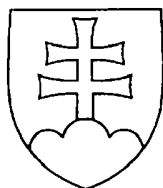


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 8. 8. 2001
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 09/637 054
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 11. 8. 2000
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 5. 8. 2003
Vestník ÚPV SR č.: 8/2003
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/US01/24822
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO02/14536

(11), (21) Číslo dokumentu:

269-2003

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

C12Q 1/48

(71) Prihlasovateľ: CEPHALON, INC., West Chester, PA, US;

(72) Pôvodca: Maroney Anna, Media, PA, US;
Walton Kevin M., Old Saybrook, CT, US;
Dionne Craig A., Downingtown, PA, US;
Neff Nicola, Wallingford, PA, US;
Knight Ernest Jr., Hilton Head Island, SC, US;
Glicksman Marcie A., Winchester, MA, US;

(74) Zástupca: Žovicová Viera, Mgr., Bratislava, SK;

(54) Názov: Spôsoby modulácie proteínov kináz viacerých rodov a skríningu zlúčenín, ktoré modulujú proteíny kináz viacerých rodov

(57) Anotácia:
Uvádžajú sa spôsoby identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov a podporujú prežívanie alebo umieranie buniek, kde uvedený spôsob obsahuje kroky kontaktovania bunky obsahujúcej proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou, určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, a určenia, či zlúčenina podporuje prežívanie buniek. Uvádžajú sa aj spôsoby identifikácie zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe neurodegeneratívnych porúch a/alebo zápalu a spôsoby modulácie aktivity proteínu kinázy viacerých rodov pozostávajúce z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín s indeno- alebo indozlúčeninou podľa vynálezu.

Spôsoby modulácie proteínov kináz viacerých rodov a skrínungu zlúčenín, ktoré modulujú proteíny kináz viacerých rodov

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka čiastočne spôsobov modulácie členov rodiny kináz viacerých rodov (MLK – multiple lineage kinase), spôsobov identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú proteín kináz viacerých rodov a buď podporujú prežívanie buniek, alebo podporujú umieranie buniek, spôsobov identifikácie zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe neurodegeneratívnych porúch a/alebo zápalu, a spôsobov liečby neurodegeneratívnych porúch zlúčeninami, ktoré inhibujú proteín kináz viacerých rodov.

Doterajší stav techniky

Rodina MLK predstavuje skupinu proteínov, v ktorej proteínová sekvencia kinázových domén členov rodiny veľmi pripomína MAPKKK, ale viac sa podobajú navzájom ako iným MAPKKK. Medzi členov rodiny MLK patrí časť veľmi komplexných kinázových kaskád, napríklad stres signalizujúca kaskáda, ktorá okrem iného zahŕňa moduláciu c-Jun N-koncovú kinázu (JNK), ktorá zase medzi inými moduluje transkripčné faktory vrátane c-Jun, ATF2 a ELK-1. JNK je opísaná v patentoch USA č. 5,534,426, 5,593,884, 5,605,808, a WO 95/03324, ktoré sa týmto celé zahŕňajú odkazom.

Rodina MLK zahŕňa sčasti aj nasledujúce skupiny: 1) kinázu viacerých rodov 1 (MLK1); 2) kinázu viacerých rodov 2 (MLK2); 3) kinázu viacerých rodov 3 (MLK3); 4) kinázu nesúcu leucínový zips (LZK – leucine zipper bearing kinase); 5) kinázu nesúcu duálny leucínový zips (DLK – dual leucine zipper bearing kinase); a 6) kinázu viacerých rodov 6 (MLK6). MLK1 má katalytickú doménu podobnú obom kinázam špecifickým pre Tyr a Ser/Thr. Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 213, 701-710. MLK2 má tiež katalytickú doménu podobnú obom kinázam špecifickým pre Tyr alebo Ser/Thr. Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 213, 701-710. MLK2 je známa aj ako MST. Katoh, *et al.*, *Oncogene*, 1995, 10, 1447-1451. MLK3 obsahuje proteín, ktorý popri kinézovej doméne obsahuje dva leucínové zipsy so susedným karboxy-koncovým bázickým regiónom a na prolín bohatým regiónom. Ing, *et al.*, *Oncogene*, 1994, 9, 1745-1750. MLK3 je známa aj

ako SPRK (Gallo, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 15092-15100), a PTK1 (Ezoe, *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 935-938). LZK je kináza nesúca leucínový zips. Sakuma, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 28622-28629. DLK má kinázovú doménu a dva putatívne motívy leucínových zipsov. Holzman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 30808-30817. DLK je známa aj ako ZPK (Reddy, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1994**, 202, 613-620) a MUK (Hirai, *et al.*, *Oncogene*, **1996**, 12, 641-650). Členy rodiny MLK sú opísané napríklad v patentoch USA 5,676,945, 5,554,523, WO 93/15201, kanadskom patente 2,148,898, Diener, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1997, 94, 9687-9692, DeAizpurua, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 16364-16373, Tung, *et al.*, *Oncogene*, **1997**, 14, 653-659, Sells, *et al.*, *Trends in Cell Biol.*, **1997**, 7, 161-167, Mata, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 277, 16888-16896, Hirai, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 15167-15173, Fan, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 277, 24788-24793, Blouin, *et al.*, *DNA and Cell Biol.*, **1996**, 15, 631-642, Pombo, *et al.*, *Nature*, **1995**, 377, 750-754, Kiefer, *et al.*, *EMBO J.*, **1996**, 15, 7013-7025, Hu, *et al.*, *Genes & Dev.*, **1996**, 10, 2251-2264, Su, *et al.*, *EMBO J.*, **1997**, 16, 1279-1290, a Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500. Nedávno bola v databáze EST identifikovaná ďalšia kináza príbuzná s MLK. Sekvencia DNA tohto klonu, MLK6, je opísaná siedmimi prekrývajúcimi sa položkami. Ich identifikačné čísla klonov sú: 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 a 178522, ktorých sekvencie sa týmto celé zahŕňajú odkazom. Každý z odkazov citovaných v tomto odseku sa týmto celý zahŕňa odkazom.

Nedávno sa ukázalo, že stabilná expresia ZPK znižuje proliferatívnu schopnosť fibroblastov NIH 3T3 podľa merania testom tvorby kolónií. Bergeron, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1997**, 237, 153-155. Bergeron *et al.* však neposkytli žiadne dáta, ktoré by ukazovali, že ZPK moduluje aktivitu substrátu ZPK, alebo či ZPK podporovala umieranie buniek.

Expresia konštruktu kódujúceho Myc-MLK2 vo švajčiarskych 3T3 bunkách viedla k apoptóze približne 20 hodín po injekcii. Nagata, *et al.*, *EMBO J.*, 1998, 17, 149-158.

Prihlasovatelia vyvinuli väčší počet indolo a indeno zlúčenín, ktoré medzi iným inhibujú rast buniek spojený s hyperproliferatívnymi stavmi a inhibujú smrť u radu embryonálnych kultúr, ako napríklad ganglion zadného sensorického koreňa miechových nervov, striatálnych, horných cervikálnych gangliách a motoneurónoch. Patenty USA

5,475,110, 5,591,855, 5,594,009, 5,461,146, 5,621,100, 5,621,101, 5,705,511 a 5,756,494, ktoré sú všetky udelené prihlasovateľovi tejto prihlášky a ktoré sa týmto zahŕňajú celú odkazom. Zlúčeniny uvedené v patente USA 5,705,511 so vzorcom G sa v tejto prihláške označujú ako zlúčeniny vzorca I. Prihlasovatelia tiež ukázali, že motoneurónovú apoptózu inhibuje derivát K-252a, indolokarbazol, ktorý tiež moduluje stres signalizujúcu kaskádu. Maroney, *et al.*, *J. Neurosci.*, 1998, 18, 104-111, ktorá publikácia sa týmto zahŕňa celú odkazom.

V dôsledku nedostatočnosti skríningových zlúčenín, ktoré modulujú členy stres signalizujúcej kaskády a podporujú buď umieranie buniek alebo prežívanie buniek, pretrváva potreba nových, selektívnych spôsobom skríningu zlúčenín. Okrem toho pretrváva potreba skríningových testov pre terapeutiká, ktoré by mohli byť užitočné pri liečbe zápalových a neurodegeneratívnych porúch. Predložený vynález sa týka týchto ako aj iných významných cieľov.

Podstata vynálezu

Predložený vynález poskytuje spôsoby identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov a podporujú prežívanie buniek, ktorý spôsob obsahuje kroky kontaktovania bunky obsahujúcej proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou, určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, a určenia, či zlúčenina podporuje prežívanie buniek.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov a podporujú umieranie buniek, ktorý spôsob obsahuje kroky kontaktovania bunky obsahujúcej proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou, určenia, či zlúčenina zvyšuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, a určenia, či zlúčenina podporuje umieranie buniek.

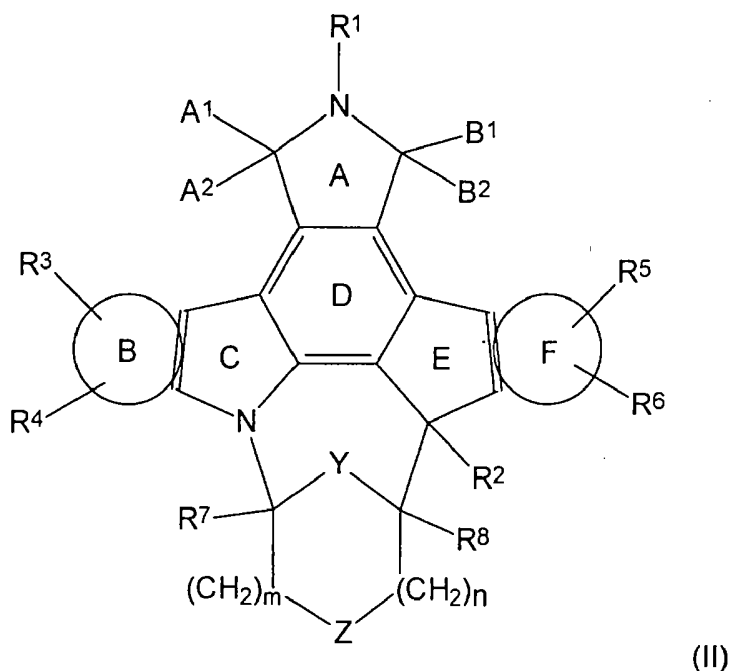
Predložený vynález poskytuje aj spôsoby na identifikáciu zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe neurodegeneratívnych porúch, pozostávajúce z kontaktovania bunky alebo bunkového extraktu obsahujúceho proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou a určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby na identifikáciu zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe zápalu, pozostávajúce z kontaktovania bunky alebo bunkového extraktu obsahujúceho proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou a určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby liečby cicavca, ktorý má neurodegeneratívnu poruchu alebo podozrenie na ňu, pozostávajúci z podania zlúčeniny, ktorá inhibuje alebo znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, tomuto cicavcovi.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby liečby cicavca, ktorý má zápal, pozostávajúci z podania zlúčeniny, ktorá inhibuje alebo znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, tomuto cicavcovi.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby modulácie aktivity proteínu kinázy viacerých rodov pozostávajúce z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou vzorca II:



kde:

kruh B a kruh F nezávisle a každý spolu s uhlíkovými atómami, na ktoré sú pripojené, sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

nenasýtený 6-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom od 1 do 3 uhlíkových atómov môže byť nahradených atómami dusíka;

nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh; a

nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom buď

jeden atóm uhlíka je nahradený atómom kyslíka, dusíka alebo síry;

dva atómy uhlíka sú nahradené atómom síry a dusíka, atómom kyslíka a dusíka, alebo dvoma atómami dusíka; alebo

tri atómy uhlíka sú nahradené tromi atómami dusíka;

R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

H, substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl majúci 1 až 4 uhlíky, substituovaný alebo nesubstituovaný aryl, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný alebo nesubstituovaný heteroaryl, alebo substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

$-C(=O)R^9$, kde R^9 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí alkyl, aryl a heteroaryl;

$-OR^{10}$, kde R^{10} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci 1 až 4 uhlíky;

$-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ a $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, kde p je od 1 do 4; a kde buď

R^{11} a R^{12} sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov; alebo

R^{11} a R^{12} spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, kde X^1 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $-O-$, $-S-$ a $-CH_2-$;

R^2 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, $-OH$, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$,

substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, a substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí:

H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, -CN, CF_3 , $-NO_2$, -OH, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$;

$-CH_2OR^{14}$, kde R^{14} je zvyšok aminokyseliny po odstránení hydroxylovej skupiny karboxylovej skupiny;

$-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ alebo $-CH=NNR^2R^{2A}$, kde R^{2A} je rovnaké ako R^2 ;

$-S(O)_yR^2$, $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$, kde y je 0, 1 alebo 2;

alkyl majúci od 1 do 8 uhlíkov, alkenyl majúci od 2 do 8 uhlíkov a alkynyl majúci 2 až 8 uhlíkov, kde

každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je nesubstituovaný; alebo

každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je substituovaný 1 až 3 skupinami vybranými zo skupiny, ktorú tvorí aryl majúci od 6 do 10 uhlíkov, heteroaryl, arylalkoxy, heterocykloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkyloxy-alkoxy, hydroxyalkyltio, alkoxyalkyltio, F, Cl, Br, I, -CN, $-NO_2$, -OH, $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pCO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OCONHR^2$, -O-tetrahydropyranyl, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}C(=O)R^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2OR^{10}$, $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ a monosacharid majúci od 5 do 7 uhlíkov, kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je buď nesubstituovaná alebo nahradená H, alkylom majúcim od 1 do 4 uhlíkov, alkylkarbonyloxylom majúcim od 2 do 5 uhlíkov alebo alkoxylokom majúcim od 1 do 4 uhlíkov;

X^2 je O, S alebo NR^{10} ;

R^7 a R^8 sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ a $-(CH_2)NR^{11}R^{12}$; alebo R^7 a R^8 spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca $-CH_2-X^3-CH_2-$, kde X^3 je X^2 alebo väzba;

m a n sú každé nezávisle 0, 1 alebo 2;

Y je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí -O-, -S-, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ a $-CH_2-$;

Z je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí väzba, -O-, $-CH=CH-$, -S-, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ a $-CH(O(C(=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, kde R^{9A} je rovnaké ako R^9 ;

R^{15} a R^{16} sú nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, -OH, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C(=O)R^9)$, hydroxyalkyl a $-CO_2R^{10}$;

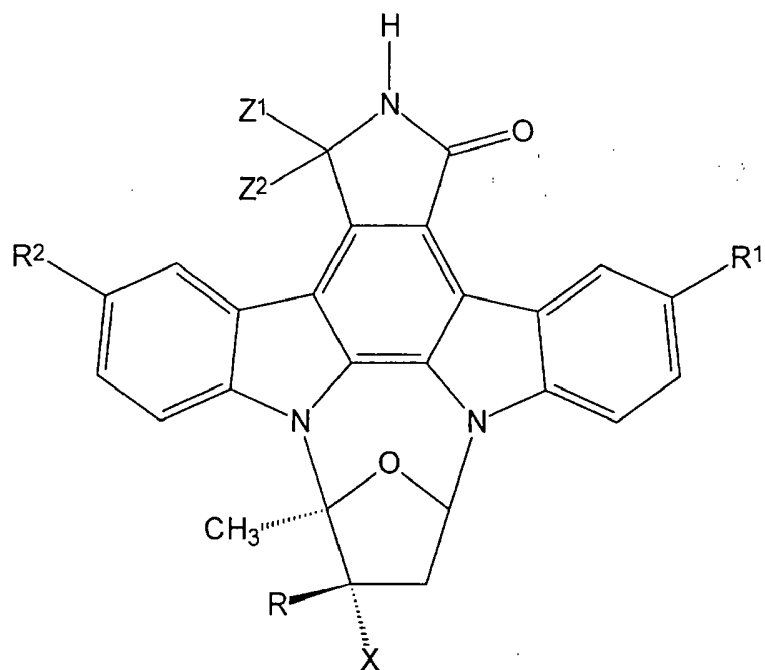
R^{17} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl, aryl a heteroaryl;

A^1 a A^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, H; H, OR^2 ; H, $-SR^2$; H, $-N(R^2)_2$ a skupina, kde A^1 a A^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí =O, =S a $=NR^2$;

B^1 a B^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, H; H, $-OR^2$; H, $-SR^2$; H, $-N(R^2)_2$ a skupina, kde B^1 a B^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí =O, =S a $=NR^2$;

s výhradou, že aspoň jeden z párov A^1 a A^2 , alebo B^1 a B^2 , tvorí =O.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby modulácie aktivity proteínu kinázy viacerých rodov pozostávajúce z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou vzorca III:

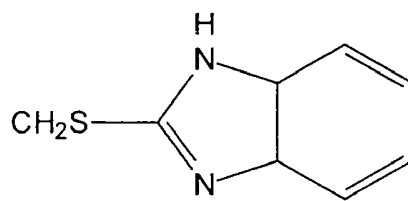
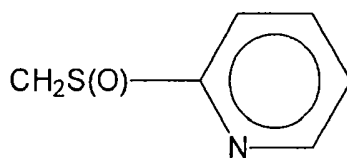
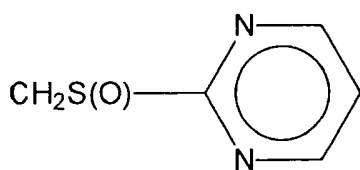
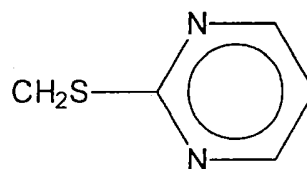
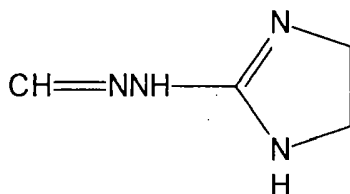
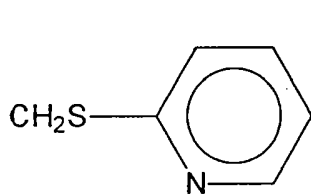


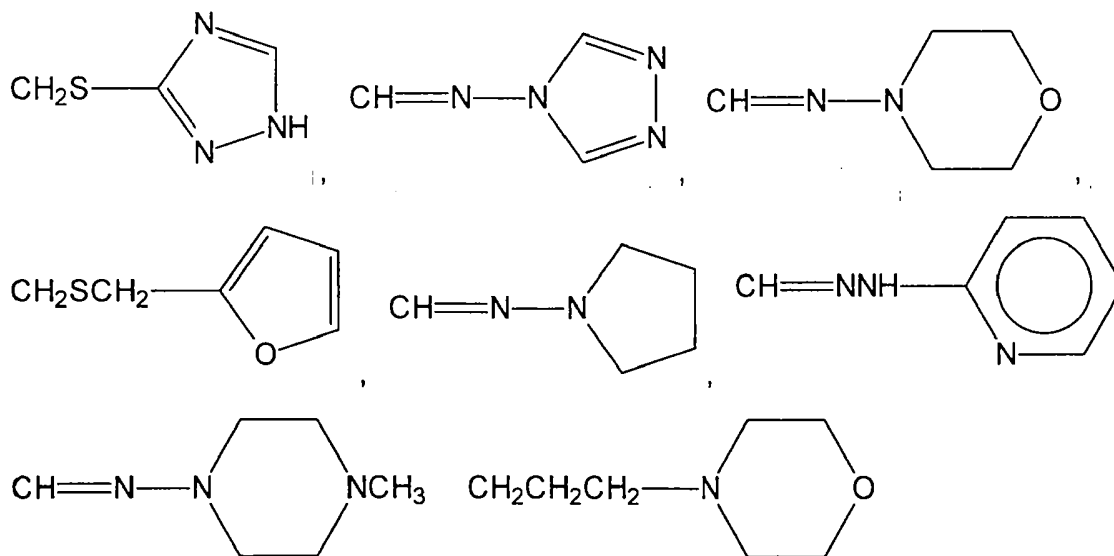
(III)

kde

Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=O$;

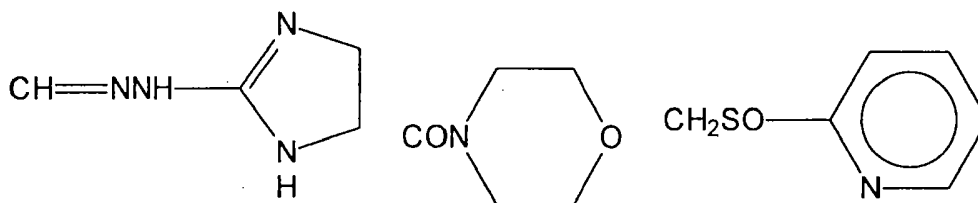
R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Cl, $CH_2SO_2C_2H_5$, Br, $CH_2S(CH_2)NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $n-C_4H_9$, $NHCONHC_6H_5$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, OH, O-n-propyl, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4\text{-triazín})]$, $CH_2CH_2SCH_3$;





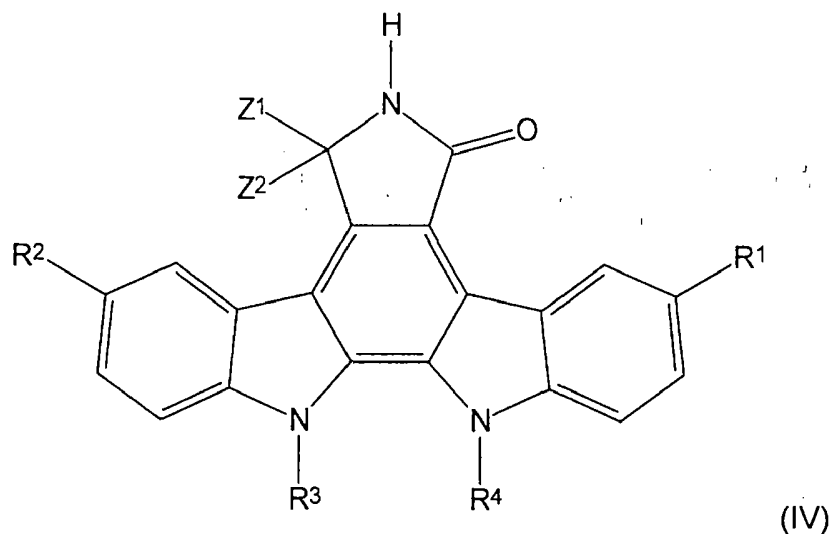
R_2 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazín})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ a CH_2OH ;

X je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerínH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycín}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2^-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serín}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH , $\text{CH}_2\text{NH-Prolín}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, CH=NNHC(=NH)NH_2 , $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, CH=NNHCONH_2 , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2n\text{-hexyl}$, CONHCH_3 a $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$; alebo jeden z nasledujúcich vzorcov



R je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z OH a OCH_3 .

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby modulácie aktivity proteínu kinázy viacerých rodov pozostávajúce z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou vzorca IV:



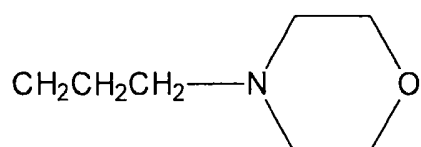
kde

Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria =O;

R^1 je H alebo Br;

R^2 je H;

R^3 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ alebo



a

R^4 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ alebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Prehľad obrázkov na výkresoch

S cieľom ilustrovať uskutočnenia predloženého vynálezu sú na výkresoch zobrazené isté aspekty. Rozumie sa však, že tento vynález nie je obmedzený na zobrazené uskutočnenia.

Obrázok 1 je schematický obrázok zobrazujúci všeobecnú prípravu premostených indenopyrolokarbazolov.

Obrázok 2 je schematický obrázok zobrazujúci všeobecnú prípravu premostených indenopyrolokarbazolov.

Obrázok 3 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu indenopyrolokarbazolov naviazaných na živicu.

Obrázok 4 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu chránených, rozpustných indenopyrolokarbazolov.

Obrázok 5 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu intermediátu V.

Obrázok 6 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu premostených indenopyrolokarbazolov použitím spôsobu A.

Obrázok 7 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu premostených indenopyrolokarbazolov použitím spôsobu B.

Obrázok 8 je schematický obrázok zobrazujúci prípravu premostených indenopyrolokarbazolov substituovaných na kruhu B.

Obrázok 9 je schematický obrázok zobrazujúci derivatizáciu kruhu E premostených indenopyrolokarbazolov.

Obrázok 10 predstavuje graf dvoch osobitných experimentov zobrazujúci množstvo životaschopných neuronálne diferencovaných buniek PC-12 ostávajúcich po 5 dňoch kultivácie za neprítomnosti NGF. Výsledky sú vyjadrené ako percento kontroly NGF v rámci každej skupiny (vektorová kontrola za neprítomnosti NGF, $n = 12$; všetky ostatné skupiny, $n = 3$). Rozdiel medzi vektorovou kontrolou a stabilnými skupinami buniek exprimujúcimi dominantný negatívny MLK-3 mutant za neprítomnosti NGF je štatisticky významný podľa určenia dvojstranným T – testom ($p < 0,05$).

Obrázok 11A predstavuje fosforyláciu kinázovo mŕtvych GST-SEK-1 baculovírusom exprimovanou FLAG-MLK-3 (zmes domény plnej dĺžky a kinázovej domény) pomocou testu na báze rádioaktívneho gélu.

Obrázok 11B predstavuje produkt fosforylovaného myelínového bázického proteínu označeného izotopom ^{32}P vytvoreného kinázovou reakciou katalyzovanou baculovírusom exprimovanou FLAG-MLK-3 (zmes domény s plnou dĺžkou a kinázovej domény) alebo kinázovou doménou GST-MLK-3.

Obrázok 12 je immunoblot analýza ukazujúca fosforyláciu kinázovo mŕtvych GST-SEK-1 baculovírusom exprimovanou FLAG-MLK-3 (zmes domény plnej dĺžky a kinázovej domény) detekciou fosfo-špecifickou SEK-1 protilátkou.

Obrázok 13 predstavuje fosforyláciu myelínového bázického proteínu bakteriálne exprimovanou GST-MLK-3 kinázovou doménou pomocou (o) multiscreen testu zrážaním kyselinou trichlóroctovou alebo (•) metódou fosfocelulózovej membrány.

Obrázok 14 zobrazuje krivku saturačného viazania pre $[\text{}^3\text{H}]\text{K252a}$ inkubovanú lyzátom hmyzích buniek infikovaných baculovírusom MLK-3.

Obrázok 15A ukazuje množstvo c-jun označeného izotopom ^{32}P v imunoprecipitačnej/kinázovej reakcii z buniek nadmerne exprimujúcich MLK-3, MLK-2 alebo DLK a spracovaných buď 0,025 % DMSO (kontrola) alebo 500 nM K-252a.

Obrázok 15B predstavuje graf kvantifikujúci percentuálnu aktivitu ostávajúcu v imunoprecipitačných/kinázových reakciách zo vzoriek opísaných na obrázku 15A. Stĺpce predstavujú priemer duplicitných vzoriek, kde chybový stĺpec indikuje rozmedzie strednej hodnoty.

Obrázok 15C ukazuje množstvo c-jun označeného izotopom ^{32}P v imunoprecipitačnej/kinázovej reakcii z buniek nadmerne exprimujúcich HA-JNK1 samotnú alebo s MEKK1 pri rôznych množstvách cDNA, ako je uvedené, a spracované buď 0,025 % DMSO (kontrola) alebo 500 nM zlúčeniny III-3 (pozrite tabuľku 3). Stĺpce predstavujú priemer duplicitných vzoriek, kde chybový stĺpec indikuje rozmedzie strednej hodnoty.

Obrázok 16 ukazuje, že zlúčenina III-3 podporuje prežívanie neurónov spôsobom závislým od koncentrácie. Disociované neuróny boli kultivované zo sympatických ganglionov (SG) (A), ganglionov zadného senzorického koreňa miechových nervov (DRG – dorsal root ganglia) (B), ciliárnych ganglionov (CG) (C) a motoneurónov (MN) (D), za prítomnosti alebo neprítomnosti indikovaných trofických faktorov. Bunky sa počítali 48 h po nasadení podľa popisu v materiáloch a metódach. Údaje predstavujú stredné hodnoty $\pm$ štandardnú odchýlku trojnásobných alebo štvornásobných určení. Zobrazený je jeden z troch experimentov.

Obrázok 17 ukazuje fázovo kontrastné mikrofotografie kultúr E12 DRG (A, E), E9 sympatických (B, F), E8 ciliárnych (C, G) a E5.5 motorických neurónov (D, H) po 48 h v kultúre (24 h pre ciliárne neuróny) za prítomnosti príslušného neurotrofického faktora (20 ng/ml NGF pre sympatické a senzorické neuróny, 10 ng/ml CNTF pre ciliárne neuróny, 30 μ g/ml svalového extraktu (MEX) pre motoneuróny (A-D) alebo za prítomnosti 1 μ M zlúčeniny III-3 (E-H). Dielik = 200 μ m.

Obrázok 18 ukazuje fotomikrograf explantátov zadného senzorického koreňa miechových nervov in vitro. Explantáty z kuracích DRG (E9) sa naniesli na 96-jamkové platničky v médiu obsahujúcom 0,05 % BSA. Po dvojhodinovom období naväzovania sa pridalo nasledujúce: (A) kontrola DMSO; (B) 20 ng/ml NGF; (C) 250 nM zlúčeniny III-3. O štyridsaťosem hodín neskôr sa médium odstránilo a explantáty sa fixovali 4 % paraformaldehydrom vo fyziologickom roztoku tlmenom fosfátom.

Obrázok 19 ukazuje počet kuracích lumbálnych motorických neurónov prežívajúcich na E10 po dennom pôsobení (E5-9) uvedenými dávkami zlúčeniny III-3. Prezentované údaje sú stredné hodnoty $\pm$ štandardná odchýlka pre 5 – 6 zvierat na liečebnú skupinu. Uvedený experiment sa opakoval dvakrát. Údaje sú z jedného reprezentatívneho experimentu a predstavujú jednu stranu lumbálneho stĺpca. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, Studentov t test medzi zlúčeninou III-3 a kontrolnými skupinami s Bonferroniho korekciou.

Obrázok 20 ukazuje počet motorických neurónov v miechovom jadre samice potkana pre bulbokavernózný sval (SNB) prežívajúcich na PN10 alebo PN60 po dennom

pôsobení (PN1-5) zlúčeninou III-3, alebo kontrolným vehikulom (5 % Solutol™). Na PN10 (A, B) alebo PN60 (B) sa potkany usmrtili a oblasť miechy obsahujúca SNB sa vypitvala a spracovala na histológiu; motorické neuróny vyfarbené Cresylecht fialovou sa potom počítali v sériovej sekcii lumbálneho 5-sakrálného 1 regiónu miechy podľa publikovaného popisu (Wingfield, *et al*, *Steroids*, 1975, 26, 311-327). Experimentálne údaje sú stredné hodnoty $\pm$ exponenciálne vyrovnaný priemer pre 4 – 8 zvierat na liečebnú skupinu.

Obrázok 21 ukazuje stratu imunoreaktivity ChAT po podjazykovej axotómii u dospelého potkana po pôsobení zlúčeniny III-3. Fotomikrografie podjazykového jadra po transsekcii podjazykového nervu a pôsobení (A) roztoku vehikula samotného (5 % Solutol™) a (B) 200 μ g zlúčeniny III-3 aplikovanej na miesto transsekcie. (C) Počet ChAT-imunoreaktívnych podjazykových motorických neurónov po liečbe opísanej vyššie pod (A) a (B). Výsledky sú vyjadrené ako percento ChAT-imunoreaktívnych motorických neurónov s 100 % definovaných ako počet of ChAT-imunoreaktívnych motorických neurónov v kontralaterálnom podjazykovom jadre bez lézie.

Obrázok 22 ukazuje inhibíciu dráhy MLK-3 a demonštruje *in vivo* účinnosť a blokádu fosforylačných udalostí v smere toku. Obrázok 22A ukazuje zvýšenie imunoreaktívnych neurónov tyrozínhydroxylázy v substantia nigra po lézii MPTP pri systémovom podaní zlúčeniny III-3. Obrázok 22B je reprezentatívny imunoblot ukazujúci zvýšenie v hladinách fosforylovanej MKK4 indukované pomocou MPTP. Obrázok 22C zobrazuje reprezentatívny imunoblot a ELISA ukazujúce zoslabenie fosforylovanej MKK4 indukovanej pomocou MPTP za prítomnosti zlúčeniny III-3.

Obrázok 23 ukazuje indukciu IL-2 v Jurkatových bunkách. Obrázok 23A ukazuje časový priebeh indukcie IL-2. Obrázok 23B ukazuje inhibíciu indukcie IL-2 zlúčeninou III-3. Obrázok 23C ukazuje inhibíciu indukcie IL-2 zlúčeninou III-3 a zlúčeninou I-4.

Opis výhodných uskutočnení vynálezu

Pri použití vyššie a v rámci celej prihlášky budú mať nasledujúce termíny, pokiaľ nie je uvedené inak, nasledujúce významy.

„Apoptóza“ označuje špecifickú morfológickú formu smrti buniek vyznačujúcu sa fragmentáciou buniek a ich jadier na častice viazané na membránu. Apoptózu môže

spustiť napríklad pôsobenie zlúčenín indukujúcich apoptózu, napríklad etopozid, staurosporín, faktor nádorovej nekrózy- α , ceramid a podobne, alebo stavmi, ako je ožiarenie RTG lúčmi.

Pojem „umieranie buniek“ označuje umieranie buniek v dôsledku apoptózy, nekrózy alebo iným spôsobom všeobecne známym odborníkom v danej oblasti. „Umieranie buniek“ môže byť charakterizované napríklad ako zníženie v celkových počtoch buniek alebo zníženie životaschopnosti buniek v porovnaní s neliečenými populáciami buniek. Zlúčeniny, ktoré „podporujú umieranie buniek“ vedú k zníženiu počtov buniek alebo zníženiu životaschopnosti buniek v porovnaní s kontrolnými populáciami. Naproti tomu zlúčeniny, ktoré „podporujú prežívanie buniek“ vedú k zvýšeniu počtov buniek alebo životaschopnosti buniek, alebo spomaľujú alebo znižujú rýchlosť umierania buniek.

Pojmy „reaguje selektívne“ alebo „viaže sa špecificky“ popisujú zlúčeniny, ktoré fyzicky alebo chemicky interagujú priamo s proteínom MLK. Naproti tomu zlúčeniny, ktoré „nereagujú selektívne“ alebo „neviažu sa špecificky“ môžu ovplyvniť proteíny nadol alebo nahor oproti proteínu MLK a tým môžu ovplyvniť aktivitu proteínov MLK, ale neinteragujú priamo fyzikálne ani chemicky s proteínom MLK.

Pojem „moduluje“ označuje zvýšenie alebo zníženie aktivity konkrétneho proteínu alebo jeho substrátu.

Predložený vynález sa sčasti týka spôsobov identifikácie zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu MLK a podporujú buď prežívanie buniek alebo umieranie buniek. Zlúčeniny, ktoré vedú k zvýšenej aktivite proteínu MLK, môžu podporovať umieranie buniek, zatiaľ čo zlúčeniny, ktoré vedú k zníženej aktivite proteínu MLK, môžu podporovať prežívanie buniek.

Proteínom MLK môže byť akýkoľvek proteín identifikovaný ako patriaci do triedy proteínov MLK. Proteín MLK je s výhodou vybraný zo skupiny pozostávajúcej z MLK1, MLK2, MLK3 (SPRK, PTK1), LZK, DLK (ZPK, MUK) a MLK6, ktoré sú opísané vyššie. Vo výhodných uskutočneniach vynálezu metódy identifikujú zlúčeniny, ktoré priamo

interagujú alebo viažu sa na proteín MLK podľa určenia na základe testov viazania, kinázových testov alebo iných ekvivalentných testov.

Aby sa identifikovali zlúčeniny, ktoré modulujú aktivitu proteínu MLK a podporujú prežívanie buniek alebo umieranie buniek, bunka alebo bunky obsahujúce proteín MLK sa kontaktujú s testovanou zlúčeninou. Kontaktovanie môže prebiehať v tlmivých roztokoch alebo médiách známych odborníkom v danej oblasti. Kontaktovanie môže alternatívne prebiehať *in vivo*, kedy sa zviera, napríklad myš alebo iné vhodné zviera známe odborníkom v danej oblasti, kontaktuje podaním farmaceutickej kompozície obsahujúcej testovanú zlúčeninu a farmaceuticky prijateľnú soľ, nosič alebo riedidlo. Okrem toho možno použiť rôzne počty buniek a koncentrácie testovaných zlúčenín. Určuje sa, či testovaná zlúčenina zvyšuje alebo znižuje aktivitu proteínu MLK. Okrem toho sa určuje aj to, či testovaná zlúčenina podporuje prežívanie buniek alebo umieranie buniek.

Bunky, ktoré sa kontaktujú s testovanými zlúčeninami, môžu byť akékoľvek bunky cicavcov. Bunkou je s výhodou neurónová bunka. Bunka je s výhodou zapojená do neurodegeneratívnej choroby. Na účely predloženého vynálezu sú „neurodegeneratívna choroba“, „neurodegeneratívna porucha“ a „neurodegeneratívny stav“ navzájom zameniteľné a používajú sa na opísanie akejkoľvek choroby alebo poruchy zahŕňajúcej neurónové bunky alebo bunky zapojené do neurónového systému okrem iných vrátane Alzheimerovej choroby, choroby motorických neurónov, amyotrofnej laterálnej sklerózy, Parkinsonovej choroby, cerebrovaskulárnej choroby, ischemických stavov, AIDS demencie, epilepsie, Huntingtonovej choroby a nárazových alebo prienikových zranení mozgu alebo miechy.

Aktivitu proteínu MLK možno určiť niekoľkými technikami. Aktivitu MLK možno napríklad určiť meraním aktivity substrátu proteínu MLK. Také substráty sú známe a ľahko rozpoznateľné pre odborníkov v danej oblasti. Substrát je s výhodou členom rodiny kináz proteínkináz aktivovaných mitogénom alebo rodiny proteínkináz aktivovaných mitogénom alebo substrátov ďalej v smere dráhy, medzi ktoré patria okrem iného proteíny vybrané zo skupiny pozostávajúcej z JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a cicavčieho homológu AEX-3 a tiež všeobecných substrátov Ser/Thr proteínkináz, ako je

napríklad myelínový bázický proteín (MBP). Činidlá a spôsoby merania aktivity substrátov sú tiež známe odborníkom v danej oblasti.

Prítomnosť MLK možno určiť aj meraním množstva proteínu MLK alebo mRNA kódujúcej proteín MLK. Činidlá vrátane protilátok a oligonukleotidových sond ako aj spôsoby merania množstva DNA alebo proteínu vrátane metódy Northern a Western blots sú známe odborníkom v danej oblasti. Aktivitu proteínu MLK možno určiť aj *in vitro* kinázovým testom. *In vitro* kinázové testy sú známe odborníkom v danej oblasti. Odborníkom sú známe aj iné techniky merania aktivity proteínov a tie sú tiež pokryté predloženým vynálezom. Takto môže odborník určiť, či testovaná zlúčenina moduluje, t.j. zvyšuje alebo znižuje, aktivitu proteínu MLK.

Či testovaná zlúčenina podporuje prežívanie buniek alebo umieranie buniek, možno určiť niekoľkými spôsobmi. Podpora prežívania buniek alebo umierania buniek sa s výhodou určuje pomocou buniek ohrozených rizikom umierania a porovnaním počtu buniek, ktoré boli kontaktované s testovanou zlúčeninou a ostávajú nažive, s množstvom buniek, ktoré neboli kontaktované s testovanou zlúčeninou a ostávajú nažive. Bunkami sú s výhodou primárne embryonálne motoneurónové bunky, ktoré sú naprogramované na umieranie. Primárne embryonálne motoneurónové bunky sú opísané v publikácii Maroney, *et al.*, *J. Neurosci.*, **1998**, 18, 104-111, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom. Primárne embryonálne motoneurónové bunky odumrú, pokiaľ ich nezachráni testovaná zlúčenina. Vyšší počet žijúcich motoneurónových buniek v populácii motoneurónových buniek ošetrovaných testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom motoneurónových buniek v populácii motoneurónových buniek, ktoré neboli ošetrované s testovanou zlúčeninou, teda indikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje prežívanie buniek. Naproti tomu nižší počet žijúcich motoneurónových buniek v populácii motoneurónových buniek ošetrovaných testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom žijúcich motoneurónových buniek v populácii motoneurónových buniek, ktoré neboli ošetrované s testovanou zlúčeninou, teda indikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje umieranie buniek.

V ďalšom uskutočnení vynálezu sa normálne bunky alebo bunky prírodného typu konvertujú na bunky ohrozené rizikom smrti nadmerným exprimovaním proteínu MLK, ako je opísané nižšie v príkladoch, a potom sa kontaktujú s testovanou zlúčeninou. Bunky

nadmerne exprimujúce proteíny MLK môžu odumrieť, pokiaľ ich nezachráni testovaná zlúčenina. Nadmernú expresiu proteínov MLK možno dosiahnuť pomocou vektorov schopných exprimovať konkrétny proteín vnútri bunky. Expresné vektory sú známe odborníkom v danej oblasti. Okrem toho sú odborníkom známe aj spôsoby prípravy expresných vektorov. Expresné vektory, ktoré exprimujú ktorýkoľvek z proteínov MLK možno pripraviť spôsobom podobným tým, ktoré sú opísané v príkladoch. Vyšší počet žijúcich buniek v populácii nadmerne exprimujúcich buniek ošetrených testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom žijúcich buniek v populácii nadmerne exprimujúcich buniek, ktoré neboli ošetrené s testovanou zlúčeninou, indikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje prežívanie buniek. Naproti tomu nižší počet žijúcich buniek v populácii nadmerne exprimujúcich buniek ošetrených testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom žijúcich buniek v populácii nadmerne exprimujúcich buniek, ktoré neboli ošetrené s testovanou zlúčeninou, indikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje umieranie buniek.

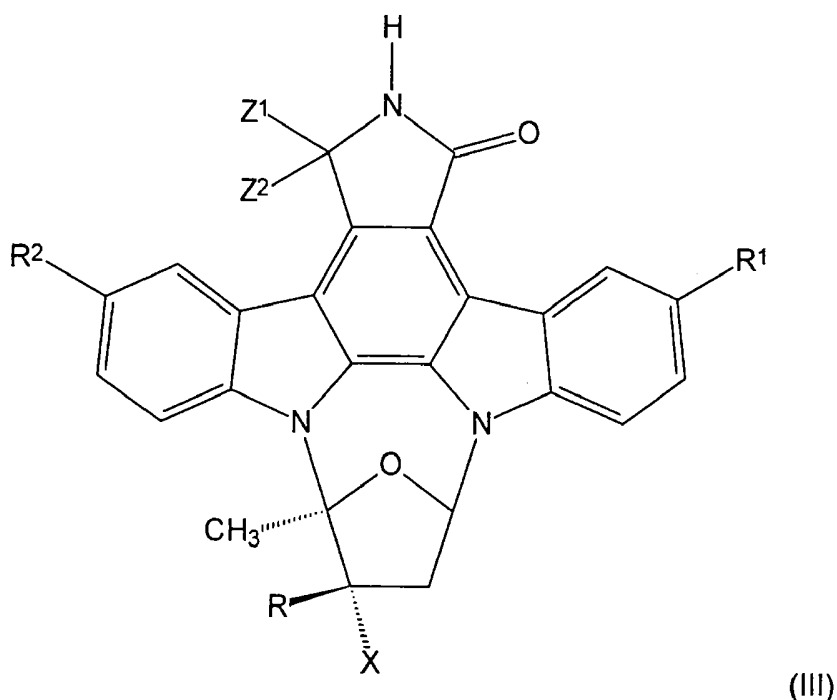
V ďalšom uskutočnení vynálezu sa podpora prežívania buniek určuje pozorovaním alebo meraním zníženia apoptózy. S apoptózou je spojený úbytok cytoplazmy a kondenzácia jadra. Odborník teda môže merať zníženie apoptózy meraním alebo pozorovaním zníženia úbytku cytoplazmy a/alebo kondenzácie jadra. Okrem toho môže odborník merať apoptózu pomocou konvenčných vyfarbovacích techník.

