

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 107623 A
7(51) C 12 Q 1/00

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107623
(22) Заявено на 10.03.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 637054 (32) 11.08.2000 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 11 на 28.11.2003
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
CERHALON, INC.
WEST CHESTER, PA (US)

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

(74) Представител по индустриална
собственост:
Красимира Дамянова Цоцова, 1113 София,
ул. "Ген. Щерю Атанасов" 5

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/US01/24822, 08.08.2001

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO02/14536, 21.02.2002

(54) МЕТОД ЗА ИЗМЕНЕНИЕ НА ПРОТЕИНИТЕ НА КИНАЗАТА С МНОГО НА БРОЙ РЕДОВЕ И ИЗСЛЕДВАНЕ НА СЪЕДИНЕНИЯТА, ИЗПОЛЗВАНИ ЗА ТОВА

(57) Изобретението се отнася до методи за идентифициране на съединения, които изменят активността на протеина на киназата с много на брой редове, като спомагат за оживяване или умиране на клетките. Те включват етапи на контакт на клетката, съдържаща протеин на киназата с много на брой редове, със съединение, определящо дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове или подпомага клетъчното оживяване. Изобретението се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на невродегенеративни нарушения и/или възпаления. Изобретението се отнася също до методи за изменение активността на протеина на киназата с много на брой редове, спомагащи за оживяване или умиране на клетките. Те включват контакт на протеина или на клетката, която го съдържа, с индено- или индолосъединение. Изобретението се отнася и до методи за лечение на невродегенеративни нарушения и/или възпаления.

12 претенции, 23 фигури

BG 107623 A

10.03.03

ИЗМЕНЕНИЕ НА ПРОТЕИНИТЕ НА КИНАЗАТА С МНОГО НА БРОЙ РЕДОВЕ

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася, отчасти, до методи за изменение на членове на семейството на киназата с много на брой редове (MLK), методи за идентифициране на съединения, които изменят активността на протеина на киназата с много на брой редове и или спомагат за оживяване на клетките, или спомагат за умиране на клетките, методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на невродегенеративни нарушения и/или възпаления, и методи за лечение на невродегенеративни нарушения със съединение, които инхибират протеина на киназата с много на брой редове.

Предшествващо състояние на: техниката

Семейството на киназата с много на брой редове (MLK) включва група протеини, при които протеиновата последователност на киназните домени на членовете на семейството силно наподобяват на MAPKKK, но повече си приличат помежду си, отколкото на другите MAPKKK. Членовете на семейството на киназата с много на брой редове (MLK) включват част от много сложни каскади на киназата, например, сигнализираща стрес каскада, която включва изменение на, освен другото, c-Jun, завършваща с азот киназа (JNK), която променя, освен другото, копирните фактори, включващи c-Jun, ATF2 и ELK-1. C-Jun, завършваща с азот киназа (JNK), е описана в U.S. Patents 5,534,426; 5,593,884; 5,605,808 и WO 95/03324, които са изцяло дадени за сравнение в настоящото изобретение.

Семейството на киназата с много на брой редове (MLK) включва, отчасти, следните групи: 1) киназа с много на брой редове 1 (MLK1); 2) киназа с много на брой редове 2 (MLK2); 3) киназа с много на брой редове 3 (MLK3); 4) киназа, създаваща леуцинов цип (LZK); 5) киназа, създаваща двоен леуцинов цип (DLK); и 6) киназа с много на брой редове 6 (MLK6). Киназата с много на брой редове 1 (MLK1) притежава каталитичен домен, подобен на двете кинази, специфични за Tyr и Ser/Thr. Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 701-710. Киназата с много на брой редове 2 (MLK2) също притежава каталитичен домен, подобен на двете кинази, специфични за Tyr и Ser/Thr. Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 701-710. Киназата с много на брой редове 2 (MLK2) е известна също като MST. Katoh, *et al.*, *Oncogene*, **1995**, 10, 1447-1451. Киназата с много на брой редове 3 (MLK3) включва протеин, който в допълнение към киназния домен, съдържа два леуцинови ципа със съседен, завършващ с карбокси регион и регион, богат на пролин. Ing, *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 1745-1750. Киназата с много на брой редове 3 (MLK3) е известна също и като SPRK (Gallo, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269,

15092-15100) и като PTK1 β (Ezoe, *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 935-938). LZK е киназа, създаваща леуцинов цип. Sakuma, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 28622-28629. Киназата, създаваща двоен леуцинов цип (DLK) притежава киназен домен и два предполагаеми мотива на леуцинов цип. Holzman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 30808-30817. Киназата, създаваща двоен леуцинов цип (DLK) е известна също и като ZPK (Reddy, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1994**, 202, 613-620) и MUK (Hirai, *et al.*, *Oncogene*, **1996**, 12, 641-650. Членовете на семейството на киназата с много на брой редове (MLK) са описани също в, например, U.S. Patents 5,676,945; 5,554,523; WO 93/15201, Canadian Patent 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**, 271, 16888-16896, Hirai, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 15167-15173, Fan, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 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, Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500. Напоследък, киназа, свързана с киназата с много на брой редове (MLK) е идентифицирана в EST база данни. DNA последователността на този клонинг, киназата с много на брой редове 6 (MLK6), е описана посредством седем припокриващи се входа. Техните идентификационни (ID) номера на клониране са: 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 и 178522, последователностите на които изцяло са дадени за сравнение. Всяка литература, цитирана в настоящия параграф, е дадена изцяло за сравнение.

Напоследък е показано стабилно изразяване на ZPK, което понижава пролиферативния капацитет на NIH 3T3 фибробластите, измерен при анализа за формиране на колония. Bergeron, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res.*

100004

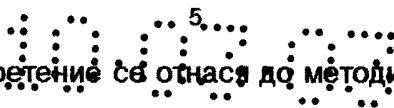
Comm., 1997, 231, 153-155. Bergelson, *et al.*, обаче, не успяват да получат данни, показващи, че ZPK променя активността на ZPK субстрата или дали ZPK спомага за умиране на клетките.

Показано е, че проявяването на изградено кодиране на Мус-MLK2 в Swiss 3T3 клетките води до апоптоза, приблизително 20 часа след инжектирането. Nagata, *et al.*, *EMBO J.*, 1998, 17, 149-158.

Заявителите са разработили редица индоло- и инденосъединения, които, между другото, инхибират клетъчния растеж, свързан с хиперпролиферативни състояния и понижават смъртността в различни ембрионални култури, като дорсален коренен ганглий, набраздени, горни цервикални ганглии и мотоневрони. U.S. Patents 5,475,110; 5,591,855; 5,594,009; 5,461,146; 5,621,100; 5,621,101; 5,705,511 и 5,756,494, всеки от които е възложен на правопреемника на настоящата заявка и, всеки от които е даден за сравнение. Съединенията, цитирани в U.S. Patent 5,705,511, с формула G, в настоящата заявка имат формула I. Заявителите показват, също така, че апоптозата на мотоневроните се инхибира посредством производно на K-252a, индолокарбазол, който изменя и сигнализиращата за стрес каскада. Maroney, *et al.*, *J. Neurosci.*, 1998, 18, 104-111, даден за сравнение.

