino, (3-hydroxypropyl)amino, 2(R)-hydroxypropyl]amino, 2(S)-hydroxypropylamino, 4-hydroxybut-2(R)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(S)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(R,S)-yl]amino, 2-(hydroxy-2-methyl)propyl]amino, (2,3-dihydroxypropyl)amino, (1-hydroxy-3-methylbutyl)amino, [(R,S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(R)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, (R)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (S)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (2-aminoethyl)amino, (3-aminopropyl)amino, (4-aminobutyl)amino, (5-aminopentyl)amino, (6-aminohexyl)amino, [3-amino-2-hydroxypropyl]amino, [1-(dimethylamino)methyl]amino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino, [4-(dimethylamino)butyl]amino, [2-(diethylamino)ethyl]amino, [3-(diethylamino)propyl]amino, (aziridin-1-yl)ethylamino, (azolidin-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)ethylamino, (piperidin-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)propylamino, cyklopropylamino, cyklobutylamino, cyklopentylamino, cyklohexylamino, (*cis*-2-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (2-methoxybenzyl)amino, (3-methoxybenzyl)amino, (4-methoxybenzyl)amino, (3,5-dimethoxybenzyl)amino, (2,6-dimethoxybenzyl)amino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (2,4,6-trimethoxybenzyl)amino, (2-fluorbenzyl)amino, (3-fluorbenzyl)amino, (4-fluorbenzyl)amino, (2-chlorbenzyl)amino, (3-chlorbenzyl)amino, (4-chlorbenzyl)amino, (2,4-dichlorbenzyl)amino, (3,4,5-trichlorbenzyl)amino.

Farmaceutické kompozice

Vhodné cesty pro aplikaci systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutanní), bukální, sublingualní a nasální. Lokální podání je možné ve formě očních a ušních kapek a mastí, ve formě vaginálních přípravků a rektálních čípků. Pro terapii onemocnění skalpu a kůže jsou výhodou lékovou formou roztoky, krémy a masti. V případě onemocnění oka může být vhodnou formou podání intravitreální injekce nebo medikovaný inzert. V případě onemocnění plic pak inhalační lékové formy. Vhodnou formou prevence restenózy po cévní nebo srdeční chirurgii je medikovaný stent. V případě onemocnění gastrointestinálního traktu je výhodné perorální nebo rektální podání.

Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta, toxicitě sloučeniny a místě infekce, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Terapeutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti,

krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 do 1,0 g aktivní látky.

5 Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovadla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu. Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semi-syntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8–22, s výhodou pak 12–22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přísadkou antioxidantů, např. vitamínu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoseé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholózou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasyčených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

35 Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přísadkou dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulózové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenufosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát horečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a/nebo oxid

titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulózoých preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát horečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafínový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce. Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafínové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafínový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spaný), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a/nebo polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelínu nebo parafínový olej, a dále přírodní nebo sem i syntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricinový olej nebo olej z podzemnice olejně, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono-a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo staryl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalně a pevně vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafínový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethy-

lenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové étery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou
 5 obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

10 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

15 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

20 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolu, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

25 Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.
 30

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplo-
 35 krevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Objasnění výkresů

40 Obrázek 1 ukazuje vliv látek na fosforylaci MLC2 v liniích A375 (a), A2058 (b) a HT1080 (c). Intenzita signálu odpovídající MLC2 a pMLC2 (Thr18/Ser19) na membráně po SDS-PAGE a imunoblotu byla hodnocena denzitometricky.

45 Obrázek 2 ukazuje vliv látek na stav aktinového cytoskeletu a morfologii buněk BJ. Aktin byl vizualizován pomocí falloidinu značeného FITC. Zvětšení 10x. Kontrolní buňky (a), s látkou 30 (b).

Příklady uskutečnění vynálezu

50 Vynález je popsán pomocí následujících příkladů, které ovšem nijak neomezují jeho rozsah.

Teploty tání byly stanoveny na Kofflerově bloku a nebyly korigovány. Všechny reagenty byly ze standardních komerčních zdrojů a analytické čistoty. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na hliníkových destičkách se silikagelem F₂₅₄ od fy Merck. Skvrny byly vizualizovány

pod UV světlem (254 nm). Elementární analýzy (C, H, N) byly měřeny na EA1108 CHN analyzátoru (Thermo Finnigan). Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla prováděna na Beckman Gold systému. Vzorke jednotlivých látek byly pro HPLC analýzu rozpuštěny v methanolu a nastříknuty na kolonu LiChroCARD 250 x 4 mm s náplní Purospher RP-18e, 5 μm (Merck) a eluovány isokraticky mobilní fází sestávající z methanolu (HPLC grade) a AcOH/AcONH₄ pufru (pH = 3,4; 40 mM; s přídatkem 5 % (v/v) MeOH) ve vhodném poměru (v/v) při průtoku 0,5 ml/min, není-li uvedeno jinak. Eluované látky byly detekovány UV detektorem při 200 až 300 nm. NMR spektra (o ppm; J, Hz) byla měřena na přístroji Bruker Avance AV 300 při teplotě 300 K a frekvenci 300,13 MHz (1H), respektive 75,48 MHz (13C) nebo JEOL ECA-500 spektrometr pracující při frekvencích 500,16 MHz (¹H) a 125,76 MHz (¹³C) při 25 °C za použití tetramethylsilanu jako vnitřního standardu. Hmotnostní spektra byla měřena za použití přímého nástřiku na Waters Micromass ZMD 2000 hmotovém spektrometru (con voltage 20 V), ionizace elektrosprejem. Vzorke pro MS měření byly rozpuštěny v methanolu okyseleném kyselinou mravenčí (5 kapek HCOOH / 100 ml methanolu). Jako stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii sloužil silikagel PharmPrep 60 CC (40 až 63 μm) nebo silikagel Kieselgel 60 (zrnitost 230 až 400) (Merck). Všechny sloučeniny vykázaly uspokojivé elementární analýzy (< 0,4 %).

Příklad 1 Příprava 2-chlor-6-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purinu (18)

2,6-Dichlorpurin (206 mg; 1,1 mmol) byl rozpuštěn v 2-propanolu (3,0 ml), přidán triethylamin (0,23 ml; 1,6 mmol) a 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dekan (0,17 ml; 1,3 mmol). Roztok, který záhy přešel v suspenzi, byl zahříván 1,5 h při 65 °C. Po ochlazení bylo pH reakční směsi upraveno kyselinou octovou (10 kapek) na pH = 7. Suspenze byla uložena přes noc do lednice. Sraženina produktu byla odfiltrována, na fritě několikrát důkladně promyta 2-propanolem a destilovanou vodou a vysušena v exsikátoru s NaOH. Bílá sádrovitá látka. Výtěžek 280 mg; 87 %. T. t: 275 až 278°C. HPLC R_t = 16,9 min (60 % CH₃OH + 40 % pufr); UV (60 % CH₃OH + 40 % pufr) λ_{min} 238 nm, λ_{max} 278 nm. MS ESI+(CV 18) m/z (rel. %): 296 [M+H]⁺ (74), 298 [M+H]⁺ (27), 318 [M+Na]⁺ (100), 352 [M+Na]⁺ (38); ESI⁻ (CV 19) m/z (rel. %): 294 [M]⁻ (100), 296 [M]⁻ (31). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.70–1.72 (m, 4H); 3.93 (s, 4H); 4.24 (bs, 4H); 8.08 (s, 1H); 13.07 (bs, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 34.6, 42.8 (bs), 63.8, 106.2, 117.7, 138.7, 152.4, 152.6, 153.0.