V ďalších uskutočneniach vynálezu možno na identifikáciu zlúčenín, ktoré podporujú umieranie buniek, použiť normálne neurónové bunky prírodného typu. Normálne neurónové bunky prežijú, pokiaľ ich smrť nie je indukovaná testovanou zlúčeninou. Nižší počet žijúcich buniek v populácii normálnych buniek ošetrených testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom žijúcich buniek v populácii normálnych buniek, ktoré neboli ošetrené s testovanou zlúčeninou, indikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje umieranie buniek. Naproti tomu vyšší alebo rovnaký počet žijúcich buniek v populácii normálnych buniek ošetrených testovanou zlúčeninou v porovnaní s počtom žijúcich buniek v populácii normálnych buniek, ktoré neboli ošetrené s testovanou zlúčeninou, neindikuje testovanú zlúčeninu, ktorá podporuje umieranie buniek.

Predložený vynález sa týka sčasti aj spôsobov modulácie aktivity proteínu MLK pozostávajúcich z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so

zlúčeninou vzorca G (tu označovaný ako vzorec I) uvedenou v patente USA č. 5,705,511, ktorý je udelený prihlasovateľovi predloženej prihlášky a týmto sa celý zahŕňa odkazom.

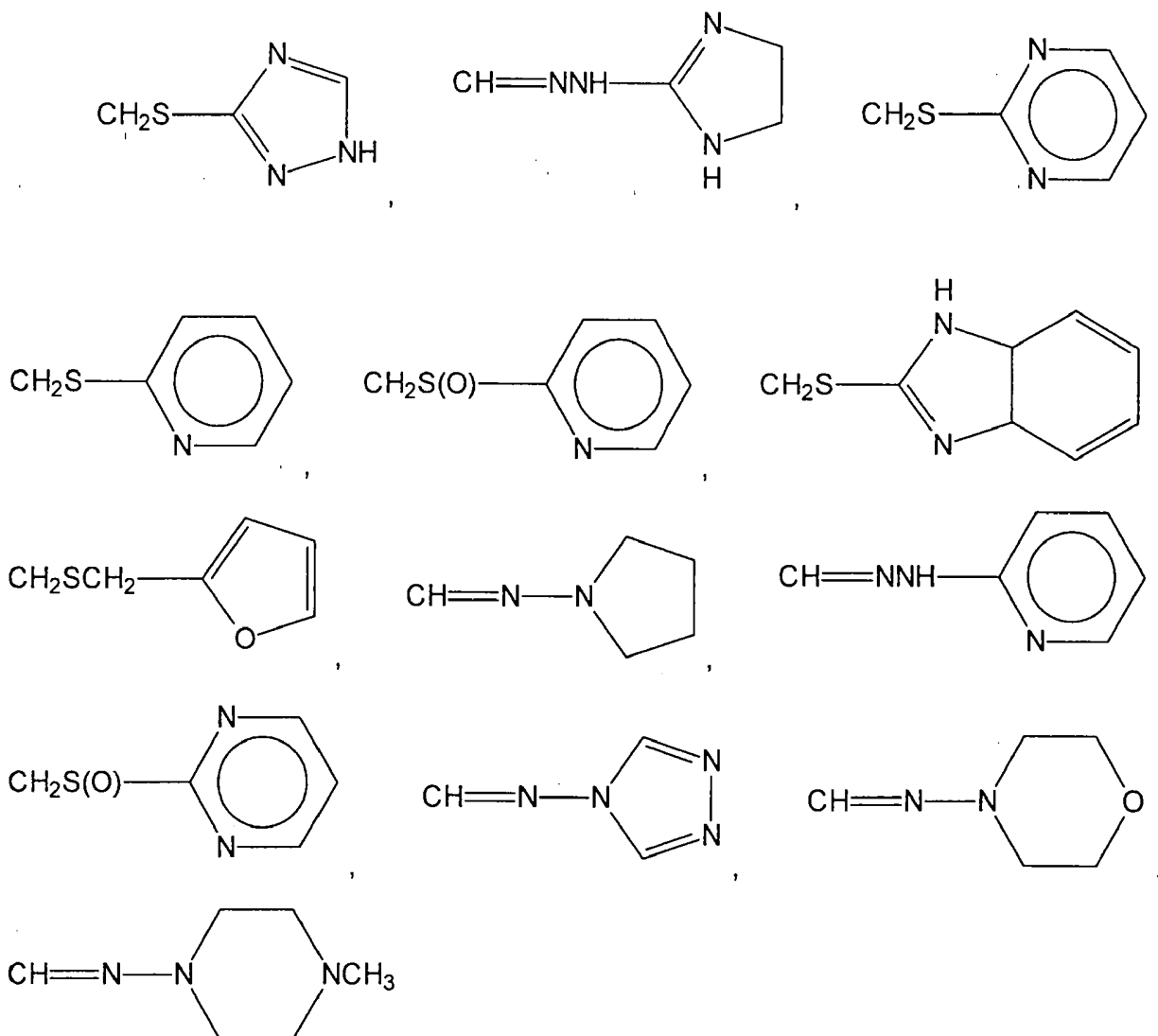
Predložený vynález sa týka sčasti aj spôsobov modulácie aktivity proteínu MLK pozostávajúcich z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou nižšie uvedeného vzorca III:



kde:

Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria =O;

R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Cl, $\text{CH}_2\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, Br, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, n-C₄H₉, $\text{NHCONHC}_6\text{H}_5$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH₃, $\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$, NHCO_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, OH, O-n-propyl, $\text{CH}=\text{NNH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CH}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{n-C}_4\text{H}_9$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazín})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$,

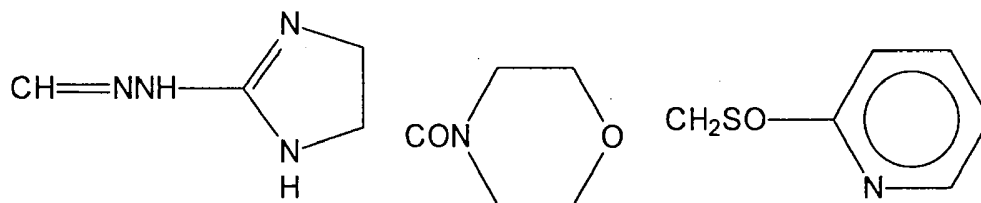


a

R^2 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazin})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ a CH_2OH ;

X je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerínH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycín}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2^-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serín}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH , $\text{CH}_2\text{NH-Prolín}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, CH=NNHC(=NH)NH_2 , $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, CH=NNHCONH_2 , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}^-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$,

$\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2\text{n-hexyl}$, CONHCH_3 a $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$; alebo jeden z nasledujúcich vzorcov

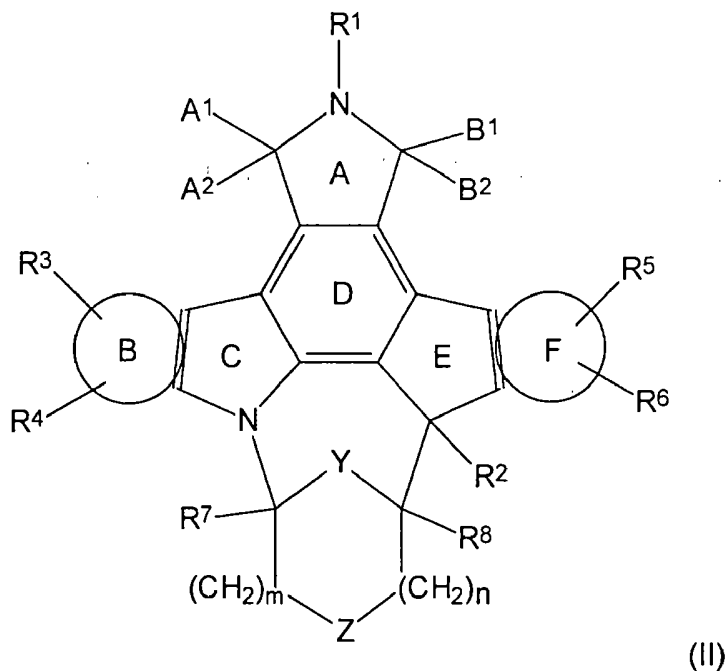


a

R je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z OH a OCH_3 .

Vo výhodných uskutočneniach vynálezu Z^1 a Z^2 sú H, X je CO_2CH_3 , R^1 je $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, R^2 je $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$ a R je OH. V ďalších výhodných uskutočneniach vynálezu Z^1 a Z^2 sú H, X je CO_2CH_3 ; R^1 a R^2 sú $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ a R je OH; alebo Z^1 a Z^2 sú H, X je CO_2CH_3 , R^1 a R^2 sú $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ a R je OH; alebo Z^1 , Z^2 , R^1 a R^2 sú H, X je CO_2CH_3 ; a R je OH; alebo Z^1 , Z^2 , R^1 a R^2 sú H, X je $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ a R je OH; alebo Z^1 , Z^2 a R^1 sú H, R^2 je CH_2OH , X je CO_2CH_3 a R je OH; alebo Z^1 a Z^2 sú H, R^1 a R^2 sú $\text{H}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazín})]$, X je CO_2CH_3 a R je OH; alebo Z^1 a Z^2 sú H, R^1 je Br, R^2 je I, X je CO_2CH_3 ; a R je OH; alebo Z^1 a Z^2 sú H, R^1 a R^2 sú $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X je CO_2CH_3 a R je OH; alebo Z^1 , Z^2 , R^1 a R^2 sú H, X je CO_2CH_3 a R je OCH_3 ; alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=\text{O}$, R^1 a R^2 sú Br, X je CO_2CH_3 a R je OH.

Predložený vynález sa týka sčasti aj spôsobov modulácie aktivity proteínu MLK pozostávajúcich z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou nižšie uvedeného vzorca II:



kde:

kruh B a kruh F nezávisle a každý spolu s uhlíkovými atómami, na ktoré sú pripojené, sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

a) nenasýtený 6-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom od 1 do 3 uhlíkových atómov môže byť nahradených atómami dusíka;

b) nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh; a

c) nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom buď

1) jeden atóm uhlíka je nahradený atómom kyslíka, dusíka alebo síry;

2) dva atómy uhlíka sú nahradené atómom síry a dusíka, atómom kyslíka a dusíka, alebo dvoma atómami dusíka; alebo

3) tri atómy uhlíka sú nahradené tromi atómami dusíka;

R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

a) H, substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl majúci 1 až 4 uhlíky, substituovaný alebo nesubstituovaný aryl, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl,

substituovaný alebo nesubstituovaný heteroaryl, alebo substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

b) $-C(=O)R^9$, kde R^9 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí alkyl, aryl a heteroaryl;

c) $-OR^{10}$, kde R^{10} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci 1 až 4 uhliky;

d) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$ a $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, kde p je od 1 do 4; a kde buď

1) R^{11} a R^{12} sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov; alebo

2) R^{11} a R^{12} spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, kde X^1 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí -O-, -S- a $-CH_2-$;

R^2 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, -OH, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, a substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí:

a) H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, -CN, CF_3 , $-NO_2$, -OH, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$;

b) $-CH_2OR^{14}$, kde R^{14} je zvyšok aminokyseliny po odstránení hydroxylovej skupiny karboxylovej skupiny;

c) $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ alebo $-CH=NNR^2R^{2A}$, kde R^{2A} je rovnaké ako R^2 ;

d) $-S(O)_yR^2$, $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$, kde y je 0, 1 alebo 2;

e) alkyl majúci od 1 do 8 uhlíkov, alkenyl majúci od 2 do 8 uhlíkov a alkynyl majúci 2 až 8 uhlíkov, kde

1) každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je nesubstituovaný; alebo

2) každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je substituovaný 1 až 3 skupinami vybranými zo skupiny, ktorú tvorí aryl majúci od 6 do 10 uhlíkov, heteroaryl, arylalkoxy, heterocykloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkyloxy-alkoxy, hydroxyalkyltio, alkoxyalkyltio, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂, -OH, -OR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pCO₂R⁹, -X²(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahydropyranyl, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰C(=O)R⁹, -NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -NHC(=NH)NH₂, NR¹⁰S(O)₂R⁹, -S(O)_yR⁹, -CO₂R², -C(=O)NR¹¹R¹², -C(=O)R², -CH₂OR¹⁰, -CH=NNR²R^{2A}, -CH=NOR², -CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -S(=O)₂NR²R^{2A}, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -OR¹⁴ a monosacharid majúci od 5 do 7 uhlíkov, kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je buď nesubstituovaná alebo nahradená H, alkylom majúcim od 1 do 4 uhlíkov, alkylkarbonyloxylom majúcim od 2 do 5 uhlíkov alebo alkoxylom majúcim od 1 do 4 uhlíkov;

X² je O, S alebo NR¹⁰;

R⁷ a R⁸ sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹² a -(CH₂)_pNR¹¹R¹²; alebo R⁷ a R⁸ spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca -CH₂-X³-CH₂-, kde X³ je X² alebo väzba;

m a n sú každé nezávisle 0, 1 alebo 2;

Y je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí -O-, -S-, -N(R¹⁰)-, -N⁺(O⁻)(R¹⁰)-, -N(OR¹⁰)- a -CH₂-;

Z je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí väzba, -O-, -CH=CH-, -S-, -C(=O)-, -CH(OR¹⁰)-, -N(R¹⁰)-, -N(OR¹⁰)-, -CH(NR¹¹R¹²)-, -C(=O)N(R¹⁷)-, -N(R¹⁷)C(=O)-, -N(S(O)_yR⁹)-,

$-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ a $-CH(O(C(=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, kde R^{9A} je rovnaké ako R^9 ;

R^{15} a R^{16} sú nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, $-OH$, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C(=O)R^9$, hydroxyalkyl a $-CO_2R^{10}$;

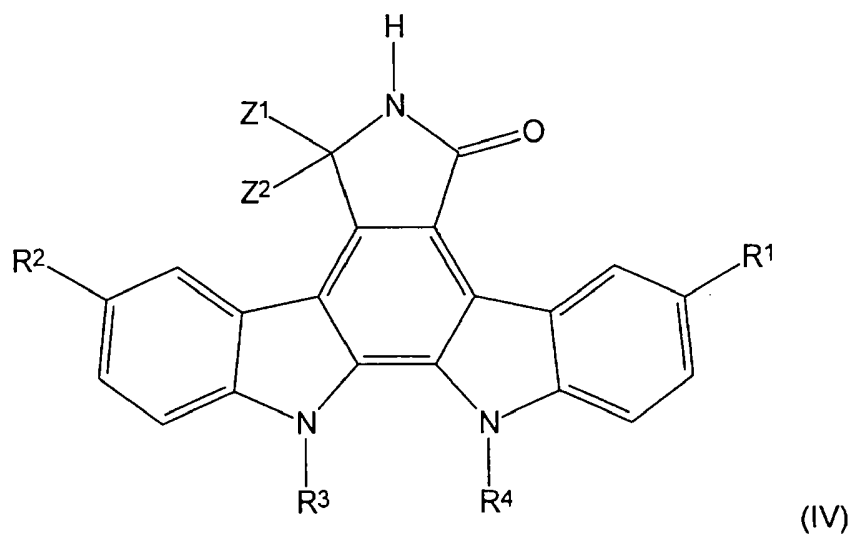
R^{17} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl, aryl a heteroaryl;

A^1 a A^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, H; H, OR^2 ; H, $-SR^2$; H, $-N(R^2)_2$ a skupina, kde A^1 a A^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $=O$, $=S$ a $=NR^2$;

B^1 a B^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, H; H, $-OR^2$; H, $-SR^2$; H, $-N(R^2)_2$ a skupina, kde B^1 a B^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $=O$, $=S$ a $=NR^2$;

s výhradou, že aspoň jeden z párov A^1 a A^2 , alebo B^1 a B^2 , tvorí $=O$.

Predložený vynález sa týka sčasti aj spôsobov modulácie aktivity proteínu MLK pozostávajúcich z kontaktovania proteínu alebo bunky obsahujúcej tento proteín so zlúčeninou nižšie uvedeného vzorca IV:



kde:

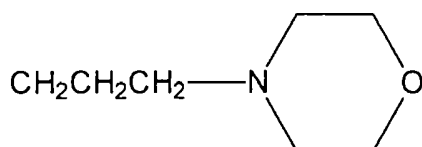
Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=O$;

R^1 je H alebo Br;

R^2 je H;

R^3 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$,

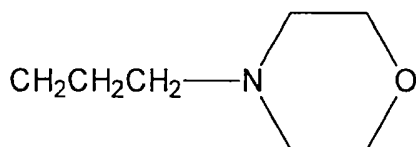
alebo



a

R^4 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ alebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Vo výhodných uskutočneniach vynálezu R^1 , R^2 , R^4 , Z^1 a Z^2 sú H a R^3 je $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$. V ďalších výhodných uskutočneniach vynálezu R^1 je Br a R^2 , R^3 , R^4 , Z^1 a Z^2 sú H; alebo R^1 , R^2 , Z^1 a Z^2 sú H a R^3 a R^4 sú $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$; alebo R^1 , R^2 , R^3 , Z^1 a Z^2 sú H a R^4 je $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$; alebo R^1 , R^2 , Z^1 a Z^2 sú H a R^3 a R^4 sú $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; alebo R^1 , R^2 , R^4 , Z^1 a Z^2 sú H a R^3 je



Predložený vynález poskytuje aj spôsoby na identifikáciu zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe neurodegeneratívnych porúch, pozostávajúce z kontaktovania bunky alebo bunkového extraktu obsahujúceho proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou a určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov. Bunky a extrakty z nich obsahujú vyššie uvedené. Zlúčeniny, ktoré sa nájdu pomocou týchto metód (t.j. zlúčeniny, ktoré inhibujú alebo znižujú aktivitu proteín kinázy viacerých rodov) môžu byť užitočné na liečbu neurodegeneratívnych porúch. Proteín je s výhodou vybraný zo skupiny pozostávajúcej z kinázy viacerých rodov 1, kinázy viacerých rodov 2, kinázy viacerých rodov 3, kinázy nesúcej leucínový zips, kinázy nesúcej duálny leucínový zips a

kinázy viacerých rodov 6. Bunka sa kontaktuje *in vitro* alebo *in vivo*. Aktivita proteínu sa s výhodou určí meraním aktivity alebo fosforylačného stavu substrátu uvedeného proteínu. Substrát je s výhodou vybraný zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a cicavčieho homológu AEX-3, ako aj všeobecných substrátov Ser/Thr, ako je napríklad myelinový bázičný proteín (MBP). Aktivitu proteínu možno určiť aj meraním aktivity substrátu proteínu, množstva substrátu proteínu alebo mRNA kódujúcej substrát proteínu. Aktivitu proteínu možno určiť aj *in vitro* kinázovým testom alebo testom viazania. Bunky sú s výhodou primárne embryonálne motoneurónové bunky, bunky, ktoré nadmerne exprimujú proteín kinázy viacerých rodov alebo neurónové bunky, ale môžu to byť akékoľvek bunky alebo extrakty z nich. Zlúčeniny, ktoré priamo viažu proteín kinázy viacerých rodov, sa identifikujú vyššie opísanými spôsobmi.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby na identifikáciu zlúčenín, ktoré môžu byť užitočné pri liečbe zápalu, pozostávajúce z kontaktovania bunky alebo bunkového extraktu obsahujúceho proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou a určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov. Bunky a extrakty z nich obsahujú vyššie uvedené. Zlúčeniny, ktoré sa nájdu pomocou týchto metód (t.j. zlúčeniny, ktoré inhibujú alebo znižujú aktivitu proteín kinázy viacerých rodov) môžu byť užitočné pri liečbe zápalu. Proteín je s výhodou vybraný zo skupiny pozostávajúcej z kinázy viacerých rodov 1, kinázy viacerých rodov 2, kinázy viacerých rodov 3, kinázy nesúcej leucínový zips, kinázy nesúcej duálny leucínový zips a kinázy viacerých rodov 6. Bunka sa kontaktuje *in vitro* alebo *in vivo*. Aktivita proteínu sa s výhodou určí meraním aktivity alebo fosforylačného stavu substrátu uvedeného proteínu. Substrát je s výhodou vybraný zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a cicavčieho homológu AEX-3, ako aj všeobecných substrátov Ser/Thr, ako je napríklad myelinový bázičný proteín (MBP). Aktivitu proteínu možno určiť aj meraním aktivity substrátu proteínu, množstva substrátu proteínu alebo mRNA kódujúcej substrát proteínu. Aktivitu proteínu možno určiť aj *in vitro* kinázovým testom alebo testom viazania.

Bunky sú s výhodou primárne embryonálne motoneurónové bunky, bunky, ktoré nadmerne exprimujú proteín kinázy viacerých rodov alebo neurónové bunky, ale môžu to byť akékoľvek bunky alebo extrakty z nich. Medzi bunky patria okrem iných aj tie, ktoré sú zapojené do zápalu, napríklad lymfocyty, makrofágy a iné biele krvinky všeobecne známe odborníkom. S výhodou sa identifikujú zlúčeniny, ktoré priamo viažu proteín kinázy viacerých rodov.

Predložený vynález poskytuje aj spôsoby liečby cicavca, ktorý má neurodegeneratívnu poruchu alebo podozrenie na ňu, pozostávajúci z podania zlúčeniny, ktorá inhibuje alebo znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, tomuto cicavcovi. Zlúčeniny, ktoré inhibujú alebo znižujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, zahŕňajú okrem iných zlúčeniny vzorca I, II, III a IV. Medzi výhodné zlúčeniny patria zlúčeniny opísané vyššie v súvislosti so spôsobom skrínungu zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov a buď podporujú prežívanie buniek alebo umieranie buniek. Výhodným cicavcom je človek. Jednotlivec môže mať podozrenie na neurodegeneratívnu chorobu, ak má tento jednotlivec symptómy konkrétnej neurodegeneratívnej choroby, je v rizikovej skupine, alebo má neurodegeneratívnu chorobu v rodinnej anamnéze.

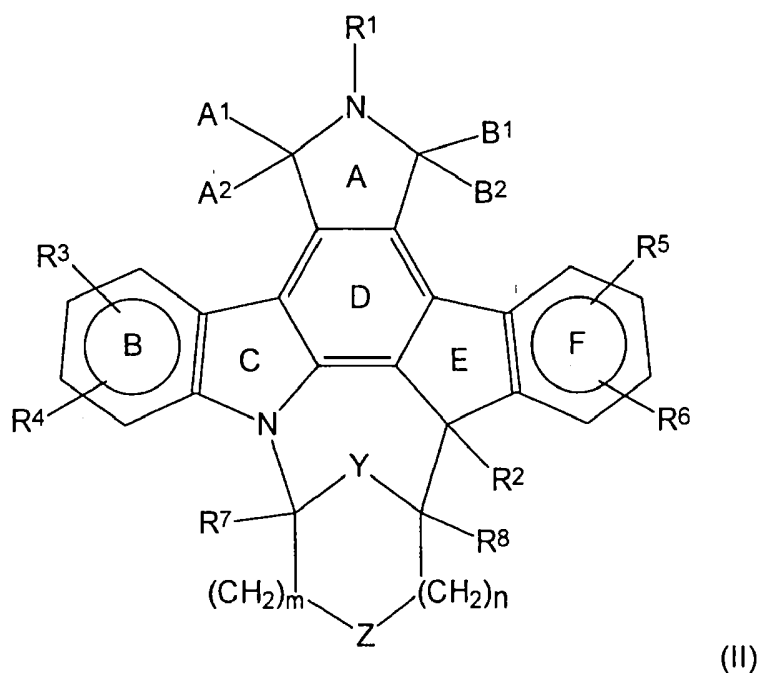
Predložený vynález poskytuje aj spôsoby liečby cicavca, ktorý má zápal, pozostávajúci z podania zlúčeniny, ktorá inhibuje alebo znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, tomuto cicavcovi. Zlúčeniny, ktoré inhibujú alebo znižujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov, zahŕňajú okrem iných zlúčeniny vzorca I, II, III a IV. Medzi výhodné zlúčeniny patria zlúčeniny opísané vyššie v súvislosti so spôsobom skrínungu zlúčenín, ktoré modulujú aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov a buď podporujú prežívanie buniek alebo umieranie buniek. Výhodným cicavcom je človek.

Kontaktovanie so zlúčeninami vzorcov I – IV môže prebiehať v tlmivých roztokoch alebo médiách známych odborníkom v danej oblasti. Kontaktovanie môže alternatívne prebiehať podaním farmaceutickej kompozície obsahujúcej testovanú zlúčeninu a farmaceuticky prijateľnú soľ, nosič alebo riedidlo vhodnému zvieraťu alebo cicavcovi, napríklad myši alebo inému vhodnému zvieraťu známemu odborníkom v danej oblasti. Okrem toho možno použiť rôzne počty buniek a koncentrácie zlúčenín. Bunky, ktoré sa

kontaktujú s testovanými zlúčeninami, môžu byť akékoľvek bunky cicavcov. Bunkou je s výhodou neurónová bunka. Bunka je s výhodou zapojená do neurodegeneratívnej choroby, napríklad do Alzheimerovej choroby, choroby motorických neurónov, amyotrofnej laterálnej sklerózy, Parkinsonovej choroby, cerebrovaskulárnej choroby, ischemických stavov, AIDS demencie, epilepsie, Huntingtonovej choroby a nárazových alebo prienikových zranení mozgu alebo miechy. Zlúčeniny vzorca I a spôsoby ich prípravy sú opísané v patente USA 5,705,511, ktorý sa týmto celý zahŕňa odkazom. Zlúčeniny vzorca III a spôsoby ich prípravy sú opísané v patentoch USA 5,741,8098, 5,621,100, 5,621,101, 5,461,146 a 5,756,494 a WO 97/46567, ktoré sa týmto celé zahŕňajú odkazom. Zlúčeniny vzorca IV a spôsoby ich prípravy sú opísané v patentoch USA 5,741,8098, 5,621,100, 5,621,101, 5,461,146 a 5,756,494 a WO 97/46567, ktoré sa týmto celé zahŕňajú odkazom.

Medzi zlúčeniny vzorca II patria diastereoizoméry a enantioméry okolo atómov uhlíka, ku ktorým sú pripojené substituenty R^2 , R^7 a R^8 .

Výhodné premostené indenopýrolokarbazoly predstavuje vzorec II:



V niektorých výhodných uskutočneniach zlúčenín vzorca II je R^1 H. V ďalších výhodných uskutočneniach je R^2 H, hydroxyl alebo substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl.

V ďalších výhodných uskutočneniach sú R^3 , R^4 , R^5 a R^6 nezávisle H, substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl, halogén, substituovaný alebo nesubstituovaný alkoxy, substituované alebo nesubstituované amino alebo substituovaný alebo nesubstituovaný aryl. V ďalších výhodných uskutočneniach je R^7 a R^8 nezávisle H alebo substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl.

V niektorých výhodných uskutočneniach je Y O. V ďalších výhodných uskutočneniach je Z väzba, O, S alebo substituovaný alebo nesubstituovaný N. V ďalších výhodných uskutočneniach sú m a n nezávisle 1 alebo 2. V niektorých osobitne výhodných uskutočneniach je Y O, Z je väzba alebo O a m a n sú nezávisle 1 alebo 2.

V ďalších výhodných uskutočneniach je $A^1 A^2$ a $B^1 B^2$ sú =O alebo H, H.

V niektorých osobitne výhodných uskutočneniach sú R^1 , R^4 , R^6 aj R^7 H, Y je =O, n je 1, $A^1 A^2$ a $B^1 B^2$ sú =O alebo H, H, R^2 je H, OH alebo nižší alkyl, R^3 je H alebo substituovaný alkyl, R^5 a R^8 sú každé H alebo alkoxy, pričom metoxy je výhodnejšie, Z je väzba alebo O a m je 1 alebo 2.

Niektorými osobitne výhodnými uskutočneniami zlúčenín vzorca II sú zlúčeniny II-1, II-2, II-3, II-4a, II-4b, II-5, II-6, II-7a, II-7b, II-8, II-9, II-10, II-11 a II-12 uvedené v tabuľke 1.

Zlúčeniny, ktoré predstavuje vzorec II, sa ďalej označujú ako zlúčenina (II).

V tu používanom význame sa pojem „karbocyklický“ vzťahuje na cyklické skupiny, v ktorých je kruhová časť zložená výlučne z atómov uhlíka. Pojmy „heterocyklo“ a „heterocyklický“ sa vzťahujú na cyklické skupiny, v ktorých kruhová časť obsahuje aspoň jeden heteroatóm ako O, N alebo S.

V tu používanom význame pojem „alkyl“ znamená lineárny, cyklický alebo rozvetvený alkyl majúci 1 až 8 atómov uhlíka, napríklad metyl, etyl, propyl, izopropyl,

butyl, izobutyl, *sek*-butyl, *terc*-butyl, pentyl, izoamyl, neopentyl, 1-etylpropyl, hexyl, oktyl, cyklopropyl a cyklopentyl. Alkylové zoskupenie skupín obsahujúcich alkyl, napríklad alkoxy, alkoxykarbonyl a alkylaminokarbonyl, má rovnaký význam ako vyššie definovaný alkyl. Nižšie alkylové skupiny, ktoré sú výhodné, sú alkylové skupiny s vyššie uvedeným významom, ktoré obsahujú 1 až 4 uhliky. Pojem „alkenyl“ zahŕňa lineárne alebo rozvetvené uhľovodíkové reťazce majúce aspoň jednu dvojitú väzbu uhlík-uhlík. Medzi príklady na alkenylové skupiny patrí etenyl a propenyl. V tu používanom význame pojem „alkinyl“ zahŕňa lineárne alebo rozvetvené uhľovodíkové reťazce majúce aspoň jednu trojitú väzbu uhlík-uhlík. Medzi príklady na alkinylové skupiny patrí etinyl a propinyl.

Acylové zoskupenie skupín obsahujúcich acyl ako napríklad acyloxyskupín zahŕňa lineárny alebo rozvetvený alkanoyl majúci 1 až 6 atómov uhlíka, napríklad formyl, acetyl, propanoyl, butyryl, valeryl, pivaloyl alebo hexanoyl.

V tu používanom význame pojem „aryl“ znamená skupinu majúcu 6 až 12 atómov uhlíka, napríklad fenyl, bifenyl a naftyl. Medzi výhodné arylové skupiny patrí nesubstituovaný alebo substituovaný fenyl a naftyl. Pojem „heteroaryl“ v tu používanom význame označuje aryl, v ktorom je jeden alebo viacero kruhových atómov uhlíka nahradených hetero (t.j. neuhlíkovým) atómom, napríklad O, N alebo S. Medzi výhodné heteroarylové skupiny patrí pyridyl, pyrimidyl, pyrolyl, furyl, tienyl, imidazolyl, triazolyl, tetrazolyl, chinolyl, izochinolyl, benzimidazolyl, tiazolyl, pyrazolyl a benzotiazolyl.

Pojem „aralkyl“ (alebo „arylalkyl“) označuje skupinu majúcu od 7 do 15 uhlíkov pozostávajúcu z alkylovej skupiny, ktorá nesie aryl. Medzi príklady aralkylov patrí benzyl, fenetyl, benzhydryl a naftylmetyl.

Alkylové skupiny a alkylové zoskupenia obsiahnuté v substituentoch ako aralkyl, alkoxy, arylalkoxy, hydroxyalkoxy, alkoxy-alkoxy, hydroxy-alkyltio, alkoxy-alkyltio, alkylkarbonyloxy, hydroxyalkyl a acyloxy môžu byť substituované alebo nesubstituované. Substituovaný alkyl má 1 až 3 nezávisle vybrané substituenty, s výhodou hydroxy, nižší alkoxy, nižší alkoxy-alkoxy, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkoxy-nižší alkoxy; substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkoxy-nižší alkoxy, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný alebo nesubstituovaný heterocykloalkoxy,

halogén, karboxyl, nižší alkoxykarbonyl, nitro, amino, mono- alebo di-nížší alkylamino, dioxolán, dioxán, ditiolán, ditión, furán, laktón alebo laktám.

Substituovaný aryl, substituovaný heteroaryl a substituovaný aralkyl majú 1 až 3 nezávisle vybrané substituenty, ktorými sú s výhodou nižší alkyl, hydroxy, nižší alkoxy, karboxy, nižší alkoxykarbonyl, nitro, amino, mono- alebo di-nížší alkylamino a halogén.

Medzi heterocyklické skupiny tvorené s atómom dusíka patrí pyrolidinyľ, piperidinyľ, piperidino, morfolinyľ, morfolino, tiomorfolino, N-metylpiperazinyľ, indolyľ, izoindolyľ, imidazol, imidazolín, oxazolín, oxazol, triazol, tiazolín, tiazol, pyrazol, pyrazolón and triazol. Medzi heterocyklické skupiny tvorené s atómom kyslíka patrí furán, tetrahydrofurán, pyrán a tetrahydropyrán.

„Hydroxyalkyly“ sú alkylly, ktoré majú pripojený hydroxyl.

Medzi halogény patrí fluór, chlór, bróm a jód.

V tu používanom význame znamená pojem „heteroarylalkyl“ arylalkylovú skupinu, ktorá obsahuje heteroatóm. Pojem „oxy“ označuje prítomnosť atómu kyslíka. Teda „alkoxy“ znamená alkylly, ktoré sú pripojené cez atóm kyslíka, a „karbonyloxy“ znamená karbonylové skupiny, ktoré sú pripojené cez atóm kyslíka.

Pojem „heterocykloalkoxy“ znamená alkoxyľ, ktorý má na svoje alkylové zoskupenie pripojenú heterocyklickú skupinu, a pojem „arylalkoxy“ znamená alkoxyľ, ktorý má na svoje alkylové zoskupenie pripojený aryl. Pojem „alkylkarbonyloxy“ znamená skupinu vzorca $-O-C(=O)-alkyl$.

V tu používanom význame pojem „alkyloxy-alkoxy“ označuje alkoxyľ, ktorý obsahuje alkyloxy substituent pripojený na alkyl. Pojem „alkoxy-alkyltio“ znamená skupinu alkyltio (t.j. skupinu vzorca $-S-alkyl$), ktorá obsahuje alkoxy substituent pripojený na jej alkylové zoskupenie. Pojem „hydroxy-alkyltio“ znamená skupinu alkyltio (t.j. skupinu vzorca $-S-alkyl$), ktorá obsahuje hydroxy substituent pripojený na jej alkylové zoskupenie.

V tu používanom význame má pojem „monosacharid“ zvyčajný význam jednoduchého cukru.

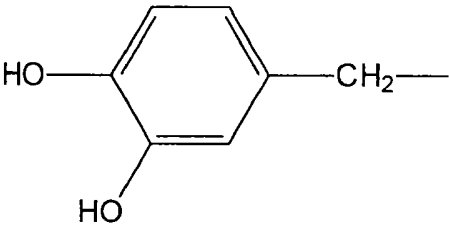
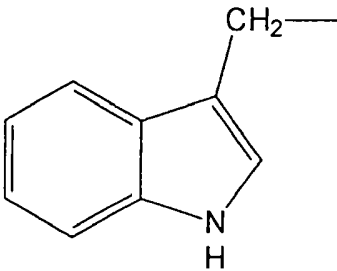
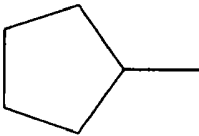
V tu používanom význame pojem „aminokyselina“ označuje molekulu obsahujúcu aminoskupinu a karboxylovú skupinu. Medzi príklady aminokyselín patria α -aminokyseliny, t.j. karboxylové kyseliny všeobecného vzorca $\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-(vedľajší reťazec)}$.

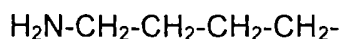
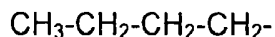
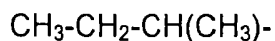
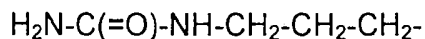
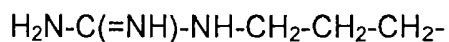
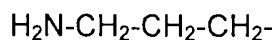
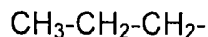
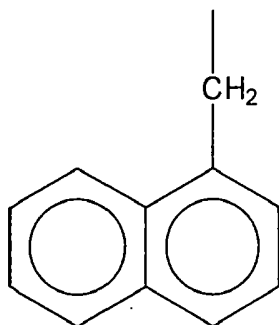
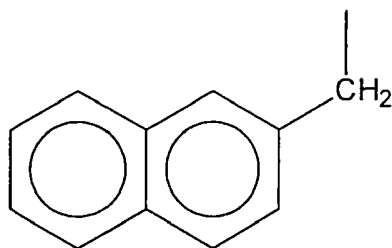
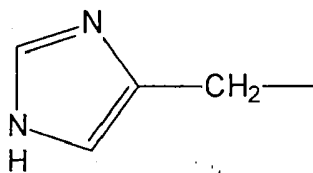
Medzi vedľajšie reťazce aminokyselín patria prírodne sa vyskytujúce a neprírodné zoskupenia. Neprírodné aminokyselinové vedľajšie reťazce sú zoskupenia, ktoré sa používajú namiesto prírodne sa vyskytujúcich aminokyselinových vedľajších reťazcov, napríklad v aminokyselinových analógoch. Pozrite napríklad Lehninger, Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, Inc, 1975, strany 73-75, zahrnuté odkazom.

Medzi výhodné α -aminokyseliny patrí glycín, alanín, prolín, kyselina glutámová a lyzín, ktoré majú D konfiguráciu, L konfiguráciu, alebo sú vo forme racemátu.

Vedľajšie reťazce ďalších reprezentatívnych α -aminokyselín sú uvedené nižšie v tabuľke 1.

Tabuľka 1

$\text{CH}_3\text{-}$	$\text{HS-CH}_2\text{-}$
$\text{HO-CH}_2\text{-}$	$\text{HO}_2\text{C-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$
$\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-}$	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
	$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
	$\text{CH}_3\text{-CH}(\text{OH})\text{-}$
	$\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-NHC(=O)-CH}_2\text{-}$
	
	$\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
	$\text{NH}_2\text{C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-}$
	$(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$



V niektorých výhodných uskutočneniach substitučné skupiny pre zlúčeniny vzorca II zahŕňajú zvyšok aminokyseliny po odstránení hydroxylovej skupiny jej karboxylovej skupiny; t.j. skupiny vzorca $\text{-C(=O)-CH(NH}_2\text{)-}$ (vedľajší reťazec).

Funkčné skupiny prítomné na zlúčeninách vzorca II môžu obsahovať chrániace skupiny. Napríklad aminokyselinové vedľajšie reťazce ako substituenty zlúčenín vzorca II môžu byť substituované chrániacimi skupinami ako benzyloxykarbonyl alebo *t*-butoxykarbonyl. Chrániace skupiny sú známe ako chemické funkčné skupiny, ktoré možno selektívne naviazať a odstrániť zo skupín, ako sú hydroxylové skupiny a karboxylové skupiny. Tieto skupiny sú prítomné v chemickej zlúčenine, aby takú funkčnú skupinu urobili inertnou voči podmienkam chemickej reakcie, ktorým je zlúčenina vystavená. V predložennom vynáleze možno použiť ktorúkoľvek z radu chrániacich skupín. Jednou z takých chrániacich skupín je benzyloxykarbonyl (Cbz; Z). Ďalšie výhodné chrániace skupiny podľa vynálezu možno nájsť v Greene, T. W. a Wuts, P. G. M., „Protective Groups in Organic Synthesis“ 2. vyd., Wiley & Sons, 1991.

Premostené indenopyrolokarbazolové zlúčeniny majú dokázané významné funkčné farmakologické aktivity, ktoré nachádzajú uplatnenie v celom rade situácií vrátane výskumu a terapie. Tieto deriváty sú užitočné ako terapeutické prostriedky. Aktivity zlúčenín vykazujú pozitívne efekty na funkciu a/alebo prežitie buniek reagujúcich na trofický faktor. Účinok na funkciu a/alebo prežitie buniek reagujúcich na trofický faktor, napr. bunky neurónovej rodiny, bol preukázaný pomocou ktoréhokoľvek z nasledujúcich testov. (1) test kultivovanej acetyltransferázy cholínu miechy („ChAT“ – choline acetyltransferase); alebo (2) test aktivity ChAT kultivovaných neurónov bazálneho predného mozgu.

V tu používanom význame pojem „účinok“, keď sa používa ako rozvinutie pojmov „funkcia“ a „prežitie“ znamená pozitívnu alebo negatívnu premenu alebo zmenu. Účinok, ktorý je pozitívny, tu môže byť označený ako „zlepšenie“ alebo „podporujúci“ a účinok, ktorý je negatívny, tu môže byť označený ako „inhibícia“ alebo „inhibujúci“.

V tu používanom význame pojmy „podporiť“ alebo „zlepšujúci“ pri použití ako rozvinutie pojmov „funkcia“ alebo „prežitie“ znamená, že prítomnosť premostenej indenopyrolokarbazolovej zlúčeniny má kladný účinok na funkciu a/alebo prežitie bunky reagujúcej na trofický faktor v porovnaní s bunkou za neprítomnosti zlúčeniny. Napríklad (nie je myslené obmedzujúco) vzhľadom na prežitie napríklad cholinergického neurónu by zlúčenina vykazovala zlepšenie prežívania cholinergickej neurónovej populácie ohrozenej smrťou (v dôsledku napríklad zranenia, chorobného stavu, degeneratívneho stavu alebo prirodzeného progresu) v porovnaní s cholinergickou neurónovou populáciou, na ktorú nepôsobí taká zlúčenina, keby liečená populácia mala pomerne väčšie obdobie funkčnosti ako neliečená populácia.

V tu používanom význame „inhibovať“ a „inhibícia“ znamená, že špecifikovaná odozva určeného materiálu (napr. enzymatická aktivita) je pomerne znížená za prítomnosti premostenej indenopyrolokarbazolovej zlúčeniny.

V tu používanom význame sa pojem „*trk*“ vzťahuje na rodinu vysokoafinitných neurotrofinových receptorov v súčasnosti pozostávajúcu z *trkA*, *trkB* a *trkC*, a na ďalšie proteíny spojené s membránami, na ktoré sa neurotrofin môže viazať.

V tu používanom význame inhibícia VEGFR implikuje použiteľnosť napríklad pri chorobách, kde angiogenéza hrá dôležitú úlohu, napríklad rakovina alebo tuhé nádory, endometrióza, diabetická retinopatia, psoriáza, hemangioblastóm ako aj iné očné choroby a rakoviny.