Поради несъответствие на изследваните съединения, които изменят членове на сигнализиращата за стрес каскада и спомагат или за умиране на клетки или за оживяване на клетки, необходимо е да се създадат нови селективни методи за изследване на съединенията. Освен това, необходимо е да се извършват анализи на терапевтици, които могат да бъдат ефикасни при лечение на възпаления и невродегенеративни нарушения. Настоящото изобретение си поставя тези, както и други важни цели.

Техническа същност на изобретението



Настоящото изобретение се отнася до методи за идентифициране на съединения, които изменят активността на протеина на киназата с много на брой редове и спомагат за оживяване на клетките, характеризиращи се с това, че включват етапи на контакт на клетката, съдържаща протеин на киназата с много на брой редове, със съединение, определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове и определяне дали съединението подпомага клетъчното оживяване.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които изменят активността на протеина на киназата с много на брой редове и спомагат за умиране на клетките, характеризиращи се с това, че включват етапи на контакт на клетката, съдържаща протеин на киназата с много на брой редове, със съединение, определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове и определяне дали съединението подпомага клетъчното умиране.

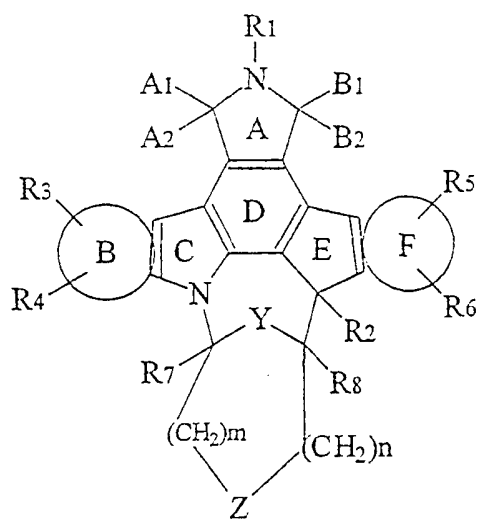
Настоящото изобретение се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на невродегенеративни нарушения, характеризиращи се с това, че включват контакт на клетка или клетъчен екстракт, съдържащи протеин на киназата с много на брой редове, със съединението и определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на възпаление, характеризиращи се с това, че включват контакт на клетка или клетъчен екстракт, съдържащи протеин на киназата с много на брой редове, със съединението и определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за лечение на бозайник, притежаващ или се предполага, че притежава невродегенеративно нарушение, характеризиращи се с това, че включват администриране в споменатия бозайник на съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за лечение на бозайник, притежаващ възпаление, характеризиращи се с това, че включват администриране в споменатия бозайник на съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за изменение на активността на протеина на киназата с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула II:

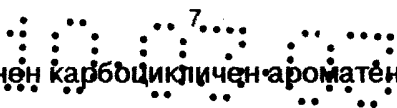


II

където:

пръстен В и пръстен F, независимо един от друг, и всеки, заедно с въглеродните атоми, с които са свързани, се подбират от групата, състояща се от:

ненаситен шестчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в който от 1 до 3 въглеродни атома могат да бъдат заместени с азотни атоми;



ненаситен петчленен карбоциклически ароматен пръстен; и

ненаситен петчленен карбоциклически ароматен пръстен, в който, или

един въглероден атом е заместен с кислороден, азотен или серен атом;

два въглеродни атома са заместени със серен и азотен атом, кислороден и азотен атом, или два азотни атома; или

три въглеродни атома са заместени с три азотни атома;

R^1 е избран от групата, състояща се от:

водород, заместен или незаместен алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен арил, заместен или незаместен арилалкил, заместен или незаместен хетероарил, или заместен или незаместен хетероарилалкил;

$-C(=O)R^9$, където R^9 е избран от групата, състояща се от алкил, арил или хетероарил;

$-OR^{10}$, където R^{10} е избран от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома;

$-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ и $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, където p е от 1 до 4; и, където, или

R^{11} и R^{12} независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома; или

R^{11} и R^{12} заедно образуват свързваща група с формула

$-(CH_2)_zX^1-(CH_2)_z$, където X^1 е избран от групата, състояща се от $-O-$, $-S-$ и $-CH_2-$;

R^2 е избран от групата, състояща се от водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, хидроксилна група, алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, заместен или незаместен арилалкил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или незаместен хетероарилалкил;

8

R^3, R^4, R^5 и R^6 независимо един от друг са подбрани от групата, състояща се от:

водород, арил, хетероарил, флуор, хлор, бром, йод, циано, CF_3 , нитро, хидроксид, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$;

$-CH_2OR^{14}$, където R^{14} е остатък от аминокиселина, след като хидроксилната група от карбоксилната група се отдели;

$-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ или $-CH=NNR^2R^{2A}$, където R^{2A} е същия като R^2 ;

$-S(O)_yR^2$, $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$, където y е 0, 1 или 2;

алкил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома, алкенил, притежаващ от 2 до 8 въглеродни атома и алкинил, притежаващ от 2 до 8 въглеродни атома, където

всеки алкил, алкенил или алкинил е незаместен; или

всеки алкил, алкенил или алкинил е заместен с от 1 до 3 групи, подбрани от групата, състояща се от арил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома, хетероарил, арилалкокси, хетероциклоалкокси, хидроксиалкокси, алкилоксиалкокси, хидроксиалкилтио, алкоксиалкилтио, флуор, хлор, бром, йод, циано, нитро, хидроксид, $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pCO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)NR^9$, $-OCONHR^2$, $-O$ -тетрахидропиранил, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}C(=O)R^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2OR^{10}$, $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ и монозахарид, притежаващ от 5 до 7 въглеродни атома, където всяка хидроксилна група на монозахарида, независимо една от друга, е или незаместена, или е заменена с водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, алкилкарбонилноксид,

притежаващ от 2 до 5 въглеродни атома или алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома;

X^2 е кислород, сяра или NR^{10} ;

R^7 и R^8 независимо един от друг са подбрани от групата, състояща се от водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен арилалкил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или незаместен хетероарилалкил, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ и $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$; или R^7 и R^8 заедно образуват свързваща група с формула $-CH_2-X^3-CH_2-$, където X^3 е X^2 или връзка;

m и n , независимо един от друг, са 0, 1 или 2;

Y е подбран от групата, състояща се от $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ и $-CH_2-$;

Z е подбран от групата, състояща се от връзка, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ и $-CH(O(C=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, където R^{9A} е същия като R^9 ;