Příklad 2 Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-6-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purinu (19)

2-Chlor-6-(1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purin (příklad 10) (143 mg; 0,49 mmol) byl rozpuštěn v ethanolaminu (1,5 ml). Roztok byl zahříván 25 h při 147 °C. Po ochlazení byla reakční směs vložena na týden do lednice. Z reakční směsi vykristaloval sádrovitý produkt. Produkt byl odfiltrován, na fritě několikrát důkladně promyt vychlazeným 2-propanolem (celkem 10 ml) a destilovanou vodou (celkem 10 ml) a vysušen v exsikátoru s P₂O₅. Bílá sádrovitá látka. Výtěžek 120 mg; 78 %. T. t: 246 až 248°C. HPLC R_t = 5,4 min (60 % CH₃OH + 40 % pufr), R_t = 6,9 min (50 % CH₃OH + 50 % pufr); UV (50 % CH₃OH + 50 % pufr) λ_{max} 238 nm, λ_{min} 251 nm, λ_{max} 255 nm, λ_{min} 273 nm, λ_{max} 291 nm. MS ESI+ (CV 18) m/z (rel. %): 321 [M+H]⁺ (100); ESI⁻ (CV 19) m/z (rel. %): 319 [M]⁻ (100). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.62–1.64 (m, 4H); 3.27 (q, *J* = 6.11 Hz, 2H); 3.49 (t, *J* = 6.11 Hz, 2H); 3.91 (s, 4H); 4.18 (bs, 4H); 4.63 (bs, 1H); 6.08 (bt, *J* = 5.81 Hz, 1H); 7.66 (s, 1H); 12.26 (bs, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 34.7, 42.4, 43.8, 60.3, 63.7, 106.6, 113.2, 134.6, 153.1, 153.7, 158.8.

Příklad 3 Příprava 2-chlor-6-(1,4-dithia-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purinu (28)

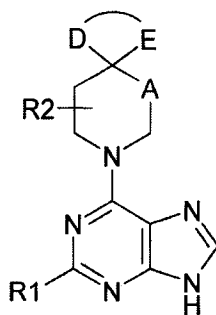
2-Chlor-6-(4-piperidon-1-yl)purin (8, příklad 9) (215 mg; 1,0 mmol) byl suspendován v toluenu (10,0 ml), přidán ethandithiol (0,11 ml; 1,3 mmol) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (198 mg; 1,0 mmol). Reakční směs byla zahřívána 3 h 40 min při 90 °C. Po ochlazení byla reakční směs vložena přes noc do lednice. Z reakční směsi vykristaloval sádrovitý produkt. Pro-

dukt byl odfiltrován, na fritě několikrát důkladně promyt vychlazeným toluenem (celkem 10,0 ml), 2-propanolem (celkem 2,5 ml) a destilovanou vodou (celkem 5 ml) a vysušen v exsikatoru s P₂O₅. Výtěžek surového produktu 207 mg; 63 %. Surový produkt byl krystalován z ethanolu. Bílý prášek. T. t.: 283 až 286°C (tání předchází sublimace, tání za rozkladu). HPLC R_t = 16,7 min (80 % CH₃OH + 20 % pufr); UV (80 % CH₃OH + 20 % pufr) λ_{min} 238 nm, λ_{max} 280 nm. MS ESI+ (CV 18) m/z (rel. %): 328 [M+H]⁺ (100), 330 [M+H]⁺ (48), 350 [M+Na]⁺ (97), 352 [M+Na]⁺ (46); ESI⁻ (CV 19) m/z (rel. %): 326 [M]⁻ (100), 328 [M]⁻ (42). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.09–2.12 (m, 4H); 3.34 (s, 4H); 4.24 (bs, 4H); 8.12 (s, 1H); 13.17 (bs, 1H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 37.9, 41.2, 44.6 (bs), 66.2, 117.7, 138.7, 152.3, 152.6, 153.0.

10 Příklad 4 Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-6-(1,4-dithia-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purinu (30)

2-Chlor-6-(1,4-dithia-8-azaspiro[4.5]dekan-8-yl)purin (28, příklad 12) (137 mg; 0,42 mmol) byl rozpuštěn v ethanolaminu (1,3 ml). Roztok byl zahříván 19 h při 149 °C. Po ochlazení byl produkt vysrážen z reakční směsi destilovanou vodou (10 ml). Suspenze byla vložena přes noc do lednice. Mlékovitá sraženina produktu byla odfiltrována, na fritě několikrát důkladně promyta destilovanou vodou (celkem 10 ml) a vysušena v exsikatoru s P₂O₅. Výtěžek surového produktu 134 mg; 91 %. Surový produkt byl krystalován z ethanolu. Bílá sádrovitá látka. T. t.: 222 až 224°C. HPLC R_t = 6,3 min (80 % CH₃OH + 20 % pufr), R_t = 8,5 min (70 % CH₃OH + 30 % pufr); UV (80 % CH₃OH + 20 % pufr) λ_{max} 239 nm, λ_{min} 272 nm, λ_{max} 294 nm. MS ESI+ (CV 18) m/z (rel. %): 353 [M+H]⁺ (100), 375 [M+Na]⁺ (15); ESI⁻ (CV 21) m/z (rel. %): 351 [M]⁻ (100). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.03–2.05 (m, 4H); 3.28 (q, J = 6.11 Hz, 2H); 3.33 (s, 4H); 3.49 (app. bt, 2H); 4.20 (bs, 4H); 4.62 (bs, 1H); 6.10 (bt, J = 5.81 Hz, 1H); 7.66 (s, 1H); 12.27 (bs, 1H); ¹³C NMR(125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 37.8, 41.4, 43.8, 44.3, 60.3, 66.7, 113.2, 134.7, 153.0, 153.7, 158.7.

Tabulka 1: Látky připravené podle metod popsanych v příkladech 1 až 13.



| Č. | R1 | A* | R2 | -D-E- | CHN ANALÝZA [%] vypočteno nalezeno | | | MS (ZMD)- ANALÝZY | |
|----|------------------------------|--------------------|----|--|--|-------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | | | C | H | N | [M-H] ⁻ a) | [M+H] ⁺ b) |
| 18 | Cl | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 48,74 48,7 | 4,77 4,8 | 23,68 23,5 | 294 | 296 |
| 19 | 2-hydroxyethylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 52,49 52,6 | 6,29 6,0 | 26,23 26,0 | 319 | 321 |
| 20 | 3-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 53,88 54,0 | 6,63 6,9 | 25,13 25,5 | 333 | 335 |
| 21 | (R/S)-4-hydroxybut-2-ylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 55,16 54,8 | 6,94 6,8 | 24,12 23,8 | 347 | 349 |
| 22 | 4-hydroxypiperidin-1-yl | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 56,65 56,8 | 6,71 6,5 | 23,32 23,1 | 359 | 361 |
| 23 | Cl | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 46,23 46,5 | 4,53 4,5 | 22,46 22,1 | 310 | 312 |
| 24 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 52,48 52,6 | 6,29 6,3 | 26,23 26,5 | 319 | 321 |
| 25 | (S)-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 51,41 51,2 | 6,33 6,0 | 23,98 24,0 | 349 | 351 |
| 26 | 3-amino-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 49,30 49,0 | 6,34 6,5 | 26,83 27,0 | 364 | 366 |