Inhibícia trk implikuje použiteľnosť napríklad pri chorobách prostaty, napríklad pri rakovine prostaty a benígnej hyperplázii prostaty, a liečbe zápalovej bolesti.

Inhibícia receptora rastového faktora odvodeného z trombocytov (PDGFR – Platelet Derived Growth Factor Receptor) implikuje použiteľnosť napríklad pri rôznych formách neoplázie, reumatoidnej artritídy, pulmonárnej fibrózy, myelofibrózy, abnormálnom hojení rán, chorobách s kardiovaskulárnymi prejavmi ako ateroskleróza, restenóza, restenóza po angioplastike, atď.

V tu používanom význame sa pojmy „rakovina“ a „rakovinový“ vzťahujú na akúkoľvek malígnu proliferáciu buniek u cicavca. Medzi príklady patria rakoviny prostaty, benígna hyperplázia prostaty, rakoviny vaječníkov, prsníkov, mozgu, pľúc, pankreasu, kolorektálna rakovina, rakovina žalúdka, tuhé nádory, rakovina hlavy a krku, neuroblastóm, karcinóm renálnych buniek, lymfóm, leukémia, iné známe zhubné nádory hematopoetických systémov a iné známe rakoviny.

V tu používanom význame pojmy „neurón“, „bunka neurónovej rodiny“ a „neurónová bunka“ zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na heterogénnu populáciu neurónových typov s jednotlivými alebo viacerými transmitrami a/alebo jednotlivými alebo viacerými funkciami; s výhodou ide o cholinergické a senzorické neuróny. V tu používanom význame slovné spojenie „cholinergický neurón“ znamená neuróny centrálnej nervovej sústavy (CNS) a periférnej nervovej sústavy (PNS), ktorých neurotransmitrom je acetylcholín; príkladmi sú bazálny predný mozog, neuróny priečne pruhovaného svalstva a miechové neuróny. V tu používanom význame fráza „senzorický neurón“ zahŕňa neuróny reagujúce na environmentálne podnety (napr. teplota, pohyb) napríklad z kože, svalov a kĺbov; príkladom je neurón z ganglionu zadného senzorického koreňa miechových nervov.

„Bunka reagujúca na trofický faktor“ podľa tu používaného významu je bunka, ktorá obsahuje receptor, na ktorý sa môže špecificky viazať trofický faktor; medzi príklady patria neuróny (napr. cholinergické a senzorické neuróny) a neneurónové bunky (napr. monocyty a neoplastické bunky).

Premostené indenopyrolokarbazolové zlúčeniny tu opísané nachádzajú uplatnenie vo výskume i v terapii, napríklad pri inhibícii enzýmovej aktivity. Napríklad vo výskume možno zlúčeniny použiť vo vývoji testov a modelov na ďalšie zlepšenie pochopenia úloh, ktoré hrá inhibícia serín/treonín alebo tyrozín proteín kinázy (napr. PKC, *trk* tyrozín kinázy) v mechanistických aspektoch súvisiacich porúch a chorôb. V terapii možno zlúčeniny, ktoré inhibujú tieto enzýmové aktivity, použiť na inhibíciu škodlivých dôsledkov týchto enzýmov vzhľadom na choroby, ako je rakovina.

Ako dokazujú nižšie uvedené príklady, inhibíciu enzýmovej aktivity pomocou premostených indenopyrolokarbazolových zlúčenín možno určiť napríklad pomocou nasledujúcich testov:

1. Test inhibície aktivity tyrozín kinázy *trk* A;
2. Inhibícia fosforylácie *trk* stimulovanej NGF v celobunkovom prípravku;
3. Test inhibície kinázy vaskulárneho endotelového receptora rastového faktora;
4. Test inhibície aktivity PKC;
5. Test inhibície PDGFR.

Uvedené premostené indenopyrolokarbazolové zlúčeniny možno použiť na zlepšenie funkcie a/alebo prežitia buniek neurónovej rodiny u cicavca, napríklad človeka. V týchto kontextoch možno tieto zlúčeniny použiť jednotlivo alebo s inými kondenzovanými pyrolokarbazolmi a/alebo indolokarbazolmi, alebo v kombinácii s inými užitočnými molekulami, ktoré tiež vykazujú schopnosť ovplyvňovať funkciu a/alebo prežitie cieľovej bunky.

Rad neurologických porúch je charakterizovaný neurónovými bunkami, ktoré umierajú, sú poranené, funkčne narušené, podliehajú axonálnej degenerácii, sú ohrozené rizikom smrti atď. Medzi tieto poruchy patria okrem iných nasledujúce: Alzheimerova choroba; poruchy motorických neurónov (napr. amyotrofická laterálna skleróza); Parkinsonova choroba; cerebrovaskulárne poruchy (napr. mŕtvica, ischemia); Huntingtonova choroba; AIDS demencia; epilepsia; skleróza multiplex; periférne neuropatie (napr. neuropatie postihujúce DRG neuróny pri periférnej neuropatii spojenej s chemoterapiou) vrátane diabetickej neuropatie a periférnej neuropatie spojenej s AIDS; poruchy indukované excitačnými aminokyselinami; a poruchy spojené s nárazovými alebo prienikovými poraneniami mozgu alebo miechy.

ChAT katalyzuje syntézu neurotransmitra acetylcholínu a považuje sa za enzymatický marker pre funkčný cholinergický neurón. Funkčný neurón je tiež schopný prežiť. Prežívanie neurónov sa hodnotí kvantifikáciou špecifickej absorpcie a enzymatickej konverzie farbiva (napr. kalceín AM) žijúcimi neurónmi.

Vzhľadom na svoje rôzne využitie nachádzajú tu opísané zlúčeniny vrátane zlúčenín identifikovaných tu opísanými spôsobmi využitie v rade situácií. Tieto zlúčeniny možno použiť pri vývoji in vitro modelov prežívania, funkcie alebo identifikácie neurónových buniek alebo na skrining iných syntetických zlúčenín, ktoré majú aktivity podobné aktivitám zlúčenín tu opísaným alebo zlúčenín identifikovaných tu opísanými spôsobmi. Zlúčeniny tu opísané ako aj zlúčeniny identifikované pomocou tu opísaných spôsobov možno použiť vo výskume na skúmanie, definovanie a určenie molekulových cieľov spojených s funkčnými odozvami. Napríklad rádioaktívnym označením premostenej indenopyrazolokarbazolovej zlúčeniny, alebo zlúčeniny identifikovanej spôsobmi tu opísanými, spojenej so špecifickou bunkovou funkciou (napr. mitogénézou) možno identifikovať, izolovať a vyčistiť na charakterizáciu cieľovú entitu, na ktorú sa tento derivát viaže.

Zlúčeniny tu opísané ako aj zlúčeniny identifikované spôsobmi tu opísanými sú užitočné medzi iným nielen na podporu aktivít indukovaných trofickým faktorom buniek reagujúcich na trofický faktor, napr. cholinergických neurónov, ale môžu tiež fungovať ako prostriedky podporujúce prežitie pre iné neurónové bunkové typy, napr. dopaminergické a

glutamatergické. Rastový faktor môže regulovať prežívanie neurónov signalizačnými kaskádami v smere malých GTP viažucich proteínov, medzi ktoré okrem iných patrí ras, rac a cdc42 (Denhardt, *Biochem. J.*, 1996, 318, 729). Špecificky, aktivácia ras vedie k fosforylácii a aktivácii kinázy aktivovanej mimobunkovým receptorom (ERK – extracellular receptor-activated kinase), ktorá bola dávaná do súvislosti s biologickým rastom a diferenciačnými procesmi. Stimulácia rac/cdc42 vedie k zvýšeniu aktivácie JNK a p38, čo sú odozvy spojené so stresom, apoptózou a zápalom. Hoci odozvy rastového faktora sú primárne cez dráhu ERK, ovplyvnenie týchto procesov môže viesť k alternatívnym mechanizmom prežívania neurónov, ktoré môžu napodobňovať rastový faktor podporujúci vlastnosti prežívania (Xia et al., *Science*, 1995, 270, 1326). Tieto zlúčeniny môžu pôsobiť aj ako prostriedky podporujúce prežitie pre neurónové a neneurónové bunky mechanizmami súvisiacimi ale aj vzdialenými prežívaniu sprostredkovanému rastovým faktorom, napríklad inhibíciou dráh JNK a p38, čo môže viesť k prežitiu inhibíciou procesov umierania apoptotických buniek.

Predložené zlúčeniny sú užitočné pri liečbe porúch spojených so zníženou aktivitou ChAT alebo smrťou alebo poranením miechových motoneurónov a majú napríklad význam pri chorobách spojených s umieraním apoptotických buniek centrálného a periférneho nervového systému, imunitného systému a pri zápalových chorobách.

Zlúčeniny tu opísané môžu tiež nájsť využitie pri liečbe chorobných stavov zahŕňajúcich malígnu proliferáciu buniek, napríklad mnohých rakovín.

Medzi farmaceuticky prijateľné soli zlúčenín tu opísaných ako aj zlúčenín identifikovaných týmito metódami patria farmaceuticky prijateľné kyselinové adičné soli, soli kovov, amóniové soli, adičné soli organických amínov a aminokyselinové adičné soli. Príkladmi kyselinových adičných solí sú adičné soli s anorganickými kyselinami, ako je hydrochlorid, sulfát a fosfát, a adičné soli s organickými kyselinami, ako je acetát, maleát, fumarát, vínan, citrát a laktát; príkladmi solí s kovmi sú soli s alkalickými kovmi, napríklad lítna soľ, sodná soľ a draselná soľ, soli s kovmi alkalických zemín, napríklad horečnatá soľ a vápenatá soľ, hlinitá soľ a zinočnatá soľ; príkladom amóniových solí je amónna soľ a tetrametylamóniová soľ; príkladmi adičných solí s organickými amínmi sú soli

s morfolínom a piperidínom; a príkladmi aminokyselinových adičných solí sú soli s glycínom, fenylalanínom, kyselinou glutámovou a lyzínom.

Tu uvedené zlúčeniny vrátane zlúčenín identifikovaných týmito metódami možno formulovať do farmaceutických kompozícií zmiešaním s farmaceuticky prijateľnými netoxickými vehikulami a nosičmi. Také kompozície možno pripraviť na použitie pri parenterálnom podaní, najmä vo forme kvapalných roztokov alebo suspenzií; alebo orálnom podaní, najmä vo forme tabliet alebo kapsúl; alebo intranazálne, najmä vo forme práškov, nosných kvapiek alebo aerosólov; alebo dermálne napríklad prostredníctvom transdermálnych náplastí.

Kompozíciu možno s výhodou podávať v jednotkovej liekovej forme a možno ju pripraviť ktorýmkoľvek zo spôsobov známych v oblasti farmácie, napríklad podľa *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Prípravky na parenterálne podanie môžu obsahovať ako bežné vehikulá sterilnú vodu alebo fyziologický roztok, polyalkylénglykoly ako polyetylénglykol, oleje rastlinného pôvodu, hydrogenované naftalény a podobne. Užitočnými vehikulami na kontrolu uvoľňovanie účinných zlúčenín môžu byť najmä biologicky kompatibilné, biologicky odbúrateľné laktidové polyméry, laktidovo-glykolidový kopolymér alebo polyoxyetylénovo-polyoxypropylénové kopolyméry. Medzi ďalšie potenciálne užitočné systémy na parenterálne podávanie pre tieto účinné zlúčeniny patria etylénovo-vinylacetátové kopolymérové čiastočky, osmotické pumpy, implantovateľné infúzne systémy a lipozómy. Formulácie na inhalačné podanie obsahujú ako vehikulá napríklad laktózu, alebo môže ísť o vodné roztoky obsahujúce napríklad polyoxyetylén-9-lauryléter, glykocholát a deoxycholát, alebo olejovité roztoky na podávanie vo forme nosných kvapiek alebo ako gél na intranazálnu aplikáciu. Formulácie na parenterálne podanie môžu tiež obsahovať glykocholát na bukálne podávanie, salicylát na rektálne podávanie alebo kyselinu citrónovú na vaginálne podávanie. Formulácie na transdermálne náplasti sú s výhodou lipofilné emulzie.

Zlúčeniny podľa tohto vynálezu možno použiť ako jedinú účinnú látku vo farmaceutickej kompozícii. Alternatívne ich možno použiť v kombinácii s inými účinnými

zložkami, napríklad inými rastovými faktormi, ktoré uľahčujú prežívanie neurónov alebo axonálnu regeneráciu pri chorobách alebo poruchách.

Zlúčeniny podľa vynálezu a ich farmaceuticky prijateľné soli možno podávať orálne alebo neorálne, napríklad ako masť alebo ako injekciu. Koncentrácie zlúčenín podľa vynálezu v terapeutickej kompozícii sa môžu meniť. Koncentrácia bude závisieť od faktorov ako celkové dávkovanie liečiva, ktoré sa má podávať, chemické charakteristiky (napr. hydrofóbnosť) použitých zlúčenín, cesta podania, vek, telesná hmotnosť a symptómy pacienta atď. Zlúčeniny podľa tohto vynálezu sa väčšinou podávajú vo vodnom fyziologickom tlmenom roztoku obsahujúcom asi 0,1 až 10 % hmotnosť/objem zlúčeniny na parenterálne podanie. Typické rozmedzia dávok sú od asi 1 µg/kg do asi 1 g/kg telesnej hmotnosti na deň; výhodný interval dávok je od asi 0,01 mg/kg do 100 mg/kg telesnej hmotnosti na deň a s výhodou asi 0,1 až 20 mg/kg raz až štyrikrát denne. Výhodné dávkovanie liečiva, ktoré sa má podávať, bude pravdepodobne závisieť od premenných, ako je typ a rozsah progresie choroby alebo poruchy, celkový zdravotný stav konkrétneho pacienta, relatívna biologická účinnosť vybranej zlúčeniny a formulácia vehikula zlúčeniny a cesta jej podania.

Zlúčeniny podľa vynálezu vrátane testovanej zlúčeniny a zlúčenín identifikovaných metódami podľa predloženého vynálezu a ich farmaceuticky prijateľné soli možno podávať samotné alebo vo forme rôznych farmaceutických kompozícií podľa farmakologickej aktivity a účelu podania. Farmaceutické kompozície podľa predloženého vynálezu možno pripraviť rovnomerným zmiešaním účinného množstva zlúčeniny alebo jej farmaceuticky prijateľnej soli ako účinnej zložky s farmaceuticky prijateľným nosičom. Nosič môže mať široké spektrum foriem podľa foriem kompozície vhodných na podávanie. Je vhodné, aby sa také farmaceutické kompozície pripravovali v jednotkovej liekovej forme vhodnej na orálne alebo neorálne podanie. Medzi formy na neorálne podanie patria masti a injekcie.

Tablety možno pripraviť pomocou vehikúl ako laktóza, glukóza, sacharóza, manitol a metylcelulóza, dezintegrátorov ako škrob, alginát sodný, kalcium karboxymetylcelulóza a kryštalická celulóza, mazív ako stearan horečnatý a mastenec, spojiv ako želatína, polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidón, hydroxypropylcelulóza a metylcelulóza, povrchovo

aktívnych látok ako ester sacharózy s mastnou kyselinou a ester sorbitolu s mastnou kyselinou a podobne, konvenčným spôsobom. Je výhodné, aby každá tableta obsahovala 15 – 300 mg účinnej zložky.

Granuly možno pripraviť s použitím vehikúl ako laktóza a sacharóza, dezintegrátorov ako škrob, spojív ako želatína a podobne, konvenčným spôsobom. Prášky možno pripraviť s použitím vehikúl ako laktóza a manitol a podobne, konvenčným spôsobom. Kapsule možno pripraviť s použitím želatíny, vody, sacharózy, arabskej gummy, sorbitolu, glycerínu, kryštalickej celulózy, stearanu horečnatého, mastenca a podobne, konvenčným spôsobom. Je výhodné, aby každá kapsula obsahovala 15 – 300 mg účinnej zložky.

Sirupové prípravky možno pripraviť s použitím cukrov ako sacharóza, vody, etanolu a podobne, konvenčným spôsobom.

Masť možno pripraviť s použitím masťových základov ako vazelína, kvapalný parafín, lanolín a makrogol, emulgátorov ako laurylacetát sodný, benzalkónium chlorid, monoester sorbitanu s mastnou kyselinou, natrium karboxymetylcelulóza, arabská guma a podobne, konvenčným spôsobom.

Injektovateľné prípravky možno pripraviť s použitím rozpúšťadiel ako voda, fyziologický roztok, rastlinné oleje (napr. olivový olej a arašidový olej), etyleleát a propylénglykol, solubilizačných prostriedkov ako benzoát sodný, salicylát sodný a uretán, izotonických prostriedkov ako chlorid sodný a glukóza, konzervačných prostriedkov ako fenol, krezol, ester kyseliny p-hydroxybenzoovej a chlórbutanol, antioxidantov ako kyselina askorbová, pyrosiričitan sodný a podobne, konvenčným spôsobom.

Vynález je ďalej ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi, ktoré slúžia ako vysvetlenie vynálezu. Tieto príklady nie sú myslené ako obmedzenie rozsahu vynálezu a nemajú sa tak ani vysvetľovať.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1: Všeobecný popis syntetických postupov a príklady

Všeobecný syntetický postup použitý na prípravu premostených indenopyrolokarbazolov vzorca II podľa tohto vynálezu je zobrazený na obrázkoch 1 a 2. Všeobecné postupy na syntézu indenopyrolokarbazolov (III)/(VIII) možno uskutočniť podľa popisu v patente USA č. 5,705,511, ktorého publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom. Keď R^1 je H, laktámový dusík indenopyrolokarbazolov (III)/(VIII) je chránený vhodnou chrániacou skupinou, čo vedie k (IV)/(IX). Chránené zlúčeniny sa spracúvajú vhodnou bázou v bezvodých organických rozpúšťadlách, čo má za následok vytvorenie tmavočerveného roztoku, čo sa pripisuje vzniku karbaniónu. Reakcia karbaniónu s dvojfunkčným reagentom (V) vedie k elektrofilnej adícii na väzbu $C=Y$ (V) za vzniku počiatočného intermediátu (VI)/(X). Pridaním buď kyseliny sulfónovej alebo Lewisovej kyseliny, napríklad bórtrifluorid éterátu, k intermediátom (VI)(X) a/alebo (VII)/(XI) sa získajú premostené indenopyrolokarbazoly (I)/(II).

Stratégia chránenia laktámového dusíka (zobrazená na obrázkoch 3 a 4) sa môže uskutočniť buď kyslo alebo bázičky katalyzovaným procesom. Kyselinou katalyzovanú reakciu možno uskutočniť činidlom viazaným na živicu umožňujúcim imobilizáciu indenopyrolokarbazolu (III)/(VIII) na polymérny nosič, napríklad na Rinkovu kyselinovú živicu na báze polystyrénu (XII) (obrázok 3), čím sa získa (XIII). Alternatívne možno kyselinou katalyzovanú reakciu uskutočniť s rozpustným činidlom, čím sa získa zlúčenina (XIV) (obrázok 4). Silylom chránená zlúčenina (XV) sa pripraví za bázičky katalýzy (obrázok 4).

Obrázok 5 opisuje niekoľko metód na prípravu intermediátu (V). Postup (a) opisuje transformácie rôznych acetálov (XVI) na (XVII, Z = väzba). Napríklad ester-acetál/ketál (XVI, D = COOR) sa úplne redukuje na príslušný alkohol a potom sa oxiduje (napr. Swernovou alebo Dess-Martinovou oxidáciou) na aldehyd-acetál/ketál (XVII, $R^8 = H$). Alternatívne sa ester-acetál/ketál (XVI, D = COOR) čiastočne redukuje pomocou DIBAL, čím sa získa priamo aldehyd (XVII, $R^8 = H$). Podobne redukcia nitril-acetálu (XVI, D = CN) pomocou DIBAL dáva aldehyd (XVII, $R^8 = H$). Keto-acetály/ketály sa pripravujú adíciou Grignardových činidiel na Weinrebov amid-acetál/ketál (XVI, D = CON(OMe)Me).

Intermediát (XVII, Z = väzba) možno získať aj dvojstupňovým postupom načrtnutým v postupe (b). Pridanie organokovového činidla (XIX) k acetálu/ketálu (XVIII) dáva alkén (XX), ktorý ozonolýzou s nasledujúcim redukčným spracovaním dáva keto-acetál/ketál (XVII). Príprava intermediátu (XVII, Z = heteroatóm) dvojstupňovým postupom je načrtnutá v postupe (c). Naviazanie acetálu (XXII) na alkén (XXI) s nasledujúcou ozonolýzou (s redukčným spracovaním) získaného alkénu dáva keto-acetál/ketál (XVII). Alternatívne možno intermediát (XVII, Z = heteroatóm) pripraviť dvojstupňovým postupom načrtnutým v postupe (d). Reakcia zlúčeniny (XXIV) s acetálom/ketálom (XVIII) dáva (XXV), ktorá sa transformuje na keto-acetál/ketál (XVII) metódami opísanými v postupe (a). Kondenzácia keto-acetálu/ketálu (XVII) s hydroxylamínmi, hydrazínmi, N-alkyl-N-alkoxyamínmi a amínmi dáva intermediát (XXVI) nesúci elektrofilnú funkciu C=N.

Na živicu naviazaný indenopyrolokarbazol (XIII) (obrázok 6, metóda A) sa pôsobí nadbytkom Grignardovho činidla ako bázy, čo vedie k vytvoreniu tmavočerveného roztoku karbaniónu. Následná reakcia s (V) vedie k produktom získaným elektrofilnou adíciou na skupinu C=Y. Spracovanie vodou a odštiepenie produktov od živice zriedenou kyselinou (1 % TFA v dichlórmetáne) vedie k izolácii zlúčenín (XXVII) a/alebo (XXVIII). Pridaním buď kyseliny sulfónovej alebo Lewisovej kyseliny, napríklad bórtrifluorid éterátu, k intermediátom (XXVII) a/alebo (XXVIII) sa získajú premostené indenopyrolokarbazoly (II).

Podobná stratégia sa používa na reakciu rozpustného laktámového chráneného intermediátu, napr. (XV) (obrázok 7, metóda B). V tomto prípade sa však na intermediát (XV) pôsobí činidlom Triton B v pyridíne ako bázou namiesto Grignardovho činidla. Intermediáty (XXIX) a/alebo (XXX) možno izolovať s chrániacou skupinou laktámu nedotknutou a možno ich čistiť chromatografiou. Rovnako ako v metóde A (obrázok 6), pôsobenie Lewisovej kyseliny (napríklad bórtrifluorid éterát) vedie k premosteným indenopyrolokarbazolom (II), kde $R^1 = H$.

Zavedenie skupín R^3 , R^4 , R^5 a R^6 možno uskutočniť podľa popisu v patentoch USA č. 5,705,511 a 4,923,986, ktorých publikácie sa týmto celé zahŕňajú odkazom. Substituent R^3 možno inak zaviesť po skonštruovaní premostených indenopyrolokarbazolov, ako je uvedené na obrázku 8. Poloha 3 kruhu B sa brómuje pomocou NBS, čím sa získa

zlúčenina (XXXI). Potom sa zavedie uhlíkatý fragment pomocou paládiom katalyzovanej Stilleho, Suzukiho, Heckovej, Kumadovej alebo Castro-Stephensovej reakcie, čím sa získajú zlúčeniny typu (XXXII), (XXXIII), atď. Okrem toho zlúčenina (XXXI) môže poskytnúť prístup k zlúčeninám, kde je bróm nahradený heteroatómom, napr. skupinou na báze amínu, použitím Buchwaldovej paládiom katalyzovanej aminačnej chémie.

Oxidačným procesom možno zaviesť skupinu naviazanú cez kyslík na indénový uhlík kruhu E, ako to ukazuje obrázok 9, zlúčenina (XXXIV). Táto chémia tiež vedie k oxidácii metylénovej skupiny laktámu (kruh A), čím sa získa amidový derivát, ako je uvedené.

Príklad 2: Príprava intermediátov viazaných na Rinkovu živicu: (XIII-A), (XIII-B) a (XIII-C), (obrázok 3)

Príklad 2-A

Trojhrdlová banka s guľatým dnom vybavená horným mechanickým miešadlom a Dean-Starkovým nástavcom sa postupne naplnila Rinkovou kyselinovou živicom XII (10,00 g, 0,64 mmol/g), 1-metyl-2-pyrolidinónom (80 ml), benzénom (350 ml), VIII-A [A^1 , $A^2 = H_2$, B^1 , $B^2 = O$, $R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$] (3,00 g) a kyselinou p-toluénsulfónovou (1,00 g). Reakčná zmes sa zahrieva na reflux 20 hodín a potom sa prefiltrovala. Živica sa premyla THF (5 x 175 ml) a filtrát sa odložil. Živica sa potom postupne premyla DMSO (4 x 100 ml), 2 % vodným $NaHCO_3$ (4 x 100 ml), vodou (4 x 100 ml), DMSO (2 x 200 ml), THF (4 x 100 ml) a etylacetátom (4 x 100 ml). Živica sa vysušila za vákua (24 hodín), čím sa získalo 11,70 (0,47 mmol/g) na živicu viazaného VIII-A (XIII-A).

Pôvodné extrakty v THF sa odparili, zvyšok sa zriedil vodou (750 ml) a získaná zrazenina sa prefiltrovala a postupne premyla vodou, 2% vodným $NaHCO_3$ (4 x 100 ml), a vodou (4 x 100 ml). Po vysušení vo vákuu sa získala látka VIII-A (1,28 g).

Príklad 2-B

Podobným spôsobom sa na Rinkovu kyselinovú živicu XII (1,52 g) naviazala látka VIII-B [A^1 , $A^2 = O$, B^1 , $B^2 = H_2$, $R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$], (0,5 g), čím sa získalo 1,58 g na živicu naviazanej látky VIII-B, (XIII-B).

Príklad 2-C

Podobným spôsobom sa na Rinkovu kyselinovú živicu (3,12 g) naviazala látka VIII-C [$A^1, A^2 = H_2$, $B^1, B^2 = O$, $R^3 = R^4 = R^5 = H$, $R^6 = 10-OMe$], (1,02 g), čím sa získalo 3,70 (0,46 mmol/g) na živicu naviazanej zlúčeniny VIII-C, (XIII-C) spolu so spätne získanou zlúčeninou VIII-C (0,44 g).

Príklad 3: Príprava zlúčeniny (II-1), zlúčeniny (II-2), zlúčeniny (II-3), zlúčeniny (II-4a), zlúčeniny (II-4b), zlúčeniny (II-6) a zlúčeniny (II-8) (metóda A, obrázok 6)

Príklad 3-A

Do suspenzie (XIII-A), (1,25 g) v THF (24 ml) sa pridal 1,0 M roztok EtMgBr (6,25 ml v THF) a reakčná zmes sa miešala 1 hodinu pred pridaním HMPA (5,0 ml). Po 10 minútach miešania sa pridal dietoxybutyraldehyd (3,0 g) (ktorý sa pripravil podľa literárneho postupu: Paquette, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9662-71), a reakčná zmes sa miešala 20 hodín. Reakcia sa ukončila pridaním 10 % vodného NH_4Cl (5 ml) a prefiltrovala sa. Živica sa postupne premyla 10 % vodným NH_4Cl (3 x 10 ml), vodou (3 x 10 ml), THF (3 x 10 ml), DMF (3 x 10 ml), vodou (3 x 10 ml), THF (3 x 10 ml) a éterom (3 x 10 ml). Živica sa vysušila za vákua, rozmiešala sa v dichlórmetáne (15 ml) a pridala sa kyselina trifluóroctová (0,15 ml). Po 1 hodine miešania sa reakčná zmes prefiltrovala a filtrát sa odparil. Získaný zvyšok sa rozpustil v dichlórmetáne (20 ml), pridal sa pyridinium tozylát (50 mg) a získaný roztok sa miešal 4 hodiny. Reakčná zmes sa premyla nasýteným vodným $NaHCO_3$ a soľankou a vysušila sa nad $MgSO_4$.

Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa zvyšok vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, elúcia 60 % zmesou MeCN a vody s 0,1% kyseliny trifluóroctovej). Príslušné frakcie sa neutralizovali $NaHCO_3$, extrahovali do dichlórmetánu (3 x 50 ml) a vysušili nad $MgSO_4$. Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získalo 70,2 mg zlúčeniny II-1 vo forme bieleho prášku, ktorý mal nasledujúce charakteristiky: ^{13}C NMR ($DMSO-d_6$) δ 171,8, 143,3, 142,4, 141,4, 140,1, 140,0, 136,6, 129,2, 127,9, 127,4, 127,1, 126,8, 124,1 (2C), 122,7, 121,6, 121,5, 118,3, 112,1, 88,1, 79,2, 56,6, 45,6, 33,4, 24,8; 1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 9,21 (d, $J = 7,5$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,86 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,71 (d, $J = 7,3$, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,9$, 7,4, 1H), 7,41 (dd, $J = 7,5$, 7,4, 1H), 7,36 - 7,27 (m,

2H), 6,86 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63 - 5,58 (m, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,53 (d, $J = 3,3$, 1H), 2,23 - 2,14 (m, 1H), 1,96 - 1,92 (m, 1H), 0,96 - 0,88 (m, 1H), 0,60 - 0,57 (m, 1H); MS m/z (M+H) vypočítané 379, zistené 379.

Preparatívnou HPLC tejto reakčnej zmesi sa izolovala aj zlúčenina II-2 (0,5 mg), ktorá mala nasledujúce charakteristiky: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9,17 (d, $J = 8,1$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,0$, 1H), 7,85 (d, $J = 6,8$, 1H), 7,57 (d, $J = 6,8$, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,9$, 7,4, 1H), 7,44 - 7,26 (m, 3H), 6,81 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,43 - 5,33 (m, 1H), 4,43 (s, 2H), 2,23 - 2,14 (m, 1H), 1,96 - 1,92 (m, 1H), 1,45 - 1,55 (m, 2H), 0,96 - 0,88 (m, 1H), 0,60 - 0,57 (m, 1H), 0,29 (t, $J = 7,0$, 3H); MS m/z (M+H) vypočítané 407, zistené 407.

Príklad 3-B

Podobným spôsobom, ako je opísané vyššie pre zlúčeninu II-1, sa na živicu (XIII-A) (70,3 mg) pôsobilo 1,1-dietoxy-2-pentanómom (0,75 ml) (ktorý sa pripravil podľa literatúry: Sworin, *et al*, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4894-6), čím sa získala zlúčenina II-3 (3,5 mg), ktorá bola izolovaná preparatívnou TLC (silikagél, elúcia zmesou 50% EtOAc/toluén) a mala nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9,42 (d, $J = 8,2$, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 7,4$, 1H), 7,79 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,71 (d, $J = 7,1$), 7,50 - 7,20 (m, 4H), 6,81 (d, $J = 5,9$, 1H), 4,90 (s, 2H), 4,46 (s, 1H), 2,35 - 2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,75 - 1,60 (m, 1H), 1,25 - 1,00 (m, 1H), 0,35 - 0,15 (m, 1H); MS m/z (M+H) vypočítané 393, zistené 393.

Príklad 3-C

Podobným spôsobom sa na zlúčeninu (XIII-A) (74,3 mg) pôsobilo 1,1-dietoxy-2-hexanómom (ktorý sa pripravil podľa literatúry: Brenner, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 22-7) (0,75 ml), čím sa získala zlúčenina II-4a (2,10 mg) a zlúčenina II-4b (1,06 mg), ktoré boli individuálne izolované preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65 % MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej). Zlúčenina II-4a mala nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9,30 (d, $J = 8,3$, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,97 (d, $J = 7,2$, 1H), 7,65 (d, $J = 8,5$, 1H), 7,59 (d, $J = 7,5$), 7,48 (dd, $J = 7,8$, 7,2, 1H), 7,39 - 7,15 (m, 3H), 6,31 (dd, $J = 5,9$, 5,5, 1H), 5,02 (s, 1H), 4,88 (s, 2H), 0,88 (s, 3H) ostatné alifatické signály stratené pod píkmí rozpúšťadla; MS m/z (M+H) vypočítané 407, zistené 407. Zlúčenina II-4b mala

nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,43 (d, $J = 8,1$, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,99 (d, $J = 7,3$, 1H), 7,75 - 7,65 (m, 2H), 7,49 (dd, $J = 7,0$, 6,4, 1H), 7,43 (dd, $J = 8,2$, 8,1, 1H), 7,36 - 7,25 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,50 (s, 1H), 1,95 (s, 3H) ostatné alifatické signály stratené pod pikmi rozpúšťadla; MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) vypočítané 407, zistené 407.

Príklad 3-D

Podobným spôsobom sa na zlúčeninu (XIII-C) (1,00 g) pôsobilo dietoxybutyraldehydom (3,65 g), čím sa získala zlúčenina II-6 (87,8 mg), ktorá bola izolovaná preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65 % MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej) a mala nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,09 (d, $J = 8,6$, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 7,4$, 1H), 7,84 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,47 (dd, $J = 7,2$, 7,0, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (dd, $J = 7,0$, 7,0, 1H), 6,98 (dd, $J = 8,6$, 1,9, 1H), 6,83 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,65 - 5,55 (m, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,48 (d, $J = 3,9$, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,25 - 2,10 (m, 1H), 2,08 - 1,85 (m, 1H), 0,96 - 0,75 (m, 1H), 0,65 - 0,50 (m, 1H); MS m/z ($\text{M}+\text{Na}$) vypočítané 431, zistené 431.

Príklad 3-E

Podobným spôsobom sa na živicu (XIII-B) (153,2 mg) pôsobilo dietoxybutyraldehydom (1,5 ml), čím sa získala zlúčenina II-8 (3,6 mg), ktorá bola izolovaná preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65 % MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej) a mala nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,09 (d, $J = 7,9$, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,81 - 7,73 (m, 3H), 7,48 - 7,35 (m, 3H), 7,24 (dd, $J = 7,6$, 7,5, 1H), 6,85 (d, $J = 6,2$, 1H), 5,63-5,59 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,61 (d, $J = 3,6$, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,21 - 2,13 (m, 1H), 1,96 - 1,90 (m, 1H), 0,87 - 0,79 (m, 1H), 0,61 - 0,56 (m, 1H); MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) vypočítané 379, zistené 379.

Príklad 4: Príprava zlúčeniny II-7a a zlúčeniny II-7b (metóda A, obrázok 6)

Príklad 4-A

Príprava (1,1-dietoxyetoxy)acetónu

Do studenej (0 °C) suspenzie NaH (2,68 g, 60%) v THF (150 ml) sa pridal roztok 1,1-dietoxyetanolu (ktorý bol pripravený podľa literatúry: Zirkle, *et. al. J. Org. Chem.* **1961**,

26, 395-407) (9,00 g) v THF (20 ml), a reakčná zmes sa miešala pri teplote miestnosti 1 hodinu pred pridaním metalychloridu (8,0 ml). Reakčná zmes sa zahrievala na reflux cez noc, ochladila sa a prefiltrovala cez vrstvu celitu. Rozpúšťadlo sa odstránilo na rotačnej odparke a zvyšok sa vyčistil stĺpcovou chromatografiou (silikagél, 20 % éter/hexán), čím sa získal 1,1-dietoxyetylmetalyéter (11,5 g, 90 %). Ozonolýza chladeného (-30 °C) roztoku tohto éteru (6,00 g) v EtOAc (80 ml) sa uskutočňovala dovtedy, kým sa pomocou TLC nedokázala neprítomnosť východiskovej látky (1 hodina). Vtedy sa reakčná zmes prepláchla kyslíkom, pridal sa Pd(OH)₂ (150 mg) a zmes sa miešala pod atmosférou vodíka cez noc. Katalyzátor sa odfiltroval a filtrát sa nakoncentroval na rotačnej odparke. Získaný zvyšok sa vyčistil stĺpcovou chromatografiou (silikagél, 20 % EtOAc/hexán), čím sa získala titulná zlúčenina (4,53 g, 82 %).

Příklad 4-B

Podľa metódy A (obrázok 6) sa na živicu (XIII-A) (230,2 mg) pôsobilo EtMgBr (1,25 ml) a potom (1,1-dietoxyetoxy)acetónom (příklad 3-A) (1,2 ml). Po spracovaní a odštiepení od živice sa časť surového reakčného produktu (10,5 mg) rozpustila v dichlórmétáne (20 ml) a pridal sa BF₃ éterát (20 µl). Po 2,5 hodine miešania sa roztok premyl nasýteným vodným roztokom NaHCO₃ a roztokom NaCl a vysušil sa nad MgSO₄. Po filtrácii a odstránení rozpúšťadla sa zvyšok vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65 % MeCN/voda s 0,1% kyseliny trifluóroctovej), čím sa získala zlúčenina II-7a (2,34 mg) a zlúčenina II-7b (1,34 mg). Zlúčenina (II-7a) mala nasledujúce vlastnosti: ¹H NMR (CDCl₃) δ 9,35 - 9,20 (m, 1H), 7,87 (d, *J* = 7,6, 1H), 7,62 (d, *J* = 7,0, 1H), 7,60 - 7,45 (m, 1H), 7,49 (dd, *J* = 7,7, 7,5, 1H), 7,40 (d, *J* = 8,1, 1H), 7,37 - 7,26 (m, 3H), 6,22 (s, 1H), 5,20 - 4,85 (m, 1H), 4,47 (s, 1H), 3,67 (d, *J* = 12,7, 1H) 3,52 (d, *J* = 11,8, 1H), 3,40 (d, *J* = 12,7, 1H), 3,38 (d, *J* = 11,8, 1H), 1,91 (s, 3H); MS *m/z* (M+H) vypočítané 409, zistené 409. Zlúčenina II-7b mala nasledujúce vlastnosti: ¹H NMR (CDCl₃) δ 9,58 - 9,22 (m, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,4, 1H), 7,60 - 7,40 (m, 3H), 7,37 - 7,27 (m, 3H), 7,21 (d, *J* = 8,1, 1H), 5,81 (s, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,10 - 4,80 (m, 1H), 4,59 (d, *J* = 13,5, 1H), 4,38 (dd, *J* = 13,5, 5,3, 1H), 4,21 (d, *J* = 13,1, 1H), 3,82 (d, *J* = 13,2, 1H), 1,13 (s, 3H); MS *m/z* (M+H) vypočítané 409, nájdené 409.

Príklad 5: Príprava zlúčeniny II-5 (obrázok 8)

Do roztoku zlúčeniny II-1 (8,1 mg) v THF (2 ml) sa pridal NBS (4,6 mg) a reakčná zmes sa miešala cez noc. Pridal sa ďalší NBS (4,5 mg) a reakčná zmes sa miešala 2,5 hodiny. Nerozpustný materiál sa odfiltroval a filtrát sa nakoncentroval na rotačnej odparke. Získaný zvyšok sa vyčistil stĺpcovou chromatografiou (C-18, 65 % MeCN/voda s 0,1% kyseliny trifluóroctovej). Príslušné frakcie sa neutralizovali NaHCO_3 , extrahovali do dichlórmetánu (3 x 20 ml) a vysušili nad MgSO_4 . Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získala zlúčenina II-5 (5,1 mg) vo forme bieleho prášku, ktorý mal nasledujúce charakteristiky: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,22 (d, $J = 7,4$, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,86 (d, $J = 8,7$, 1H), 7,72 (d, $J = 7,0$, 1H), 7,63 (d, $J = 7,8$, 1H), 7,42 (dd, $J = 7,5$, 7,3, 1H), 7,35 (dd, $J = 7,3$, 7,2, 1H), 6,86 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63 - 5,58 (m, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,54 (d, $J = 3,1$, 1H), 2,30 - 2,14 (m, 1H), 2,00 - 1,82 (m, 1H), 0,96 - 0,88 (m, 1H), 0,62 - 0,50 (m, 1H); MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) vypočítané 457/9 (1:1), zistené 457/9 (1:1).

Príklad 6: Príprava intermediátu XV (obrázok 4)

Do roztoku VIII-A [$\text{A}^1, \text{A}^2 = \text{H}_2$, $\text{B}^1, \text{B}^2 = \text{O}$, $\text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{R}^5 = \text{R}^6 = \text{H}$] (1,05 g) v DMF (25 ml) sa pridal trietylamin (0,75 ml) a *t*-butyldimetylsilylchlorid (TBS-Cl) (0,65 g). Po 3 hodinách miešania sa reakcia ukončila pridaním nasýteného vodného NaHCO_3 a zmes sa extrahovala do EtOAc. Organická vrstva sa premyla vodou a soľankou a vysušila sa nad MgSO_4 . Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získaný zvyšok rozotrel s éterom, čím sa získala zlúčenina XV (848 mg). Extrakty sa odparili a zanechali zvyšok, ktorý sa vyčistil stĺpcovou chromatografiou (silikagél, 1 % EtOAc/ CH_2Cl_2) a získal sa ďalší produkt (502 mg, kombinovaný výťažok 94 %), ktorý mal nasledujúce spektrálne vlastnosti: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 11,94 (s, 1H), 9,32 (d, $J = 7,6$, 1H), 8,03 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,64 (d, $J = 7,2$, 1H), 7,58 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,44 (dd, $J = 7,7$, 7,6, 1H), 7,39 (dd, $J = 7,7$, 7,6, 1H), 7,32 (d, $J = 7,3$, 1H), 7,25 (dd, $J = 7,6$, 7,3, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,14 (s, 2H), 0,99 (s, 9H), 0,46 (s, 6H); MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) vypočítané 425, zistené 425.

Príklad 7: Príprava zlúčeniny II-1 metódou B (obrázok 7)

Roztok činidla Triton B v pyridíne (0,45 M) sa pripravil rozpustením 40 % roztoku činidla Triton B v metanole (10 ml) v pyridíne (10 ml). Rozpúšťadlo sa odstránilo za zníženého tlaku (20 mm Hg) na konečný objem ~ 8 ml. Zvyšok sa zriedil pyridínom na 50

ml, prefiltroval a uložil pod dusíkom. Roztok látky XV (20,3 mg) v pyridíne (2,0 ml) sa vypláchol argónom a pridalo sa 300 μ l činidla Triton B (0,45 M v pyridíne) a dietoxybutyraldehyd (50 μ l). Po 2 hodinách miešania sa reakčná zmes extrahovala do EtOAc, premyla sa 1 N vodnou HCl, soľankou a vysušila sa nad MgSO_4 . Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa adukt rozpustil v CH_2Cl_2 (10 ml) a pridalo sa BF_3 éterát (10 μ l). Po 2,0 hodinách miešania sa roztok premyl nasýteným vodným NaHCO_3 a soľankou a vysušil sa nad MgSO_4 . Odstránením rozpúšťadla na rotačnej odparke sa získal zvyšok, ktorý sa vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65% MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej). Príslušné frakcie sa neutralizovali NaHCO_3 , extrahovali do dichlórmétanu (3 x 20 ml) a vysušili nad MgSO_4 . Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získala látka II-1 (11,8 mg, 65 % výťažok), ktorej ^1H NMR a MS spektrá a HPLC retenčný čas boli identické s materiálom pripraveným a izolovaným metódou A opísanou v príklade 3-A.