R^{15} и R^{16} независимо един от друг са подбрани от групата, състояща се от водород, хидрокси, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, хидроксиалкил и $-CO_2R^{10}$;

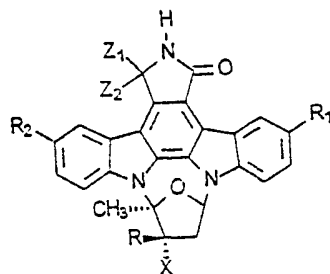
R^{17} е подбран от групата, състояща се от водород, алкил, арил и хетероарил;

A^1 и A^2 са подбрани от групата, състояща се от H, H ; H, OR^2 ; $H, -SR^2$; $H, -N(R^2)_2$; и група, в която A^1 и A^2 заедно образуват част, подбрана от групата, състояща се от $=O$, $=S$ и $=NR^2$;

B^1 и B^2 са подбрани от групата, състояща се от H, H ; H, OR^2 ; $H, -SR^2$; $H, -N(R^2)_2$; и група, в която B^1 и B^2 заедно образуват част, подбрана от групата, състояща се от $=O$, $=S$ и $=NR^2$;

при условие, че поне една от двойките A^1 и A^2 или B^1 и B^2 образуват $=O$.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за изменение на активността на протеина на киназата с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или на клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула III:

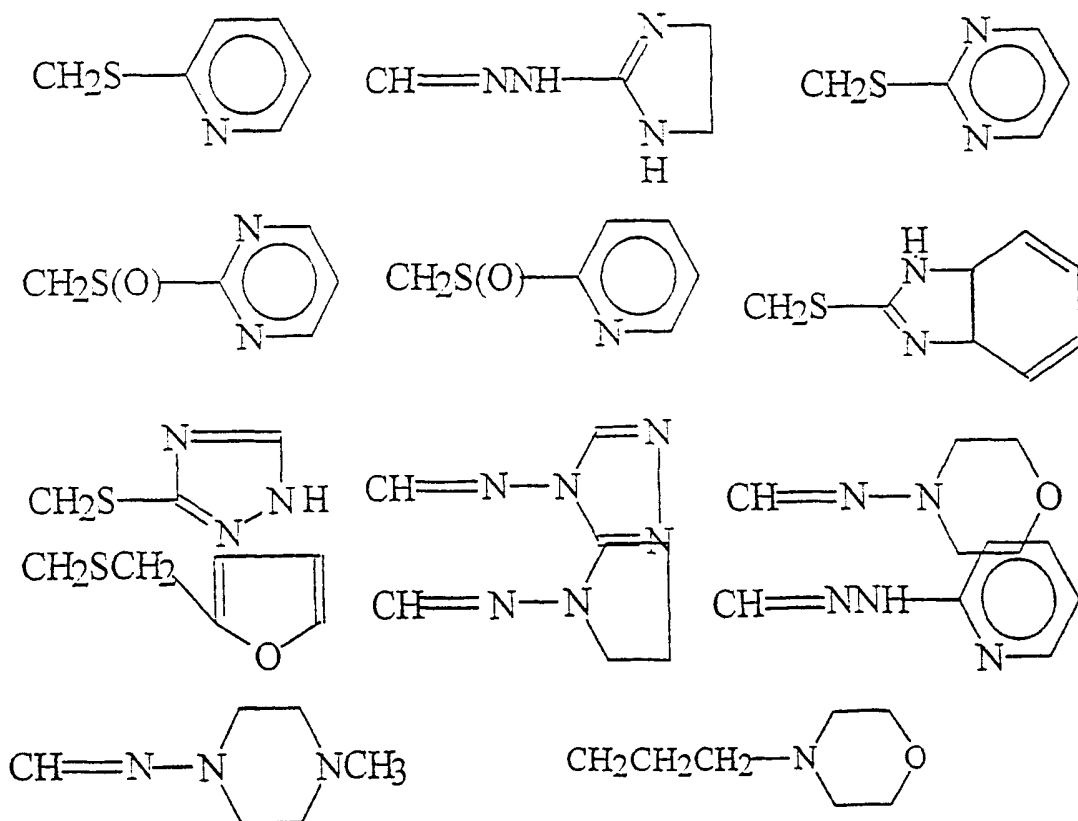


III

където:

Z_1 е водород и Z_2 е водород, или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=O$;

R_1 е избран от групата, състояща се от водород, хлор, $CH_2SO_2C_2H_5$, бром, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2n-C_4H_9$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, хидрокси, О-п-пропил, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4\text{-триазин})]$, $CH_2CH_2SCH_3$,



или



и R_4 е водород, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ или $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Описание на приложените фигури

С цел да се илюстрират аспектите на настоящото изобретение, са представени графики. Обаче, трябва да се разбере, че настоящото изобретение не се ограничава от дадените по-долу аспекти.

На Фигура 1 е представена схема, показваща общ метод за получаване на мостови инденопиролокарбазоли.

На Фигура 2 е представена схема, показваща общ метод за получаване на мостови инденопиролокарбазоли.

На Фигура 3 е представена схема, показваща общ метод за получаване на свързани със смола инденопиролокарбазоли.

На Фигура 4 е представена схема, показваща общ метод за получаване на защитени разтворими инденопиролокарбазоли.

На Фигура 5 е представена схема, показваща метод за получаване на междинно съединение V.

На Фигура 6 е представена схема, показваща метод за получаване на мостови инденопиролокарбазоли по метод A.

На Фигура 7 е представена схема, показваща метод за получаване на мостови инденопиролокарбазоли по метод B.

На Фигура 8 е представена схема, показваща метод за получаване на заместени в пръстен B мостови инденопиролокарбазоли.

На Фигура 9 е представена схема, показваща метод за получаване на пръстен E на мостови инденопиролокарбазоли.

На Фигура 10 е показано графично изображение на два отделни експеримента, изобразяващи количеството на жизнеспособните невронално диференцирани PC-12 клетки, оставащи след 5 дни култивиране

в отсъствие на NGF. Резултатите са дадени като процент от NGF контрола за всяка група (векторен контрол в отсъствие на NGF, $n=12$; всички други групи, $n=3$). Разликата между контролния вектор и стабилните колонии от клетки, изразяваща доминантен негативен мутант на киназата с много на брой редове 3 (MLK3) в отсъствие на NGF, е статистически значима, както е определена чрез двустранен Т-тест ($p<0.05$).

На Фигура 11A е показано фосфорилирането на киназа-мъртви GST-SEK-1 посредством бакуловирус-изразен FLAG-MLK-3 (смес на киназа с цяла дължина и киназен домен) при прилагане на анализ базиран на радиоактивен гел.

На Фигура 11B е показан ^{32}P -маркиран фосфорилиран миелинов основен протеинов продукт, получен в резултат на взаимодействие на киназата, катализирано от бакуловирус-изразен FLAG-MLK-3 (смес на киназа с цяла дължина и киназен домен) или GST-SEK-3 киназен домен.