| Č. | R1 | A* | R2 | -D-E- | CHN ANALÝZA [%] vypočteno nalezeno | | | MS (ZMD)- ANALÝZY | |
|-----|--|--------------------|----|---|---|-------------|---------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | | | | C | H | N | [M-H] ⁺ _{a)} | [M+H] ⁺ _{b)} |
| 27 | 4-aminocyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 55,50 55,7 | 6,99 7,0 | 25,17 24,8 | 388 | 390 |
| 28 | Cl | -CH ₂ - | II | -S(CH ₂) ₂ S- | 43,96 44,1 | 4,30 4,4 | 21,36 21,0 | 326 | 328 |
| 29 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S | 49,97 50,2 | 5,99 6,1 | 24,98 25,1 | 335 | 337 |
| 30 | 2-hydroxyethylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S | 47,71 47,7 | 5,72 5,7 | 23,84 23,7 | 351 | 353 |
| 31 | 3-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S | 49,16 48,9 | 6,05 6,0 | 22,93 23,1 | 365 | 367 |
| 32 | (S)-4-hydroxybut-2-ylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S | 50,50 50,8 | 6,36 6,5 | 22,08 22,1 | 379 | 381 |
| 33 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ - | H | NH(CH ₂) ₂ S - | 52,64 53,0 | 6,63 7,0 | 30,69 31,0 | 318 | 320 |
| 34 | (R)-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | NH(CH ₂) ₂ S - | 51,56 51,6 | 6,63 6,9 | 28,06 28,2 | 348 | 350 |
| 35 | (R/S)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ - | H | NH(CH ₂) ₂ S - | 54,09 54,3 | 7,21 7,1 | 25,97 25,8 | 376 | 378 |
| 36 | Cl | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 50,41 50,2 | 5,21 5,3 | 22,61 22,7 | 308 | 310 |
| 37 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 56,59 56,9 | 6,97 6,5 | 26,4 26,0 | 317 | 319 |
| 38 | 2-aminocyklohexylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 58,90 59,0 | 7,54 7,5 | 25,30 25,4 | 386 | 388 |
| 39 | Cl | -CH ₂ - | H | -O-CH ₂ - CHOH- CH ₂ O- | 47,93 48,3 | 4,95 5,1 | 21,50 21,7 | 324 | 326 |
| 40 | 2-hydroxyethylamino | -CH ₂ - | H | -O-CH ₂ - CHOH- CH ₂ O- | 51,42 51,8 | 6,33 6,0 | 23,99 24,4 | 349 | 351 |
| 41 | 3-aminopropylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₃ S- | 52,73 52,7 | 6,64 6,5 | 23,06 23,1 | 365 | 367 |
| °42 | (R)-1-(hydroxymethyl)propylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₃ S- | 53,95 54,3 | 6,92 7,0 | 22,20 22,4 | 377 | 376 |
| 43 | <i>cis,trans</i> -3-aminocyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₃ S- | 56,55 56,3 | 7,24 7,5 | 24,30 24,6 | 402 | 404 |
| 44 | (R/S)-4-hydroxybut-2-ylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ S- | 51,75 51,9 | 6,64 6,5 | 21,30 21,3 | 393 | 395 |
| 45 | (R/S)-1-(hydroxymethyl)propylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ S- | 50,50 50,8 | 6,36 6,3 | 22,08 22,2 | 379 | 381 |
| 46 | <i>cis</i> -4-hydroxycyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ S- | 54,26 54,6 | 6,71 6,5 | 19,98 19,5 | 419 | 421 |
| 47 | <i>trans</i> -2-hydroxycyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ N- | 56,55 56,5 | 7,24 7,3 | 24,30 24,4 | 402 | 404 |
| 48 | <i>trans</i> -3-hydroxycyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ N- | 56,55 57,0 | 7,24 7,5 | 24,30 24,0 | 402 | 404 |
| 49 | <i>trans</i> -4-hydroxycyklohexylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ N- | 56,55 56,6 | 7,24 7,3 | 24,30 24,7 | 402 | 404 |
| 50 | (S)-4-hydroxybut-2-ylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₄ O- | 57,34 57,0 | 7,50 7,1 | 22,32 22,5 | 375 | 377 |
| 51 | 3-amino-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₄ O- | 54,10 54,3 | 7,21 7,1 | 25,98 26,0 | 376 | 378 |
| 52 | 2-hydroxy-2-methylpropylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 55,08 54,7 | 7,19 7,5 | 21,41 21,8 | 391 | 393 |
| 53 | 3-hydroxy-3-methylbutylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 56,13 56,5 | 7,44 7,3 | 20,67 20,8 | 405 | 407 |
| 54 | 2-aminoethylamino | -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 52,73 52,7 | 6,64 6,6 | 23,06 22,7 | 363 | 365 |
| 55 | morfolin-4-yl | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 53,18 53,2 | 6,45 6,4 | 20,67 20,5 | 405 | 407 |
| 56 | 3-aminopropylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 51,88 52,0 | 6,91 6,9 | 24,91 25,0 | 392 | 394 |
| 57 | 4-aminobutylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 53,04 | 7,17 | 24,05 | 406 | 408 |