Príklad 8: Príprava zlúčeniny II-9 (obrázok 8)

Do suspenzie brómovanej zlúčeniny II-5 (6,2 mg) v 1-propanole (4,0 ml) sa pridala kyselina 3-aminofenylboritá (3,8 mg). Po 0,25 hodiny miešania sa postupne pridalo $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2,0 mg) Ph_3P (4,8 mg), Na_2CO_3 (2,8 mg) a voda (2,0 ml). Zmes sa zahrievala na reflux 0,75 hodiny, ochladila sa, extrahovala do CH_2Cl_2 a premyla sa vodou a soľankou. Organická vrstva sa vysušila nad MgSO_4 a rozpúšťadlo sa odstránilo na rotačnej odparke, čím sa získal zvyšok, ktorý sa vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 50 % MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej). Príslušné frakcie sa neutralizovali NaHCO_3 , extrahovali do dichlórmétanu (3 x 20 ml) a vysušili nad MgSO_4 . Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získala zlúčenina II-9 (3,1 mg, 49 % výťažok) s nasledujúcimi spektrálnymi charakteristikami: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,22 (d, $J = 7,5$, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,00 - 7,25 (m, 8H), 7,12 (dd, $J = 7,1$, 7,0, 1H), 6,95 - 6,80 (m, 3H), 6,53 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63 - 5,58 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 4,55 (s, 1H), 2,25 - 2,10 (m, 1H), 1,95 - 1,90 (m, 1H), 0,98 - 0,88 (m, 1H), 0,65 - 0,57 (m, 1H); MS m/z ($\text{M}+\text{H}$) vypočítané 470, zistené 470.

Príklad 9: Príprava zlúčeniny II-10 (obrázok 9)

Do roztoku zlúčeniny II-1 (5,0 mg) v DMSO (1 ml) sa pridal NaCN (4,3 mg) a zmes sa zahrievala na 145 °C 1 hodinu. Zmes sa ochladila, extrahovala do EtOAc a premyla vodou (3 x 20 ml) a soľankou. Organická vrstva sa vysušila nad MgSO₄, prefiltrovala a odparila, čím sa získal zvyšok, ktorý sa vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 55 % MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej). Príslušné frakcie sa neutralizovali NaHCO₃, extrahovali do dichlórmétanu (3 x 20 ml) a vysušili nad MgSO₄. Po filtrácii a odparení rozpúšťadla sa získala zlúčenina II-10 (2,7 mg, 50% výťažok) s nasledujúcimi spektrálnymi charakteristikami: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11,4 (s, 1H), 8,86 (d, *J* = 7,9, 1H), 8,79 (d, *J* = 7,6, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,3, 1H), 7,62 - 7,55 (m, 2H), 7,49 (dd, *J* = 7,6, 7,4, 3H), 7,40 (dd, *J* = 7,4, 7,3 1H), 7,35 (dd, *J* = 7,5, 7,4, 1H), 6,86 (d, *J* = 6,0, 1H), 6,03 (s, 1H), 5,40 - 5,30 (m, 1H), 2,25 - 2,14 (m, 1H), 2,03 - 1,90 (m, 1H), 1,10 - 0,98 (m, 1H), 0,82 - 0,77 (m, 1H).

Príklad 10: Príprava zlúčeniny II-11 (metóda A, obrázok 6)

Podľa metódy A sa nechala reagovať živica (XIIIa) (150,2 mg) s EtMgBr (1,0 ml) a potom s etyl-2,5-dioxopentanoátom (Schmidt, *et al.*, *Synthesis*, **1993**, 809) (1,5 ml). Po spracovaní a odštiepení od živice sa surový reakčný produkt rozpustil v dichlórmétane (20 ml) a pridal sa BF₃ éterát (20 µl). Po 2,5 hodine miešania sa roztok premyl nasýteným vodným roztokom NaHCO₃ a roztokom NaCl a vysušil sa nad MgSO₄. Po filtrácii a odstránení rozpúšťadla sa zvyšok vyčistil preparatívnou HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 55% -75% gradient MeCN/voda s 0,1 % kyseliny trifluóroctovej), čím sa získala zlúčenina II-11 (6,4 mg), ktorá mala nasledujúce vlastnosti: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9,36 (d, *J* = 7,7, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 7,7, 1H), 7,83 (d, *J* = 8,3, 1H), 7,58 - 7,15 (m, 5H), 6,97 (d, *J* = 5,9, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,82 (s, 1H), 4,48 (q, *J* = 7,1, 2H), 2,42 - 1,91 (m, 2H), 1,37 (t, 3H, *J* = 7,1), 1,25 - 0,63 (m, 2H).

Príklad 11: Príprava zlúčeniny II-12

K roztoku zlúčeniny II-11 (3,4 mg) v THF (2 ml) sa pridal 2 M roztok LiBH₄ (1,0 ml v THF) a reakčná zmes sa miešala 1,5 hodiny. Reakcia sa ukončila pridaním 1 N vodnej HCl (4 ml). Po 20 minútach miešaniach sa pridal 10% vodný roztok NaOH (15 ml) a zmes sa extrahovala do dichlórmétanu (3 x 10 ml). Po vysušení nad MgSO₄ sa zmes

prefiltrovala a rozpúšťadlo sa odparilo, čím sa získala zlúčenina II-12 (0,32 mg), ktorá mala nasledujúce vlastnosti: ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 9,35 (d, $J = 7,7$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,83 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,75 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,50 - 7,25 (m, 4H), 6,84 (d, $J = 7,7$, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,71 (s, 1H), 4,50 - 4,40 (m, 1H), 4,30 - 4,20 (m, 1H), 2,42 - 1,91 (m, 2H), 1,25 - 0,63 (m, 2H); MS m/z ($M+H$) vypočítané 409, zistené 409.

Príklad 12: Zvýšenie aktivity ChAT miechy

ChAT je špecifický biochemický marker pre funkčné cholinergické neuróny. Cholinergické neuróny predstavujú dôležitý cholinergický vstup do hipokampálneho útvaru, čuchového jadra, interpedunkulárneho jadra, kortexu, amygdaly a častí talamu. V mieche sú motorické neuróny cholinergické neuróny, ktoré obsahujú ChAT (Phelps, *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 1988, 273, 459-472). Aktivita ChAT sa použila na štúdium účinkov neurotrofinov (napr. NGF alebo NT-3) na prežité a/alebo funkciu cholinergických neurónov. Test ChAT slúži aj ako indikácia regulácie hladín ChAT v cholinergických neurónoch.

Metódy: Bunky miechy potkaních plodov sa disociovali a experimenty sa uskutočnili podľa popisu (Smith, *et al.*, *J. Cell Biology*, 1985, 101, 1608-1621; Glicksman, *et al.*, *J. Neurochem.*, 1993, 61, 210-221). Disociované bunky sa pripravili z miech vypitvaných z potkanov (embryonálny deň 14-15) štandardnými trypsínovými disociačnými technikami (Smith *et al.*, *supra.*). Bunky sa naplatničkovali pri 6×10^5 buniek/ cm^2 na poly-L-ornitínom pokrytých kultivačných jamkách z plastového tkaniva v bezsérovom médiu N2 doplnenom 0,05% albumínu hovädzieho séra (BSA) (Bottenstein, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 514-517). Kultúry sa inkubovali pri 37°C v zvlhčovanej atmosfére s 5 % CO_2 /95 % vzduchu počas 48 hodín. Aktivita ChAT sa merala po 2 dňoch *in vitro* pomocou modifikácie Fonnumovho postupu (Fonnum, *Neurochem.*, 1975, 24, 407-409) podľa McManaman, *et al.* and Glicksman, *et al.* (McManaman, *et al.*, *Develop. Biol.*, 1988, 125, 311-320; Glicksman, *et al.*, *J. Neurochem.*, *supra.*).

Zlúčeniny vzorca II opísané v príkladoch sú uvedené v tabuľke 2. Hodnoty pre R^1 , R^4 , R^6 a R^7 sú H; Y je O a n je 1.

Tabuľka 2

Zlúčenina	A ¹ A ²	B ¹ B ²	R ²	R ³	R ⁵	R ⁸	Z	m
II-1	O	H,H	H	H	H	H	väzba	1
II-2	O	H,H	Et	H	H	H	väzba	1
II-3	O	H,H	H	H	H	Me	väzba	1
II-4a	O	H,H	H	H	H	Me	väzba	2
II-4b	O	H,H	H	H	H	Me	väzba	2
II-5	O	H,H	H	Br	H	Me	väzba	1
II-6	O	H,H	H	H	10-OMe	H	väzba	1
II-7a	O	H,H	H	H	H	Me	O	1
II-7b	O	H,H	H	H	H	Me	O	1
II-8	RH	O	H	H	H	H	väzba	1
II-9	O	H,H	H	3'-NH ₂ -Ph	H	H	väzba	1
11-10	O	O	OH	H	H	H	väzba	1
11-11	O	H,H	H	H	H	CO ₂ -Et	väzba	1
11-12	O	H,H	H	H	H	CH ₂ -OH	väzba	1

Príklad 13: pCDNA3-EE-MLK3, pcDNA3-EE-MLK3 (K144R)

MLK3 bola klonovaná podľa popisu (Lee, *et al.*, *Oncogene*, 1993, 8, 3403-3410; Ezoe, *et al.*, *Oncogene*, 1994, 9, 935-938). cDNA bola pripravená z 200 ng polyadenylovanej melanocytovej mRNA a 5 % reakčnej zmesi sa použilo ako šablóna na amplifikáciu repertoáru PTK cDNA pomocou zmesí dvoch alebo štyroch vysoko degenerovaných oligonukleotidových primérov odvodených od konsenzuálnych sekvencií konzervovaných subdomén VIb a IX známych PTK: PTK1, 5'-CGGATCCACMGIGAYYT-3' (sekvencia č. 1); PTK2, 5'-GGAATTCCA WAGGACCASACRTC-3' (sekvencia č. 2); PTK3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYYTIGCIGCIMGIAA-3' (sekvencia č. 3); PTK4, 5'-

GGAATTIAYIGGAWAIGWCCAIACRTCISW-3' (sekvencia č. 4). Uskutočnilo sa štyridsať cyklov PCR pomocou Taq DNA polymerázy (AmpliTaq; Perkin-Elmer/Cetus) a automatizovaného DNA termálneho cyklovača, pričom každý cyklus pozostával zo 40 s pri 94°C, 2 min pri 37°C a 3 min pri 63°C. Produkty ôsmich PCR sa skombinovali, pridala sa DNA polymeráza (Klenow), štiepili sa pomocou BamH1 plus EcoR1 a podrobili sa elektroforéze v 5 % polyakrylamidovom géle. Vyfarbovaním etídiom bromidom sa identifikoval dominantný 200-230 bp pás, ktorý sa vyrezal, eluoval a klonoval do M13mp18. V jednom experimente sa časť cDNA amplifikovanej pomocou PCR neštiepila, ale namiesto toho sa klonovala surová do M13mp18 štiepeného pomocou SmaI. Nukleotidové sekvencie sa určili pomocou metódy sekvencovania ukončenia reťazca.

Jedna cDNA, identifikovaná ako PTK1, sa použila ako sonda na skríning knižníc cDNA ľudského melanómu a melanocyty. Klon označený ako PTK1-3.2 obsahoval celý otvorený čítací rámec 2541 nt kódujúci proteín s 847 aminokyselinami. Táto cDNA bola strihaná pomocou Nco1, bluntovaná pomocou DNA polymerázy (Klenow), znova strihaná pomocou EcoR1 a ligovaná do vektora pCDNA3-EE, strihaná pomocou BamH1, bluntovaná a potom strihaná pomocou EcoR1. Vektor pCDNA3-EE bol skonštruovaný tak, že do miesta HindIII/BamH1 sa inzeroval oligo, ktorý kóduje štartový kodón nasledovaný EE epitopom, MEEEEYMPME (sekvencia č. 5) (Grussenmeyer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 7952-7954). Kinázovo mŕtva verzia MLK3 bola pripravená mutáciou K144R pomocou PCR s použitím už publikovanej techniky (Chen, *et al.*, *Biotechniques*, 1994, 17, 657-659). Prvý, mutagénny oligo bol 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCGCCAG-3' (sekvencia č. 6) a druhý oligo bol 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (sekvencia č. 7). Pri použití MLK3 ako šablóny sa tieto oligo použili v PCR na generovanie fragmentu 806 bp a použili sa v druhej PCR s použitím priméra T7 ako druhého ampliméru a MLK3 ako šablóny na generovanie fragmentu 1285 bp. Fragment sa oddelil elektroforézou na agarózovom géle, izoloval, naklonoval do pGEM-5 (Promega) a sekvencoval. Fragment sa excidoval pomocou HindIII a HpaI a inzeroval sa do pCDNA3-EE-MLK3 strihanej pomocou HindIII a HpaI. Ďalšia bodová mutácia sa zistila pri nukleotide 1342. Aby sa korigovala, PflM1 fragment (nt 1093-1418) sa excidoval z MLK3 prírodného typu a použil sa na náhradu totožného fragmentu v K144R mutovanej MLK3.

Príklad 14: pFB-FLAG-MLK3

Aby sa získal proteín MLK3, cDNA bola klonovaná do baculovírusového expresného vektora pFB-FLAG. MLK3 bola excidovaná z PTK1-3.2 štiepením pomocou Nco1, bluntovaná pomocou DNA polymerázy (Klenow), znova strihaná pomocou Not1 a ligovaná do pFB-FLAG štiepenej pomocou Stu1 a Not1. pFB-FLAG je odvodená od pFB (Life Technologies) a má kódovaciu sekvenciu pre FLAG epitop (Hopp, *et al.*, *Biotechnology*, **1988**, 6, 1205-1210) so štartovým kodónom, MDYKDDDDK (sekvencia č. 8), pridaným do polylinkera v mieste BamH1.

Príklad 15: pFB-GST-MLK3(KD)

Baculovírusová expresia kinázovej domény MLK3 sa dosiahla excíziou MLK3 fragmentu z pGEXKG-MLK3(KD) pomocou EcoR1 a Xho1 a ligovaním do pFB vektora strihaného pomocou EcoR1 a Xho1, v ktorom sa kódujúca sekvencia pre glutatión S-transferázu (GST) klonovala upstream. Toto sa dosiahlo získaním sekvencie kódujúcej GST a polylinkera z pGEXKG vektora pomocou PCR s použitím vektora ako šablóny (Guan, *et al.*, *Anal. Bioch.*, **1991**, 192, 262-267). 5' oligo pre PCR vytvoril Bgl2 reštrikčné miesto na konci 5' fragmentu. Tento izolovaný fragment sa potom štiepil pomocou Bgl2 a Hind3 a ligoval sa do pFB štiepenej pomocou BamH1 a Hind3.

Príklad 16: pGEXKG-MLK3(KD)

Fragment cDNA, ktorý obsahoval MLK3 kinázovú doménu aj časť leucínového zipsu (nt 736-1791), sa získal pomocou PCR s použitím cDNA z PTK1. Izolovaný fragment bol štiepený reštrikčnými enzýmami EcoR1 a Xho1, miestami obsiahnutými v PCR oligo a klonovaný do pGEX-KG štiepenej pomocou EcoR1 a Xho1. Tento fragment v pGEX-KG sa potom skrátil pomocou PCR tak, aby obsahoval len kinázovú doménu (nt 736-1638).

Príklad 17: pKH3-MLK2, pKH3-MLK2(KA)

MLK2 bola klonovaná pomocou degenerovanej PCR (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 273, 701-710; Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500). Segmenty cDNA kódujúcich katalytické subdomény proteínkináz exprimované v epitelovej nádorovej bunkovej línii Colo 16 sa amplifikovali z RNA reverznou transkriptázovou PCR.

Degenerované PCR priméry boli založené na sekvenciách kódujúcich konzervované motívy v subdoménach Vib a VIII katalytických domén kinázy rodiny receptora epidermálneho rastového faktora. Sekvencie primérov boli nasledovné: priamy primér, 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G(A)ACC(T)T-3' (sekvencia č. 9), reverzný primér, 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTCCAG(C)ACATC-3' (sekvencia č. 10).

Niekoľko produktov PCR bolo klonovaných do M13 a sekvencovaných pomocou sekvenčného kitu T7 Super-Base (Bresatec). Jeden 216-bp produkt PCR sa použil ako sonda na skrining knižnice cDNA λ gt11 ľudského čreva (Clontech, katalógové č. HL10346)). Fragment sa označil náhodným primingom, hybridizácia sa uskutočnila pri 65°C a filtre sa premyli na stringenciu 0,2 X NaCl/citrát (150 mM chlorid sodný, 15 mM citrát sodný, pH 7,0) a 0,5 % SDS pri 65°C. Filtre sa autorádiografovali 16 hodín pri -70°C na film Kodak XAR-5. Izolovali sa štyri klony a najdlhší, 1,2 kb, sa použil na resondovanie tej istej knižnice pri tých istých podmienkach. Vybrali sa štyri ďalšie klony a jeden z týchto klonov predstavoval 1034 bp fragment MLK2. Tento klon sa použil na sondovanie knižnice λ gt10 ľudského mozgu. Skrinovalo sa približne 500 000 klonov a izoloval sa jeden 3454 bp klon predstavujúci celý kódovací región MLK2.

MLK2 bola klonovaná z chvosta ATG do polyA, do vektora pKH3 medzi miestami BamH1 a EcoR1 v dvoch krokoch a uprostred sekvencie MLK2 je miesto BamH1. Vektor pKH3 bol skonštruovaný inzerciou troch kópií privesku epitopu HA s nasledujúcim miestom BamH1 medzi miestami Xba1 a EcoR1 pRK7 polylinkera. Aby sa pripravila mutagenizovaná verzia, K125A, MLK2 5' BamH1 fragment sa klonoval do Promega pAlter vektora a mutoval sa podľa odporúčania výrobcu. Fragment sa potom klonoval späť do MLK2 pKH3 vektora.

Príklad 18: pcDNA3-HA-JNK1

JNK1 cDNA sa získala podľa popisu (Coso, *et al.*, *Cell*, 1995, 81, 1137-1146). cDNA sa získala pomocou PCR použitím cDNA ľudského kostrového svalu (Invitrogen) ako šablóny a klonovala sa do Bgl2 / Sal1 miest pcDNA3-HA, modifikovaného pcDNA3 expresného plazmidu kódujúceho HA epitop (Wilson, *et al.*, *Cell*, 1984, 37, 767-778). Tá sa potom excidovala z pcDNA3, vrátane HA epitopu, a ligovala do pGEX-4T3 (Pharmacia). JNK1 cDNA sa excidovala z konštruktu pGEX-4T3 ako Bgl2 / Sal1 fragment

a ligovala sa do pcDNA3-HA, vektoru s HA epitopom pridaným do miesta Hind3/BamH1 v pcDNA3.

Príklad 19: pFLAG-DLK

DLK sa klonovala do expresného vektora pcDNA3 s FLAG epitopom pridaným podľa popisu (Holzman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 30808-30817). Fragment cDNA pre DLK sa izoloval klonovaním pomocou PCR na báze degenerovaného oligonukleotidu. Celková RNA bola extrahovaná z embryonálnych obličiek dňa 13,5 (32 orgánov) a embryonálnych obličiek dňa 17,5 (16 orgánov) pomocou komerčne pripraveného fenol/guanidín izotiokyanátového činidla podľa návodu výrobcu (TRIzol Reagent, Life Technologies, Inc.). Po štiepení pomocou DNázy I neobsahujúcej RNázu sa celková RNA reverzne transkribovala s RNázovou H-reverznou transkriptázou (Superscript, Life Technologies, Inc.) z oligo(dT) syntetického oligonukleotidového priméra na jednovláknovú cDNA. Degenerované oligonukleotidové priméry zodpovedajúce proteín tyrozínkinázovým katalytickým subdoménam VIb a IX, ktoré pôvodne označil Wilks (Wilks, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1989, 86, 1603-1607) sa modifikovali na 5' *EcoRI*, resp. *HindIII* miesta (5'-ATAATTC(GT)GC(TAGC)GCCA(GA)GTC(TAGC)CGGTG-3' (sekvencia č. 11), 5'-ATAAGCTTCC(TC)(AG)T(GC)AAGTGGA(TC)(GC)GC(AGC)CC(CT)GA-3') (sekvencia č. 12). Štyridsať cyklov PCR sa uskutočnilo počas 1,5 min pri 94 °C, 2 min pri 37 °C a 3 min pri 63 °C. Pridali sa čerstvé činidlá a uskutočnilo sa ďalších 40 cyklov pred konečným 10-minútovým predĺžením pri 72 °C. Získaný 200-210-bp produkt amplifikácie DNA sa gélovo izoloval, subklonoval do pripraveného plazmidu pGEM7zf(+) (Promega) a transformoval do *Escherichia coli*. Miniprep plazmidová DNA sa pripravila z transformovaných baktérií a časť sa štiepila reštrikčnými endonukleázami *EcoRI* a *HindIII*; klony obsahujúce inzerty sa sekvencovali.

195-bp DLK cDNA fragment získaný z degenerovanej PCR sa rádioaktívne označil a použil na skríning približne 1×10^6 rekombinantov Uni-ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA), knižnicu cDNA mozgu dospelaj myši primovanú pomocou oligo(dT) (Holzman, *et al.*, *Mol Cell Biol*, 1990, 10, 5830-5838). Filtre sa hybridizovali v tlmivom roztoku pozostávajúcom z 50 % formamidu, 5 x SSC, 3 x Denhardtov roztok, 0.25 % SDS, 1 mg/ml kyseliny polyadenylovej a 200 mg/ml DNA z mlieču lososa pri 42 °C. Filtre sa premyli raz pri

teplote miestnosti v 2 x SSC, 0,2 % SDS a dvakrát 30 min pri 65 °C. Identifikovalo sa dvadsaťpäť jedinečných klonov; 10 klonov sa vyčistilo do homogénosti, *in vivo* excidovalo podľa protokolu výrobcu a reštrikčne zmapovalo. Dva najdlhšie klony (3401 a 3397 bp, lišiac sa len na koncoch 5') sa sekvencovali pozdĺž oboch vlákien po celej dĺžke.

Fragment cDNA *NotI-XhoI* DLK (3401 bp) sa subklonoval do pcDNA3 eukaryotického expresného vektora na báze cytomegalovírusového promótora (Invitrogen, San Diego, CA) (konštrukt označený ako pcDNA3-DLK). Ďalej sa vyrobil konštrukt označený pomocou NH₄-Met FLAG epitopu (DYKDDDDK) (sekvencia č. 13) (pFLAG-DLK). PCR sa použila na amplifikáciu fragmentov cDNA, ktoré kodovali miesto 5' *HindIII*, DLK Kozakovu konsenzuálnu sekvenciu obsahujúcu iniciačný ATG, FLAG epitop a DLK cDNA sekvenciu otvoreného čítacieho rámca od nukleotidu 88 po interné *EcoRI* miesto pri nukleotide 758. (Syntetické oligonukleotidy čistené pomocou HPLC použité v ekvimolárnych množstvách: 5'-

ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACTACAAGGACGACGATGAC

AAGGCCTGCCTCCATGAAACCCGAACA-3' (sekvencia č. 14) pre FLAG konštruktový sense primér a 5'-GACAGGGCGGCCGGCTCT-3' (sekvencia č. 15) pre antisense primér.) Gélovo čistené amplifikované fragmenty štiepené pomocou *HindIII* a *EcoRI* sa subklonovali do *HindIII-EcoRI* do pripraveného pcDNA3-DLK plazmidu. Konštrukty sa sekvencovali pozdĺž oboch vlákien, aby sa zabezpečila vernosť Taq polymerázy a udržanie čítacieho rámca.

Príklad 20: pcDNA3-MLK1

Časť 5' z MLK1 sa získala z databázy EST (akcesné č. AA160611). Tento klon bol fúziou medzi MLK1 a ďalšou cDNA neznámej totožnosti. Obsahovala doposiaľ nepublikovanú 5' sekvenciu MLK1 spolu s časťou už publikovanej kinázovej domény MLK1 (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 273, 701-710). MLK1 cDNA sekvencia z klonu EST je nasledovná:

GAATTCGGCACGAGAGGACTCGCAGGTGTCCGGCGACGAG

GGCTGGTGGACCGGGCAGCTGAACCAGCGGGTGGGCATCTTCCCCAGCAA

CTACGTGACCCCGCGCAGCGCCTTCTCCAGCCGCTGCCAGCCCGGCGGCG

AGGACCCCAGTTGCTACCCGCCCATTGAGTTGTTAGAAATTGATTTTGCG
 GAGCTCACCTTGAAGAGATTATTGGCATCGGGGGCTTTGGGAAGGTCTA
 TCGTGCTTTCTGGATAGGGGATGAGGTTGCTGTGAAAGCAGCTCGCCACG
 ACCCTGATGAGGACATCAGCCAGACCATAGAGAATGTTGCGCCAAGAGGCC
 AAGCTCTTCGCCATGCTGAAGCACCCCAACATCATTGCCCTAAGAGGGGT
 ATGTCTGAAGGAGCCCAACCTCTGCTTGGTCATGGAGTTTGCTCGTGGAG
 GACCTTTGAATAGAGTGTTATCTGGGAAAAGGATTCCCCCAGACATCCTG
 GTGAATTGGGCTGTGCAGATTGCCAGAGGGATGAACTACTTACATGATGAGGCAATT
 GTTCCCATCATCCACCGCGACCTTAAGTCCAGCAAC (sekvencia č. 16). Z tejto
 translácie vzniká: NSAREDSQVS GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTPRSAFSS
 RCQPGGEDPS CYPPIQLLEI DFAELTLEEI IGIGGFGKVY RAFWIGDEVA
 VKAARHDPDE DISQTIENVR QEAKLFAMLK HPNIIALRGV CLKEPNLCLV
 MEFARGGPLN RVLSGKPJPP DILVNWAVQI ARGMNYLHDE AIVPIIHRDL KSSN
 (sekvencia č. 17).

3' časť MLK1 bola najprv klonovaná degenerovanou PCR podľa publikovaného postupu (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 701-710). Protokol na klonovanie 3' časti MLK1 bol rovnaký ako pre MLK2 s nasledujúcimi výnimkami. Zo štyroch klonov získaných z reskríningu knižnice s 1,2 kb klonom tri predstavovali MLK1. Žiadny z klonov neobsahoval celú kinázovú doménu, ktorá sa získala pomocou PCR.

Fágy z 1 µl alikvótov amplifikovaných knižníc (cDNA bunkových línií normálneho epitelu ľudského čreva a karcinómu ľudského čreva T84 v λ Uni-ZAPXR (Stratagene, katalógové č. 937204) sa lýzovali suspendovaním v 20 µl vody a okamžitým zmrazením. 5 µl vzorka lýzovaného fágu sa použila ako šablóna PCR v dvoch reakciách pre každú knižnicu. Priméry predstavujúce vektory sa vzali z nukleotidových sekvencií susediacich s miestami klonovania. V prípade knižnice buniek črevnej T84 sa použili sekvenčné priméry T3 a T7 (Promega). V každej reakcii bol jeden primér z 3' - 5' vlákna génu MLK1, približne 100 bp od 5' konca známej sekvencie. Druhý primér bol jedným z dvoch vektorových primérov. Reakčné zmesi PCR obsahovali 1 X PCR tlmivý roztok, 2,5 mM chloridu horečnatého, 1 U *Taq* polymerázy (všetko od Bresatec), 0,2 mM dNTP a 0,4 mM každého priméru v celkovom objeme 50 µl. Reakčné podmienky boli 60s pri 95 °C, 90s pri 52 °C,

90s pri 72 °C počas 30 cyklov s 15 min predĺžením v poslednom cykle. Produkty PCR boli klonované a sekvencované podľa vyššie uvedeného popisu. Najdlhší klon zo skrínungu knižnice a fragment PCR, ktorý obsahoval ďalšiu sekvenciu MLK1, sa spolu ligovali, čím sa vytvorila 1,08 kb MLK1 cDNA v pUC18.

Klon MLK1 z databázy EST bol poskytnutý vo vektore pBluescript (Stratagene). MLK1 cDNA z knižnice čreva bola ligovaná do EST klonu štiepením s EcoRI, bluntovaná pomocou Klenow a potom strihaná s AflII. Tento izolovaný fragment bol klonovaný do MLK1 cDNA z databázy EST strihanej pomocou XhoI, bluntovaný pomocou Klenow a strihaný pomocou AflII. Tento nový konštrukt bol potom excidovaný z pBluescript štiepením s NotI a ApaI a ligovaný do pcDNA3-EE tiež strihanej s NotI a ApaI. Všetky klonovacie pripojenia boli sekvenčne overené.

Príklad 21: Expresia GST-MLK3_{KD} pomocou *E. coli*

pGEXKG-MLK3(KD) bola transformovaná do kmeňa *E. coli* BL21 elektroporáciou. Baktérie obsahujúce plazmid boli naočkované do 15 litrového fermentora Applikon v 10 litrovom objeme nasledujúceho bohatého média: 1,95 g/l K₂HPO₄, 0,9 g/l KH₂PO₄, 0,1 g/l ampicilínu, 0,3 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,92 g/l MgSO₄·7H₂O, 42,7 mg/l Na citrátu, 21,8 mg/l FeSO₄·7H₂O, 0,5 ml stopových kovov Pichia (Higgins, *et al.*, *Methods Molecular Biology*, 1998, 103, 149-177), 20 g/l casaminokyselin, 40 g/l glycerolu, 25,5 mg/l CaCl₂. Baktérie sa kultivovali cez noc pri 800 ot./min/68 % rozpusteného kyslíka/30 °C, kým kultúra dosiahla OD₆₀₀ = 4,4. Produkcia rekombinantného proteínu bola indukovaná pridaním 1 mM izopropyl-β-D-tiogalaktozidu s pokračujúcou fermentáciou pri 25 °C až do 6 hodín. Baktérie sa potom oddelili centrifugovaním a bunková pasta sa uložila zmrazená pri -20 °C až do vyčistenia.

Príklad 22: Čistenie bakteriálnej GST-MLK3_{KD}

Čiastočne vyčistená GST-MLK3_{KD} bola pripravená sonikáciou 100 g bakteriálnej bunkovej pasty v 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM ditiotreitolu (DTT), pH 7,5 (tlmivý roztok A). Roztok sa upravil na 1 % pomocou Triton X-100 a miešal sa na ľade 1 hodinu. Supernatant sa po 45 minútach centrifugovania pri 20 000 x g miešal 1 hodinu na ľade s 10 ml živice glutatión Sepharose 4B (Pharmacia) ekvilibrovanej v tlmivom roztoku A. Peletovaná živica sa premyla dvakrát s 12,5 objemami tlmivého

roztoku A a potom sa eluovala s 20 ml 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DTT (tlmivý roztok B) s obsahom 20 mM glutatiónu, pH 7,5. Proteín bol dialyzovaný cez noc oproti tlmivému roztoku B a uložený v alikvótoch pri -80°C .

Príklad 23: Baculovirálna expresia FLAG-MLK3 a GST-MLK3_{KD}

Rekombinantné baculovírusy exprimujúce FLAG-MLK3 a GST-MLK3_{KD} boli produkované zo svojich príslušných transferových vektorov, pFB-FLAG-MLK3 a pFB-GST-MLK3_{KD} pomocou BAC-TO-BAC systému (Life Technologies) podľa návodu na použitie. Suspenzné kultúry buniek Sf21 (Vaughn, et al., *In Vitro*, 1977, 13, 213-217) sa kultivovali pri $27^{\circ}\text{C}/120$ ot./min v doplnenom Graceho médiu (Hink, *Nature*, 1970, 226, 466-467) s 10 % teplom inaktivovaného fetálneho hovädzieho séra (FBS). Aby sa pripravila rekombinantná FLAG-MLK3, bunky Sf21 s hustotou $1,5 \times 10^6$ buniek/ml doplneného Graceho média obsahujúceho 5 % FBS sa infikovali s multiplicitou infekcie (MOI) 3,1 a oddelili sa 39 hodín po infekcii. Aby sa pripravila rekombinantná GST-MLK3_{KD}, bunky Sf21 s hustotou $1,5 \times 10^6$ buniek/ml doplneného Graceho média obsahujúceho 5 % FBS sa infikovali s MOI 2 a oddelili sa 41 hodín po infekcii. V oboch prípadoch sa peletované bunky resuspendovali v tlmivom roztoku pozostávajúcom z 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,5 mM Pefabloc SC, 5 μM pepstatínu, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinínu, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptínu, pH 7,4. Supernatant sa po 1 hodine centrifugovania pri $147\,000 \times g$ adjustoval na pH 7,4 pomocou 3 M Tris bázy a potom sa uložil pri -70°C pred vyčistením.

Príklad 24: Čistenie baculovirálny GST-MLK3_{KD}

Čiastočne vyčistená baculovirálna GST-MLK3_{KD} bola pripravená glutatiónovou afinitnou chromatografiou. Na 10 ml bunkového extraktu (26,6 mg celkového proteínu) sa pridal 1 ml živice glutatión Sepharose 4B (Pharmacia) ekvilibrovanej v 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4 (tlmivý roztok C) a proteín sa nechal viazať 45 min pri 4°C . Živica sa potom premyla v stĺpcovej forme 30 objemami stĺpca tlmivého roztoku C a potom sa eluovala 5 objemami stĺpca tlmivého roztoku C obsahujúceho 20 mM glutatión. Kombinovaný konečný produkt bol dialyzovaný cez noc oproti tlmivému roztoku C a uložený v alikvótoch pri -70°C .

Príklad 25: Čistenie baculovirálnej FLAG-MLK3

Čiastočne vyčistená baculovirálna FLAG-MLK3 bola pripravená protilátkovou afinitnou chromatografiou. Proteín z 15 ml extraktu (19.5 mg celkového proteínu) s dodatočným 0,1 M NaCl sa naviazal na 0,25 ml stĺpec M2 monoklonálnej protilátky FLAG peptidu naviazanej na agarózovú živicu (Sigma) opakovaným nanášaním (celkovo tri razy). Živica sa ekvilibrovala 5 objemami stĺpca 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (TBS), 3 objemami stĺpca 0,1 M glycínu, pH 3,5 a ďalšími 5 objemami stĺpca TBS pred chromatografiou. Rekombinantný proteín bol primárne eluovaný 5 objemami stĺpca 0,2 mM FLAG peptidu (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (sekvencia č. 18) v TBS. Proteín sa uložil v alikvótoch pri -80°C až do testu.

Príklad 26: Dominantný negatívny mutant: Dominantný negatívny mutant rodiny MLK blokuje smrť v diferencovaných bunkách PC12 po odstránení nervového rastového faktora

Bunková línia PC-12 odvodená z potkanieho pheochromocytómového nádoru sa široko používala ako model neurónovej bunky na skúmanie molekulových udalostí vedúcich k neurónovej smrti (prehľadný článok: Troy, *et al.*, *Adv. Neurology*, 1997, 103-111). Nervový rastový faktor (NGF) indukuje diferencovanie buniek PC-12 na sympatický neurónový fenotyp (Greene, *Cell Biol.*, 1978, 78, 747-755). NGF diferencované bunky PC-12 sú závislé od NGF v súvislosti s prežitím a podliehajú morfológicky popísanej apoptotickej smrti pri odstránení NGF z kultivačného média. Bol vyvinutý bunkový systém na určenie efektu členov kinázovej rodiny zmiešaného rodu na smrť buniek PC-12 po vysadení NGF. Bunky PC-12 sa transfikovali s cDNA kódujúcou dominantný negatívny (DN) mutant MLK-3 pomocou Pfx lipid transferového systému podľa odporúčania výrobcu (Invitrogen, Carlsbad, CA). Stabilná zásoba DN-MLK-3 exprimujúcich transfektant bola vybraná pomocou G418 sulfátu (Mediatech Inc., Herndon, VA). Približne 30 % buniek v týchto zásobách exprimuje DN MLK3 podľa určenia imunohistochémiou. Zásoby buniek stabilne exprimujúcich mutantnú kinázu boli naplatničkované na polyornitínom/laminínom (po 10 $\mu\text{g/ml}$ vo fosfátom tlmene fyziologickom roztoku) pokryté bunkovo-kultivačné 96-jamkové platničky s hustotou 2×10^4 buniek/jamku a pôsobilo sa na ne 100 ng/ml NGF počas 7 dní. Médium obsahujúce NGF sa odstránilo, bunková monovrstva sa premyla fosfátom tlmene fyziologickým roztokom a médium sa nahradilo médiom obsahujúcim

neutralizujúcu NGF protilátku (kat. č. N6655; Sigma, St. Louis, MO) s konečným zriedením 1:1000 na 1-5 dní. Životaschopnosť buniek sa kvantifikovala testom životaschopnosti buniek pomocou konverzie tetrazoliovej soli MTS na farebný formazan, ktorý sa odčítal pri absorbanzii 570 nm na prístroji CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) podľa odporúčaní výrobcu (Promega, Madison, WI). Stabilné zásoby exprimujúce DN-MLK-3 sa čiastočne zachránili pred smrťou buniek spôsobenou vysadením NGF (obrázok 10).

Príklad 27: Test enzymatickej aktivity rekombinantného proteínu MLK

Aby sa ukázalo, že proteín MLK exprimovaný buď v baculovírusovom alebo bakteriálnom expresnom systéme je enzymaticky aktívny, možno použiť niekoľko foriem testov. Proteín MLK môže byť konštruktom plnej dĺžky alebo kinázovou doménou exprimovanou buď v baculovírusovom alebo bakteriálnom expresnom systéme. Test môže byť na báze protilátok, napríklad enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), časovo rozlíšená fluorescencia (TRF – time-resolved fluorescence) alebo fluorescenčná polarizácia (FP). Protilátka môže byť monoklonálna alebo polyklonálna s reaktivitou voči fosfoserínu, fosfotreonínu alebo fosfo-špecifickému substrátu. Alternatívne možno použiť metódu nie na báze protilátok, napríklad test na báze rádioaktívneho gélu (pozrite obrázok 11), multiscreen testu zrážaním kyselinou trichlóroctovou (TCA) (obrázok 13), scintilačným proximitným testom (SPA – scintillation proximity assay), flashplate metódou alebo testom fosfocelulózového filtra (obrázok 13). Test môže byť postavený na monitoringu priamej fosforylácie substrátu, alebo môže byť kombinovaným testom využívajúcim downstream kinázy v signalizačnej dráhe. Substrátom môže byť špecifický substrát, napríklad SEK-1, alebo relatívne nešpecifický substrát, napríklad myelínový bázický proteín (MBP).

Príklad 28: Kinázové testy:

(1) Kinázový test na báze rádioaktívneho gélu

Kinázová aktivita MLK-3 bola testovaná monitoringom zabudovania ^{32}P z $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ do substrátu MLK (napr. kinázovo mŕtva SEK-1; myelínový bázický proteín). 50- μl testová zmes obsahovala tlmivý roztok A (20 mM MOPS, pH 7,2, 25 mM β -glycerol

fosfátu, 5 mM EGTA, 1 mM ortovanadičnanu sodného, 1 mM ditiotreitolu), 15 mM MgCl_2 , 100 μM ATP, 10 μCi [γ - ^{32}P]-ATP a 0,1 μg kinázovo mŕtveho SEK-1 substrátu (Stressgen, Inc; viazaná glutatión S-transferáza-SEK-1 (GST-SEK-1) bola uvoľnená z glutatión-agarózových granúl s 10 mM glutatiónom, pH 8,0) alebo 25 μg MBP (Sigma Chemical Co.). Reakcia sa iniciovala pridaním MLK proteínu (kinázová doména alebo prípravok obsahujúci celý proteín aj kinázovú doménu) alebo kontrolného proteínu. Zmes sa inkubovala 30 minút pri 30 °C. Na konci reakcie sa pridal 2 x redukčný vzorkový tlmivý roztok. Zmes sa varila 5 minút, naniesla sa na buď 12 % SDS-PAGE gél (s použitím MBP ako substrátu) alebo 8 % gél (SEK-1 ako substrát). Po elektroforéze sa gél vysušil. Kvantifikácia zabudovania fosfátu do substrátu, SEK-1, sa uskutočnila pomocou prístroja Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, CA). Výsledky experimentov určených na preukázanie enzymatických aktivít baculovírusom exprimovanej MLK-3 (FLAG-značený proteín plnej dĺžky alebo GST-značená kinázová doména) pomocou kinázovo mŕtvej GST-SEK-1 alebo MBP ako substrátu sú uvedené na obrázkoch 11A a 11B.

(2) Western Blot analýza

Kinázová aktivita baculovírusom exprimovanej MLK-3 sa skúmala immunoblot analýzou. 20- μl testovacia zmes obsahovala tlmivý roztok A, 15 mM MgCl_2 , 100 μM ATP a 0,1 μg kinázovo mŕtveho SEK-1 substrátu. Reakcia sa nechala prebiehať 30 minút pri 30°C, potom sa ukončila pridaním 10 μl 4 x redukčného vzorkového tlmivého roztoku. Proteíny sa oddelili na 8 % Tris-glycínovom géle a elektroforeticky preniesli na membránu Immobilon PVDF. Membrána sa inkubovala fosfo-špecifickou SEK-1 (Thr223) protilátkou (New England Biolabs, Inc.) nasledovanou chrenovou preoxidázou označeným kozím anti-králičím IgG (Bio-Rad). Detekcia imunoreaktívnych pásov sa uskutočnila pomocou zosilnenej chemiluminiscencie (Amersham). Fosforylácia kinázovo mŕtvej GST-SEK-1 pomocou proteínu FLAG-MLK-3 (baculovírusový prípravok obsahujúci proteín plnej dĺžky aj kinázovú doménu) je ilustrovaná na obrázku 12.

(3) Multiscreen test zrážaním kyselinou trichlóroctovou (TCA)

Kinázová aktivita bakteriálne exprimovanej GST-MLK-3 kinázovej domény sa vyhodnotila pomocou Millipore Multiscreen testu kyselinou trichlóroctovou (TCA) „in-plate“ podľa popisu Pitt, *et al.*, *J. Biomol. Screening*, 1996, 1, 47-51). Testy sa uskutočnili v 96-

jamkových platničkách Multiscreen Durapore (Millipore). Každá 50- μ l testová zmes obsahovala 20 mM Hepes, pH 7,4, 20 mM MgCl_2 , 20 mM MnCl_2 , 2 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 1 μCi [$\gamma\text{-P}^{32}$] ATP a 30 μg MBP substrátu. Reakcia sa iniciovala pridaním MLK proteínu a nechala sa prebiehať 15 min pri 37 °C. Reakcia sa ukončila pridaním 25 μ l 50 % TCA. Platničky sa nechali ekvilibrovať 30 min pri 4°C, potom sa umyli ľadovo studenou 25 % TCA. Na platničky sa pridal scintilačný kokteil a rádioaktivita sa určila pomocou scintilačného počítača Wallac MicroBeta 1450 PLUS. Odozva na dávku proteínu oproti tvorbe MBP označeného ^{32}P je zobrazená na obrázku 13.