Фигура 12 представлява имунопетнист анализ, показващ фосфорилирането на киназа-мъртви GST-SEK-1 посредством бакуловирус-изразен FLAG-MLK-3 (смес на киназа с цяла дължина и киназен домен), открито посредством фосфо-специфично SEK-1 антитяло.

На Фигура 13 е показано фосфорилирането на миелинов основен протеин посредством бактериално-изразен GST-MLK-3 киназен домен при използване на (o) анализ за утаяване на трихлороцетна киселина или (i) фосфоцелулозен мембранен метод.

На Фигура 14 е показана сатурационната свързваща крива на $[^3\text{H}]$ K252a инкубиран с лизат на MLK-3 заразени с бакуловирус клетки на насекоми.

На Фигура 15A е показано количеството на ^{32}P -маркиран c-jun при реакция на имуноутаяване/киназа от клетки, свръхизразяващи MLK-3, MLK-2 или DLK и третиран или с 0.025% диметилсулфоксид (контрола) или 500 nM K-252a.

На Фигура 15B е показана графика, количествено показваща процентната активност оставаща в имуноутаяване/киназа реакциите от пробите, описани на Фигура 15A. Колоните представят средна стойност за двукратни проби, където е показана разликата от средното.

На Фигура 15C е показано количеството на ^{32}P -маркиран c-jun при реакция на имуноутаяване/киназа от клетки, свръхизразяващи HA-JNK1 самостоятелно или с MEKK1 при различни количества cDNA, както е показано, и третиран или с 0.025% диметилсулфоксид (контрола) или 500 nM Съединение III-3 (виж Таблица 3). Колоните представят средна стойност за двукратни проби, където е показана разликата от средното.

Фигура 16 показва, че Съединение III-3 спомага за невронално оцеляване в условия, зависими от концентрацията. Дисоциирани неврони се култивират от симпатетични ганглии (SG) (A), дорсални коренни ганглии (DRG) (B), ресничести ганглии (CG) (C) и мотоневрони (MN) (D), в присъствие или отсъствие на индикираните трофични фактори. Клетките се броят 48 часа след поставянето, както е описано в материали и методи. Данните представят средните стойности $\pm$ S.D. от трикратни и четирикратни определения. Показан е един от три експеримента.

На Фигура 17 са показани микроскопски снимки с фазов контраст на култури от E12 (DRG) (A,E), E9 симпатетични (B,F), E8 ресничести (C,G) и E5.5 мотоневрони (D,H) след 48 часа в култура (24 часа за ресничестите неврони) в присъствие на съответен неотрофичен фактор (20 ng/ml NGF за симпатетичните и сензорните неврони, 10 ng/ml CNTF за ресничестите неврони, 30 $\mu\text{g/ml}$ мускулен екстракт (MEX) за мотоневроните (A-D) или в присъствие на 1 μM от Съединение III-3 (E-H). Отклонение 200 μm .

На Фигура 18 е показана микроскопска снимка на дорсални коренни ганглии, присадени *in vitro*. Присадките от детски DRG (E9) се поставят на плочки с 96 гнезда в среда, съдържаща 0.05% BSA. След 2 часа се правят допълнения: (A) контрола диметилсулфоксид; (B) 20 ng/ml NGF; (C) 250 nM от

Съединение III-3. След 48 часа средата се отделя и присадките се фиксират с 4% параформалдехид във фосфатно буфериран салин.

На Фигура 19 е показан броя на детски лумбални мотоневрони, живяли върху E10 след дневно третиране (E5-9) със специфични дози от Съединение III-3. Представените данни са средна стойност $\pm$ S.D. за 5-6 животни за третирана група. Показаният експеримент се повтаря два пъти. Данните са от един представителен експеримент и представят една страна на колоната. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, Student *t* тест между Съединение III-3 и контролните групи с корекция на Bonferroni.

На Фигура 20 е показан броя на мотоневрони в ядра от гръбначен мозък на женски плъх *bulbocavernosus* (SNB), оцеляващ върху PN10 или PN60 след дневно третиране (PN1-5) със Съединение III-3 или контролна среда (5% Solutol™). Върху PN10 (A,B) или PN60 (B) плъховете се умъртвяват и областта от гръбначния мозък, съдържаща SNB се изрязва и се изследва хистологично; мотоневроните, оцветени с Cresylect violet след това се преброяват в серии на лумбалния 5-прешлен на гръбначния стълб, както е описано в Wingfield, *et al.*, *Steroids*, 1975, 26, 311-327. Експерименталните данни представляват средна стойност $\pm$ S.E.M. от 4-8 животни на третирана група.

На Фигура 21 е показана загубата на ChAT реактивоспособност след хипоглосална аксотомия във възрастен плъх след третиране със Съединение III-3. Микроскопските снимки на хипоглосалното ядро след разрязване на хипоглосалния нерв и третиране с (A) среда на разтвор (5% Solutol™) и (B) 200 μ g от Съединение III-3, прилагано на мястото на разрязването. (C) Броят на ChAT-реактивоспособните хипоглосални мотоневрони след третирането е описан в (A) и (B) по-горе. Резултатите са представени като процент на ChAT-реактивоспособните мотоневрони със 100% определен брой ChAT-реактивоспособни мотоневрони в контралатералните, хипоглосални ядра.

На Фигура 22 е показано инхибирането на MLK-3, демонстриращо *in vivo* ефикасност и блокиране на низходящия поток на фосфорилиране. На Фигура 22A е показано повишение на субстанция нигра тирозин хидроксилаза имунореактивни неврони след MPTP увреждане при системно администриране на Съединение III-3. На Фигура 22B е показан представителен имунопетнист анализ, показващ индуцирано от MPTP повишаване на нивата на фосфорилиран MKK4. На Фигура 22C са показани представителен имунопетнист анализ и ELISA, показващи понижаване на индуциран от MPTP фосфорилиран MKK4 в присъствие на Съединение III-3.

На Фигура 23 е показана индуциране на IL-2 в Jurkat клетки. На Фигура 23A е показан хода с времето на индукцията на IL-2. На Фигура 23B е показано инхибирането на индукцията на IL-2 посредством Съединение III-3. На Фигура 23C е показано инхибирането на индукцията на IL-2 посредством Съединение III-3 и Съединение I-4.

Описание на предпочитани аспекти на изобретението

Използваните по-горе и в цялото описание следващи термини, ако не е показано друго, имат следните значения:

Терминът "апоптоза" се отнася до специфична морфологична форма на клетъчна смърт, характеризираща се с преминаване на клетки или техни ядра в свързани с мембрани частици. На апоптозата може да се влияе, например, посредством лечение със съединения, индуциращи апоптоза, като етопозид, ставроспорин, туморен некрозен фактор- α , церамид и други, или различни условия, например рентгеново излъчване.