| Č. | R1 | A* | R2 | -D-E- | CHN ANALÝZA [%] vypočteno nalezeno | | | MS (ZMD)- ANALÝZY | |
|-----|--|-------------------------------------|----|---|---|-------------|---------------|----------------------|---------------------|
| | | | | | C | H | N | [M-H] ^{a)} | [M+H] ^{b)} |
| | | | | | 53,3 | 7,0 | 23,7 | | |
| 58 | 2-aminoethylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ N- | 53,01 53,2 | 7,23 7,4 | 30,91 31,0 | 361 | 363 |
| 59 | 1-(dimethylamino)methylamino | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ N- | 54,23 45,0 | 7,50 7,8 | 29,76 30,0 | 375 | 377 |
| 60 | 4-hydroxypiperidin-1-yl | -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ N- | 56,55 56,8 | 7,24 7,5 | 24,30 24,1 | 402 | 404 |
| 85 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 56,59 57,0 | 6,97 6,6 | 26,40 26,6 | 317 | 319 |
| 86 | 2-hydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 55,16 54,8 | 6,94 6,9 | 24,12 24,0 | 347 | 349 |
| 87 | <i>N,N</i> -dimethylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 53,87 53,5 | 6,63 6,5 | 25,13 25,5 | 333 | 335 |
| 88 | 2-(<i>N,N</i> -dimethylamino)ethylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 54,09 54,3 | 7,21 7,3 | 25,97 26,1 | 376 | 378 |
| 89 | Cl | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 45,67 45,7 | 4,72 4,5 | 20,48 20,4 | 340 | 342 |
| 90 | 4-aminobutylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 51,88 52,0 | 6,91 6,7 | 24,91 24,5 | 392 | 394 |
| 91 | 1-hydroxybut-2-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 51,75 51,5 | 6,64 6,7 | 21,30 21,5 | 393 | 395 |
| 92 | 6-aminohexylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - NH(CH ₂) ₂ S- | 56,41 56,0 | 7,97 8,1 | 27,70 27,9 | 403 | 405 |
| 93 | 2-hydroxy-2-methylpropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - NH(CH ₂) ₂ S- | 54,09 54,3 | 7,21 7,0 | 25,97 25,7 | 376 | 378 |
| 94 | 2-hydroxy-2-methylpropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 57,43 57,8 | 7,50 7,8 | 22,32 22,4 | 375 | 377 |
| 95 | 3-hydroxy-3-butylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | - O(CH ₂) ₂ O- | 57,43 57,1 | 7,50 7,4 | 22,32 22,6 | 375 | 377 |
| 96 | 2,3-dihydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 51,76 51,5 | 6,64 6,6 | 21,30 21,6 | 393 | 395 |
| 97 | 1-hydroxy-3-methylbut-2-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₂ S- | 56,13 56,0 | 7,44 7,3 | 20,67 20,5 | 405 | 407 |
| 98 | (<i>R/S</i>)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 54,00 53,7 | 7,16 7,0 | 19,89 19,7 | 421 | 423 |
| 99 | (<i>R</i>)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 54,00 53,8 | 7,16 7,1 | 19,89 19,8 | 421 | 423 |
| 100 | (<i>S</i>)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₂ S- | 54,00 53,6 | 7,16 7,2 | 19,89 19,7 | 421 | 423 |
| 101 | 2-hydroxyethylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ N- | 52,87 52,5 | 6,93 7,0 | 26,97 27,2 | 362 | 364 |
| 102 | (<i>R/S</i>)-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₃ N- | 54,09 54,4 | 7,21 7,5 | 25,97 26,3 | 376 | 378 |
| 103 | (<i>R</i>)-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 55,08 55,4 | 7,19 7,1 | 21,41 21,1 | 391 | 393 |
| 104 | (<i>S</i>)-2-hydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 55,08 54,8 | 7,19 7,4 | 21,41 21,3 | 391 | 393 |
| 105 | 2,3-dihydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -O(CH ₂) ₄ S- | 52,92 52,7 | 6,91 6,8 | 20,57 20,4 | 407 | 409 |
| 106 | 3-hydroxy-3-methylbutylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 55,02 55,0 | 7,39 7,3 | 19,25 19,2 | 435 | 437 |
| 107 | 2,3-dihydroxypropylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 50,92 51,3 | 6,65 6,8 | 19,79 20,0 | 423 | 425 |
| 108 | 1-hydroxy-3-methylbut-2-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ S- | 55,27 55,4 | 6,96 6,8 | 19,34 19,2 | 433 | 435 |
| 109 | (<i>R/S</i>)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ N- | 57,25 57,5 | 7,93 8,2 | 23,27 23,2 | 418 | 420 |
| 110 | (<i>R</i>)-2-hydroxypent-3-ylamino | -CH ₂ -CH ₂ - | H | -S(CH ₂) ₄ N- | 55,22 55,5 | 7,47 7,7 | 25,04 25,1 | 390 | 392 |

* pokud má fragment A více členů, je první uvedený atom ve struktuře umístěn blíže atomu dusíku vázanému na purin

a) roztok: MeOH p.a. + HCOOH

b) roztok: MeOH p.a. + H₂O + NH₃

Příklad 5 Hodnocení inhibice ROCK kinázy *in vitro*

5

Schopnost látek inhibovat rekombinantní ROCK2 byla hodnocena v testu založeném na sledování inhibice inkorporace ³³P pocházejícího z ATP do oligopeptidu LRRWSLG odpovídajícímu části peptidové sekvence rozpoznávané ROCK2. Do jednotlivých jamek 96 jamkové desky bylo přidáno 2 μl 5–krát koncentrované testované látky, 1 μl roztoku rekombinantního enzymu (Prokinase), 1 μl roztoku substrátu peptidu LRRWSLG a 1 μl vody. Reakce byla nastartována přidáním 5 μl reakčního pufru obsahujícího [γ-³³P]ATP. Deska byla inkubována 50 minut v termobloku nastaveném na 37 °C. Poté byla reakce zastavena přidáním 5 μl 3% kyseliny orthofosforečné. 5 μl reakční směsi z každé jamky bylo přeneseno na fosfocelulózový papír, který byl poté opláchnut 96% etanolem a uzavřen do kazety AE-PR-2025 s citlivou deskou. Ta byla po 16 hodinách skenována v přístroji Image Reader Bas-1800 softwarem BAS-1800. Intenzita signálu byla odečtena v programu Aida Image Analyzer. Hodnoty IC₅₀ byly vypočteny z dávkových křivek pro 10 koncentrací inhibitoru. Maximální testovaná koncentrace byla obvykle 10 nebo 50 μmol/litr, následující koncentrace byla poloviční oproti koncentraci předchozí. Experiment byl opakován alespoň 3 krát.

15

Složení pufrů bylo následující:

Reakční pufr (2x): 1 ml 2x kinázového pufru + 30 μl 1 mM ATP + 0,5 [γ-³³P]ATP

20

Kinázový pufr (2x) (20 ml): 4 ml 0,5 mol/l Hepes pH 7,4 + 0,2 ml 2 mol/l MgCl₂ + 0,4 ml 0,25 mol/l EGTA + 0,8 ml 0,5 mol/l glycerol 2–fosfát + 0,2 ml 0,2 mol/l NaF; úprava na pH 7,4; doplnění přesně na objem 20 ml H₂O

25

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. Z výsledků je patrné, že testované látky efektivně inhibují ROCK2 kinázu *in vitro*.

30

Tabulka 2: Hodnocení inhibice ROCK kinázy *in vitro*. Hodnoty jsou uvedeny v μmol/l

| látka | IC ₅₀ | SD |
|-------|------------------|------|
| 30 | 1,54 | 0,37 |
| 19 | 18,94 | 3,45 |

35

Příklad 6 Hodnocení inhibice kináz *in vitro*

40

K určení zbytkové aktivity po aplikaci 50 mikromolárního roztoku látky v DMSO byl použit systém KinomeScan (Discoverx). Rekombinantní kinázy značené DNA jsou vázané na imobilizovaný ligand. Pokud testovaná látka naruší tuto vazbu, dojde k uvolnění kinázy. Její množství v eluátu je pak stanoveno pomocí RT-PCR. Každý experiment byl proveden v duplikátu. Výsledky shrnuje tab. 3. Testované látky významně inhibují kinázy z ROCK, JNK a JAK rodin (tučně), přičemž schopnost inhibovat dalších 52 kináz reprezentujících lidský kinom je podstatně nižší.

Tabulka 3: Hodnocení inhibice ROCK, JNK, JAK a dalších kináz *in vitro*.

| kinasa | Látka 30 % residuální aktivity |
|------------------------|-----------------------------------|
| JAK3 | 0 |
| JNK1 | 0.1 |
| ROCK2 | 0.1 |
| JNK3 | 0.4 |
| JNK2 | 1.4 |
| JAK2 | 1 |
| KIT | 40 |
| SRPK3 | 24 |
| PDGFRA | 25 |
| ALK | 24 |
| ABL1-phosphorylated | 26 |
| ABL1-nonphosphorylated | 28 |
| TRKA | 31 |
| PIK3CG | 21 |
| VEGFR2 | 23 |
| MEK1 | 42 |
| CTK | 25 |
| MEK2 | 39 |
| PLK4 | 43 |
| CSNK1G2 | 35 |
| ERK1 | 25 |
| ERBB2 | 63 |
| PLK1 | 33 |
| PIK3C2B | 20 |
| PAK4 | 35 |
| BRAF(V600E) | 32 |
| PLK3 | 44 |
| ZAP70 | 63 |
| PIM1 | 40 |
| FGFR3 | 23 |
| PIM3 | 31 |
| PDPK1 | 29 |
| MKNK1 | 45 |
| GSK3B | 51 |
| PHKG1 | 45 |
| LKB1 | 82 |
| FAK | 44 |
| p38-alpha | 66 |
| p38-beta | 91 |

| kinasa | Látka 30 % residuální aktivity |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| RPS6KA5(Kin.Dom.2-C-terminal) | 23 |
| PIM2 | 86 |
| PAK2 | 46 |
| EGFR | 34 |
| TIE2 | 38 |
| PIK3CA | 60 |
| MAP3K4 | 36 |
| ACVR1B | 100 |
| AKT2 | 84 |
| PKAC-beta | 62 |
| YANK3 | 85 |
| MAPKAPK2 | 99 |
| PAK1 | 70 |
| SRC | 71 |
| EPHA2 | 80 |
| PKAC-alpha | 87 |
| AKT1 | 100 |
| IGF1R | 100 |
| RAF1 | 100 |
| TGFBR1 | 100 |