(4) Test fosfoacelulózového filtra

Kinázový test sa uskutočnil v 50- μ l reakčnej zmesi obsahujúcej 20 mM Hepes, pH 7,4, 20 mM MgCl_2 , 20 mM MnCl_2 , 2 mM DTT, 0,1 mM Na_3VO_4 , 1 μCi [$\gamma\text{-P}^{32}$] ATP a 30 μg MBP. Reakcia sa iniciovala pridaním MLK proteínu a nechala sa prebiehať 15 min pri 37 °C. Reakcia sa ukončila pridaním 75 μ l 75 mM kyseliny fosforečnej. Alikvót neutralizovaného roztoku sa naniesol priamo na fosfoacelulózovú membránu (Pierce). Alternatívne možno použiť 96-jamkovú fosfoacelulózovú multiscreen platničku (Millipore). Membrány sa premyli 75 mM H_3PO_4 . Naviazaný fosforylovaný MBP označený ^{32}P sa eluoval do zberných skúmaviek pridaním 1 M hydroxidu sodného. Rádioaktivita sa určila Cerenkovovým počítaním v Beckmanovom scintilačnom počítači (Somerset, NJ). Tvorba fosforylovaného MBP s rastúcou koncentráciou bakteriálne exprimovanej GST-MLK-3 kinázovej domény je uvedená na obrázku 13.

Príklad 29: Test na určenie viazania zlúčenín na rekombinantnú MLK rodinu

K-252a (zlúčenina III-3; pozrite tabuľku 4), indolokarbazolový metabolit druhu *Nocardia*, sa viaže na rad serín/treonín- a tyrozínkináz (Angeles, et al., *Anal. Biochem.* 1996, 236, 49-55; Knight, et al., *Anal. Biochem.*, 1997, 247, 376-381). Tríciový K-252a ligand sa použil na vyhodnotenie viazania na ľudskú rekombinantnú MLK-3 plnej dĺžky zo surového prípravku baculovírusom infikovaných buniek. [^3H]K-252a bol špecificky označený tríciumom v polohách 3 a 9 kontraktom s výrobkami NEN Research (Billerica, MA) a mal špecifickú aktivitu 40 Ci/mmol. Reakcie viazania sa uskutočnili v 1 ml na 96-jamkovej platničke. Reakčná zmes obsahovala 50 mM tlmiaceho roztoku MOPS, pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM MnCl_2 , 1 mg/ml BSA, 1 % DMSO a 0,25 nM [^3H]K252a. Vzorky sa

spracovali trojnásobne s koncentráciou 5 µg/ml surovej MLK-3 získanej z baculovírusa. Nešpecifické viazanie bolo definované ako viazanie za prítomnosti neoznačeného 1,2 µM K252a a odčítalo sa od celkového viazania, čím sa získalo špecifické viazanie. Pri tomto zriedení bolo 12-15 % celkových počtov nešpecificky viazaných na proteín a 75-85 % týchto počtov bolo špecificky viazaných na MLK-3 (obrázok 14). Všetky experimenty sa uskutočňovali 2 hodiny pri 4 °C. Komplexy [³H]K252a/MLK-3 sa zachytili na filtroch GF/C Whatman pomocou zberača Brandel, premyli sa studeným tlmivým roztokom MOPS/NaCl a spočítali sa na počítači Wallac Micro Beta. Uskutočnil sa experiment viazania do nasýtenia, aby sa získala konštanta K_d pre K252a. Příklad výsledkov z jedného z týchto experimentov je uvedený na obrázku 14. Získala sa K_d 0,89 nM (interval spoľahlivosti: 0,2 až 1,5 nM).

Príklad 30: Testy intaktných buniek

(A) Systém nadmernej expresie Cos 7

Materiály

K-252a a deriváty tejto zlúčeniny poskytla firma Kyowa-Hakko Kogyo Co. Ltd. (Tokio, Japonsko) (Kaneko et al., 1997). Zlúčeniny sa rozpustili v dimetylsulfoxide (DMSO) čistoty pre kultiváciu buniek a uložili sa v tme pri 4 °C. Všetky zriedenia zlúčenín sa robili v Dulbeccovom modifikovanom Eagleho médiu (DMEM) obsahujúcom 1 % albuminu hovädzieho séra. Hemaglutinínová (HA) protilátka bola kúpená od firmy BAbCO (Richmond, CA). AP-1 (c-jun) substrát bol kúpený od firmy Promega (Madison, WI). [γ -³²P]ATP (6000 Ci/mmol) bol kúpený od firmy Amersham (Arlington Heights, IL).

Bunková kultúra Cos7

Bunky Cos7 z obličiek *Cercopithecus aethiops* boli získané od firmy ATCC, Rockville, Maryland (CRL 1651) a udržiavané v DMEM obsahujúcom 10 % hovädzieho séra, 2 mM glutamínu, 1 mM pyruvátu, 50 U/ml penicilínu/streptomycínu pri 37 °C v atmosfére 10 % CO₂, 90 % vzduch. Bunky Cos7 sa odpojili na pasážovanie pridaním 0,25 % trypsinu.

(1) Nadmerná expresia členov rodiny MLK a JNK1 v bunkách Cos7

Bunky Cos7 sa naplatničkovali pri 80 % konfluencii a transfikovali sa po 2 μ g cDNA konštruktmi s použitím lipofektamínu podľa odporúčaní poskytovateľa (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). cDNA plnej dĺžky ľudskej MLK-3, MLK-2 alebo myšacej DLK alebo čiastočnej ľudskej MLK-1 podľa vyššie uvedeného popisu a ľudská JNK1 plnej dĺžky značená hemaglutinínom A, ktorú láskavo poskytol J. Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD), sa subklovovali do pcDNA3 vektora (Invitrogen, San Diego, CA). Po 48 hodinovej transfekcii sa na bunky pôsobilo 0,025% DMSO alebo 500 nM of uvedených zlúčenín počas 2 hodín s nasledujúcou lýzou v 0,4 ml tlmivého roztoku Triton (1 % Triton X-100, 50 mM chlorid sodný, 10 mM Tris (pH 7,6), 0,1 % hovädzí sérový albumín, 30 μ M pyrofosfát sodný, 50 mM fluorid sodný, 20 μ g/ml aprotinín, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid, 1 mM vanadičnan sodný). Aktivita JNK z lýzátu bola testovaná imunoprecipitačným/kinázovým testom podľa nižšie uvedeného popisu.

(2) Imunoprecipitácia a kinázový test z celých buniek

Lyzát z buniek Cos 7 sa zmeral na koncentráciu proteínu pomocou súpravy Micro BCA od firmy Pierce (Rockford, IL) a rovnaké množstvá proteínu sa imunoprecipitovali HA protilátkou 1 hodinu pri 4 °C. Imunoprecipitáty sa peletovali centrifugovaním v centrifúge microfuge počas 20 s, resuspendovali sa v tlmivom roztoku Triton, premyli 2 krát centrifugovaním s nasledujúcim posledným premytím v kinázovom tlmivom roztoku (20 mM Hepes pH 7,4, 20 mM MgCl₂, 2 mM ditiotritol, 0,1 mM vanadičnan sodný). Imunoprecipitát sa resuspendoval v kinázovom tlmivom roztoku obsahujúcom 1 μ M ATP a 5 μ Ci [γ -³²P]ATP a substrát (1 μ g/vzorku AP-1) a inkuboval sa 15 min pri 30 °C. Kinázová reakcia sa zastavila pridaním redukujúceho vzorkového tlmivého roztoku (Laemmli, Nature 1970: 227, 680-685). Vzorky sa zahrievali na 80 °C 5 min a naniesli sa na 10 % SDS-polyakrylamidové gély. Proteíny sa oddelili elektroforézou. Gél sa vysušil a rádioaktivita v substráte AP-1 sa kvantifikovala na prístroji Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, Ca.). Výsledky z experimentov, v ktorých sa MLK-3, MLK-2 a DLK koexprimujú s HA-JNK1 a inkubujú za neprítomnosti alebo prítomnosti K-252a, sú uvedené na obrázkoch 15A a 15B. Naproti tomu derivát pôvodnej zlúčeniny K-252a označený ako zlúčenina III-3 (pozrite tabuľku 4), ktorý je selektívnejším kinázovým

inhibítorom, neinterferoval s dráhou JNK aktivovanou inou MAPKKK nahor od JNK, MEKK1 (obrázok 15C).

(B) Celobunkový reportérový test pre JNK aktivovanú pomocou MLK

Pokusy o odvodenie klonov konštitutívne exprimujúcich rodinu MLK boli neúspešné, čo naznačuje, že nadmerná expresia MLK môže postihovať prežívanie buniek (Bergeron *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 237, 153-155; Nagata, *et al.*, *EMBO J.*, 1998, 17, 149-158). Preto pri vývoji celobunkového testu na sledovanie biochemických udalostí indukovaných pomocou MLK môže byť potrebná bunková línia obsahujúca geneticky inžinierovaný indukovateľný expresný systém príslušnej kinázy. Napríklad bunková línia PC-12 transfikovaná tetracyklínom kontrolovaným transaktívatorom. Keď sa bunky ďalej transfikujú skúmaným génom vedeným indukovateľným promótorom *tetO*, expresia tohto génu je úzko kontrolovaná tetracyklínom v médiu (Shockett *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 6522).

Aby sa kvantifikovala aktivácia MLK, možno merať fosforyláciu downstream substrátov, ako je napríklad MEK4, JNK alebo c-jun, vo viacerých testových formách, ako je opísané vyššie. Ďalším prístupom ku kvantifikácii aktivácie MLK v celých bunkách je použiť reportérovú enzýmovú aktivitu, napríklad reportérový systém c-jun luciferázy komerčne dostupný v systéme PathDetect™ (Stratagene, LaJolla, CA). V tomto systéme sa tetracyklínom indukovateľná bunková línia transfikuje dvoma plazmidmi. Jeden plazmid konštitutívne exprimuje fúziu cJun NH₂-koncovej transaktivačnej domény s kvasnicovou GAL4 DNA viažucou doménou (cJun-DBD fúzny proteín). Ďalší plazmid nesie kódovacie sekvencie pre luciferázu svätojánskej mušky vedené piatimi tandemovými opakovaniami miesta viazania GAL4. Po aktivácii MLK sa fosforyluje downstream substrát JNK, cJun-DBD fúzny proteín, viaže sa na miesta viazania GAL4 a indukuje transkripciu luciferázového génu. Luciferáza sa jednoducho testuje v bunkových lyzátoch pridaním svojho substrátu (Promega, Madison, WI) a meraním chemiluminiscencie.

Príklad 31: Asociácia inhibície členov rodiny MLK s prežívaním motorických neurónov

Prežívanie kultúr potkanej miechy obohatených o motorické neuróny

Miechy sa vypitvali z plodov potkana Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) embryonálneho veku (E) 14,5-15. Bunky len z ventrálnej časti miechy sa oddelili a ďalej obohatili na motorické neuróny centrifugovaním pri 6,5 % krokovom metrizamidovom gradiente, ako už bolo publikované (Henderson, *et al.*, 1993), a analyzovali sa na čistotu vyfarbovaním nízkoafinitnou protilátkou neurotrofinového receptora (IgG-192, Boehringer-Mannheim) (dáta nezobrazené). Bunky sa naočkovali na 96-jamkové platničky vopred pokryté poly-L-ornitínom a laminínom (po 5 $\mu\text{g/ml}$) pri hustote 6×10^4 buniek/ cm^2 v chemicky definovanom bezsérovom médiu N2 (Bottenstein, *et al.*, 1979, *supra*). Aby sa oddelilo naviazanie od efektov prežitia, zlúčeniny sa pridali do kultúr po úvodnom období 1 – 3 hodín. Prežívanie neurónov sa vyhodnotilo po 4 dňoch pomocou kalceínu AM (Molecular Probes, Eugene, OR) vo fluorimetrickom teste prežívania (Bozyczko-Coyne, *et al.*, 1993, *supra*). Mikroskopické počty neurónov korelovali priamo s relatívnymi hodnotami fluorescencie. V stručnosti, kultivačné médium sa sériovo zriedilo v DPBS (Dulbeccov fosfátom tlmný fyziologický roztok) a do každej z 96 jamiek sa pridala konečná koncentrácia zásobného 6 μM kalceínu AM. Platničky sa inkubovali 30 min pri 37°C s nasledujúcim sériovým zriedením v DPBS. Fluorescenčný signál sa odčítal pomocou platničky čítajúceho fluorimetra od firmy Millipore (Cytofluor 2350) pri excitácii = 485 nm a emisii = 538 nm. Pre každú platničku sa od všetkých hodnôt odčítalo stredné pozadie získané z jamiek s prídavkom kalceínu AM ale neobsahujúcich žiadne bunky. Lineárnosť fluorescenčného signálu sa overila na koncentráciu a inkubačný čas pre interval bunkových hustôt v týchto experimentoch. Príklad percentuálneho prežitia nad kontrolou motorických neurónov za prítomnosti testovaných zlúčenín pri 250 nM je uvedený v tabuľke 3.

Prežívanie kortikálnych neurónov

Cerebrálne kortiká sa vypitvali z potkaních plodov v embryonálnom dni 18 a enzymaticky sa štiepili, aby sa získala jenobunková suspenzia. Bunky sa nasadili pri hustote $1,56 \times 10^5/\text{cm}^2$ na polyornitínom/laminínom pokryté 96-jamkové tkanivovo-kultivačné platničky v bezsérovom neurálnom bazálnom médiu obsahujúcom doplnky

B27. Platničky sa pokryli roztokom polyornitínu/laminínu (po 8 µg/ml) pripravenom v PBS počas najmenej dvoch hodín pri 37 °C. V *in vitro* dňoch 5 – 7 sa kortikálne neuróny exponovali voči Ab25-35 (20 µM) buď za prítomnosti alebo neprítomnosti testovaných zlúčenín. Zásobné roztoky Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) (1 mM) boli pripravené v deionizovanej destilovanej sterilnej H₂O. Relatívne prežívanie neurónov bolo určené 48 hodín po pridaní peptidu pomocou uvoľňovania laktátdehydrogenázy (LDH) ako indikátora integrity plazmovej membrány/životaschopnosti buniek. LDH bola meraná pomocou súpravy Cytotoxicity Detection Kit (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) podľa pokynov výrobcu. Dáta sú vyjadrené ako percento inhibície uvoľňovania DLH voči kultúram ošetrovaným len AB25-35.

Tabuľka 3

Vzorec	Prežívanie kortikálnych neurónov % kontroly pri 250 nm	Motorické neuróny		Bunky Cos 7 DLK % JNK inhibície pri 500 nm	Bunky Cos 7 MLK3 % JNK inhibície pri 500 nm	Bunky Cos 7 MLK2 % JNK inhibície pri 500 nm	Bunky Cos 7 MLK1 % JNK inhibície pri 500 nm
		Prežívanie % kontroly pri 250 nM	% JNK inhibície pri 500 nm				
III ¹	46, 56	300	65	63, 73	98, 99	89, 67	97, 96
III ²	47, 80	315	88	36, 22, 42	94, 94	69, 44	92, 64
I ³	22, 54	177	88	20, 25	94, 93	0	79, 29
I ⁴	29, 39	165	97	58, 13,	84, 92,	0	63, 38
				52, 8	90		

¹Zlúčenina má vzorec III, kde Z¹, Z², R¹ a R² sú H; X je CO₂CH₃ a R je OH.

²Zlúčenina má vzorec III, kde Z¹ a Z² sú H; X je CO₂CH₃; R¹ a R² sú CH₂SCH₂CH₃; a R je OH.

³Zlúčenina má vzorec I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂OAc; R⁴ je CH₂CH₂(2-pyridyl); a X je CH₂.

⁴Zlúčenina má vzorec I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je H; R⁴ je CH₂CH₂(2-pyrimidinyl); a X je CH₂.

Príklad 32: Imunoprecipitácia endogénnej aktivity JNK z motoneurónových kultúr za neprítomnosti alebo prítomnosti indolokarbazolov alebo kondenzovaných pyrolokarbazolov

Vyčistené motorické neuróny boli naplatničkované pri hustote 6×10^4 buniek/cm² v jamkách s priemerom 16 mm. Bunky sa nechali naviazať v priebehu 2 hodín pred spracovaním. Na bunky sa pôsobilo buď 0,0125 % DMSO alebo 500 nM zlúčeniny počas 2 hodín v definovanom médiu N2. Bunky sa potom prepláchli ľadovo studeným fosfátom tlmeným fyziologickým roztokom lýzou v 0,4 ml tlmivom roztoku Triton podľa vyššie uvedeného popisu v príklade 30. Lyzát z motoneurónových kultúr sa normalizoval na počet buniek a imunoprecipitoval protilátkou JNK1 (kat. č. sc-474) kúpenou od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Aktivita JNK z imunoprecipitátov sa testovala za prítomnosti ³²P-ATP a c-jun substrátu podľa vyššie uvedeného popisu. Profil inhibičnej aktivity 4 testovaných zlúčenín sa porovnal v motorických neurónoch a bunkách Cos7 nadmerne exprimujúcich buď DLK, MLK-1, MLK-2 alebo MLK-3 (tabuľka 3).

Príklad 33: Korelácia medzi inhibíciou aktivity JNK indukovanej pomocou MLK3 v bunkách Cos7 a aktivitou cholinacetyltransferázy v primárnych embryonálnych kultúrach

Aby sme určili, či inhibícia cesty JNK regulovanej týmito kinázami koreluje s neurotrofickými zlúčeninami, vyhodnotili sme účinok zlúčenín na aktivitu JNK v bunkách Cos7 nadmerne exprimujúcich HA-JNK a MLK3. Po 48 hodinách transfekcie sa bunky inkubovali so zlúčeninami pri 500 nM počas 2 hodín, po čom nasledovala bunková lýza. Lyzát sa imunoprecipitoval a kinázová aktivita sa zmerala podľa vyššie uvedeného popisu. Výsledky sú uvedené ako percento inhibície kontrolnej vzorky, kde kontrolou je aktivita JNK za prítomnosti DMSO. Ako vidno v tabuľke 4, väčšina zlúčenín, ktoré boli aktívne v aktivite ChAT miechy a/alebo bazálneho predného mozgu, boli potentnými inhibítormi MLK-3 aktivácie JNK.

Tabuľka 4

Účinok indolo- a indenokarbazolov na JNK aktivitu v bunkách Cos7 nadmerne exprimujúcich MLK3

	Aktivita cholinacetyltransferázy		% inhibície aktivity JNK (priemer)
Zlúčenina	Miecha	Bazálny predný mozog	MLK3 v bunkách Cos7
III-1 ¹	+	+	84
III-2 ²	+	+	96
III-3 ³	+	+	94
I-1 ⁴	+	+	93
I-2 ⁵	+	+	85
I-3 ⁶	+	+	93,5
I-4 ⁷	-	+	95
I-5 ⁸	-	+	97
I-6 ⁹	-	+	58
I-7 ¹⁰	-	+	85,5
III-4 ¹¹	-	+	66
III-5 ¹²	-	+	96
III-7 ¹³	-	+	54
I-8 ¹⁴	+	-	89
III-8 ¹⁵	+	-	94
III-9 ¹⁶	+	+	98,5
III-10 ¹⁷	+	-	78
I-9 ¹⁸	+	-	88
I-10 ¹⁹	+	-	94

	Aktivita cholinacetyltransferázy		% inhibície aktivity JNK (priemer)
Zlúčenina	Miecha	Bazálny predný mozog	MLK3 v bunkách Cos7
III-11 ²⁰	-	-	92,5
I-11 ²¹	-	4-	33
I-12 ²²	-	-	11
I-13 ²³	-	-	1

¹ Zlúčenina vzorca III, kde Z¹ a Z² sú H; X je CO₂CH₃; R¹ je NHCONHC₂H₅; R² je CH₂CH₂(2-pyridyl); a R je OH.

² Zlúčenina vzorca III, kde Z¹ a Z² sú H; X je CO₂CH₃; R¹ a R² sú CH₂OCH₂OCH₂CH₃; a R je OH.

³ Zlúčenina vzorca III, kde Z¹ a Z² sú H; X je CO₂CH₃; R¹ a R² sú CH₂SCH₂CH₃; a R je OH.

⁴ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³ a R⁴ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂OH; R⁵ a R⁶ sú OCH₃; a X je CH₂.

⁵ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂OAc; R⁴ je Br a X je CH₂.

⁶ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂OAc; R⁴ je CH₂CH₂(2-pyridyl); a X je CH₂.

⁷ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁴, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂OH; a X je CH₂.

⁸ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁴, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂CH₂OH; a X je CH₂.

⁹ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R², R³, R⁴, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; a X je S.

¹⁰ Zlúčenina vzorca I, kde A¹, A², R¹, R³, R⁴, R⁵ a R⁶ sú H; B¹ a B² spolu predstavujú O; R² je CH₂CH₂CH₂NHCO(4-(OH)Ph); a X je CH₂.

¹¹ Zlúčenina vzorca III, kde Z¹, Z², R¹ a R² sú H; X je CO₂(CH₂)₄CH₃; a R je OH.

¹² Zlúčenina vzorca III, kde Z¹, Z² a R¹ sú H; R² je CH₂OH; X je CO₂CH₃; a R je OH.

¹³ Zlúčenina vzorca III, kde Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=O$; R^1 a R^2 sú Br; X je CO_2CH_3 ; a R je OH.

¹⁴ Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^3 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^2 je H; R^4 je $CH_2CH_2(2\text{-pyrimidinyl})$; a X je CH_2 .

¹⁵ Zlúčenina vzorca III, kde Z^1 a Z^2 sú H; R^1 je Br; R^2 je I; X je CO_2CH_3 ; a R je OH.

¹⁶ Zlúčenina vzorca III, kde Z^1 , Z^2 , R^1 a R^2 sú H; X je CO_2CH_3 a R je OH.

¹⁷ Zlúčenina vzorca III, kde Z^1 a Z^2 sú H; R^1 a R^2 sú $CH_2CH_2SCH_3$; X je CO_2CH_3 ; a R je OH.

¹⁸ Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^2 , R^3 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^4 je $CH_2CH_2(2\text{-pyridazinyl})$; a X je CH_2 .

¹⁹ Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^3 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^2 je H; R^4 je $CH_2CH_2(2\text{-pyridyl})$; a X je CH_2 .

²⁰ Zlúčenina vzorca III, kde Z^1 , Z^2 , R^1 a R^2 sú H; X je CO_2CH_3 a R je OCH_3 .

²¹ Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^2 je $(CH_2)_3-NH-C(=O)-3,5\text{-dihydroxyfenyl}$; a X je CH_2 .

²² Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^2 je benzoyl; a X je CH_2 .

²³ Zlúčenina vzorca I, kde A^1 , A^2 , R^1 , R^2 , R^3 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^4 je $CH=CH-C\equiv N$; a X je CH_2 .

Příklad 34: Test gélového posunu pre aktiváciu MLK:

Aktivácia MLK môže viesť k indukcii transkripcie *c-jun*, čo má za následok zvýšený proteín c-Jun. Zvýšené množstvo proteínu c-Jun možno merať štandardným testom označovaným ako test gélového posunu. Garner, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **1981**, 9, 3047-3060, ktorá publikácia sa týmto zahŕňa celá odkazom. Rádioaktívne označené dvojvláknové oligoméry DNA, ktoré kódujú väzobné miesto DNA c-Jun, sa inkubujú s jadrovým bunkovým extraktom, po čom nasleduje elektroforéza na akrylamidovom géle a kvantifikácia rádioaktívne označenej DNA posunutej k pomalšej mobilite. Tá predstavuje tú časť DNA, ktorá je viazaná na proteín c-Jun, a je priamoúmerná množstvu proteínu c-Jun v extrakte.

Aktivácia MLK môže indukovať aj fosforyláciu c-Jun. Tú možno zistiť pomocou protilátok, ktoré špecificky rozpoznávajú fosforylovanú formu proteínu v detekčných systémoch, ako napríklad testy Western blots alebo ELISA.

Príklad 35: Prežívanie kuracích embryonálnych neurónov

Materiály

Leibovitzove médiá L15, glukóza, hydrogenuhličitan sodný, trypsín a antibiotiká boli od firmy Gibco. Svalový extrakt bol pripravený podľa popisu (Henderson, *et al. Nature*, **1983**, 302, 609-611, ktorá publikácia sa týmto zahŕňa celá odkazom). Všetky ostatné činidlá boli od firmy Sigma, pokiaľ nie je uvedené inak.

Bunková kultúra

Motorické neuróny (embryonálny deň 5,5) boli izolované imunologickou metódou podľa postupu definovaného v publikácii Bloch-Gallego, *et al., Development*, **1991**, 111, 221-232, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom, s modifikáciami podľa popisu v publikácii Weng, *et al., NeuroReport*, **1996**, 7, 1077-1081, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom. Vyčistené motorické neuróny boli nasadené na 35 mm tkanivovo-kultivačné misky (Nunc) vopred pokryté poly-DL-ornitínom a laminínom (1 $\mu\text{g/ml}$, Upstate Biotech). Kultivačné médium bolo L15 s hydrogenuhličitanom sodným (22,5 mM), glukózou (20 mM), progesterónom (2×10^{-8} M), seleničitanom sodným (3×10^{-8} M), konalbumínom (0,1 mg/ml), inzulínom (5 $\mu\text{g/ml}$), penicilínom-streptomycínom a 10 % teplom inaktivovaným konským sérom. Svalový extrakt bol doplnený pri 30 $\mu\text{g/ml}$. Zlúčenina III-3 bola pripravená ako 4 mM zásobný roztok v DMSO a uložená chránená pred svetlom pri 4 °C. Konečná koncentrácia DMSO v spracúvaných a kontrolných kultúrach bola 0,125 %.

Paravertebrálne sympatické gangliony (SG; embryonálny deň 12 (E12)), gangliony zadného senzorického koreňa miechových nervov (DRG; E9), a ciliárne gangliony (CG; E8) sa vypitvali z kuracích embryí v uvedený embryonálny deň podľa popisu v publikácii Lindsay, *et al., Dev. Biol.*, **1985**, 112, 319-328, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom. Po trypsinizácii a disociácii sa nervovo-bunkové suspenzie naplatničkovali na polyornitínom-laminínom pokryté kultivačné misky v Hamovom kultivačnom médiu F14 doplnenom 10 % konským sérom. Okamžite po naplatničkovaní sa pridali faktory prežitia v nasledujúcich

koncentráciách: Nervový rastový faktor (NGF), 20 ng/ml; ciliárny neurotrofický faktor (CNTF), 10 ng/ml. Kultúry boli udržiavané pri 37 ° a 5 % CO₂ vo zvlhčovanom prostredí.

Počítanie buniek

Neuróny boli naplatničkované do 35 mm kultivačných misiek s mriežkami (Nunc). Vybrané plochy každej misky obsahujúce spolu asi 10 % sa skenovali na prítomnosť fázovo jasných buniek okamžite po naplatničkovaní a znova po 48 hodinách, aby sa vyhodnotilo percento prežitia. Prežívanie buniek bolo potvrdené vitálnym vyfarbovaním trypanovou modrou (nezobrazené).

Intaktné DRG

Gangliony sa umiestnili do 96-jamkových platničiek vopred pokrytých poly-L-ornitínom a laminínom (po 5 µg/ml fosfátom tlmeného fyziologického roztoku) v bezsérovom médiu N2 (Bottenstein, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 514-517; ktorá publikácia sa týmto zahŕňa celá odkazom) obsahujúcim 0,05 % hovädzieho sérového albumínu (BSA) a udržiavala sa počas 48 hodín pri 37 °C a 5 % CO₂ vo zvlhčovanom prostredí. Na gangliony sa pôsobilo buď 250 nM zlúčeniny III-3 alebo 20 ng/ml NGF 2 hodiny po naplatničkovaní.

Zlúčenina III-3 podporuje prežívanie kuracích embryonálnych periférnych neurónov koncentračne závislým spôsobom

Vysadenie NGF z disociovaných kultúr senzorických neurónov zadného senzorického koreňa miechových nervov E9 (DRG) a neurónov sympatických ganglionov E12 (SG) spôsobuje, že podliehajú PCD v priebehu 48 hodín. Tomu sa zabránilo pridaním zlúčeniny III-3 do kultivačného média v čase vysadenia NGF. Pri 1 µM zlúčenina III-3 udržala 94 % SG neurónov a 890 % DRG neurónov nažive po 48 hodinách (kontrola ošetrovaná NGF: SG 65 %, DRG 66 %). Podobne zlúčenina III-3 podporila prežitie 76 % neurónov ciliárneho ganglionu (CG) závislých od CNTF po 24 hodinách (kontrola ošetrovaná CNTF 67 %). Za prítomnosti 10 % séra boli účinky zlúčeniny III-3 na prežitie závislé od koncentrácie s plató dosiahnutým okolo 1 µM pre všetky tri neurónové populácie (obr. 16A-C). Prežívajúce neuróny vykazovali rozsiahle prerastanie neuritov s hrubšími a zakrivenejšími neuritmi v porovnaní s kontrolnými kultúrami. (Obr. 17 E-H).

Po štyroch dňoch bola aktivita podporujúca prežívanie stále intaktná: DRG: zlúčenina III-3 52 %, rastovým faktorom ošetrovaná kontrola 41 %; SG: zlúčenina III-3 83 %, kontrola ošetrovaná NGF 55 %; SG: zlúčenina III-3 58 %, kontrola ošetrovaná CNTF 50 %). Za normálnych podmienok bolo kultúry možné udržať zlúčeninou III-3 jeden týždeň a dlhšie (nezobrazené).

Zlúčenina III-3 podporuje prežívanie kuracích embryonálnych motorických neurónov koncentračne závislým spôsobom

Kultivované kuracie motorické neuróny môžu prežiť a predlžovať procesy za prítomnosti svalového extraktu, zatiaľ čo rýchlo umierajú za jeho neprítomnosti. V našich experimentoch po 48 h prežilo 65 % motorických neurónov za prítomnosti svalového extraktu na rozdiel od 14 % pre neošetrované kontroly. Za bezsérových podmienok bol účinok zlúčeniny III-3 na prežitie maximálny pri 300 nM a bol o niečo vyšší (79 %) ako účinok indukovaný svalovým extraktom. Koncentračná závislosť účinku zlúčeniny III-3 na prežitie v tomto systéme je odlišná od závislosti u periférnych neurónov, keďže koncentrácie zlúčeniny III-3 nad 300 nM vykazovali progresívne znížený efekt (obr. 16A). To by mohlo indikovať osobitnú citlivosť motorických neurónov na niektorý aspekt aktivity zlúčeniny III-3. Morfologicky motorické neuróny zachránené zlúčeninou III-3 vykazovali fázovo jasné bunkové telá a boli schopné predlžovať dlhé neurity, ktoré sa zdali byť mierne hrubšími ako tie, ktoré indukoval svalový extrakt (obr. 17). Po štyroch dňoch kultivácie bolo nažive 56 % motorických neurónov pri zlúčenine III- v porovnaní s 42 % pre svalový extrakt. Pri 300 nM prežili neuróny ošetrované zlúčeninou III prežili in vitro aspoň týždeň (nezobrazené).

Zlúčenina III-3 podporuje prerastanie neuritov z intaktných zadných senzorických koreňov miechových nervov

Výsledky z vyššie uvedených experimentov demonštrujú, že zlúčenina III-3 nielen podporuje prežívanie embryonálnych neurónov z periférnych a centrálnych nervových systémov, ale vedie aj k robustnému prerastaniu neuritov. Mnohé z týchto výrastkov sa zdali byť hrubšie ako tie, ktoré vyrástli za prítomnosti rastových faktorov (porovnajcie obr. 17 A-D s obr. 17 E-H). Tento účinok sa pozoroval aj v neuritickom vyrastaní vyvolanom u intaktných embryonálnych zadných senzorických koreňov miechových nervov

kultivovaných za prítomnosti 250 nM zlúčeniny III-3 (obr. 18C). Neurity rástli ako odozva na NGF (obr. 18B) aj zlúčeninu III-3; neurity vyvolané NGF boli oveľa jemnejšie a rozvetvenejšie ako tie, ktoré vyrástli za prítomnosti zlúčeniny III-3, ktoré vyzerali hrubšie a prípadne vo zväzkoch.

Príklad 36: Pôsobenie in vivo

Vývojovo regulované umieranie buniek motorických neurónov u kŕmácich embryí

Tento príklad je opísaný podrobne v publikácii Glicksman, *et al.*, *J. Neurobiol.*, **1998**, 35, 361 - 370, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom. Na E6 sa urobilo okienko v škrupine slepačích vajec (Spafas, Preston, CT) priamo na vaskularizovanú chorioalantoickú membránu sa aplikovalo buď vehikulum (5 % Solutol™ HS 15, polyetylén glykol 660 hydroxysterát; BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany (vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku, pH 7,2)) alebo špecifikovaná dávka zlúčeniny III-3 vo vehikule raz denne od E6 do E9, ako je opísané v publikácii Oppenheim, *et al.*, *Science*, **1991**, 251, 1616-1617, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom). Embryá boli usmrtené na E10 a ich miechy sa vybrali, fixovali v Carnoyho roztoku (10 % ľadová kyselina octová, 60 % absolútny etanol, 30 % chloroform), spracovali na sériové parafínové sekcie a vyfarbili sa tionínom. Každá 20. sekcia lumbálnych segmentov 1 – 8 sa počítala podľa kritérií opísaných v publikácii (Clarke, *et al.*, *Methods In Cell Biology: Cell Death*, 1995, Schwart & Osborne, Eds., Academic Press, New York, 277-321, ktorá sa týmto zahŕňa celá odkazom).

Vývojovo regulované umieranie buniek motorických neurónov u novorodených potkanov

Nenačasované gravidné potkany Sprague-Dawley boli získané od Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Novorodeným samiciam potkanov sa podávala injekcia denne subkutánne (SC) nad cieľovými perineálnymi svalmi zlúčenina III-3 v 5 % prípravku Solutol™ HS 15 alebo vehikulum počnúc dňom narodenia (P1) a pokračujúc 5 dní (P5). Na P10 alebo P60 sa mláďatá dekapitovali, krv sa zachytila do heparinizovaných kapilárnych rúrok a oblasť miechy obsahujúca pohlavne dimorfne miechové jadro pre bulbokavernózný sval (SNB) a perineálna oblasť obsahujúca bulbokavernózný sval (BC) a análny levátor (LA) sa vypitvali po perfúzii zvierať fyziologickým roztokom/formalínom. Oblasť miechy obsahujúca SNB sa postfixovala, umiestnila do Paraplastu, narezala na 10

μm a vyfarbila farbivom Cresylecht fialová (Nordeen, *et al.*, *Science*, **1985**, 229, 671-673, ktorá publikácia sa týmto zahŕňa celá odkazom). Motorické neuróny sa spočítali pri X500 v sériových sekciách z lumbálnej oblasti 5 po sakrálnu oblasť 1 miechy podľa publikovaného popisu (Nordeen, *et al.*, *supra*). Mikroskopické počítanie sa uskutočnilo na kódovaných sekciách pozorovateľom nevediacim o liečebných skupinách. Počty motorických neurónov boli korigované na veľkosť bunky a hrúbku sekcie (Königsmark, *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, Nauta & Ebbesson, Eds., **1970**, Springer-Verlag, New York, 315-340, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom) a štatistická analýza bola jednosmerná analýza rozptylu (ANOVA). Perineálne svalstvo sa postfixovalo, dekalcifikovalo, vsadilo do Paraplastu, narezalo na 10 μm a vyfarbilo farbivom Milligan's Trichrome. Pomocou mikroskopie na pozorovanie v jasnom poli (X250), BC a LA svaly u normálnych samíc a samíc ošetrovaných zlúčeninou III-3 (405 zvierat/skupinu) sa pozitívne identifikovali na základe polohy aj prítomnosti priečne pruhovaných vlákien. Obrys svalového tkaniva sa sledoval zo striedavých sekcií pomocou projekčného mikroskopu (62,5) a plocha prierezu sa zmerala pomocou digitalizačného segmentu a počítačového morfometrického systému (Sigmascan, Jandel Scientific). Objem svalu sa vypočítal vzatím celkovej plochy prierezu a jej násobením hrúbkou sekcie a korekciou na percento vzorkovanej štruktúry.

Zachytená krv sa centrifugovala 5 min pri teplote miestnosti. Plazma sa potom oddelila a zmrazila na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sérové hladiny testosterónu (6 – 7 zvierat/skupinu) sa zmerali rádioimunologickým testom podľa postupov definovaných v publikácii Wingfield, *et al.*, *Steroids*, 1975, 26, 311-327, ktorá sa týmto celá zahŕňa odkazom.

Axotómiou indukovaná dediferenciácia motorických neurónov u dospelých potkanov

Ľavý podjazykový nerv sa prerezal v krku dospelých samíc potkana Sprague-Dawley (120 – 180 g) pod anestéziou Neumbutolom a na kúsok Gelfoam™ (AJ Buck, Owings Mills, MD) sa aplikovalo 50 μl zlúčeniny III-3 alebo jej vehikula (5 % Solutol™ HS 15), ktorý sa potom omotal okolo proximálneho konca prerezaného nervu. Po 7 dňoch sa zvieratá anestetizovali a perfundovali 4 % paraformaldehydom v Sorensonovom tlmivom roztoku, 0,07 M fosfát, pH 7,2. Mozgový kmeň sa odstránil a na kryostate sa narezali 40 μm hrubé sériové koronálne sekcie (Chiu, *et al.*, *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, ktorá

publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). Každá piata sekcia sa spracovala na ChAT imunohistochemiu podľa publikovaného popisu (Chiu, *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 1993, 328, 351-363, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom) pri použití zriedenia 1 : 350 anti-ChAT monoklonálnej protilátky získanej od firmy Chemicon. Bunky, ktoré sa jasne vyfarbili nad pozadím, sa spočítali vo vyfarbených sekciách; počet buniek bol vyjadrený ako pomer počtu ChAT-imunoreaktívnych buniek na axotomizovanej strane podjazykového jadra oproti počtu imunoreaktívnych buniek na kontrolnej (nezranenej) strane.

Zlúčenina III-3 zachránila motorické neuróny potkanieho embrya pred apoptotickou smrťou *in vitro* a inhibovala signalizačnú dráhu, čo viedlo k aktivácii JNK1 v týchto bunkách (Maroney, *et al.*, *J. Neurosci.*, 1998, 18, 104-111, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). Aby sa určila potenciálna aktivita *in vivo*, zlúčenina III-3 sa vyhodnotila v dvoch modeloch vývojovo regulovanej programovanej smrti motorických neurónov a v modeli axotómiou indukovanej diferenciácie u dospelých motorických neurónov. U kureniec približne 50 % miechových motorických neurónov podlieha PCD počas E5-10 (Hamburger, *et al.*, *J. Neurosci.*, 1982, 1, 38-55; Purves, *et al.*, *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*, 1988, Harvard University Press, Cambridge, MA, obe publikácie sa týmto celé zahŕňajú odkazom). Aplikácia zlúčeniny III-3 na chorioalantoickú membránu počas tohto obdobia zabránila umieraniu motorických neurónov dávkovo závislým spôsobom (obr. 19). Štyridsať percent motorických neurónov, ktoré by za normálnych okolností odumreli, bolo zachránených pri dvoch najvyšších testovaných dávkach (2,3 a 7 $\mu\text{g}/\text{deň}$), zatiaľ čo 25 % motorických neurónov bolo zachránených pri nižších dávkach (1,2 a 1,8 $\mu\text{g}/\text{deň}$) (obr. 19).

Počas raného perinatálneho života samíc potkanov (neskoré embryonálne štádium až do postnatálneho dňa (PN) 4) sa viac ako 50 % motorických neurónov v SNB eliminuje cez PCD (Breedlove, *J. Neurobiol.*, 1986, 17, 157-176, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). U samcov motorické neuróny v tomto jadre inervujú priečne pruhované penilné svaly zapojené do kopulačných reflexov. Testikulárna sekrécia androgénnych steroidov znižuje umieranie motorických neurónov SNB u samcov a bráni značnej miere atrofie BC a LA svalov inervovaných týmito neurónmi. Podávanie testosterónu mláďatám samičieho pohlavia viedlo k plne maskulinnemu počtu motorických neurónov SNB

(Nordeen, *et al.*, *supra*) a zabránilo atrofii BC a LA svalov (Waiman, *et al.*, *Endocrinology*, **1941**, 29, 955-978, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). Denné sc podávanie zlúčeniny III-3 (PN 1-5) samiciam potkana signifikantne znížilo umieranie motorických neurónov (obr. 20A). K záchrane pred smrťou motorických neurónov SNB zlúčeninou III-3 došlo pri dvoch dávkach (0,5 a 1 mg/kg na deň). Pri maximálne účinných dávkach 0,5 a 1 mg/kg na deň viedlo podávanie zlúčeniny III-3 k 70 % zlepšeniu prežívania motorických neurónov, čo sa vyrovnalo účinku testosterónu (obr. 20A). Zlúčenina III-3 nezmenila plazmové hladiny testosterónu liečených zvierat. Rádioimunologické meranie plazmových hladín testosterónu v skupine 1 mg/kg na deň neviedlo k žiadnemu signifikantnému rozdielu v porovnaní s kontrolnou skupinou vehikula ($0,016 \pm 0,008$ ng/ml a $0,029 \pm 0,015$ ng/ml štandardná chyba strednej hodnoty (S.E.M.)).

Aby sa určilo, či je liečba zlúčeninou III-3 účinná v dlhodobom udržiavaní prežívania motorických neurónov, samiciam sa podávala zlúčenina III-3 (0,5 a 1 mg/kg na deň) počas toho istého časového obdobia PN (1-5). Polovica zvierat v skupine vehikula a v oboch liečebných skupinách sa usmrtila na PN10. Ostávajúce zvieratá sa potom udržiavali bez ďalšej liečby zlúčeninou III-3, kým boli usmrtené na PN60. Ako bolo pozorované predtým (obr. 20A), liečenie zlúčeninou III-3 viedlo k 70 % zlepšeniu v prežívaní motorických neurónov (obr. 20B). Navyše 100 % týchto zachránených motorických neurónov bolo identifikovateľných morfológicky 55 dní po poslednej liečbe zlúčeninou III-3 (obr. 20B). Inhibícia smrti motorických neurónov zlúčeninou III-3 počas neonatálneho obdobia umožnilo prežívanie motorických neurónov do dospelosti.

Napriek jasnej demonštrácii a ničivých účinkov straty motorických neurónov pri chorobách dospelých ľudí, ako je amyotrofická laterálna skleróza, dospelé motorické neuróny vo väčšine zvieracích modelov zranenia motorických neurónov sú rezistentné voči smrti. Avšak axonálne zranenie skutočne vedie k morfológickým (Oppenheim, *et al.*, *supra*) ako aj biochemickým zmenám (Oppenheim, *et al.*, *supra*; Rende, *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 1992, 319, 285-298, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom; Chiu, *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, 1993, 328, 351-363, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom) v dospelých motorických neurónoch, ktoré môžu napodobňovať degeneratívne zmeny predchádzajúce smrť u chorých pri degenerácii motorických neurónov. Jeden príklad tohto typu zmeny vyplýva z axotómie podjazykového nervu, ktorý inervuje jazyk.

Jednostranné prerušenie tohto nervu u dospelého potkana viedlo k strate 95 % ChAT-imunoreaktívnych podjazykových motorických nervov v ipsilaterálnom jadre po 7 dňoch (Chiu, *et al.*, *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). Strata imunoreaktivity ChAT nebola trvalá. Štyri týždne po axotómii sa 100 % motorických neurónov dostalo na kontrolné hladiny imunoreaktivity ChAT (Borke, *et al.*, *J. Neurocytol*, 1993, 22, 141-153, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom). Imunoreaktivita ChAT v kontralaterálnych podjazykových motorických neurónoch nebola postihnutá (Chiu, *et al.*, *supra*) (obr. 21 a tabuľka 5).