Терминът "клетъчна смърт" се отнася до умиране на клетки при апоптоза, некроза или по друг начин, известен на специалистите. Клетъчната смърт може да бъде характеризирана, например, чрез намаляване на общия брой клетки или понижаване на жизнеспособността

на клетките в сравнение с не-третираните контролни клетъчни популации. Съединенията, които "спомогат за умиране на клетки" предизвикват намаляване на общия брой клетки или понижаване на жизнеспособността на клетките в сравнение с контролните популации. Обратно, съединенията, които "спомогат за оживяване на клетки" предизвикват повишаване на общия брой клетки или на жизнеспособността на клетките, или забавят или намаляват скоростта на умиране на клетките.

Термините "селективно взаимодействие" или "специфично се свързва" описват съединения, които физично или химично директно взаимодействат с протеин на киназата с много на брой редове. Обратно, съединенията, които не "взаимодействат селективно" или не се "свързват специфично" могат да въздействат на низходящия или на възходящия протеинов поток на протеина на киназата с много на брой редове и така могат да въздействат на активността на протеините на киназата с много на брой редове, но не взаимодействат физично или химично директно с протеина на киназата с много на брой редове.

Терминът "променя" се отнася до повишаване или намаляване на активността на отделния протеин или негов субстрат.

Настоящото изобретение се отнася, отчасти, до методи за идентифициране на съединения, които променят активността на протеина на киназата с много на брой редове и спомогат или за оживяване на клетките или за умиране на клетките. Съединенията, които предизвикват повишена активност на протеина на киназата с много на брой редове могат да спомогат за умиране на клетките, докато съединенията, които предизвикват понижена активност на протеина на киназата с много на брой редове могат да спомогат за оживяване на клетките.

Протеинът на киназата с много на брой редове може да бъде някакъв протеин, идентифициран като принадлежащ към клас протеини на киназата с много на брой редове. Предпочита се, протеинът на киназата с много на

брой редове да се подбери от групата, състояща се от описаните по-горе киназа с много на брой редове 1 (MLK1), киназа с много на брой редове 2 (MLK2), киназа с много на брой редове 3 (MLK3) (SPRK, PTK1), киназа, създаваща леуцинов цип (LZK), киназа, създаваща двоен леуцинов цип (DLK) (ZPK, MUK) и киназа с много на брой редове 6 (MLK6). В предпочитаните аспекти на настоящото изобретение, методите идентифицират съединения, които директно взаимодействат или се свързват с протеина на киназата с много на брой редове, както е определено посредством анализите за свързване, анализите на киназата или други еквивалентни анализи.

За да се идентифицират съединения, които променят активността на протеина на киназата с много на брой редове и спомагат за оживяване на клетките или за умиране на клетките, клетка или клетки, съдържащи протеина на киназата с много на брой редове, се поставят в контакт с изпитваното съединение. Контактът се осъществява в известни на специалистите буфери или среди. Или пък, контактът може да се осъществи *in vivo*, когато на животно като, например, мишка или друго подходящо според специалистите в областта животно се администрира фармацевтичен състав, включващ изпитваното съединение и фармацевтично приемлива сол, носител или разрежител. Освен това, могат да се използват различен брой клетки и концентрации на изпитваните съединения. Определя се дали изпитваното съединение повишава или понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове. Освен това се определя дали изпитваното съединение спомага за оживяване на клетките или за умиране на клетките.

Клетките, които взаимодействат с изпитваните съединения могат да бъдат клетки от бозайник. Предпочитат се нервни клетки. Предпочита се, клетките да са включени в невродегенеративна болест. За целите на настоящото изобретение, термините "невродегенеративна болест",

“невродегенеративно нарушение” и “невродегенеративно състояние” са равностойни и се използват за описание на болест или нарушение, свързано с нервни клетки или с клетки, включени в нервната система, като например, болест на Alzheimer, мотоневронна болест, амиотрофна латерална склероза, болест на Parkinson, цереброваскуларна болест, исхемични състояния, AIDS деменция, епилепсия, болест на Huntington и увреждания на главния мозък или на гръбначния мозък вследствие сътресения или проникване.

Активността на протеина на киназата с много на брой редове може да бъде определена посредством редица техники. Например, активността на протеина на киназата с много на брой редове може да бъде определена чрез измерване на активността на субстрат на протеин на киназата с много на брой редове. Такива субстрати са известни и лесно различими от специалистите в областта. Предпочита се, субстратът да е член на киназно семейство на активиран с митоген протеин на киназа, или на семейство на активиран с митоген протеин на киназа, като протеинът е избран, но без да е ограничение, от групата, състояща се от завършваща с азот киназа 1 (JNK1), завършваща с азот киназа 2 (JNK2), завършваща с азот киназа 3 (JNK3), ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 и хомолога от бозайници AEX-3, както и основни субстрати на Ser/Thr протеинови кинази, като миелинов основен протеин (MBP). Реактивите и методите за измерване на активността на субстратите са също известни на специалистите в областта. Наличието на киназа с много на брой редове може да се определи и чрез измерване на количеството на протеин на киназата с много на брой редове или mRNA, кодираща протеина на киназата с много на брой редове. Реактивите, включващи антитела и олигонуклеотидни проби, както и методите за измерване на количеството на DNA или протеин, включващи Northern или Western петна, са също известни на специалистите в областта. Активността

на протеина на киназата с много на брой редове може да бъде определена и посредством *in vitro* анализ на киназа. *In vitro* анализът на киназа е също известен на специалистите в областта. На специалистите са известни и други техники за измерване на активността на протеина, които се покриват от настоящото изобретение. Следователно, специалистът може да определи дали изпитваното съединение променя, т.е. повишава или намалява, активността на протеина на киназата с много на брой редове.

Дали или не изпитваното съединение подпомага оживяването на клетките или умирането на клетките, може да бъде определено по редица начини. Предпочита се, подпомагането на оживяването на клетките или умирането на клетките се определя при използване на клетки, подложени на риск от смърт и сравняване на количеството клетки, които контактуват с изпитваното съединение и остават живи, с количеството клетки, които не контактуват с изпитваното съединение и остават живи. Предпочита се, клетките да бъдат първични ембрионални мотоневронни клетки, които предварително са програмирани да умрат. Първичните ембрионални мотоневронни клетки са описани в Maroney, *et al.*, *J. Neurosci.*, **1998**, *18*, 104-111, дадено за сравнение. Първичните ембрионални мотоневронни клетки ще умрат, ако не бъдат спасени от изпитваното съединение. Следователно, за изпитвано съединение, което спомага за оживяване на клетките, се наблюдава по-голям брой живи мотоневронни клетки в популацията на мотоневронни клетки, третирана с изпитваното съединение, в сравнение с броя мотоневронни клетки в популацията на мотоневронни клетки, която не е третирана с изпитваното съединение. Обратно, за изпитвано съединение, което спомага за умиране на клетките, се наблюдава по-малък брой живи мотоневронни клетки в популацията на мотоневронни клетки, третирана с изпитваното съединение, в сравнение с броя мотоневронни клетки в популацията на мотоневронни клетки, която не е третирана с изпитваното съединение.