Příklad 7 Hodnocení toxicity

5

Resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) je modrá slabě fluorescentní látka, která je mitochondriemi ireverzibilně redukována na červený vysoce fluorescentní resofurin. Používá se proto k hodnocení viability bakteriálních i eukaryotických buněk. V testu byl sledován vliv 72 hodinového působení několika koncentrací látek (trojnásobná ředící řada, maximální koncentrace = 50 mikrom) na viabilitu kožních fibroblastů BJ, keratinocytů HaCaT a buněk sítnice ARPE-19. 5000 buněk bylo vyseto do jednotlivých jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky 24 hodin před přidáním testovaných látek. Jako negativní kontrola bylo použito DMSO vehiculum. Po 72 hodinovém působení byl přidán roztok 1000x koncentrovaný roztok resazurin v DMSO do konečné koncentrace 100 microM. Fluorescence byla měřena po 1 hodinové (ARPE-19) případně 3 hodinové (HaCaT a BJ) inkubaci. Hodnoty IC50 byly vypočteny z dávkových křivek pomocí programu v jazyce R využívajícího knihovnu drc. Výsledky ukazuje tabulka 4. Látky v testovaném koncentračním rozmezí nevykazují významnou toxicitu proti nenádorovým buňkám kůže a oka.

15

Tabulka 4: Hodnocení toxicity na buněčných liniích. Hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny v µmol/l.

| látka | BJ | Linie | |
|-------|------|---------|-------|
| | | ARPE-19 | HaCaT |
| 19 | >100 | >100 | >100 |
| 30 | >100 | >100 | >100 |

5

Příklad 8 Hodnocení inhibice ROCK kináz v buňkách

Jedním z cílů ROCK kináz v buňce je MLC2. MLC2 fosforylovaná na Thr18 a Ser19 reguluje stav aktinového cytoskeletu a v důsledku toho i tvar a pohyb buněk. Sledování vlivu látek na fosforylaci MLC2 pomocí imunodetekce po SDS-PAGE a westernovém přenosu bylo použito k průkazu jejich schopnosti dosáhnout efektivní koncentrace v buňkách. Jako pozitivní kontrola byly použity známé inhibitory ROCK kináz Y-27632 a fasudil. Použity byly linie A375m2, A2058, HT1080. Linie byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, D6429) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Sigma, F7524) ve standardním inkubačním prostředí (37 °C, 5% CO₂, absolutní vlhkost vzduchu). Buňky po 24 hodinovém působení látek (10 mikromol) byly zlyzovány v ledovém lyzačním pufru (1% Triton X-100 v Tris pufru s obsahem inhibitorů proteas /Serva, 20384.07/ a fosfatas/Serva, 39055.01/). Buněčné lyzáty byly rozděleny pomocí 10% SDS-PAGE, přeneseny na nitrocelulózovou membránu (AmershamTM ProtonTM 0,45µm NC nitrocellulose blotting membranes od GE Healthcare Life science, 10600002) pomocí imunoblotingu. Aby se předešlo nespecifické vazbě protilátek, membrány byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě v Tris pufru obsahujícím 4 % bovinního sérového albuminu (BSA) (Sigma, A7030) a 1% odtučněného sušeného mléka. Poté byly membrány inkubovány přes noc při 4 °C s primární protilátkou (MLC2 Cell Signaling – katalog, číslo 3672 nebo pMLC2 Thr18/Ser19 Cell Signaling katalog, číslo 3674) v TTBS (1% roztok BSA v Tris pufru s obsahem 0.1 % Tween20). Po inkubaci byly membrány důkladně opláchnuty v TTBS a inkubovány 1 h za pokojové teploty se sekundární protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidasou. (rabbit anti-mouse antibody od Abcam, ab97046 nebo goat anti-rabbit antibody od Santa Cruz Biotechnology, sc-2030). Po důkladném oplachu TTBS byla provedena detekce pomocí substrátu s obsahem luminolu. Detekce signálu byla provedena pomocí přístroje LAS-1000 Single System (Fujifilm, Tokyo, Japan)– Denzitometrická kvantifikace intenzity signálu byla provedena v programu ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Výsledky jsou zobrazeny na obr. 1. Experimenty prokázaly, že testované látky dosahují v živých buňkách koncentrací schopných inhibovat ROCK kinázy.

35

Příklad 9 Vliv na stav aktinového cytoskeletu a morfologii fibroblastů

Společným rysem fibrotických onemocnění je reorganizace aktinového cytoskeletu zúčastněných buněk včetně fibroblastů podmíněná aktivací ROCK kináz. Látky inhibující přestavbu aktinového cytoskeletu včetně ROCK inhibitorů mají terapeutických efekt v modelech fibrotických onemocnění. Ke sledování schopnosti látek ovlivnit stav aktinového cytoskeletu byly vybrány fibroblasty BJ. Linie byla kultivována v Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, D6429) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Sigma, F7524) ve standardním inkubačním prostředí (37 °C, 5% CO₂, absolutní vlhkost vzduchu). Efekt látek (100 µmol/l) na cytoskelet BJ, které byly vyseity v nízké koncentraci (3000 buněk na jamku 96-jamkové destičky, otrava 24 hodin po nasazení) byl hodnocen po 24 hodinách po obarvení aktinu TRITC-faloidninem ve fluorescenčním mikroskopu. Výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 2a, 2b. Testované látky ovlivňují stav aktinového cytoskeletu a morfologii fibroblastů mají proto potenciál ovlivnit fibrotická onemocnění.

Příklad 10 Hodnocení vlivu na ROCK na migraci a invazivitu buněk

Schopnost vybraných inhibitorů (3625, 4686) ovlivňovat invazivitu buněk byla hodnocena v testu založeném na sledování schopnosti buněk pronikat do kolagenní matrix. Z počtu buněk v jednotlivých vrstvách (hloubkách ostroži) byl po 72 hodinách vypočten index invazivity. Použity byly buňky A375m2 a A2058 (melanom), které se používají jako model ROCK dependentní migrace, a linie HT1080, která migruje ROCK nezávislým způsobem. Jako srovnávací látka byl použit klinicky používaný ROCK inhibitor fasudil. Jako kontrola sloužilo DMSO vehikulum.