Po aplikácii v materiáli Gelfoam™ na proximálny koniec podjazykového nervu zlúčenina III-3 dávkovo závislo zoslabovala znižovanie imunoreaktivity ChAT v ipsilaterálnych podjazykových motorických neurónoch hodnotených 7 dní po taxotómii. Maximálne účinná dávka (50 µg) viedla k o 40 % viac ChAT-imunoreaktívnym motorickým neurómom v porovnaní s axotomizovanou neliečenou kontrolou (obr. 21B a tabuľka 5). Zistila sa dávková závislosť tvaru zvona, kde nižšie aj vyššie dávky viedli k prežívaniu vyššiemu ako v neliečenej kontrole, ale nižšiemu ako pri 50 µg. Ako platilo pri modeli SNB, so žiadnymi testovanými dávkami nebola spojená strata hmotnosti, mortalita alebo veľké poškodenie tkaniva u týchto zvierat.

V troch osobitných modeloch degenerácie motorických neurónov *in vivo* zlúčenina III-3 preukázala neuroprotektívnu aktivitu: vývojovo regulované PCD lumbálnych miechových motorických neurónov u embryí (obr. 19), na androgén citlivé umieranie postnatálnych motorických neurónov SNB (obr. 20) a axotómiou indukovaná strata funkčného markera, ChAT, v dospelých podjazykových motorických neurónoch (obr. 21 a tabuľka 5). Zlúčenina III-3 bola účinná pri periférnom podaní sc injekciou, pri lokálnej aplikácii na odrezaný koniec nervu alebo priamo priložená na chorioalantoickú membránu kuracieho embrya. Na rozdiel od východiskovej molekuly K-252a bola zlúčenina III-3 približne päťkrát potentnejšia pri sprostredkovaní prežívania v kultúrach obohatených o motorické neuróny (dáta nezobrazené) a nevykazovala inhibičnú aktivitu proti trkA tyrozínkináze a niekoľkým treonínkinázam (Maroney *et al.*, *supra*; Kaneko, *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1997, 40, 1863-1869, ktorá publikácia sa týmto celá zahŕňa odkazom).

Tabuľka 5

Účinok zlúčeniny III-3 na imunoreaktivitu cholinacetyltransferázy v axotomizovaných podjazykových motorických neurónoch

Ošetrovanie	n	ChAT-pozitívne motorické neuróny		
		Experiment/kontrola	%	Priemer/skupina
vehikulum	2	20/544	3,68	4,01
		19/437	4,35	
3,6 µg III-3	2	55/420	13,10	12,84*
		72/572	12,59	
25 µg III-3	2	95/597	15,91	19,01*
		142/642	22,12	
50 µg III-3	2	188/484	38,84	41,34*
		278/637	43,85	
100 µg III-3	4	465/920	50,54	32,61*
		235/784	29,98	
		178/770	23,12	
		182/679	26,80	
200 µg III-3	2	99/461	21,48	24,96*
		159/559	28,44	
placebo	2	350/335	104,48	101,24
		292/298	98,00	

Zlúčenina III-3 alebo vehikulum sa pridali v gélovej pene na proximálny koniec hypoglosálneho nervu bezprostredne po jeho prerušení. Po 7 dňoch sa zvieratá usmrtili a sériovo rozrezali cez podjazykové jadro a každá piata sekcia sa imunologicky vyfarbila anti-ChAT protilátkami. ChAT-pozitívne neuróny sa spočítali v ipsilaterálnych (experimentálnych) a kontralaterálnych (kontrolných) stranách jadra.

* $p < 0,05$, štatisticky signifikantné v porovnaní so zvieratami kontrolnej skupiny liečenej vehikulom.

Inhibitor dráhy MLK-3 demonštruje *in vivo* účinnosť a blokuje fosforylačné udalosti nadol od MLK-3 v modeli MPTP

MPTP sa podával v dávke (40 mg/kg), ktorá vedie k strate priečne pruhovaných dopaminergických ukončení a bunkových tiel v substantia nigra. Tyrozínhydroxyláza sa použila ako marker pre ukončenia dopaminergických nervov v substantia nigra. Systémovo podávaná zlúčenina III-3 znížila stratu neurónov substantia nigra imunoreaktívnych na tyrozínhydroxylázu po lézii MPTP (obr. 22A; Saporito et al., 1999). Keďže zlúčenina III-3 je známym inhibitorom MLK-3, aktivácia downstream substrátu MLK-3 sa merala v myšiach ošetrovaných pomocou MPTP. Hladiny fosforylovanej MKK4 sa merali pomocou fosfo-MKK4 špecifickej protilátky (New England Biolabs, Beverly, MA), ktorá rozpoznáva monofosforylovanú formu MKK4 buď pomocou testu imunoblot (obr. 22B) alebo ELISA (obr. 22C). Podanie MPTP zvýšilo hladiny fosforylovanej MKK4 v substantia nigra až päťnásobne nad kontrolné hladiny (obr. 22B). Špičkové zvýšenia sa vyskytli 4 hodiny po podaní MPTP a zhodovali sa so špičkovými CNS hladinami MPP⁺. Fosforylácia MKK4 sprostredkovaná pomocou MPTP sa zoslabila predbežným ošetrovaním 1-deprenylom, čo indikuje, že tieto fosforylačné udalosti sprostredkuje MPP⁺ (obr. 22C). Navyše fosforylácia MKK4 bola čiastočne inhibovaná predbežným ošetrovaním zlúčeninou III-3 v dávke (1 mg/kg), ktorá poskytuje ochranu proti nigrostriálnej dopaminergickej strate indukovanej MPTP (obr. 22C). Tieto dáta demonštrujú, že MPTP (MPP⁺) aktivuje MKK4, downstream substrát MLK-3. Tieto údaje navyše demonštrujú, že známy inhibitor MLK-3 inhibuje aktiváciu tejto kinázovej dráhy *in vivo*.

Príklad 37: Zápal

Indukcia IL-1 a TNF- α pomocou LPS v bunkách THP-1 a účinok indolokarbazolov a pyrolokarbazolov na ich indukciu

Bunky imunitného systému boli vybrané preto, lebo mnohé kinázy sú zapojené do regulácie početných imunologických funkcií, napr. indukcie syntézy cytokínov a indukcie biologickej odozvy cytokínov. Nedávna správa (Hambleton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 2774-2778, ktorá sa týmto celá zahŕňa odkazom) ukázala, že pôsobenie

LPS na bunkové linie odvodené z monocytov spôsobuje rýchlu aktiváciu aktivity JNK. Keď monocyty prídu do styku s bakteriálnymi endotoxínmi, ako sú lipopolysacharidy (LPS), produkujú zápalové cytokíny, IL-1 a TNF- α . Inhibícia produkcie týchto dvoch cytokínov môže byť užitočnou liečbou istých zápalových porúch imunitného systému. Tieto cytokíny možno ľahko merať komerčnými súpravami ELISA. Postavili sme experimenty na určenie, (1) či indolo- a kondenzované pyrolokarbazoly môžu inhibovať syntézu IL-1 a TNF- α v našej monocytovej bunkovej línii THP-1, (2) či sa JNK aktivuje LPS v bunkách THP-1 a (3) či aktiváciu JNK pomocou LPS možno inhibovať indolo- a kondenzovanými pyrolokarbazolmi.

Experimentálne postupy

Bunky THP-1 sa kultivovali v médiu RPMI 1640 doplnenom 10 % fetálnym hovädzím sérom. LPS (*E. coli* sérotyp 0111.B4, extrahovaný do TCA) bol zakúpený od firmy Sigma a rozpustený v PBS. Súpravy ELISA na testovanie IL-1 a TNF- α boli zakúpené od firmy Boehringer-Mannheim a testy na kultivačnom médiu THP-1 sa uskutočnili podľa pokynov výrobcu. Pri každom teste sa získali štandardné krivky podľa návodu.

Experimenty sa uskutočnili v 12-jamkových kultivačných platničkách s buď 1 alebo 2 ml buniek THP-1 pri 4×10^5 buniek/ml. IL-1 a TNF- α sa indukovali pridaním LPS do kultivačného média a médium sa potom odoberalo v rôznych časoch na cytokínový test. Bunky sa oddelili centrifugovaním a supernatanty sa zmrazili na -70°C až do testu. Aby sa minimalizovali náklady, experimenty sa uskutočnili v duplicitných kultúrach a duplicitné supernatanty sa po centrifugovaní spojili. Každý spojený supernatant sa testoval duplicitne. Zásobné roztoky indolo- a kondenzovaných pyrolokarbazolov v 100 % DMSO sa zriedili na požadované koncentrácie buď v médiu obsahujúcom 10 % fetálne hovädzie sérum alebo v médiu obsahujúcom 0,5 mg/ml BSA. Ak nie je uvedené inak, zlúčeniny boli pridané k bunkám THP-1 1 hodinu pred pridaním LPS.

Testy aktivity JNK boli uskutočnené po imunoprecipitácii proteínu JNK z extraktu lýzovaných buniek THP-1. Peletované bunky THP-1 boli lýzované na ľade počas 15 min v 500 μl Fracovho tlmivého roztoku (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 30 μM pyrofosfátu sodného, 1 mg/ml BSA, 1 % Triton-X-100). Extrakt sa centrifugoval 10 min pri

14 K a k supernatantu sa pridalo 5 μ l JNK protilátky (Santa Cruz). Extrakt sa rotoval 60 min pri 4 °C, pridalo sa 75 μ l premytej proteínovej A Sepharose (20 % w/v, Frac) a extrakt sa rotoval ďalších 30 min, aby sa komplex s protilátkou naviazal na proteínovú A Sepharose. Proteínová A Sepharose sa premyla dvakrát Fracovým tlmivým roztokom, raz 20 mM Hepes, pH 7,6, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, potom sa inkubovala 15 min pri 30 °C v 30 μ l kinázového tlmivého roztoku (20 mM Hepes, 20 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 1 μ g rekombinantného c-jun a 2 μ M ATP- γ - ^{32}P , 2 μ Ci. Reakcia sa ukončila pridaním 10 μ l 4X tlmivého roztoku na nanášanie SDS gélu, zahrieva sa 3 min na 80 °C a proteíny sa analyzovali na 10 % SDS géle. Gél sa vysušil, exponoval na platničke prístroja Phosphorimager a rádioaktívne pásy sa analyzovali na prístroji Phosphorimager.

Výsledky z počiatočných experimentov naznačovali, že LPS pri 2 μ g/ml dáva maximálny výťažok IL-1 a táto koncentrácia LPS sa použila vo všetkých ďalších experimentoch. Minimálny čas po pridaní LPS pre maximálny výťažok cytokínov sa určil odobraním alikvótov média na analýzu v rôznych časoch po pridaní LPS. Prvý experiment naznačoval, že IL-1 aj TNF- α dosiahli maximálny výťažok po menej ako 5 hodinách po pridaní LPS. Keďže najskorší čas odberu bol v prvom experimente 2,4 hodiny, uskutočnil sa druhý experiment s odbermi média počnúc 15 min po pridaní LPS. Výsledky tohto experimentu, kde sa analyzoval len TNF- α , ukázali, že maximálne výsledky sa dosiahli 3 hodiny po pridaní LPS. V médiu sa nenašiel žiadny signifikantný obsah TNF- α až do 90 min po pridaní LPS.

Rýchle dosiahnutie maximálneho výťažku indikovalo veľmi prísnu reguláciu syntézy 2 cytokínov – rýchlu syntézu a rýchlu reguláciu nadol. Na kultúry buniek sa pôsobilo 30 minút pred pridaním LPS buď Aktinomycínom D, inhibítorom syntézy RNA, alebo cykloheximidom, inhibítorom syntézy proteínov. Médium sa odobralo 3 hodiny po pridaní LPS a analyzoval sa TNF- α . Pre indukciu TNF- α je potrebná syntéza novej RNA a nového proteínu, keďže v médiu buniek ošetrovaných jedným z inhibítorov sa nenašiel žiadny TNF- α . Ďalšie experimenty mali určiť, či zlúčenina III-3 bude inhibovať indukciu IL-1 a TNF- α . Zlúčenina III-3 inhibovala indukciu IL-1 aj TNF- α s hodnotami IC_{50} 267 nM a 139 nM. Výsledky týchto experimentov sa získali s bunkami v médiu obsahujúcom 10 % fetálne hovädzie sérum. Keďže testy s miechovým tkanivom a tkanivom bazálneho

predného mozgu na neurotrofickú aktivitu zlúčenín sa uskutočňujú v bezsérovom médiu (500 µg/ml BSA), bolo zaujímavé určiť hodnoty IC₅₀ pre inhibíciu IL-1 a TNF-α v bezsérovom médiu. Keď sa na bunky THP-1 pôsobilo zlúčeninou III-3 v bezsérovom médiu (500 µg/ml BSA), IC₅₀ sa znížilo 10-násobne z 269 nM na 23 nM. Pokiaľ nie je uvedené inak, všetky experimenty uskutočnené ďalej prebehli v bezsérovom médiu. Inhibícia indukcie IL-1 a TNF-α v bunkách THP-1 zlúčeninou III-3 naznačuje, že zlúčenina III-3 by mohla byť užitočná ako terapeutický prostriedok pri liečbe patologických stavov spôsobených produkciou nadnormálnych množstiev týchto cytokínov. Takým stavom je aj septický šok. Septický šok je spôsobovaný rastom gramnegatívnych baktérií v obeh, ktoré zase uvoľňujú veľké množstvá endotoxínu, LPS. LPS potom stimuluje primárne monocyty a makrofágy, aby produkovali veľké množstvá IL-1 a TNF-α, ktoré potom spôsobujú masívne poškodzovanie tkaniva a v mnohých prípadoch smrť.

Na schopnosť inhibovať TNF-α sa testovalo niekoľko zlúčenín a porovnala sa ich schopnosť inhibovať JNK. Výsledky sú uvedené v tabuľke 6.

Tabuľka 6

	Bunky THP-1		Nadmerne exprimovaná MLK3 v bunkách Cos7
Zlúčenina	IC ₅₀ pre TNF-α v nM	% inh. JNK pri 500 nM	% inh. JNK pri 500 nM
III-1	49,5	93,5	83,8
III-3	29	93	94
I-2	>5000	78,5	85
I-3	366	80,5	93,7
I-4	75,5	79,5	95
I-5	514	89	97,2
I-6	817,5	77,5	57,8
I-7	1009	74	85,5

	Bunky THP-1		Nadmerne exprimovaná MLK3 v bunkách Cos7
Zlúčenina	IC50 pre TNF- α v nM	% inh. JNK pri 500 nM	% inh. JNK pri 500 nM
III-4	462,5	81	66
III-5	4	84,5	96
III-7	590,5	11,5	54
III-8	11,5	51	94
III-10	4298	48	59
I-10	4500	62	94
I-11	686	51	92,5

Účinok zlúčeniny III-3 na indukciu IL-2 v Jurkatových bunkách

Uskutočnili sa experimenty, aby sa určilo, či zlúčenina III-3 inhibuje indukciu IL-2 v Jurkatových bunkách.

Experimentálne postupy

Jurkatove bunky sa kultivovali v médiu RPMI 1640 doplnenom 10 % fetálnym hovädzím sérom. TNF- α bol od firmy Promega a anti CD3 a CD28 protilátky boli od firmy Pharmigen. Jurkatove experimenty sa uskutočnili v 200 μ l v 96-jamkovej platničke. IL-2 sa meral súpravou ELISA zakúpenou od firmy Boehringer Mannheim. Protilátky proti CD3 a CD28 sa nechali naviazať na plast 96-jamkovej platničky (18 hod v PBS) pred pridaním Jurkatových buniek. Na bunky sa pôsobilo zlúčeninami 1 hodinu pred pridaním na platničku pokrytú protilátkami. Protilátky proti CD3 a CD28 sa použili na aktiváciu receptora lymfocytov T a indukovanie IL-2. IL-2 sa uvoľnil z Jurkatových buniek medzi 6 hod a 24 hod po iniciácii indukcie (obr. 23A). Konštitutívne nebol vyrobený žiadny IL-2 (obr. 23A CNT). Potom sa vyhodnotil účinok zlúčeniny III-3 (1 hod pôsobenie zlúčeniny III-3 pred indukciou) na indukciu IL-2 (obr. 23B). Koncentrácia zlúčeniny III-3 500 nM

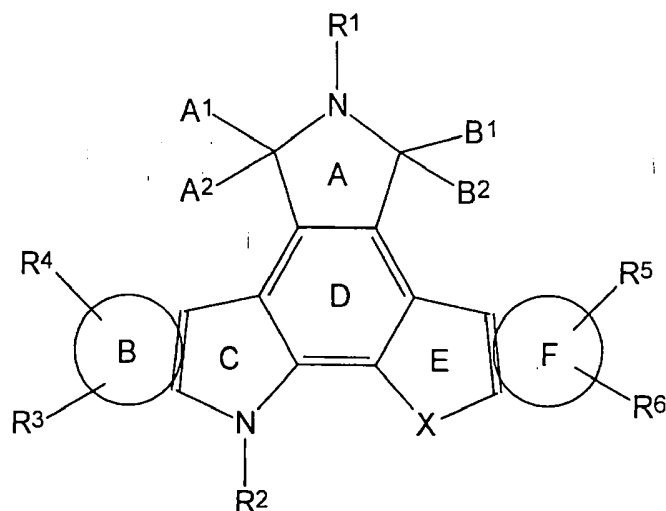
inhibovala indukciu IL-2 o viac ako 80 % (obr. 23B). Rozsiahlejší experiment na určenie odozvy na dávku sa uskutočnil so zlúčeninou III-3 a so zlúčeninou I-4, ktorá dala hodnoty IC_{50} 139 nM pre zlúčeninu III-3 a 207 nM pre zlúčeninu I-4 (obr. 23C).

Každý z patentov, prihlášok a tlačných publikácií spomenutých v tomto patentovom dokumente sa týmto celý zahŕňa odkazom.

Ako bude zrejmé odborníkom v danej oblasti, na výhodných uskutočneniach vynálezu možno uskutočniť mnoho zmien a úprav bez toho, aby došlo k odchýleniu sa od ducha vynálezu. Všetky také variácie spadajú do rozsahu predloženého vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob na identifikáciu zlúčeniny užitočnej pri liečbe periférnej neuropatie spojenej s AIDS, vyznačujúci sa tým, že pozostáva z kontaktovania bunky alebo bunkového extraktu obsahujúceho proteín kinázy viacerých rodov so zlúčeninou a určenia, či zlúčenina znižuje aktivitu proteínu kinázy viacerých rodov.
2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že tento proteín kinázy viacerých rodov je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z kinázy viacerých rodov 1, kinázy viacerých rodov 2, kinázy viacerých rodov 3, kinázy nesúcej leucínový zips, kinázy nesúcej duálny leucínový zips a kinázy viacerých rodov 6.
3. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že uvedená aktivita proteínu sa určí meraním aktivity fosforylačného stavu substrátu daného proteínu, pričom uvedený substrát je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, Jun, ATF2, ELK1 a cicavčieho homológu AEX-3.
4. Spôsob podľa nároku 2, vyznačujúci sa tým, že uvedená aktivita proteínu sa určí meraním aktivity substrátu proteínu, množstva substrátu proteínu alebo mRNA kódujúcej substrát proteínu.
5. Spôsob liečby človeka s periférnou neuropatiou spojenou s AIDS, vyznačujúci sa tým, že pozostáva z podania zlúčeniny tomuto človeku, inhibuje proteín kinázy viacerých rodov, vo farmaceuticky prijateľnej soli alebo riedidle.
6. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že uvedená zlúčenina má vzorec



kde

B a F navzájom nezávisle, spolu s atómami uhlíka, na ktoré sú naviazané, tvoria:

nenasýtený 6-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom od jedného do troch uhlíkových atómov môže byť nahradených atómami dusíka; alebo

nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom buď

jeden atóm uhlíka je nahradený atómom kyslíka, dusíka alebo síry; alebo

dva atómy uhlíka sú nahradené atómom síry a dusíka; alebo atómom kyslíka a atómom dusíka;

A¹ a A² spolu predstavujú O a B¹ a B² spolu predstavujú O;

R¹ je H, alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane), aryl, arylalkyl, heteroaryl a heteroarylalkyl; COR⁹, kde R⁹ je alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane), alebo aryl, s výhodou fenyl alebo naftyl; -OR¹⁰, kde R¹⁰ je H alebo alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); -CONH₂, -NR⁷R⁸, -(CH₂)_nNR⁷R⁸, kde n je celé číslo od 1 do 4 (vrátane); alebo -O(CH₂)_nNR⁷R⁸; a buď

R⁷ a R⁸ nezávisle sú H alebo alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); alebo

R⁷ a R⁸ sú spojené a tvoria mostíkovú skupinu všeobecného vzorca -(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂-, kde X¹ je O, S alebo CH₂;

R^2 je H, $-\text{SO}_2\text{R}^9$, $-\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{COR}^9$, alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane), alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkenyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane) alebo alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkynyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); alebo monosacharid s 5-7 uhlíkmi (vrátane), kde každá hydroxylová skupina monosacharidu nezávisle je buď nesubstituovaná alebo je nahradená H, alkylom s 1-4 uhlíkmi (vrátane), alkylkarbonyloxy s 2-5 uhlíkmi (vrátane) alebo alkoxy s 1-4 uhlíkmi (vrátane); a buď

každý alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) alebo alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) je nesubstituovaný; alebo

každý alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) alebo alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) nezávisle je substituovaný 1-3 arylom s 6-10 uhlíkmi (vrátane), s výhodou fenylom alebo naftylom; heteroaryl, F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, OH, $-\text{OR}^9$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^7\text{R}^8$, $-\text{OCOR}^9$, $-\text{OCONHR}^9$, O-tetrahydropyranyl, NH_2 , $-\text{NR}^7\text{R}^8$, $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{NR}^{10}\text{SO}_2\text{R}^9$, $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{11}$, kde R^{11} je H alebo alkyl s 1-4 uhlíkmi, aryl s 6-10 uhlíkmi, s výhodou fenyl alebo naftyl alebo heteroaryl a y je 1 alebo 2; $-\text{SR}^{11}$, $-\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{CHO}$, COR^9 , $-\text{CH}_2\text{OR}^7$, $-\text{CH}=\text{NNR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-\text{CH}=\text{NNHCH}(\text{N}=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $-\text{PO}(\text{OR}^{11})_2$ alebo OR^{14} , kde R^{14} je zvyšok aminokyseliny po odstránení hydroxylovej skupiny karboxylovej skupiny; a buď

R^{12} a R^{13} nezávisle sú H, alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane), aryl s 6-10 uhlíkmi, s výhodou fenyl alebo naftyl, alebo heteroaryl; alebo

R^{12} a R^{13} sú spojené a tvoria mostíkovú skupinu, s výhodou $-(\text{CH}_2)_2\text{-X}^1\text{-(CH}_2)_2$;

každé R^3 , R^4 , R^5 a R^6 nezávisle je H, aryl, s výhodou aryl s 6-10 uhlíkmi (vrátane), s väčšou výhodou fenyl alebo naftyl; heteroaryl; F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, CF_3 , $-\text{NO}_2$, OH, $-\text{OR}^9$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NR}^7\text{R}^8$, $-\text{OCOR}^9$, $-\text{OCONHR}^9$, NH_2 , $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$, $-\text{NR}^7\text{R}^8$, $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{SR}^{11}$, $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{11}$, kde y je 1 alebo 2; $-\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{COR}^9$, $-\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{CHO}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-\text{CH}=\text{NNR}^{11}\text{R}^{12}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{SR}^9$, kde n je celé číslo od 1 do 4 (vrátane), $-(\text{CH}_2)_n\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CH}_2\text{SR}^{15}$, kde R^{15} je alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane);

$-\text{CH}_2\text{S(O)}_y\text{R}^{14}$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^7\text{R}^8$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHR}^{14}$, alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkenyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), s výhodou alkynyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); a buď

každý alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) alebo alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) je nesubstituovaný; alebo

každý alkyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane), alkenyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) alebo alkynyl s 1-8 uhlíkmi (vrátane) je substituovaný, ako je opísané vyššie pod d)2);

X je buď

nesubstituovaný alkylén s 1-3 uhlíkmi (vrátane); alebo

X je alkylén s 1-3 uhlíkmi (vrátane) substituovaný jednou skupinou R^2 , s výhodou OR^{10} , $-\text{SR}^{10}$, R^{15} , kde R^{15} je alkyl s 1-4 uhlíkmi (vrátane); fenyl, naftyl, arylalkyl s 7-14 uhlíkmi (vrátane), s výhodou benzyl; alebo

X je $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{S}(=\text{O})-$, $-\text{S}(=\text{O})_2-$, $-\text{CR}^{10})_2-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{NOR}^{11})-$, $-\text{C}(\text{OR}^{11})(\text{R}^{11})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{CHR}^{15}-$, $-\text{CHR}^{15}\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{NOR}^{11})\text{CHR}^{15}-$, $-\text{CHR}^{15}\text{C}(=\text{NOR}^{11})-$, $-\text{CH}_2\text{Z}-$, $-\text{Z}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{ZCH}_2-$,

kde Z je $\text{C}(\text{OR}^{11})(\text{R}^{11})$, O, S, $\text{C}(=\text{O})$, $\text{C}(=\text{NOR}^{11})$ alebo NR^{11} ;

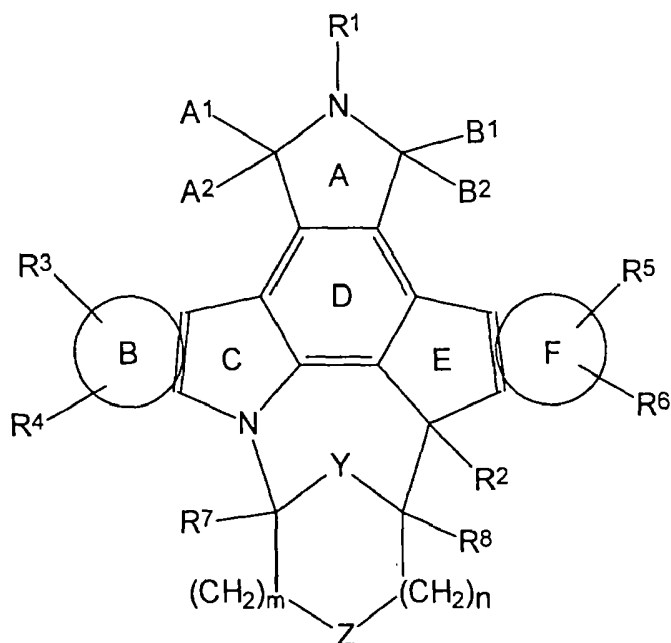
alebo

A^1 a A^2 sú spolu každé nezávisle H, H; H, $-\text{OR}^{11}$; H, $-\text{SR}^{11}$; H, $-\text{NR}^{11})_2$; alebo spolu predstavujú $=\text{S}$ alebo $=\text{NR}^{11}$; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; a každé R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 a X majú vyššie uvedený význam;

alebo

A^1 a A^2 spolu predstavujú O a B^1 a B^2 sú spolu každé nezávisle H, H; H, $-\text{OR}^{11}$; H, $-\text{SR}^{11}$; H, $-\text{NR}^{11})_2$; alebo spolu predstavujú $=\text{S}$ alebo $=\text{NR}^{11}$; a každé R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 a X majú vyššie uvedený význam;

7. Spôsob podľa nároku 6, vyznačujúci sa tým, že A^1 , A^2 , R^1 , R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú H; B^1 a B^2 spolu predstavujú O; R^2 je $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; a X je CH_2 .
8. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že uvedená zlúčenina má vzorec



kde:

kruh B a kruh F nezávisle a každý spolu s uhlíkovými atómami, na ktoré sú pripojené, sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

- nenasýtený 6-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom od 1 do 3 uhlíkových atómov môže byť nahradených atómami dusíka;
- nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh; a
- nenasýtený 5-členný karbocyklický aromatický kruh, v ktorom buď
 - jeden atóm uhlíka je nahradený atómom kyslíka, dusíka alebo síry;
 - dva atómy uhlíka sú nahradené atómom síry a dusíka, atómom kyslíka a dusíka, alebo dvoma atómami dusíka; alebo

3) tri atómy uhlíka sú nahradené tromi atómami dusíka;

R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich:

a) H, substituovaný alebo nesubstituovaný alkyl majúci 1 až 4 uhlíky, substituovaný alebo nesubstituovaný aryl, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný alebo nesubstituovaný heteroaryl, alebo substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

b) $-C(=O)R^9$, kde R^9 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí alkyl, aryl a heteroaryl;

c) $-OR^{10}$, kde R^{10} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci 1 až 4 uhlíky;

d) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ a $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, kde p je od 1 do 4; a kde buď

1) R^{11} a R^{12} sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H a alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov; alebo

2) R^{11} a R^{12} spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, kde X^1 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $-O-$, $-S-$ a $-CH_2-$;

R^2 je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, $-OH$, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, a substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl;

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí:

a) H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, $-CN$, CF_3 , $-NO_2$, $-OH$, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$;

b) $-CH_2OR^{14}$, kde R^{14} je zvyšok aminokyseliny po odstránení hydroxylovej skupiny karboxylovej skupiny;

c) $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$ alebo $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$, kde R^{2A} je rovnaké ako R^2 ;

d) $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^2$, $-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$, kde y je 0, 1 alebo 2;

e) alkyl majúci od 1 do 8 uhlíkov, alkenyl majúci od 2 do 8 uhlíkov a alkynyl majúci 2 až 8 uhlíkov, kde

1) každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je nesubstituovaný; alebo

2) každý alkyl, alkenyl alebo alkynyl je substituovaný 1 až 3 skupinami vybranými zo skupiny, ktorú tvorí aryl majúci od 6 do 10 uhlíkov, heteroaryl, arylalkoxy, heterocykloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkyloxy-alkoxy, hydroxyalkyltio, alkoxyalkyltio, F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OCONHR}^2$, $-\text{O}$ -tetrahydropyranyl, $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{NR}^{10}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{10}$, $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-\text{CH}=\text{NNHCH}(\text{N}=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^{2A}$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{10})_2$, $-\text{OR}^{14}$ a monosacharid majúci od 5 do 7 uhlíkov, kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je buď nesubstituovaná alebo nahradená H, alkylom majúcim od 1 do 4 uhlíkov, alkylkarbonyloxylom majúcim od 2 do 5 uhlíkov alebo alkoxylokom majúcim od 1 do 4 uhlíkov;

X^2 je O, S alebo NR^{10} ;

R^7 a R^8 sú každé nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H, alkyl majúci od 1 do 4 uhlíkov, alkoxy majúci od 1 do 4 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný arylalkyl majúci od 6 do 10 uhlíkov, substituovaný alebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$ a $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$; alebo R^7 a R^8 spolu tvoria spájajúcu skupinu vzorca $-\text{CH}_2-\text{X}^3-\text{CH}_2-$, kde X^3 je X^2 alebo väzba;

m a n sú každé nezávisle 0, 1 alebo 2;

Y je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ a $-CH_2-$;

Z je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí väzba, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ a $-CH(O(C=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, kde R^{9A} je rovnaké ako R^9 ;

R^{15} a R^{16} sú nezávisle vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H , $-OH$, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, hydroxyalkyl a $-CO_2R^{10}$;

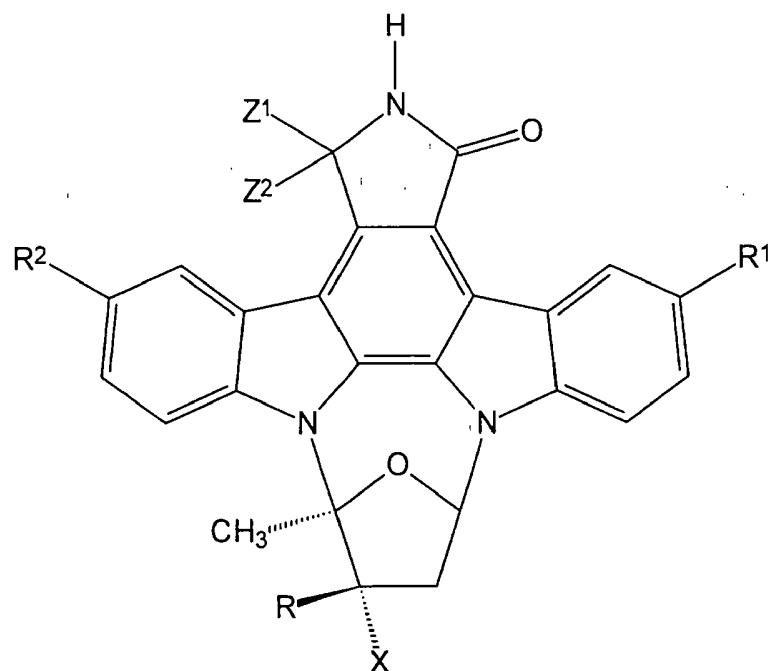
R^{17} je vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H , alkyl, aryl a heteroaryl;

A^1 a A^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H , H ; H , OR^2 ; H , $-SR^2$; H , $-N(R^2)_2$ a skupina, kde A^1 a A^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $=O$, $=S$ a $=NR^2$;

B^1 a B^2 sú vybrané zo skupiny, ktorú tvorí H , H ; H , $-OR^2$; H , $-SR^2$; H , $-N(R^2)_2$ a skupina, kde B^1 a B^2 spolu tvoria zoskupenie vybrané zo skupiny, ktorú tvorí $=O$, $=S$ a $=NR^2$;

s výhradou, že aspoň jeden z párov A^1 a A^2 , alebo B^1 a B^2 , tvorí $=O$.

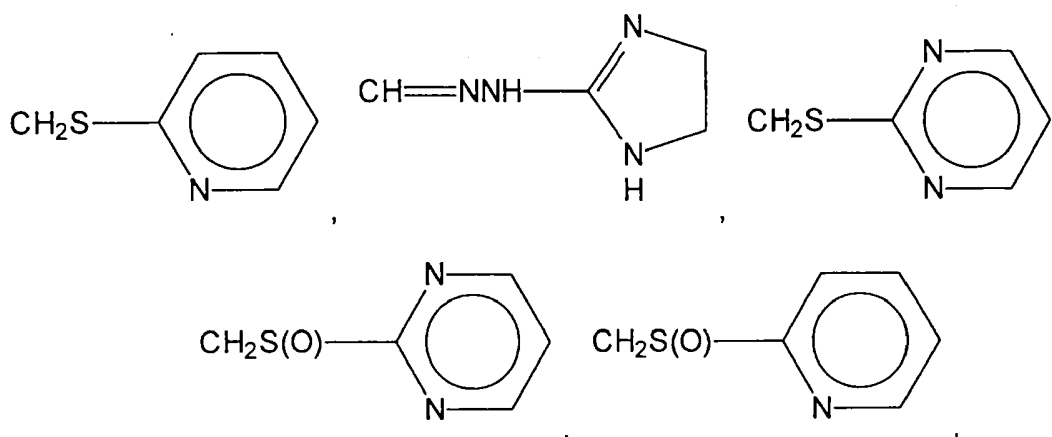
9. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že uvedená zlúčenina má vzorec

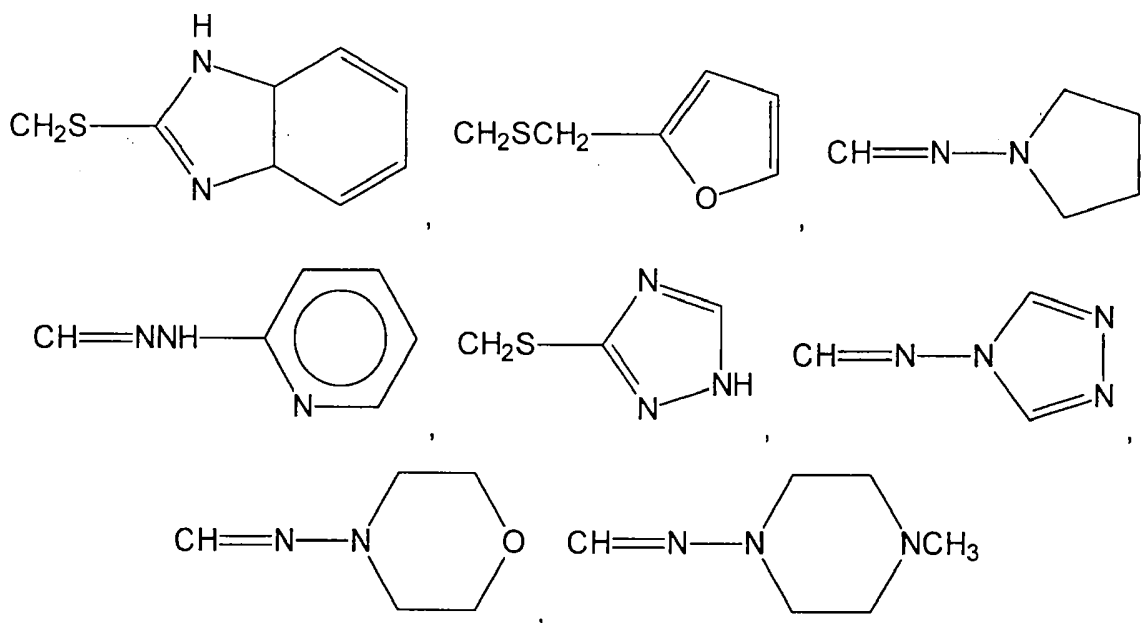


kde

Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=O$;

R^1 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Cl, $CH_2SO_2C_2H_5$, Br, $CH_2S(CH_2)NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $n-C_4H_9$, $NHCONHC_6H_5$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, OH, O-n-propyl, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-triazín)]$, $CH_2CH_2SCH_3$,

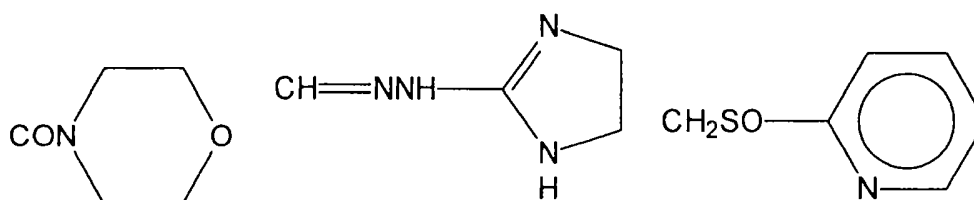




a

R^2 je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazín})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ a CH_2OH ;

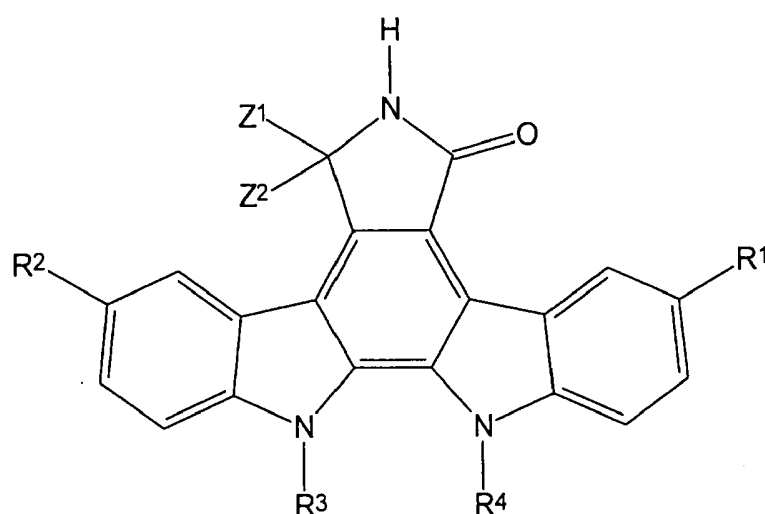
X je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z nasledujúcich: H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerínH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycín}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2^-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serín}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH , $\text{CH}_2\text{NH-Prolín}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, CH=NNHC(=NH)NH_2 , $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, CH=NNHCONH_2 , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2n\text{-hexyl}$, CONHCH_3 , $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$;



a

R je vybrané zo skupiny pozostávajúcej z OH a OCH_3 .

10. Spôsob podľa nároku 9, vyznačujúci sa tým, že Z^1 a Z^2 sú H; X je CO_2CH_3 a R je OH.
11. Spôsob podľa nároku 9, vyznačujúci sa tým, že Z^1 a Z^2 sú H; X je CO_2CH_3 ; R^1 a R^2 sú $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$; a R je OH.
12. Spôsob podľa nároku 5, vyznačujúci sa tým, že uvedená zlúčenina má vzorec



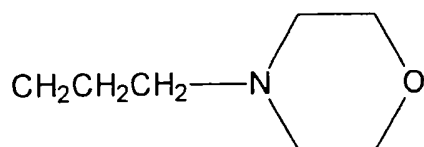
kde:

Z^1 je H a Z^2 je H alebo Z^1 a Z^2 spolu tvoria $=\text{O}$;

R^1 je H alebo Br;

R^2 je H;

R^3 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ alebo



a R^4 je H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ alebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Sekvenčný protokol

Zoznam sekvencií

<110> Cephalon, Inc.

Maroney, Anna

Walton, Kevin M.

Dionne, Craig A.

Neff, Nicola

Knight, Jr., Ernest

Glicksman, Marcie A.