В друг аспект на ~~настоящото изобретение~~ нормални клетки, или клетки от див тип, се превръщат в клетки, подложени на риск да умрат при свръхизразяване на протеина на киназата с много на брой редове, както е описано по-долу в Примерите, и след това взаимодействат с изпитваното съединение. Слетките, които свръхизразяват протеини на киназата с много на брой редове, могат да умрат, ако не бъдат спасени от изпитваното съединение. Свръхизразяването на протеини на киназата с много на брой редове може да се постигне при използване на вектори, способни да изразяват отделен протеин вътре в клетката. Изразяващите вектори са известни на специалистите в областта. Освен това, методите за получаване на тези вектори са също известни на специалистите в областта. Векторите на изразяване, които изразяват протеините на киназата с много на брой редове могат да бъдат получени по същия начин като този, описан в Примерите. По-голям брой живи клетки в популацията на свръхизразяващите се клетки, третирани с изпитваното съединение, в сравнение с броя на живите клетки в популацията на свръхизразяващите се клетки, които не са третирани с изпитваното съединение, е показателен за изпитвано съединение, което спомага за оживяване на клетките. Обратно, по-малък брой живи клетки в популацията на свръхизразяващите се клетки, третирани с изпитваното съединение, в сравнение с броя на живите клетки в популацията на свръхизразяващите се клетки, които не са третирани с изпитваното съединение, е показателен за изпитвано съединение, което спомага за умиране на клетките.

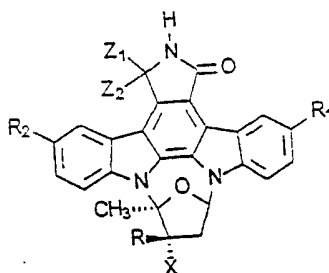
В друг аспект на настоящото изобретение, подпомагането на клетките да оживяват се определя чрез наблюдение или измерване на спада в апоптозата. С апоптозата са свързани цитоплазмено свиване и ядрена кондензация. Следователно, специалистите могат да измерват спада на апоптозата чрез наблюдение или измерване на цитоплазменото свиване и/или ядрената кондензация. Освен това, специалистите могат да измерват

апоптозата чрез прилагане на конвенционални, отговарящи техники.

В друг аспект на настоящото Изобретение, за идентифициране на съединения, които спомагат за умиране на клетки, могат да бъдат използвани нормални, нервни клетки от див тип. Нормалните нервни клетки ще оживеят, ако изпитваното съединение не ги кара да умрат. По-малък брой живи клетки в популацията на нормалните клетки, третирани с изпитваното съединение, в сравнение с броя на живите клетки в популацията на нормалните клетки, които не са третирани с изпитваното съединение, е показателен за изпитвано съединение, което спомага за умиране на клетките. Обратно, по-голям или равен брой живи клетки в популацията на нормалните клетки, третирани с изпитваното съединение, в сравнение с броя на живите клетки в популацията на нормалните клетки, които не са третирани с изпитваното съединение, е показателен за изпитвано съединение, което спомага за умиране на клетките.

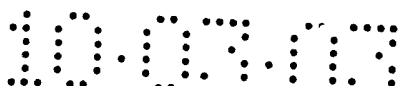
Настоящото изобретение се отнася, отчасти, и до методи за изменение на активността на протеин на киназа с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или на клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула G (означена като формула I в настоящото изобретение), представено в U.S. Patent No. 5,705,511, който е възложен на правоприемника на настоящата заявка и, който е даден за сравнение.

Настоящото изобретение се отнася, отчасти, и до методи за изменение на активността на протеин на киназа с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или на клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула III:



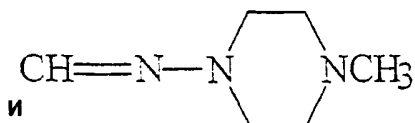
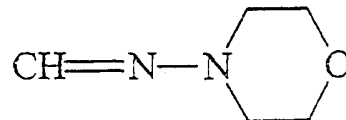
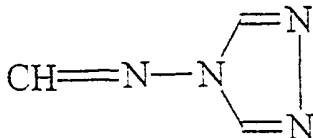
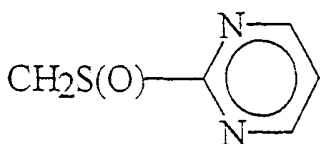
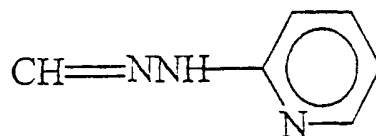
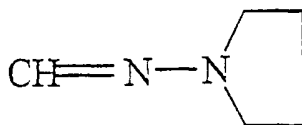
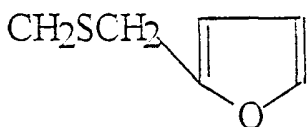
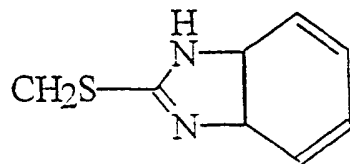
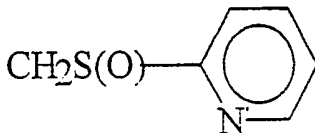
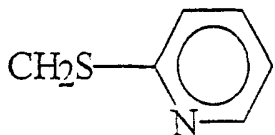
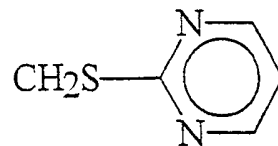
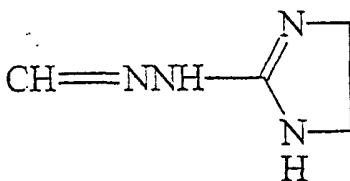
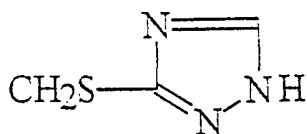
III

където:



Z_1 е водород и Z_2 е водород, или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=O$;

R_1 е избран от групата, състояща се от водород, хлор, $CH_2SO_2C_2H_5$, бром, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2n-C_4H_9$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, хидроксид, O - n -пропил, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4\text{-триазин})]$, $CH_2CH_2SCH_3$,

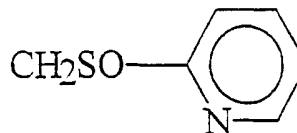
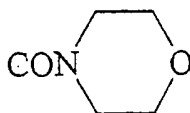
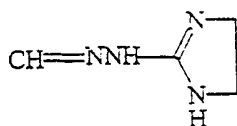


и

R_2 е избран от групата, състояща се от водород, бром, хлор, йод, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4\text{-триазин})]$, $CH_2CH_2SCH_3$ и CH_2OH ;