Linie byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, D6429) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Sigma, F7524) ve standardním inkubačním prostředí (37 °C, 5% CO₂, absolutní vlhkost vzduchu). Testování invazivity bylo provedeno v Ibidi 15μ–Slide Angiogenesis plates (ibidi, 81506), kdy do každé komůrky bylo nanášeno v 10 μl krysího kolagenu (1mg/ml) obsahujícího testované látky (10 μmol/l), fasudil (10 μmol/l) nebo DMSO vehikulum. Na zatuhlý kolagen bylo vyseto 1000 buněk 50μl kultivačního média obsahujícího testované látky (10 μmol/l). Po 8 hodinách bylo toto médium nahrazeno za médium bez séra obsahující stejnou koncentraci testovaných látek. Po 72 hodinách po vysazení byly buňky vyfotografovány v různých hloubkách kolagenního gelu (0, 10, 20, 30, 40, 50 μm) pomocí Nikon–Eclipse TE2000–S (20x/0.40 HMC objektiv). V každém ze tří nezávislých opakování experimentu byly pro jednotlivé látky i kontrolu hodnoceny 3 jamky a pro každou jamku 6 náhodně vybraných nepřekrývajících se zorných polí. Index invazivity byl vypočten podle následujícího vzorce: $\text{sum}(\text{počet buněk v jednotlivých vrstvách} * \text{číslo vrstvy}) / \text{celkový počet buněk}$ a normalizován vzhledem ke kontrole. Statistická významnost ($p < 0.05$) byla vyhodnocena pomocí ANOVA a Tukeyho testu v R. Nové inhibitory a srovnávací látka fasudil v koncentraci 10 μmol/l statisticky významně snižovaly schopnost migrovat a invadovat oproti kontrole v případě améboidních linií A375m2 a A2058. Aktivita nových látek a komerčního inhibitorů byla srovnatelná. Efekt na migraci nebyl pozorován v případě mezenchymální linie HT1080. Pozorovaný efekt na linie améboidní, ale ne na mezenchymální linii je v souladu s inhibicí ROCK kináz v buňkách (tabulka 5, 6, 7). Látky ovlivňují ROCK dependentní migraci buněk, mohou proto najít uplatnění v onemocněních, kde patologická migrace přispívá k patogenezi, jako jsou metastatická nádorová onemocnění včetně melanomu, neovaskularizace, restenózy po cévní či srdeční chirurgii, fibrózy a další nemoci, kde dochází k přestavbě tkáně (astma, chronická obstrukční plicní nemoc).

35 Tabulka 5: Hodnocení invazivity pro linii A375m2

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 30 | 2,94 | 0,36 | 0,14 | 10 μmol/l |
| Fasudil | 4,36 | 0,53 | 1,16 | 10 μmol/l |
| Kontrola | 8,26 | 1 | 0,72 | 0 μmol/l |

40 Tabulka 6: Hodnocení invazivity pro linii A2058

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 30 | 9,62 | 0,50 | 1,35 | 10 μmol/l |
| Fasudil | 7,04 | 0,37 | 0,63 | 10 μmol/l |
| Kontrola | 19,14 | 1 | 7,57 | 0 μmol/l |

Tabulka 7: Hodnocení invazivity pro linii HT1080

| | index invazivity | poměr ke kontrole | s.d. | koncentrace inhibitoru |
|----------|------------------|-------------------|------|------------------------|
| 30 | 8,68 | 1,17 | 0,61 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Fasudil | 7,62 | 1,02 | 0,67 | 10 $\mu\text{mol/l}$ |
| Kontrola | 7,44 | 1 | 1,08 | 0 $\mu\text{mol/l}$ |

5

Příklad 11 Hodnocení vlivu na morfologii buněk v kolagenní matrix

Buňky melanomu A375m2 a A2058 se v 3D–kolagenní matrix pohybují améboidním pohybem závislým na aktivitě ROCK kinázy. Inhibice ROCK kinázy vede ke ztrátě améboidního pohybu, buňky přecházejí na epiteliální morfologii. Experiment sledující vliv nových látek, klinicky používaného ROCK inhibitoru fasudilu a DMSO vehikula na morfologii výše uvedených buněk v kolagenu byl proveden ve 48 jamkových panelech (Biofil, 011048). Linie byly kultivovány v Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, D6429) obsahujícím 10% fetální bovinní sérum (Sigma, F7524) ve standardním inkubačním prostředí (37 °C, 5% CO₂, absolutní vlhkost vzduchu).

Následující hodnoty odpovídají výpočtu potřebného materiálu na jednu jamku panelu: 10⁴–1,5x10⁴ buněk v celkovém objemu 25 mikrolitrů média bylo smícháno s 225 mikrolitry roztoku krysího kolagenu (18 % 5x DMEM; 23,26 % voda; 5 % 7,5% NaHCO₃; 4,24 % 200mM NaOH; 2 % 750mM HEPES; 37,5% 4% krysí kolagen). K buněčné suspenzi byly přidány testované látky (10 $\mu\text{mol/l}$) nebo DMSO vehikulum. Po zatuhnutí kolagenní suspenze bylo do jamek panelu přidáno 500 μl kultivačního média s testovanými látkami (10 $\mu\text{mol/l}$) případně DMSO vehikulem. Morfologické změny byly hodnoceny po 24 h. Za mezenchymální, byly považovány buňky, jejichž délka byla minimálně dvakrát větší než jejich šířka. Výsledky shrnují tabulky 8 až 11. Působení testovaných inhibitorů mění fenotyp buněk z améboidního na epiteliální. Améboidní fenotyp je závislý na aktivitě ROCK a ROCK–dependentní přestavbě aktinového cytoskeletu. Testované látky tedy ovlivňují aktivitu ROCK a stav aktinového cytoskeletu v buňkách.

30 Tabulka 8: Linie A375m2, vliv látek na podíl morfologických typů

| Inhibitor | mezenchymální [%] | améboidní [%] | přechodná [%] |
|-----------|-------------------|---------------|---------------|
| 30 | 69,57 | 24,87 | 5,56 |
| fasudil | 55,14 | 34,32 | 10,54 |
| Y-73632 | 65,45 | 25,31 | 9,24 |
| kontrola | 9,43 | 87,74 | 2,83 |

35 Tabulka 9: Linie A2058, experiment 1, vliv látek na podíl morfologických typů

| Inhibitor | mezenchymální [%] | améboidní [%] | přechodná [%] |
|-----------|-------------------|---------------|---------------|
| 30 | 66,06 | 28,51 | 5,50 |
| fasudil | 53,35 | 42,33 | 4,32 |
| Y-73632 | 78,01 | 18,63 | 3,36 |

Tabulka 10: Linie A2058, experiment 2, vliv látek na podíl morfologických typů

| Inhibitor | mezenchymální [%] | améboidní [%] | přechodná [%] |
|-----------|-------------------|---------------|---------------|
| fasudil | 59,44 | 26,57 | 13,99 |
| 30 | 55,28 | 29,19 | 15,53 |
| kontrola | 6,67 | 91,43 | 1,90 |

5

Tabulka 11: Linie A2058, experiment 3, vliv látek na podíl morfologických typů.

| inhibitor | mezenchymální [%] | améboidní [%] | přechodná [%] |
|-----------|-------------------|---------------|---------------|
| 19 | 40,09 | 54,25 | 5,66 |
| fasudil | 68,49 | 24,20 | 7,31 |
| kontrola | 14,01 | 80,93 | 5,06 |

10

Příklad 12 Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

15

Složení

| | |
|-------------------|--------|
| Aktivní složka | 1250 g |
| Talek | 180 g |
| Pšeničný škrob | 120 g |
| Magnezium stearát | 80 g |
| Laktóza | 20 g |

20

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou protlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí přístroje na plnění tobolek.