<120> Spôsoby modulácie proteínov kináz viacerých rodov a skríningu zlúčenín, ktoré modulujú proteíny kináz viacerých rodov

<130> CEPH2053

<150> 60/097,980

<151> 1998-08-26

<150> 09/376,894

<151> 1999-08-18

<150> 09/637,054

<151> 2000-08-11

<160> 18

<170> PatentIn verzia 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Ala Cys Met Gly Ile Gly Ala Tyr Tyr
 1 5 10 15

Thr

<210> 2

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys Ala Trp Ala Gly Gly Ala Cys Cys
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Cys Arg Thr Cys
 20

<210> 3
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Arg Thr Ile Cys Ala Tyr Met Gly Ile
 1 5 10 15

Gly Ala Tyr Tyr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Cys Ile Met Gly Ile Ala
 20 25 30

Ala

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Gly Ala Ala Thr Thr Ile Ala Tyr Ile Gly Gly Ala Trp Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Trp Cys Cys Ala Ile Ala Cys Arg Thr Cys Ile Ser Trp
 20 25 30

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Met Glu Glu Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gtggctgtgc gggcagctcg ccag 24

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gagaccctgg atctcgcgct t 21

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 cggatccgtg acaccagtcg gaacctt 27

<210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ggaattcacc agtaagctcc agcacatc 28

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ataattcgtg ctagcgccag agtctagccg gtg 33

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ataagcttcc tcagtgaag tggatcgcg agccccctga 39

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 14
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa 60

acccgaaca 69

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gacagggcgg ccggctct 18

<210> 16
 <211> 583
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gaattcggca cgagaggact cgcaggtgtc cggcgacgag ggctggtgga ccgggcagct 60
 gaaccagcgg gtgggcatct tcccagcaa ctacgtgacc ccgcgacgag ccttctccag 120
 ccgctgccag cccggcgggc aggaccccag ttgctaccg cccattcagt tgtagaaat 180
 tgattttgcg gagctcacct tggaagagat tattggcatc gggggcttg ggaaggctta 240
 tcgtgcttc tggatagggg atgaggttgc tgtgaaagca gctcgccacg accctgatga 300
 ggacatcagc cagaccatag agaatgttcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctgaa 360
 gcacccaac atcattgccc taagaggggt atgtctgaag gagcccaacc tctgcttgg 420
 catggagttt gctcgtggag gaccttgaa tagagtgtta tctgggaaaa ggattcccc 480
 agacatcctg gtgaattggg ctgtgcagat tgccagaggg atgaactact tacatgatga 540
 ggcaattgtt cccatcatcc accgcgacct taagtccagc aac 583

<210> 17
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Asn Ser Ala Arg Glu Asp Ser Gln Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp
 1 5 10 15

Thr Gly Gln Leu Asn Gln Arg Val Gly Ile Phe Pro Ser Asn Tyr Val
 20 25 30

Thr Pro Arg Ser Ala Phe Ser Ser Arg Cys Gln Pro Gly Gly Glu Asp
 35 40 45

Pro Ser Cys Tyr Pro Pro Ile Gln Leu Leu Glu Ile Asp Phe Ala Glu
 50 55 60

Leu Thr Leu Glu Glu Ile Ile Gly Ile Gly Gly Phe Gly Lys Val Tyr
 65 70 75 80

Arg Ala Phe Trp Ile Gly Asp Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg His
 85 90 95

Asp Pro Asp Glu Asp Ile Ser Gln Thr Ile Glu Asn Val Arg Gln Glu
 100 105 110

Ala Lys Leu Phe Ala Met Leu Lys His Pro Asn Ile Ile Ala Leu Arg
 115 120 125

Gly Val Cys Leu Lys Glu Pro Asn Leu Cys Leu Val Met Glu Phe Ala
 130 135 140

Arg Gly Gly Pro Leu Asn Arg Val Leu Ser Gly Lys Arg Ile Pro Pro
 145 150 155 160

Asp Ile Leu Val Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Asn Tyr
 165 170 175

Leu His Asp Glu Ala Ile Val Pro Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser
 180 185 190

Ser Asn

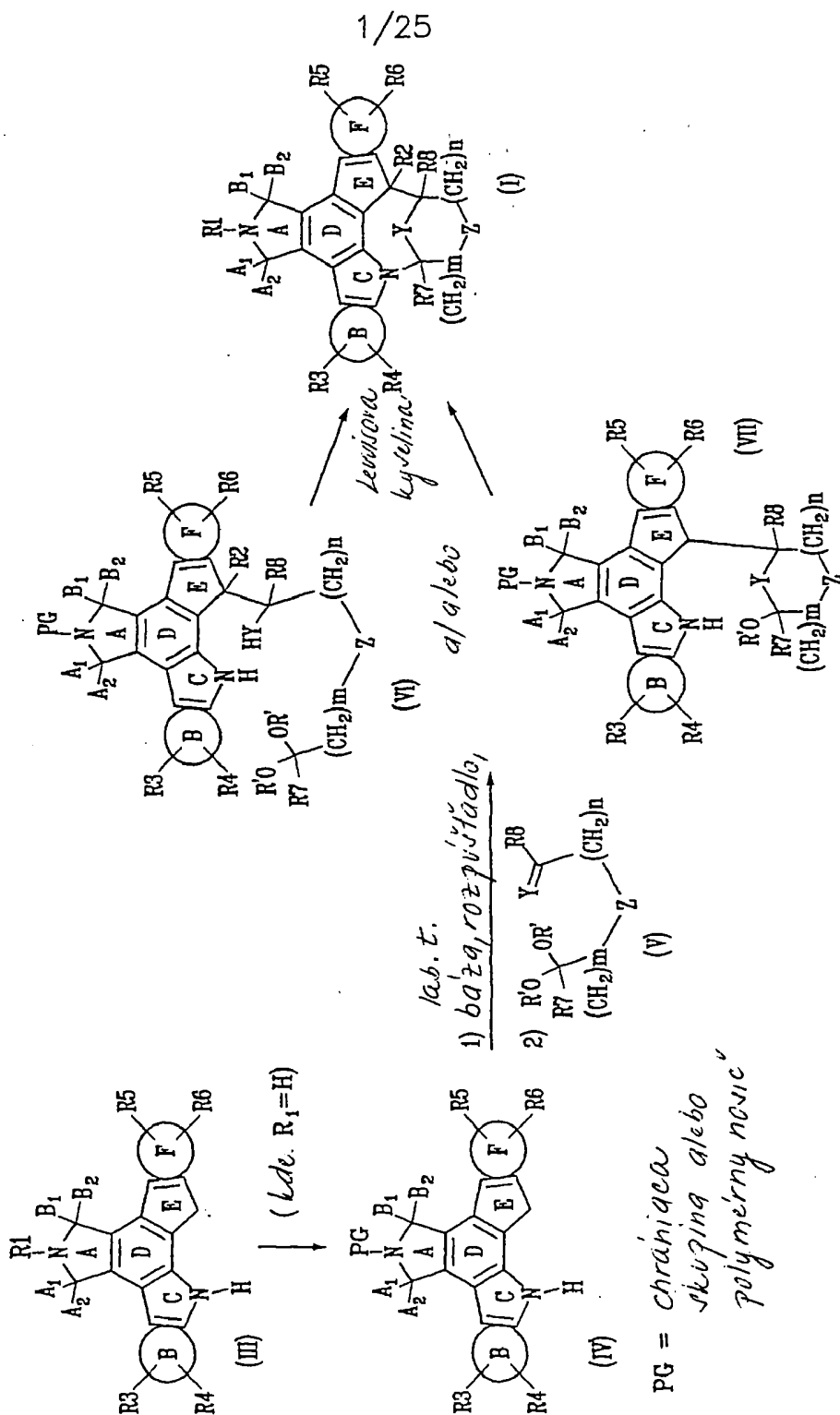
<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
1 5 10

VŠEOBECNÁ SYNTÉZA PŘEMOJENÝCH INDENOPYROLOKARBAZOLŮ

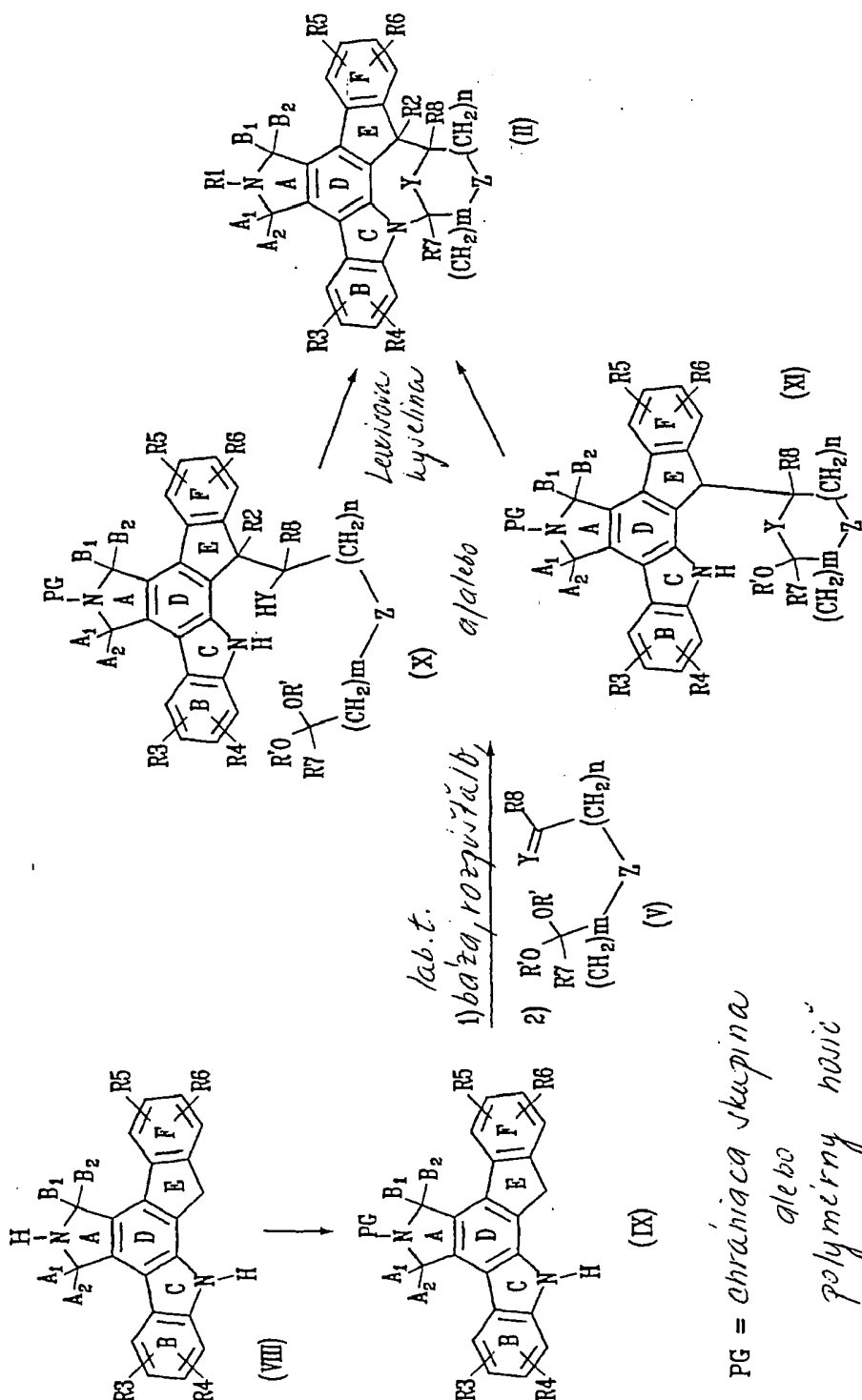
OBR. 1



VŠEOBECNÁ SYNTÉZA PŘEMOSTĚNÝCH
 INDENOPYRROLKARBAZOLŮV

03R.2

2/25



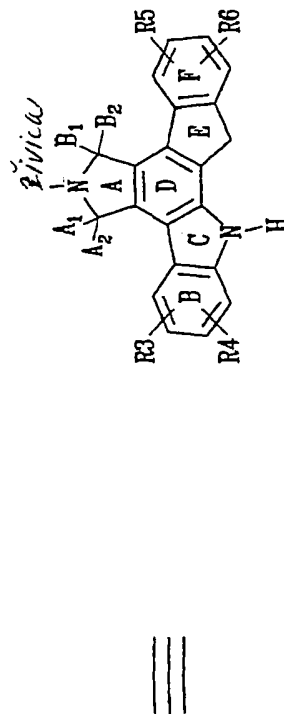
03R. 3

PRÍPRAVA INDENOPYROLKARBAZOLOV VIAZANÝCH NA ŽIVICU

3/25

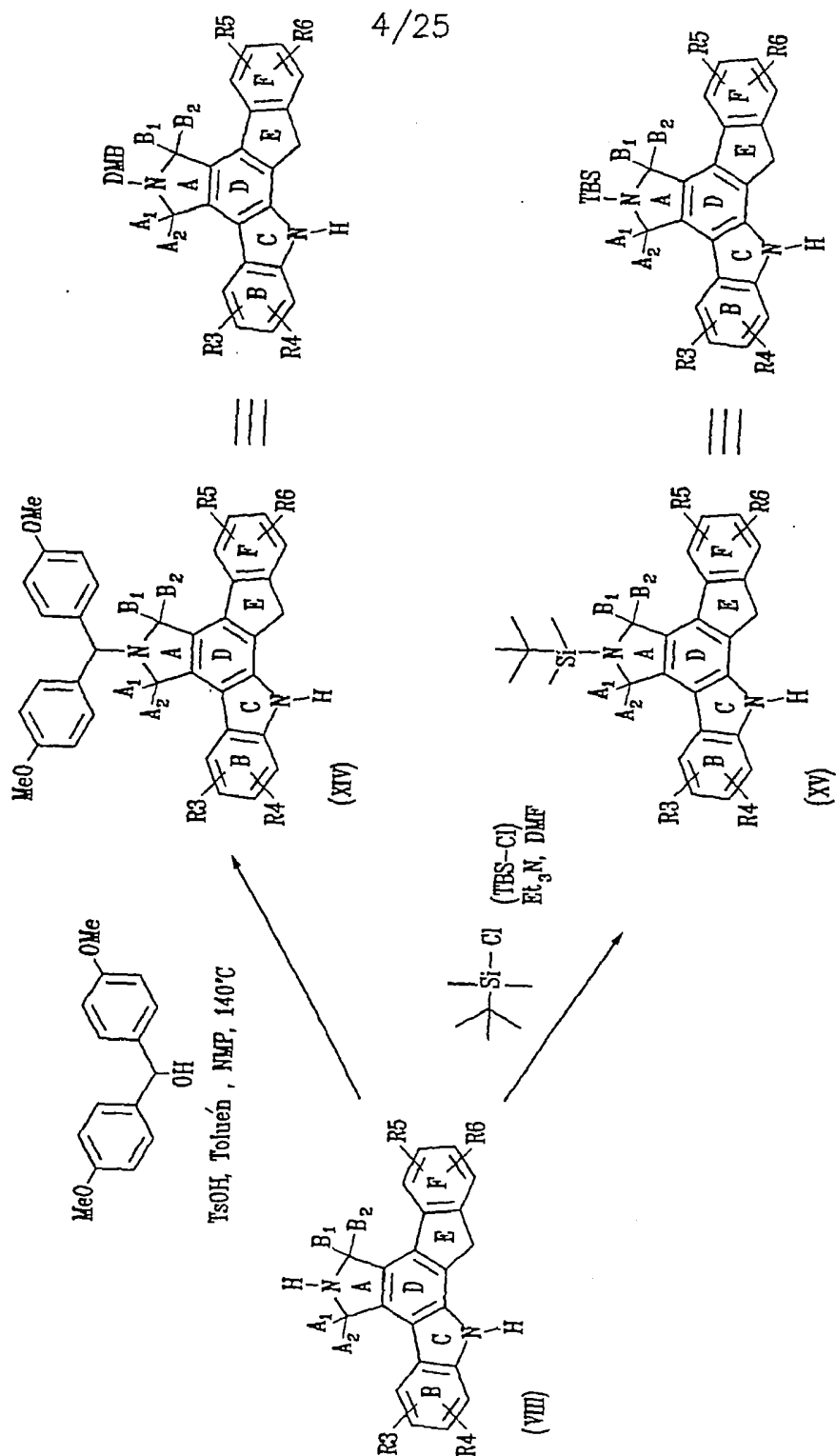


(Polymer = kopolystyren - 1% divinylbenzen)



OBR. 4

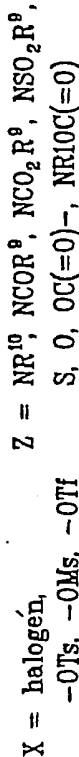
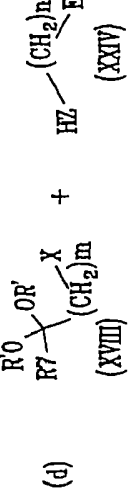
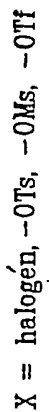
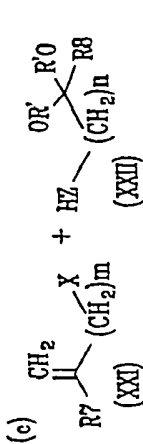
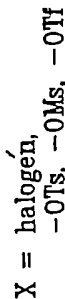
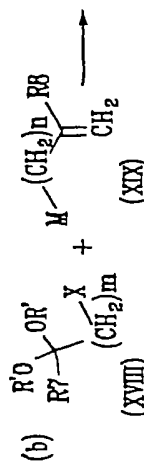
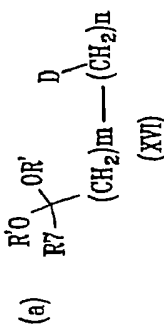
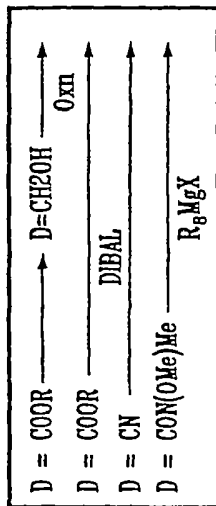
4/25



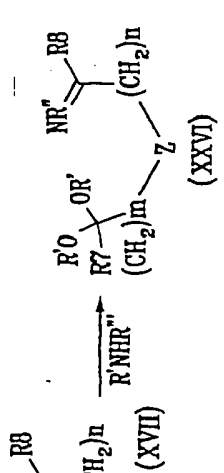
00R.5

PRÍPRAVA INTERMEDIÁTU (V)

5/25



kde Z je řádek

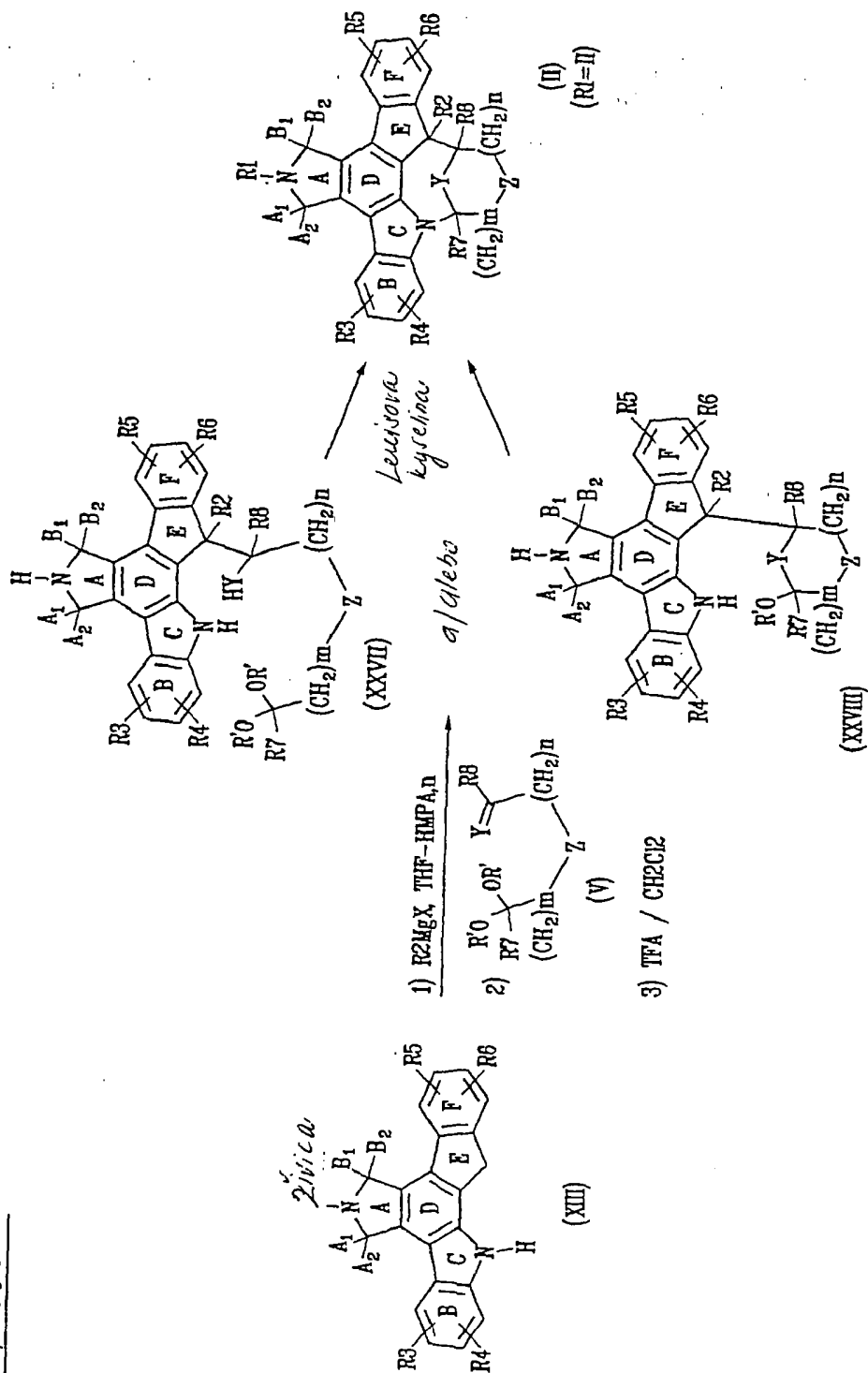


NR'' = oxím, hydrazon, nitron, imín

[ako vo výřiu uvedenom (a)]

ПРИПРАВКА ПРЕМОТЕНЬЧА ИНДЕНОПЫРОЛО КАРБАЗОЛОВ

6/25

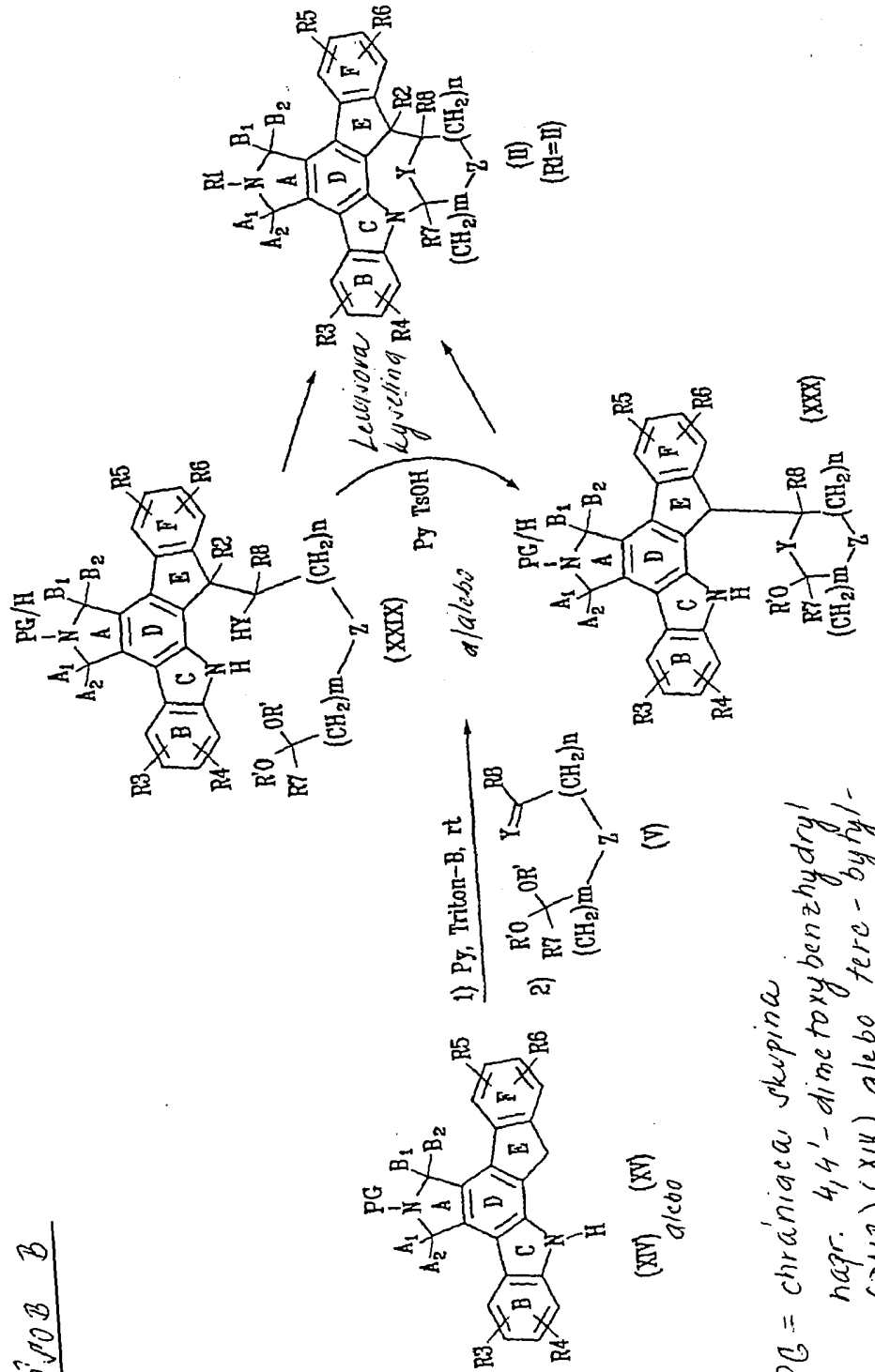


OB R. 7

38178464 FREMONTENYCH INDEPENDENT

PC/H

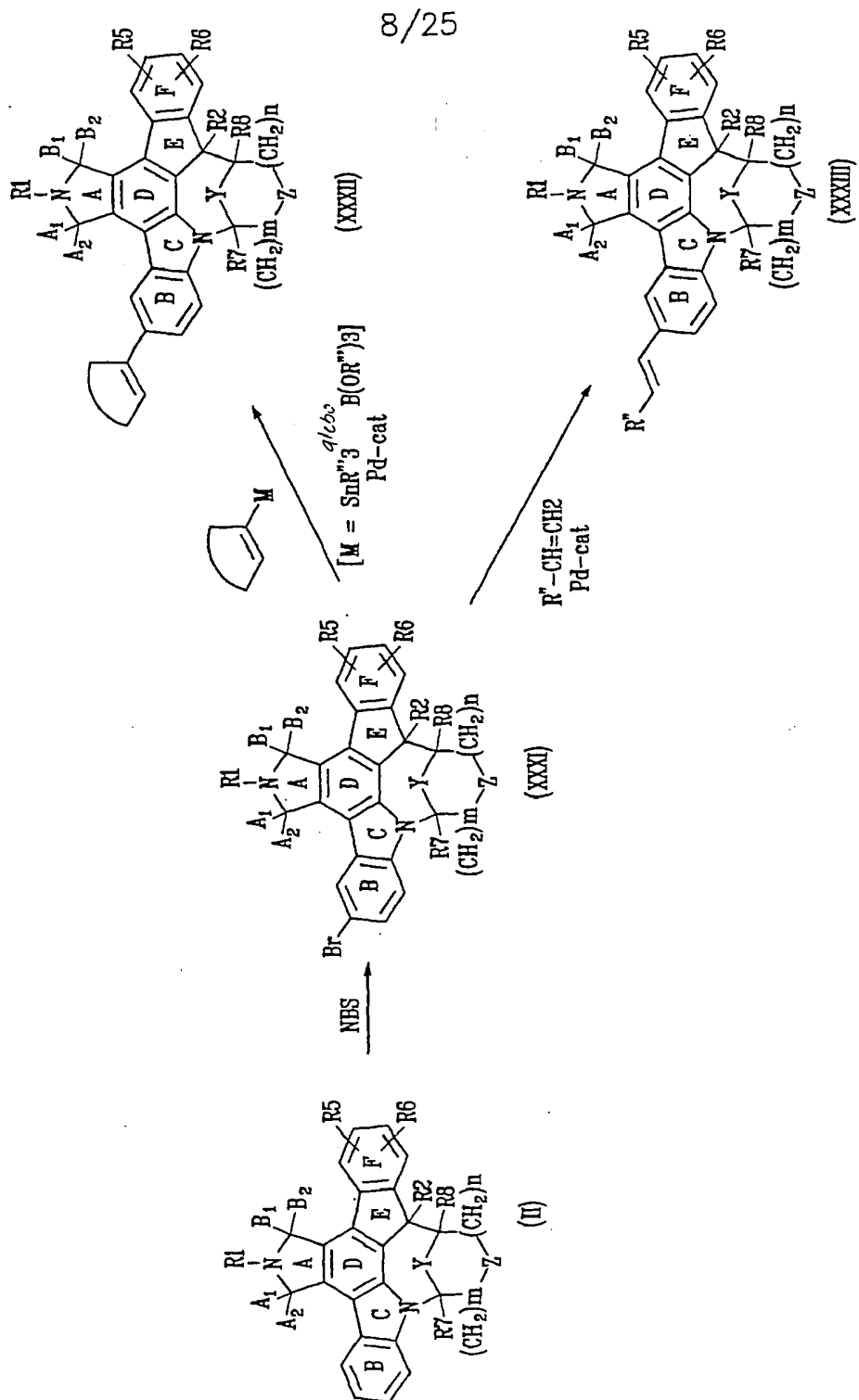
7/25



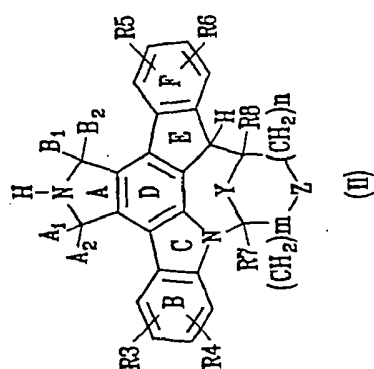
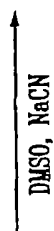
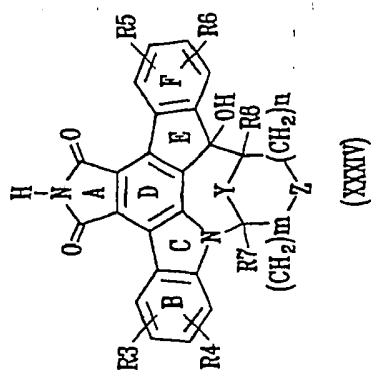
PC = chrániaca skupina
napr. 4,4'-dimetoxymetyl-
(DMB) (XIV) alebo tere-
dimetylsilyl (TBS) (XV)

ОБР. 8

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИНДЕН-7-КАРБА-2-ОЛА
 СУБСТИТУИРОВАННЫХ НА КРУГЕ В



OBČ. 9
 DERIVATIZÁCIA KRÚHU E PREHODNÝCH
 INDENOVÝ ROLO KARBÁ ZOLOV



kde

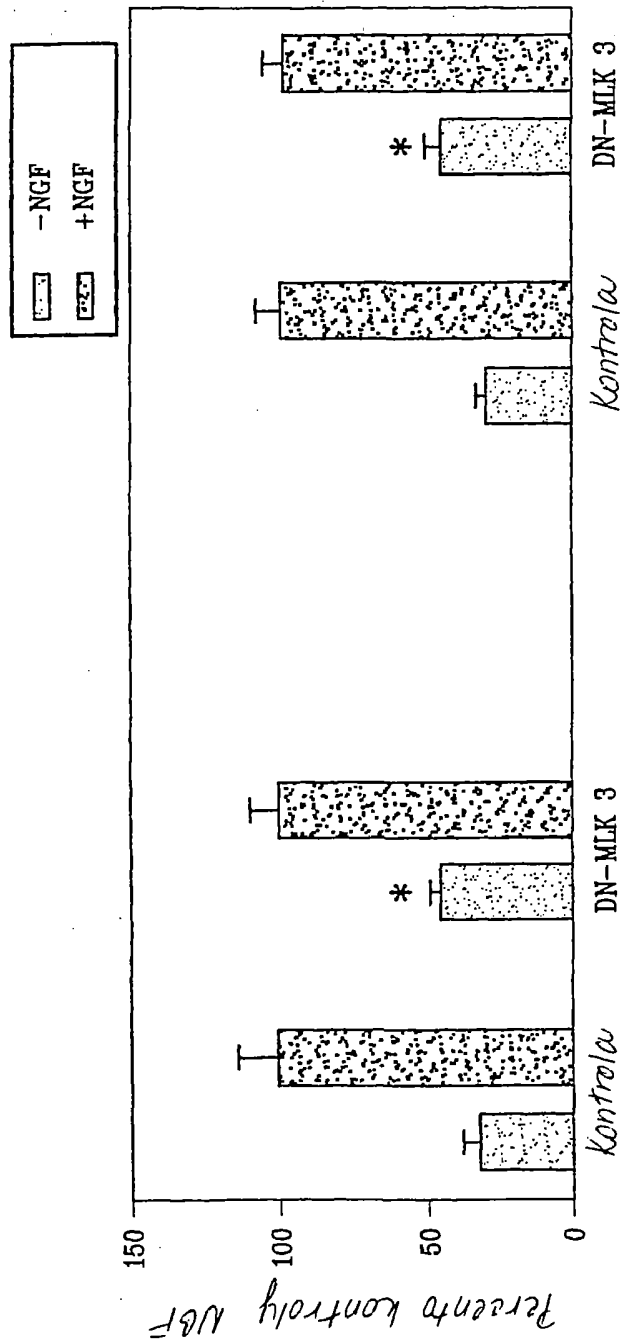
A_1 & $A_2 = H_2$, B_1 & $B_2 = O$

alebo

A_1 & $A_2 = O$, B_1 & $B_2 = H_2$

OBK. 10

10/25

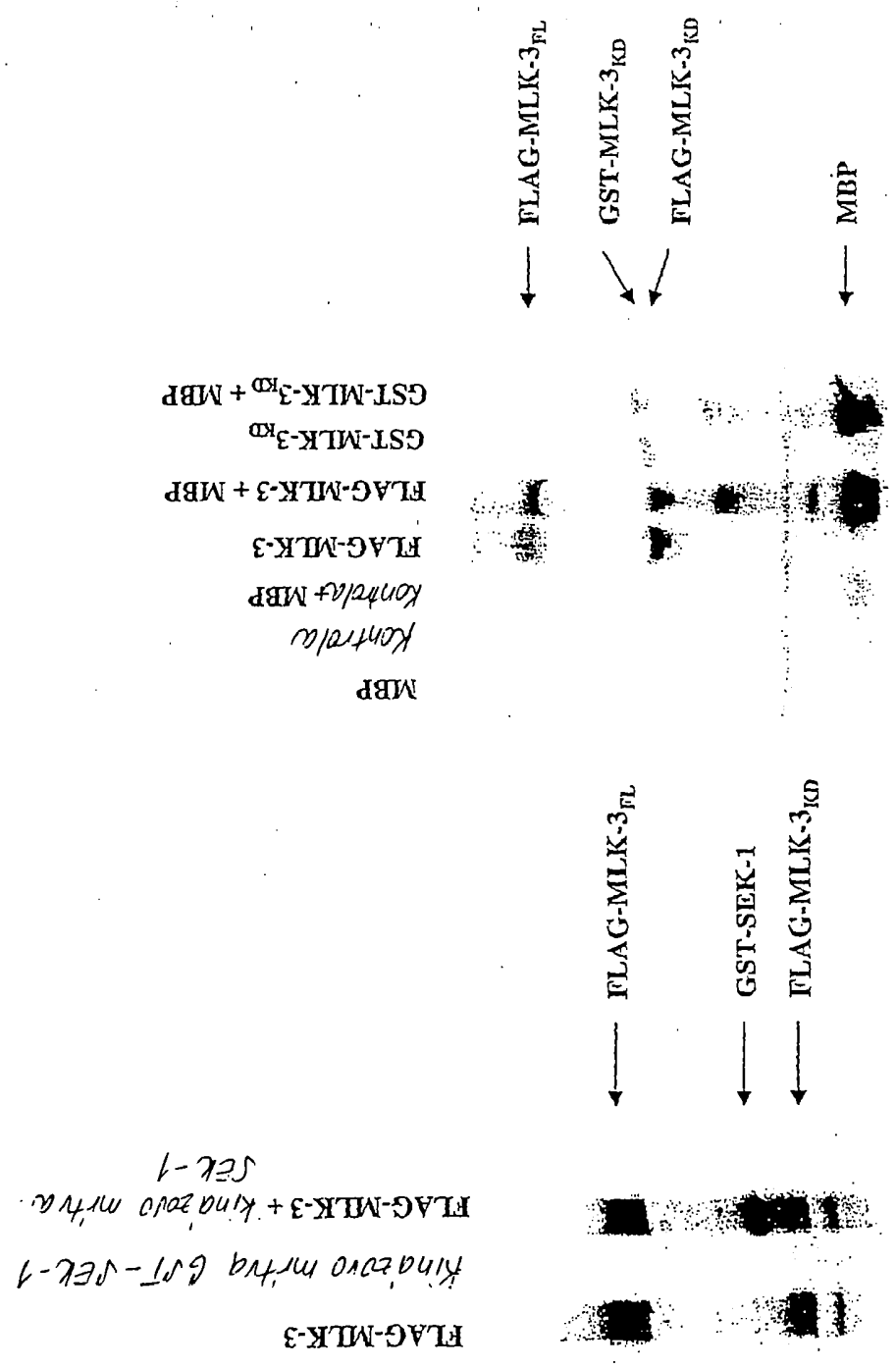


* Statisticky signifikantny rozdiel medzi kontrolou a DN-MLK-3 za neprotomnosti NGF ($p < 0,05$; T-test, dvojstranna analyza)

OBR. 11A

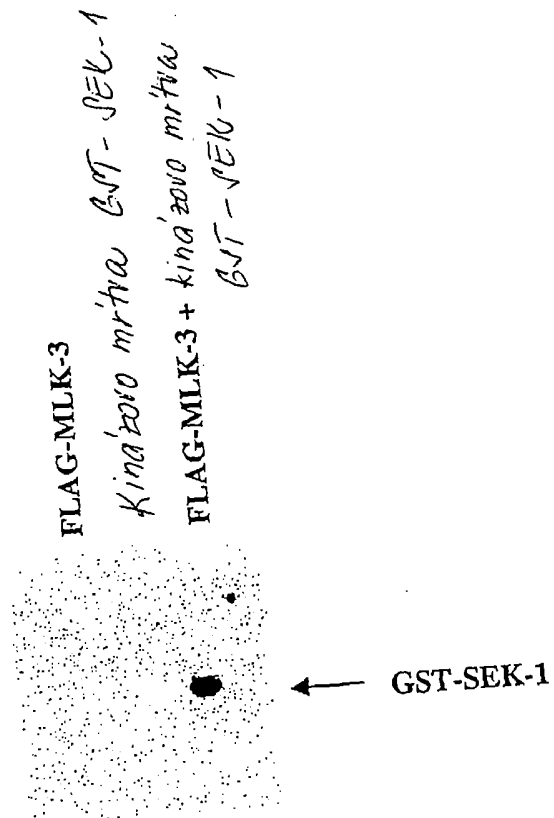
OBR. 11B

11/25

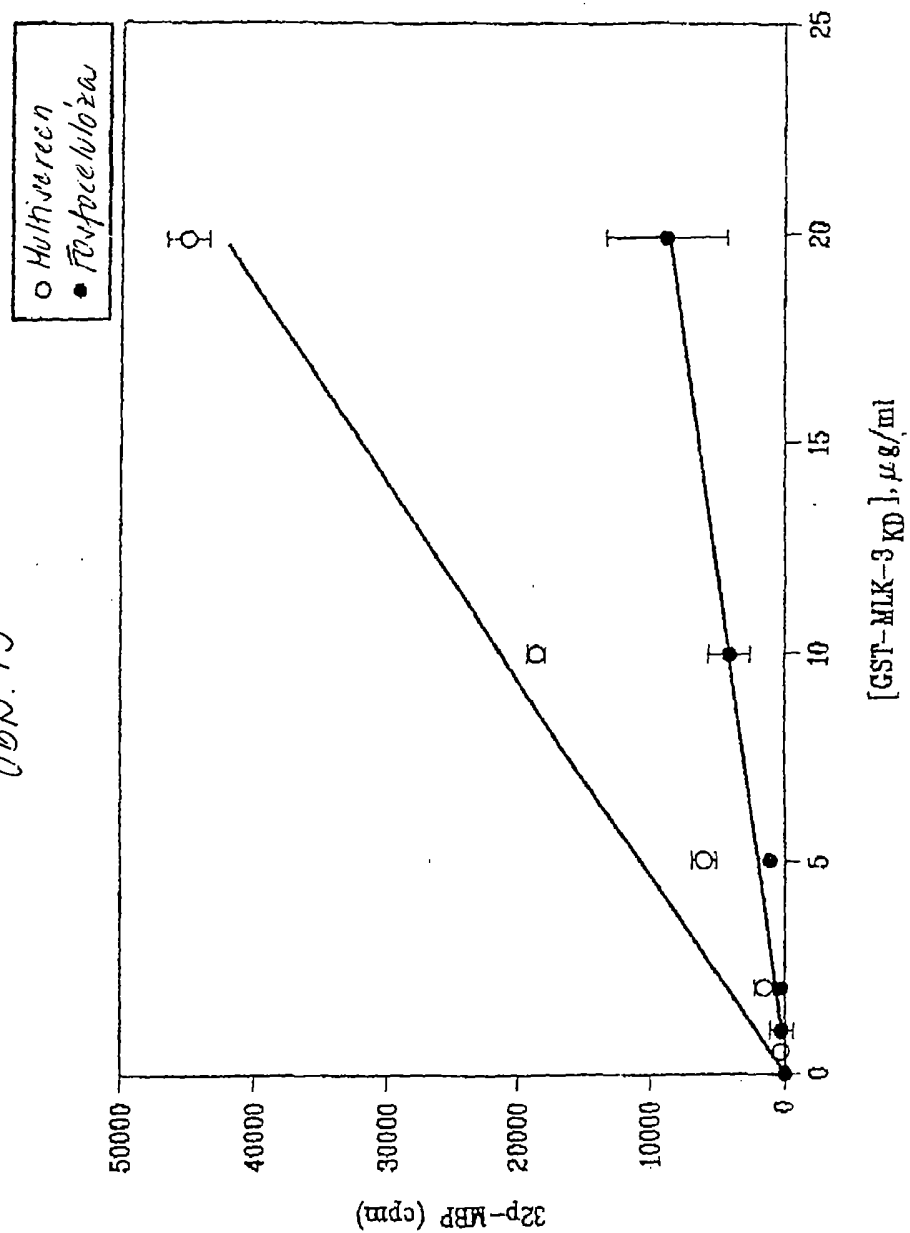


12/25

08R. 12



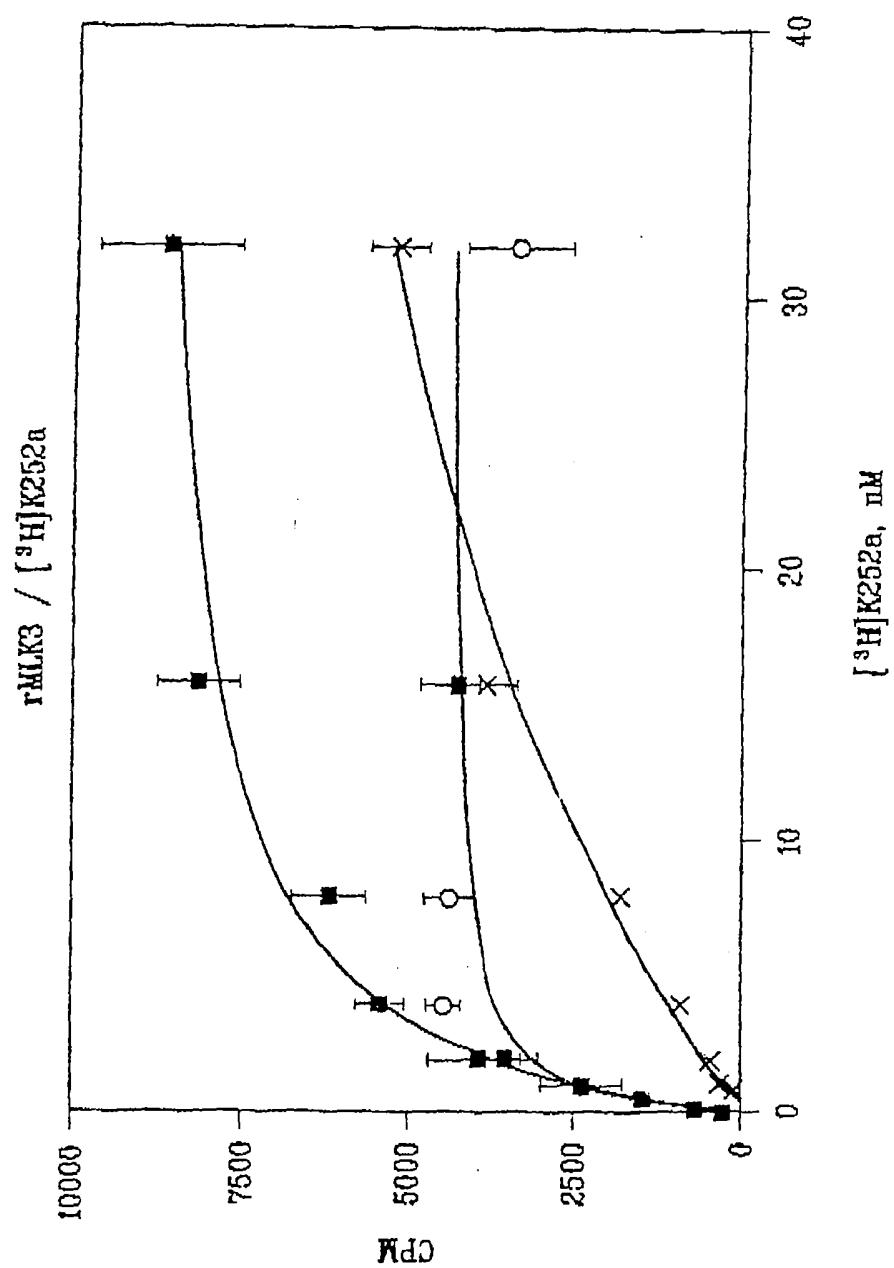
OBR. 13



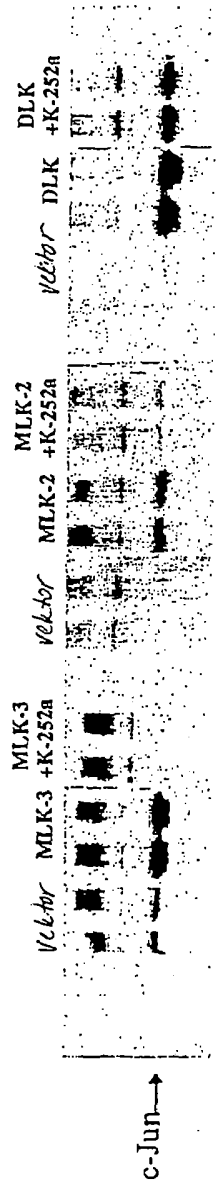
032. 14

14/25

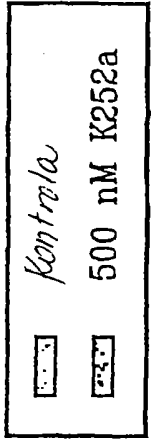
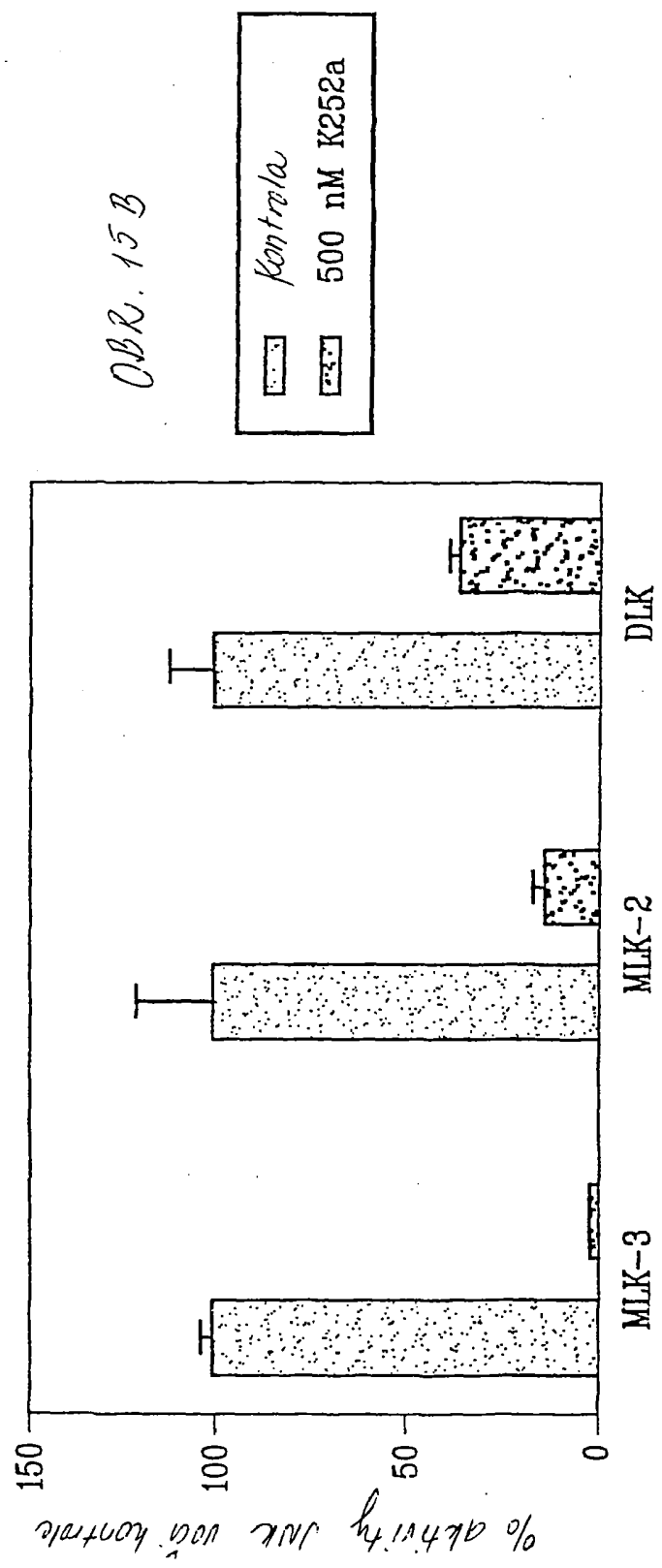
■ celá vázba
 x nešpecifická vázba
 o specifická vázba
 $K_d = 0.89 \text{ nM}$
 $B_{\text{max}} = 4514 \text{ CPM}$