X е избран от групата, състояща се от водород, CH_2OH , CH_2NH -серин, CO_2CH_3 , $CONHC_6H_5$, $CH_2NHCO_2C_6H_5$, $CH_2NHCO_2CH_3$, CH_2N_3 , $CONHC_2H_5$, CH_2NH -глицин, $CON(CH_3)_2$, $-CH_2NHCO_2-$, $CONH_2$, $CONHC_3H_7$, CH_2NH -серин,

CH_2SOCH_3 , $\text{CH}=\text{N}\ddot{\text{O}}\text{H}$. CH_2NH -пролин, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-пиридил})$,
 $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{CH}=\text{NNHC}\ddot{\text{O}}\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$,
 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2\text{n-хексил}$, CONHCH_3 и
 $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, или една от следните формули

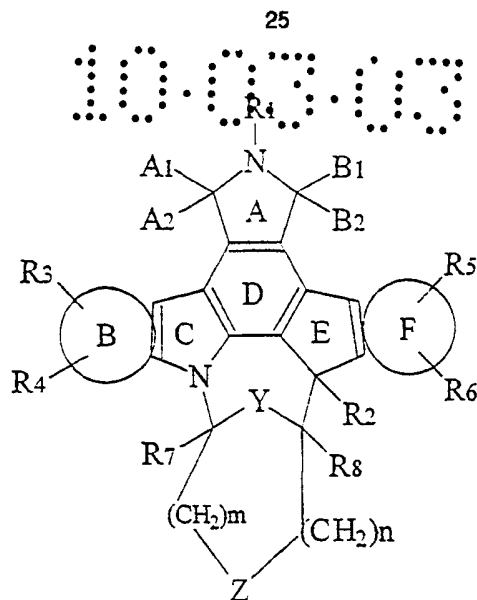


и

R е избран от групата, състояща се от хидроксид и OCH_3 .

В предпочитани аспекти на настоящото изобретение, Z_1 и Z_2 са водород, X е CO_2CH_3 , R_1 е $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, R_2 е $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-пиридил})$ и R е хидроксид. В други предпочитани аспекти на настоящото изобретение, Z_1 и Z_2 са водород, X е CO_2CH_3 , R_1 и R_2 са $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ и R е хидроксид; или Z_1 и Z_2 са водород, X е CO_2CH_3 , R_1 и R_2 са $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ и R е хидроксид; или Z_1 , Z_2 , R_1 и R_2 са водород, X е CO_2CH_3 и R е хидроксид; или Z_1 , Z_2 , R_1 и R_2 са водород, X е $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ и R е хидроксид; или Z_1 , Z_2 и R_1 са водород, R_2 е CH_2OH , X е CO_2CH_3 и R е хидроксид; или Z_1 и Z_2 са водород, R_1 и R_2 са $\text{H}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-триазин})]$, X е CO_2CH_3 и R е хидроксид; или Z_1 и Z_2 са водород, R_1 е бром, R_2 е йод, X е CO_2CH_3 и R е хидроксид; или Z_1 и Z_2 са водород, R_1 и R_2 са $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X е CO_2CH_3 и R е хидроксид; или Z_1 , Z_2 , R_1 и R_2 са водород, X е CO_2CH_3 и R е OCH_3 ; или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=\text{O}$, R_1 и R_2 са бром, X е CO_2CH_3 и R е хидроксид.

Настоящото изобретение се отнася, отчасти, и до методи за изменение на активността на протеин киназа с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или на клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула II:



където:

пръстен В и пръстен F, независимо един от друг, и всеки, заедно с въглеродните атоми, с които са свързани, се подбират от групата, състояща се от:

- а) ненаситен шестчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в който от 1 до 3 въглеродни атома могат да бъдат заместени с азотни атоми;
- б) ненаситен петчленен карбоцикличен ароматен пръстен; и
- в) ненаситен петчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в който,

или

1) един въглероден атом е заместен с кислороден, азотен или серен атом;

2) два въглеродни атома са заместени със серен и азотен атом, кислороден и азотен атом, или два азотни атома; или

3) три въглеродни атома са заместени с три азотни атома;

R^1 е избран от групата, състояща се от:

- а) водород, заместен или незаместен алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен арил, заместен или незаместен арилалкил, заместен или незаместен хетероарил, или заместен или незаместен хетероарилалкил;

б) $-C(=O)R^9$, където R^9 е избран от групата, състояща се от алкил, арил или хетероарил;

в) $-OR^{10}$, където R^{10} е избран от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома;

г) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ и $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, където p е от 1 до 4; и, където, или

1) R^{11} и R^{12} независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома; или

2) R^{11} и R^{12} заедно образуват свързваща група с формула $-(CH_2)_2X^1-(CH_2)_2$, където X^1 е избран от групата, състояща се от $-O-$, $-S-$ и $-CH_2-$;

R^2 е избран от групата, състояща се от водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, хидроксилна група, алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, заместен или незаместен арилалкил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или незаместен хетероарилалкил;

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от:

а) водород, арил, хетероарил, флуор, хлор, бром, йод, циано, CF_3 , нитро, хидрокси, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$;

б) $-CH_2OR^{14}$, където R^{14} е остатък от аминокиселина, след като хидроксилната група от карбоксилната група се отдели;

в) $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ или $-CH=NNR^2R^{2A}$, където R^{2A} е същия като R^2 ;

г) $-S(O)_yR^2$, $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$, където y е 0, 1 или 2;

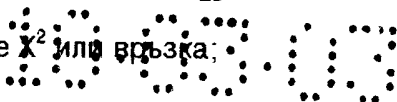
д) алкил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома, алкенил, притежаващ от 2 до 8 въглеродни атома и алкинил, притежаващ от 2 до 8 въглеродни атома, където

1) всеки алкил, алкенил или елкинил е незаместен; или

2) всеки алкил, алкенил или елкинил е заместен с от 1 до 3 групи, избрани от групата, състояща се от арил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома, хетероарил, арилалкокси, хетероциклоалкокси, хидроксиалкокси, алкилоксиалкокси, хидроксиалкилтио, алкоксиалкилтио, флуор, хлор, бром, йод, циано, нитро, хидрокси, $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pCO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)NR^9$, $-OCONHR^2$, $-O$ -тетрахиdropиранил, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}C(=O)R^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2OR^{10}$, $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ и монозахарид, притежаващ от 5 до 7 въглеродни атома, където всяка хидроксилна група на монозахарида, независимо една от друга, е или незаместена, или е заменена с водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, алкилкарбонилокси, притежаващ от 2 до 5 въглеродни атома или алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома;

X^2 е кислород, сяра или NR^{10} ;

R^7 и R^8 независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен арилалкил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или незаместен хетероарилалкил, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ и $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$; или R^7 и R^8 заедно образуват свързваща група с формула