25

Příklad 13 Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

30

Složení

| | |
|----------------|---------|
| Aktivní složka | 250 g |
| Lauroglykol | 2 litry |

35

Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 14 Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

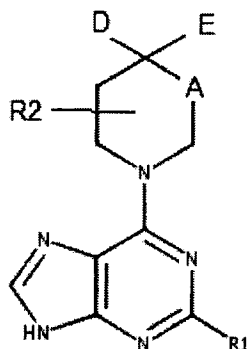
Složení

| | |
|----------------|--------|
| Aktivní složka | 250 g |
| PEG400 | 1 litr |
| 10 Tween 80 | 1 litr |

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o Mr mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween® 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem. Ind., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na částice o velikosti 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 2,6-Disubstituované puriny obecného vzorce I



(I)

ve kterém

A je vazba nebo $-Z-(CH_2)_m-$; Z je vybrán z S, O, NH, CH_2 ; m je celé číslo v rozmezí 0 až 2;

D a E dohromady tvoří cyklus a $-D-E-$ je $-X-(CH_2)_n-Y-$, kde X a Y jsou nezávisle vybrány z S, O, NH, CH_2 , přičemž alespoň jeden z X a Y jsou S, O, nebo NH, a n je celé číslo v rozmezí 2 až 4, a přičemž ve skupině $-(CH_2)_n-$ může popřípadě alespoň jeden vodík být nahrazen substituentem vybraným z halogenu, OH, O(C1-C4)alkylu, hydroxy(C1-C4)alkylu, SH, S(C1-C4)alkylu, merkpto(C1-C4)alkylu, NH_2 , NH(C1-C4)alkylu, N((C1-C4)alkyl)₂;

R1 je vybráno ze skupiny zahrnující

- halogen vybraný z F, Cl, Br, I;

- heterocykloalkyl, což znamená C3-C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1-C4 alkyl, C1-C4 alkoxy, C1-C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;

– heterocykloalkyl alkylalkyl, což znamená C3–C10 cykloalkyl skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, a která je vázána přes C1–C4 alkylenový můstek, s výhodou přes C2–C3 alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkylová skupina může být případně substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;

–**R'-G**

kde **G** je vybráno ze skupiny–NH– a –N(C1–C8 alkyl), a

R' je vybráno ze skupiny zahrnující

- 10 – C2–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl, popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy a amino substituent, s výhodou jedním hydroxy a/nebo jedním amino substituentem;
- (dialkylamino)alkyl skupinu, kde alkyl je vybrán nezávisle ze skupiny zahrnující C1–C10 lineární nebo rozvětvený alkyl;
- 15 – C3–C10 cykloalkyl, což znamená monocyklickou nebo polycyklickou alkylovou skupinu obsahující 3 až 10 uhlíkových atomů, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl a amino substituent;
- heterocykloalkyl, což znamená C3–C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, přičemž heterocykloalkyl je popřípadě substituovaný alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;
- 20 – heterocykloalkyl alkyl, což znamená C3–C10 cykloalkylovou skupinu, kde jeden nebo více, s výhodou 1 až 3, uhlíků kruhu je nahrazeno heteroatomem vybraným ze skupiny zahrnující N, O, S, která je vázána přes C1–C4 alkylenový můstek, s výhodou přes C2–C3 alkylenový můstek, přičemž heterocykloalkyl alkyl skupina je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl, a amino substituent;
- 25 – benzylová skupina, která je popřípadě substituovaná alespoň jedním substituentem vybraným ze skupiny zahrnující fluoro, chloro, hydroxy, C1–C4 alkyl, C1–C4 alkoxy, C1–C4 hydroxyalkyl a amino substituent;
- 30

R2 může nebo nemusí být přítomen, a představuje jeden nebo více substituentů vázaných v libovolné poloze kruhu, nezávisle vybraných z =O, –OH, –C(O)–(CH₂)_p–O–(H nebo C1–C4 alkyl), kde p je celé číslo v rozmezí 0 až 4, aryl, arylalkyl, hydroxy(C1–C4)alkyl, –S(O)₂–aryl, –C(O)–aryl, –C(O)–heteroaryl, –C(O)–heterocyklyl, přičemž aryl, arylalkyl, heteroaryl, heterocyklyl mohou být substituované jedním nebo více substituenty vybranými z halogenu, OH, O(C1–C4)alkylu, hydroxy(C1–C4)alkylu, SH, S(C1–C4)alkylu, merkapt(C1–C4)alkylu, NH₂, NH(C1–C4)alkylu, N((C1–C4)alkyl)₂,

40

ve kterém

aryl je C6–C10 skupina obsahující alespoň jedno aromatické jádro, a s výhodou je arylem fenyl nebo naftyl;

45

arylalkyl je skupina obsahující C6–C10 skupinu obsahující alespoň jedno aromatické jádro a C1–C4 alkylen, a s výhodou je arylalkylem benzyl;

heteroaryl je C5–C10 skupina, kde alespoň jeden uhlík je nahrazen heteroatomem vybraným z O, S, N, a s výhodou je heteroaryl vybrán ze skupiny zahrnující furan, thiofen, pyrrol, pyrrazol;

heterocyklyl je C4–C10 skupina, kde alespoň jeden uhlík je nahrazen heteroatomem vybraným z O, S, N.

50

2. 2,6-Disubstitutované puriny obecného vzorce I podle nároku 1, které nesou substituent R1 vybraný ze skupiny zahrnující N-N-morfolinyl, N-pyrrolidinyl, N-pyrazolidinyl, N-imidazolidinyl, N-piperazinyl, N-piperidinyl, N-thiomorfolinyl, 4-methylpiperazin-1-yl, 4-(2-hydroxyethyl)piperazinyl, (R)-(2-hydroxymethylpyrrolidin-1-yl), ethylamino, propylamino, butylamino, (2-hydroxyethyl)amino, (3-hydroxypropyl)amino, 2(R)-hydroxypropyl]amino, 2(S)-hydroxypropyl]amino, 4-hydroxybut-2(R)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(S)-yl]amino, 4-hydroxybut-2(R,S)-yl]amino, 2-(hydroxy-2-methyl)propyl]amino, (2,3-dihydroxypropyl)amino, (1-hydroxy-3-methylbutyl)amino, [(R,S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(R)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, [(S)-(2-hydroxypent-3-yl)]amino, (R)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (S)-[1-isopropyl-2-hydroxyethyl]amino, (2-aminoethyl)amino, (3-aminopropyl)amino, (4-aminobutyl)amino, (5-aminopentyl)amino, (6-aminohexyl)amino, [3-amino-2-hydroxypropyl]amino, [1-(dimethylamino)methyl]amino, [2-(dimethylamino)ethyl]amino, [3-(dimethylamino)propyl]amino, [4-(dimethylamino)butyl]amino, [2-(diethylamino)ethyl]amino, [3-(diethylamino)propyl]amino, (aziridin-1-yl)ethylamino, (azolidin-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)ethylamino, (piperidin-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)ethylamino, (azetidín-1-yl)propylamino, cyklopropylamino, cyklobutylamino, cyklopentylamino, cyklohexylamino, (*cis*-2-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-aminocyklohexyl)amino, (*trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-aminocyklohexyl)amino, (*cis*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-2-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-3-hydroxycyklohexyl)amino, (*trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (*cis,trans*-4-hydroxycyklohexyl)amino, (2-methoxybenzyl)amino, (3-methoxybenzyl)amino, (4-methoxybenzyl)amino, (3,5-dimethoxybenzyl)amino, (2,6-dimethoxybenzyl)amino, (3,4,5-trimethoxybenzyl)amino, (2,4,6-trimethoxybenzyl)amino, (2-fluorbenzyl)amino, (3-fluorbenzyl)amino, (4-fluorbenzyl)amino, (2-chlorbenzyl)amino, (3-chlorbenzyl)amino, (4-chlorbenzyl)amino, (2,4-dichlorbenzyl)amino, (3,4,5-trichlorbenzyl)amino.