OBR. 15A

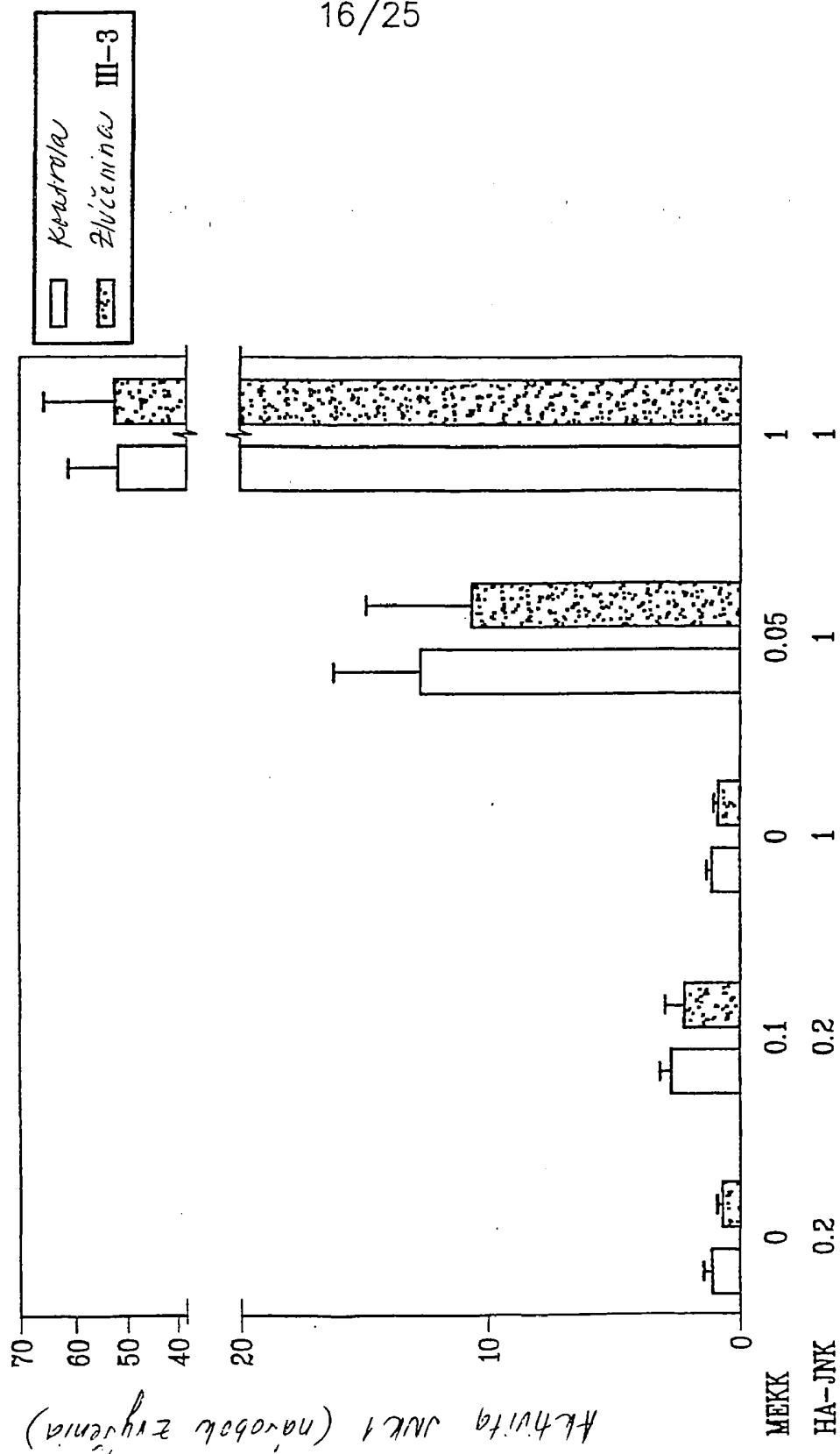


OBR. 15B

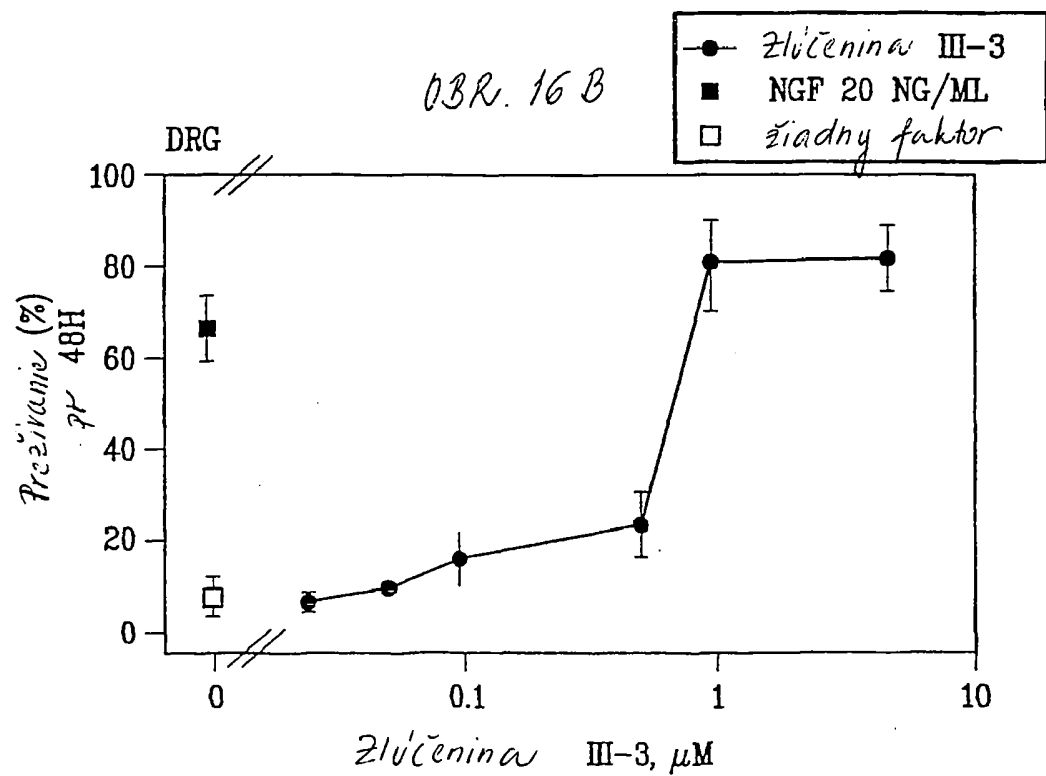
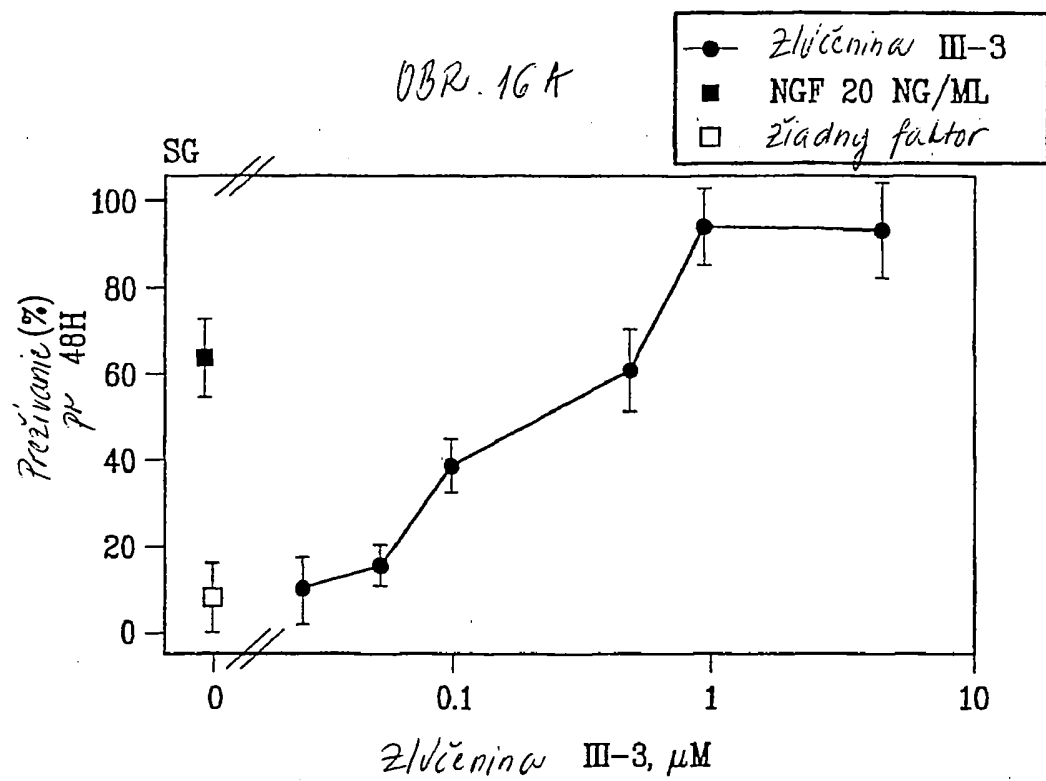


OBR. 15C.

16/25

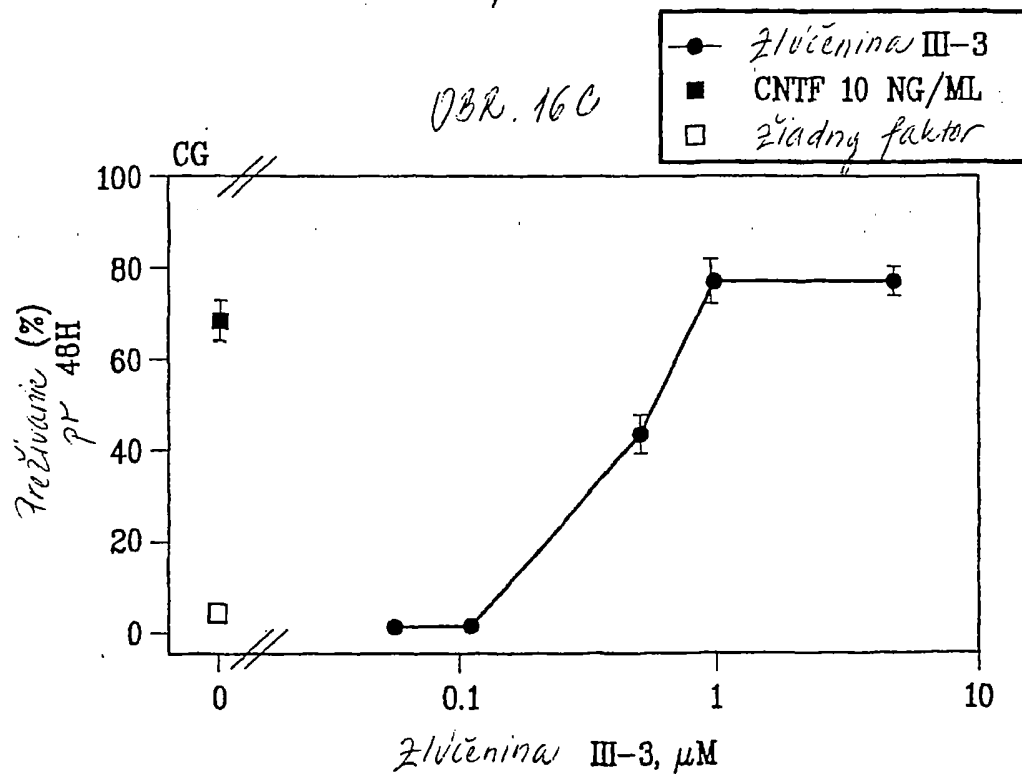


17/25

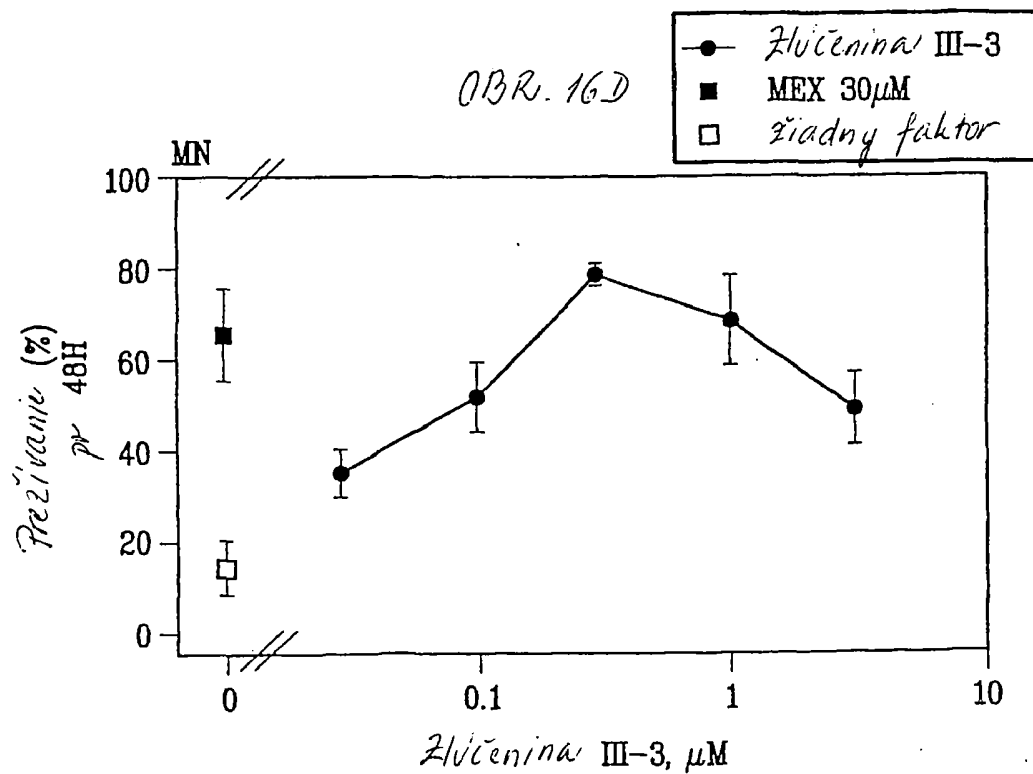


18/25

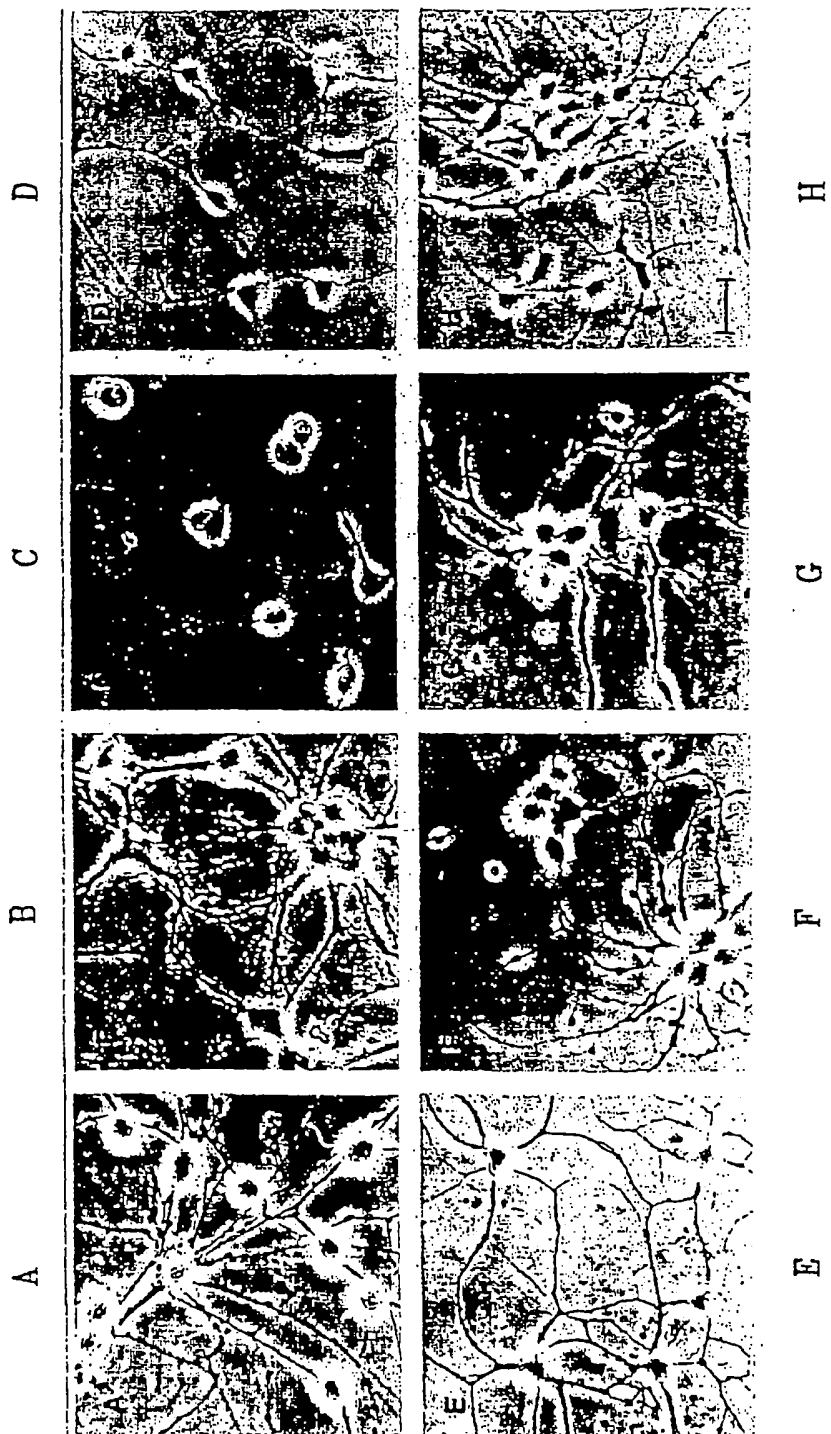
OBR. 16C



OBR. 16D



08R.17

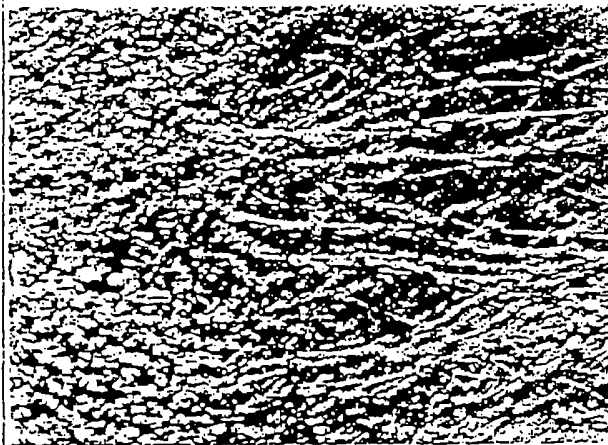


20/25

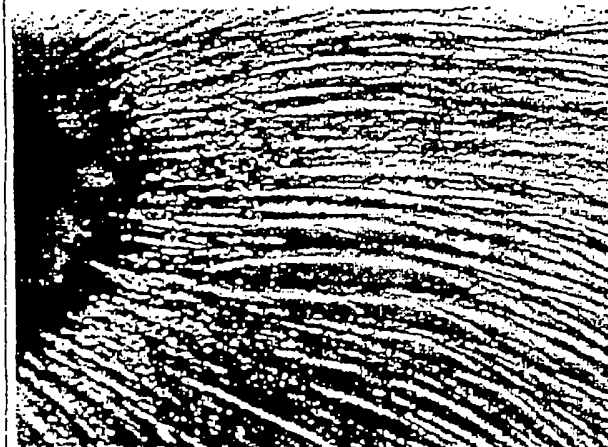
082. 18



Kontrola

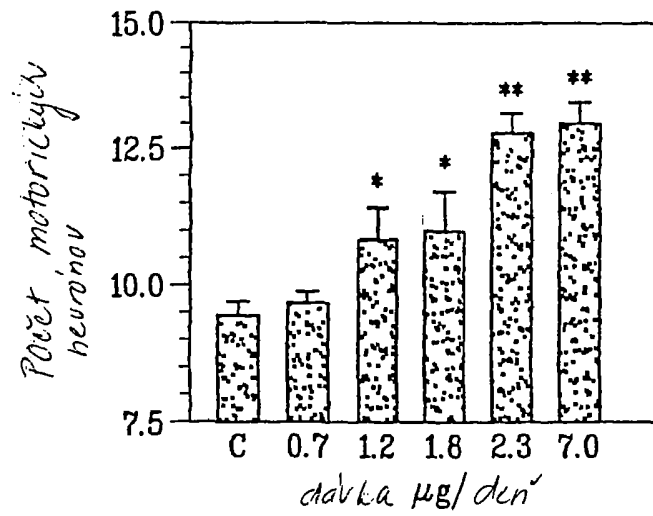


NGF



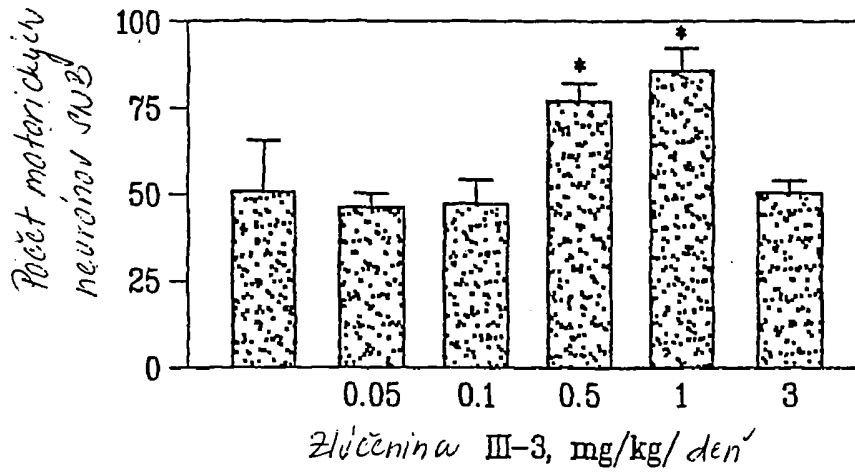
Zhienina III-3

21/25

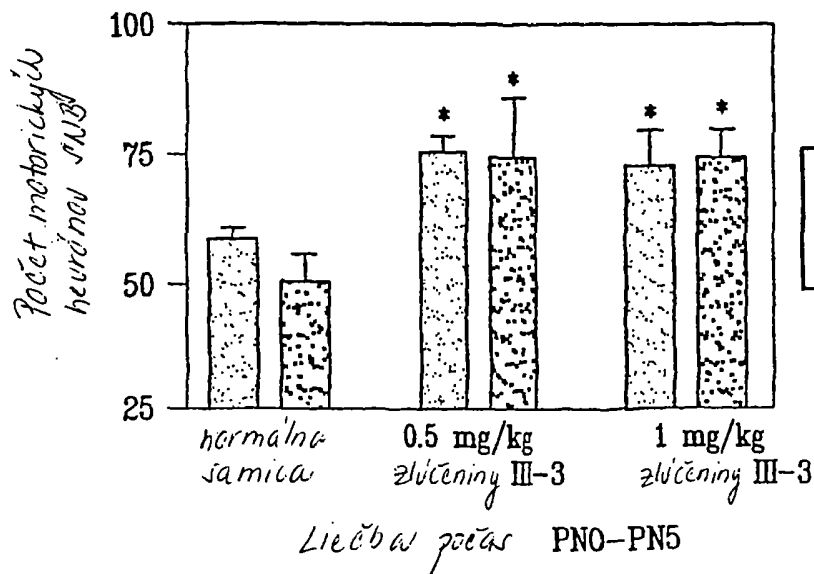


OBR. 19

*p < 0.01
**p < 0.001

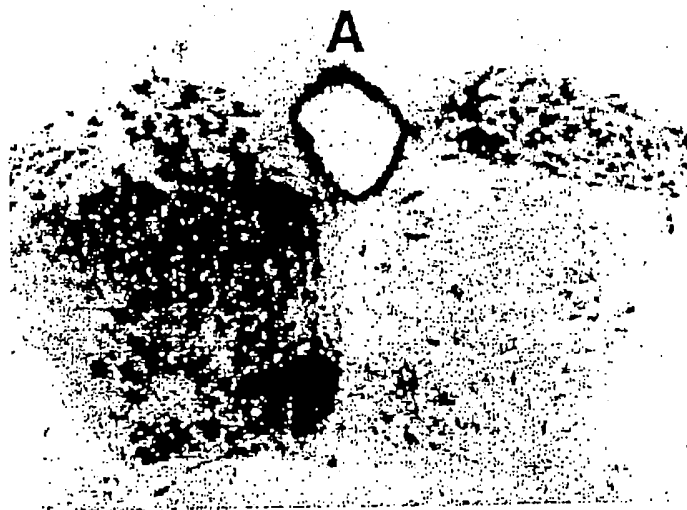


OBR. 20 A

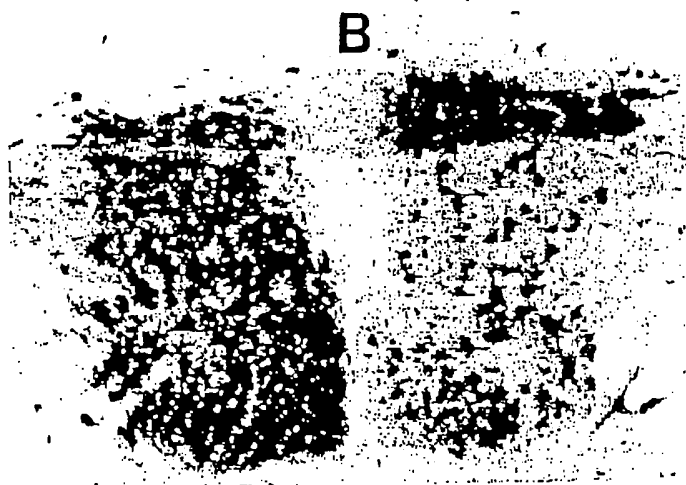


OBR. 20 B

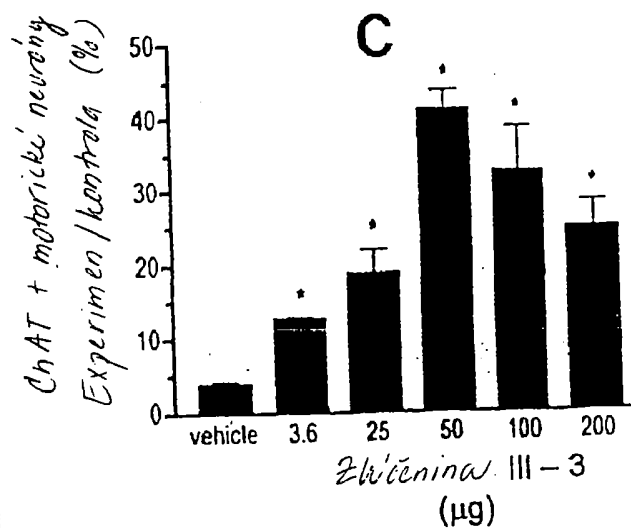
P10
P60



OBR 21A



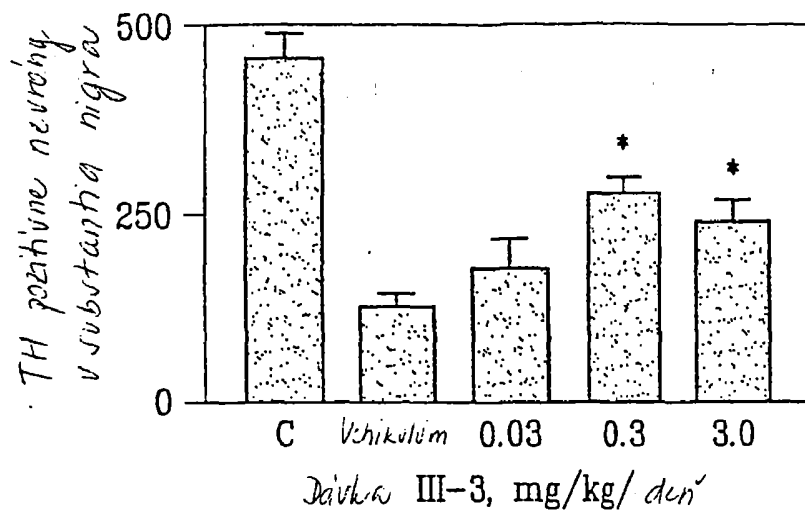
OBR 21B



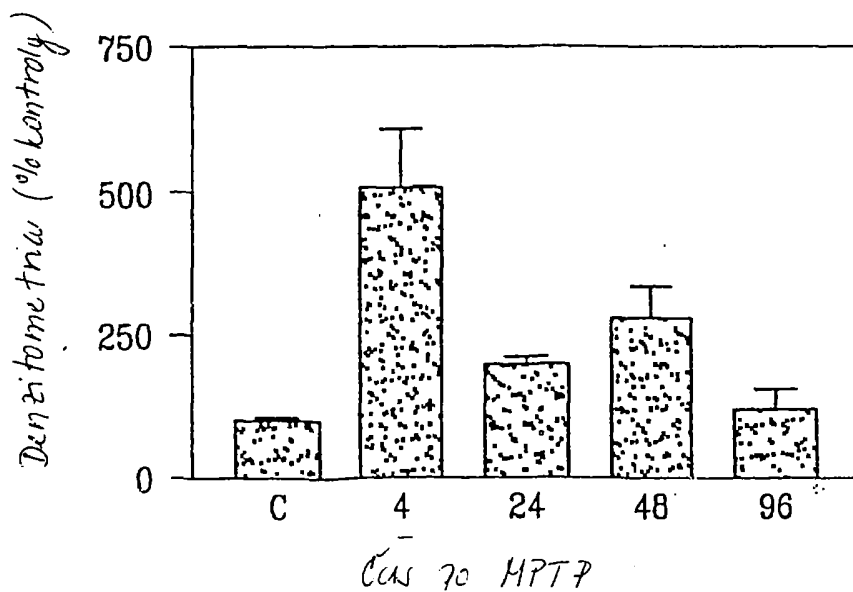
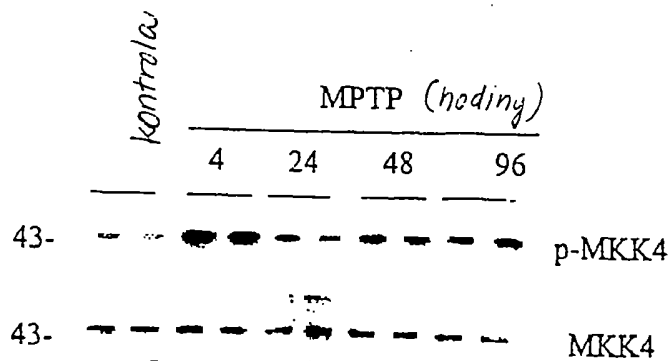
OBR 21C

23/25

POČTY TH POZITIVNÝCH BUNIEK V SUBSTANTIA NIGRA



OBR. 22A



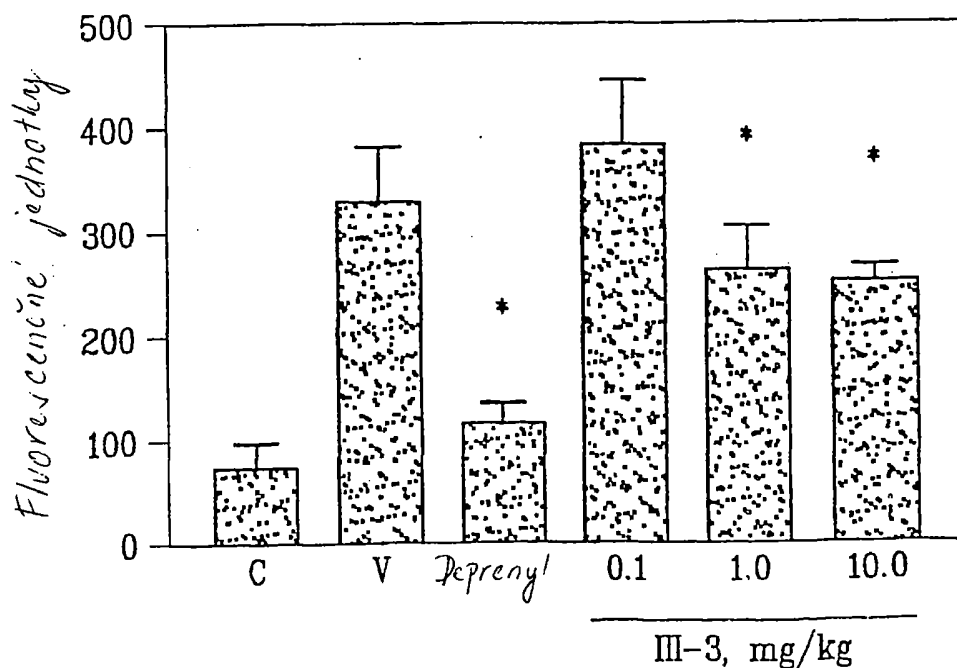
OBR. 22B

24/25

Substantia
nigra
MPTP (40 mg/kg)

Kontrola	Vehikulum	L-deprenyl	III-3 (mg/kg; sc)		
			0.1	1.0	10

082. 22 C

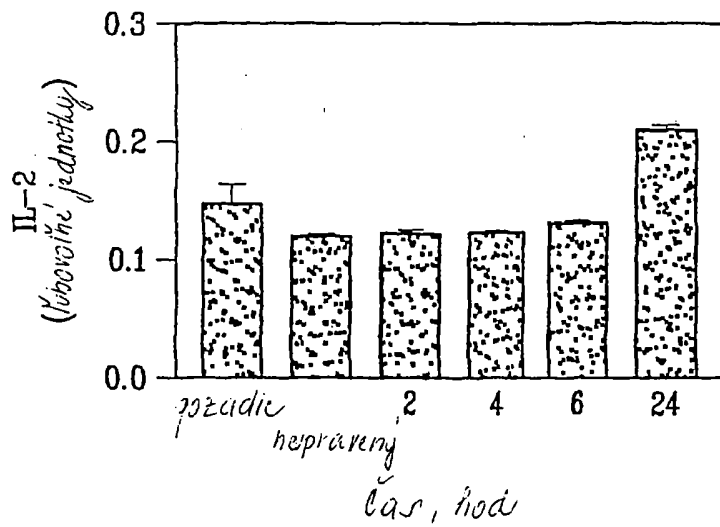


N=5/skupina

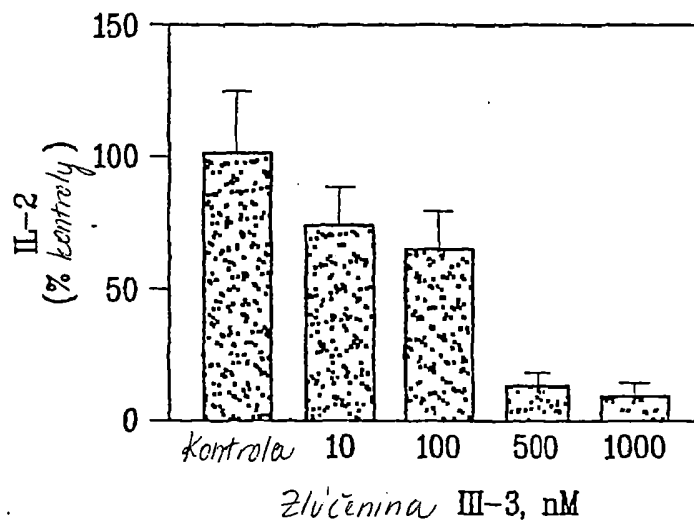
*P < 0,05

Dunnettov post-hoc test ANOVA

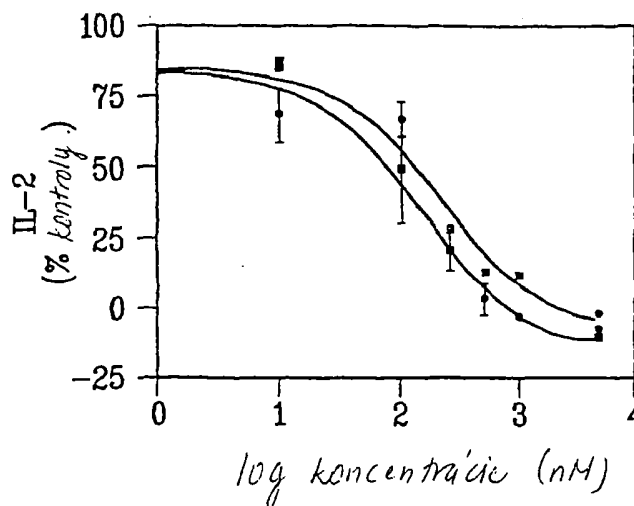
25/25



OBK. 23A



OBK. 23B



OBK. 23C

IC50		
• Zlúč. III-3	139 nM	
▪ Zlúč. 1-4	207 nM	