3. 2,6-Disubstitutované puriny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro použití jako léčiva.

4. 2,6-Disubstitutované puriny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití pro léčbu chorob vybraných ze skupiny zahrnující choroby dýchacího systému, kardiovaskulárního systému, oka, střev, kůže a nervového systému, jejichž patologie zahrnuje abnormální migraci buněk, zánět nebo fibrózu, hepatobiliárních onemocnění, zánětlivých onemocnění, patologických neovaskularizací, neurodegenerativních a metastatických nádorových onemocnění, onemocnění ve kterých hraje role vazokonstrikce nebo bronchokonstrikce.

5. 2,6-Disubstitutované puriny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 a 2 pro použití pro léčbu chorob vybraných ze systémové fibrózy, fibróz jednotlivých orgánů, zejména jater, ledvin, plic a kůže, myelofibrózy, fibrózy po radio a chemoterapii, Crohnovy nemoci, kolitidy, ulcerativní kolitidy, Behcetovy nemoci, chronické obstrukční plicní nemoci, metastatického melanomu, zánětů po operačních výkonech, zánětu povrchu oka, uveitidy, retinitidy, makulární degenerace, syndromu suchého oka, alergické rhinitis, alergického astmatu, astmatu bronchiale, sclerosis multiplex, systémové sklerózy, chronické infekce HCV, akutního poškození jater, nealkoholické steatohepatitis, rheumatoidní artritidy, psoriatické artritidy, ankylozní spondylitidy, psoriázy, alopecia areata, vitiligo, lupus erythematosus, cerebrálního vazospazmu, amyotrofické laterální sklerózy, frontotemporální demence, Alzheimerovy nemoci, Parkinsonovy nemoci, polyglutaminových onemocnění, Pickovy nemoci, demencí, iktu, nemoci s argyrofilními zrny AgD, srdečního selhání, aneurysmatu abdominalní aorty, retinoblastomu, nádorů kolorekta, prsu a ovaria, obezity, diabetu 2. typu, aterosklerózy, hypertenzní nemoci, pulmonární hypertenze, erektilní dysfunkce, restenózy po vaskulární nebo srdeční chirurgii, benigní neoplasie, neovaskulárního glaukomu, diabetické retinopatie, okulární neovaskularizace, diabetické nefropatie, hemorhagické teleangiektasie, prevenci rejekce transplantátu, korekci jizvení kůže.

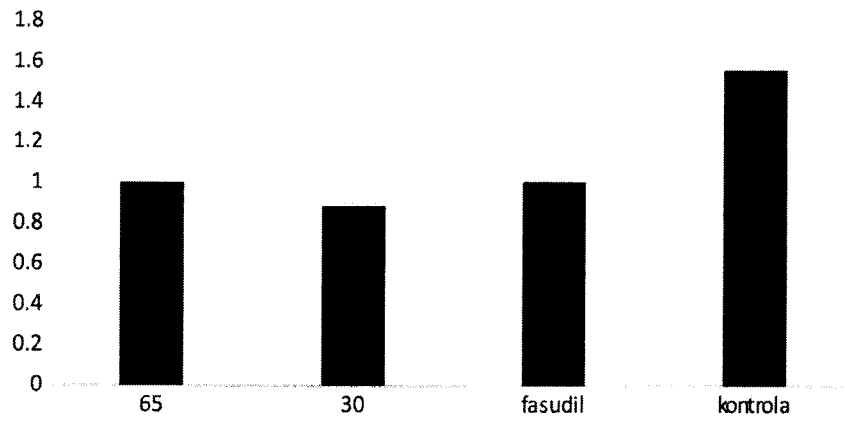
6. Farmaceutický přípravek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje alespoň jeden 2,6-disubstituted puriny obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 a alespoň jeden farmaceuticky přijatelný nosič.

5

2 výkresy

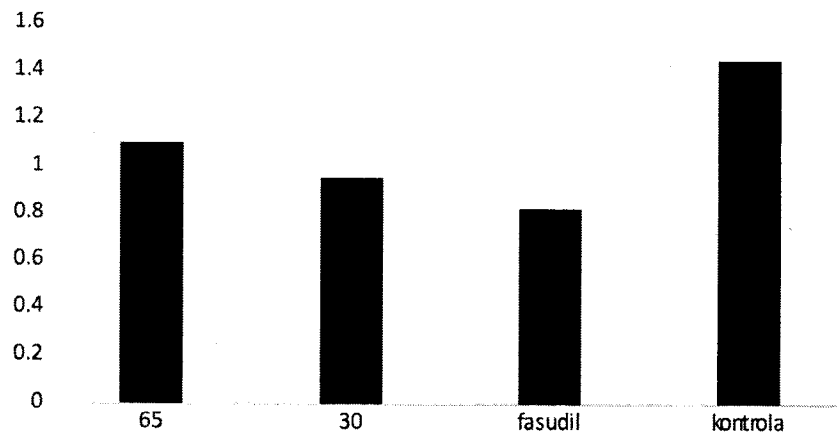
Obr. 1a

A 375m2 poměr pMLC/MLC



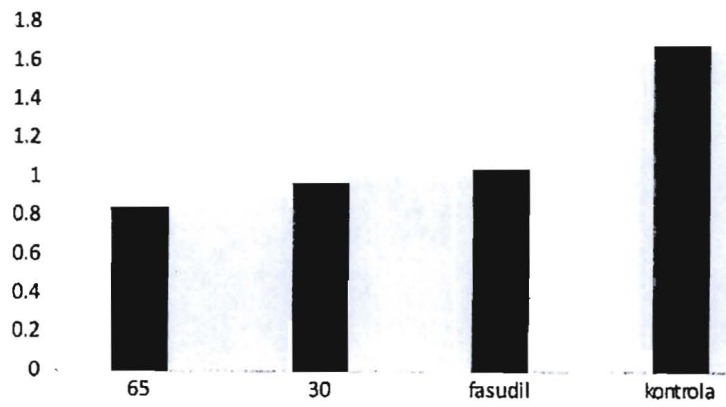
Obr. 1b

A2058 - poměr pMLC/MLC

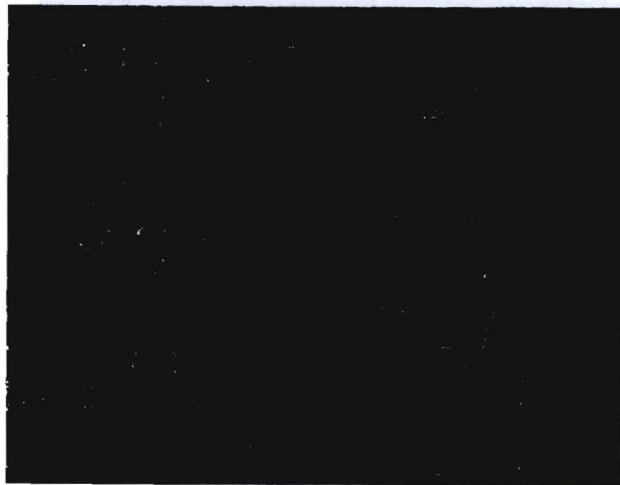


Obr. 1c.

HT1080 - poměr pMLC/MLC



Obr. 2a



Obr. 2b



Konec dokumentu