$-\text{CH}_2-\text{X}^3-\text{CH}_2-$, където X^3 е X^2 или връзка; 

m и n, независимо един от друг, са 0, 1 или 2;

Y е избран от групата, състояща се от $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}(\text{OR}^{10})-$ и $-\text{CH}_2-$;

Z е избран от групата, състояща се от връзка, $-\text{O}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}(\text{OR}^{10})-$, $-\text{N}(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}(\text{OR}^{10})-$, $\text{CH}(\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{17})-$, $-\text{N}(\text{R}^{17})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9)-$, $-\text{N}(\text{S}(\text{O})_y\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$, $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{17})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})-$, $-\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{R}^{10})-$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$ и $-\text{CH}(\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{R}^9)\text{CH}(\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{9A})-$, където R^{9A} е същия като R^9 ;

R^{15} и R^{16} независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от водород, хидроксигрупа, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{10}$, $-\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{R}^9$, хидроксиалкил и $-\text{CO}_2\text{R}^{10}$;

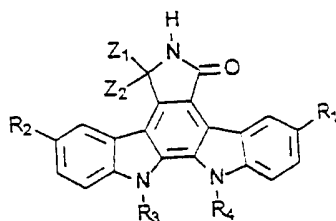
R^{17} е избран от групата, състояща се от водород, алкил, арил и хетероарил;

A^1 и A^2 са избрани от групата, състояща се от H , H ; H , OR^2 , H , $-\text{SR}^2$; H , $-\text{N}(\text{R}^2)_2$; и група, в която A^1 и A^2 заедно образуват част, избрана от групата, състояща се от $=\text{O}$, $=\text{S}$ и $=\text{NR}^2$;

B^1 и B^2 са избрани от групата, състояща се от H , H ; H , OR^2 , H , $-\text{SR}^2$; H , $-\text{N}(\text{R}^2)_2$; и група, в която B^1 и B^2 заедно образуват част, избрана от групата, състояща се от $=\text{O}$, $=\text{S}$ и $=\text{NR}^2$;

при условие, че поне една от двойките A^1 и A^2 или B^1 и B^2 образуват $=\text{O}$.

Настоящото изобретение се отнася, отчасти, и до методи за изменение на активността на протеин на киназа с много на брой редове, характеризиращи се с това, че включват контакт на протеин или на клетка, съдържаща протеин, със съединение с формула IV:



IV

където:



Z_1 е водород и Z_2 е водород, или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=O$;

R_1 е водород или бром;

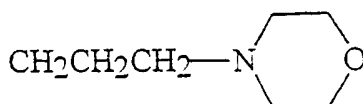
R_2 е водород;

R_3 е водород, $CH_2CH=CH_2$, $CH_2CH_2CH_2OH$, $CH_2CH_2CH_2-N$

или

и R_4 е водород, $CH_2CH=CH_2$ или $CH_2CH_2CH_2OH$.

В предпочитани аспекти на настоящото изобретение, R_1 , R_2 , R_4 , Z_1 и Z_2 са водород и R_3 е $CH_2CH=CH_2$. В други предпочитани аспекти на настоящото изобретение, R_1 е бром и R_2 , R_3 , R_4 , Z_1 и Z_2 са водород; или R_1 , R_2 , Z_1 и Z_2 са водород и R_3 и R_4 са $CH_2CH=CH_2$; или R_1 , R_2 , R_3 , Z_1 и Z_2 са водород и R_4 е $CH_2CH=CH_2$; или R_1 , R_2 , Z_1 и Z_2 са водород и R_3 и R_4 са $CH_2CH_2CH_2OH$; или R_1 , R_2 , R_4 , Z_1 и Z_2 са водород и R_3 е



Настоящото изобретение се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на невродегенеративни нарушения, характеризиращи се с това, че включват контакт на клетка или клетъчен екстракт, съдържащ протеин на киназа с много на брой редове, със съединение и определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове. Клетките и екстрактите, получени от тях, включват описаните по-горе. Съединенията, съгласно методите, съгласно настоящото изобретение, (т.е. тези съединения, които инхибират или понижават активността на протеина на киназата с много на брой редове) могат да бъдат ефикасни при лечение на невродегенеративни нарушения. Предпочита се, протеинът да бъде избран от групата, състояща се от киназа с много на брой редове 1 (MLK1), киназа с много на брой редове 2 (MLK2), киназа с много на брой редове 3 (MLK3), киназа, създаваща леуцинов цип (LZK), киназа, създаваща двоен

леуцинов цип (DLK) и киназа с много на брой редове (MLK6). Клетката контактува *in vivo* или *in vitro*. Предпочита се, активността на протеина да се определя чрез измерване на активността на фосфорилираното състояние на субстрата на споменатия протеин. Предпочита се, субстратът да бъде избран от групата, състояща се от завършваща с азот киназа 1 (JNK1), завършваща с азот киназа 2 (JNK2), завършваща с азот киназа 3 (JNK3), ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 и хомолога от бозайници AEX-3, както и основни субстрати на Ser/Thr протеинови кинази, като например, миелинов основен протеин (MBP). Активността на протеина може, също така, да бъде определена чрез измерване на активността на субстрата на протеина, количеството на субстрата на протеина, или mRNA, кодираща субстрата на протеина. Активността на протеина може, също така, да бъде определена чрез *in vitro* анализ на киназата или свързващ анализ. Предпочита се, клетките да бъдат първични ембрионални мотоневронни клетки, клетки със свръхпроявление на протеина на киназата с много на брой редове, или нервни клетки, но могат да бъдат каквито и да са клетки или техни екстракти. Предпочита се, съединенията, които директно се свързват с протеина на киназата с много на брой редове, да бъдат идентифицирани, както е показано по-горе.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за идентифициране на съединения, които могат да бъдат ефикасни при лечение на възпаление, характеризиращи се с това, че включват контакт на клетка или клетъчен екстракт, съдържащ протеин на киназа с много на брой редове, със съединение и определяне дали съединението понижава активността на протеина на киназата с много на брой редове. Клетките и екстрактите, получени от тях, включват описаните по-горе. Съединенията, съгласно методите, съгласно настоящото изобретение, (т.е. тези съединения, които инхибират или понижават активността на протеина на киназата с много на

брой редове) могат да бъдат ефикасни при лечение на възпаление. Предпочита се, протеинът да бъде избран от групата, състояща се от киназа с много на брой редове 1 (MLK1), киназа с много на брой редове 2 (MLK2), киназа с много на брой редове 3 (MLK3), киназа, създаваща леуцинов цип (LZK), киназа, създаваща двоен леуцинов цип (DLK) и киназа с много на брой редове 6 (MLK6). Клетката контактува *in vivo* или *in vitro*. Предпочита се, активността на протеина да се определя чрез измерване на активността на фосфорилираното състояние на субстрата на споменатия протеин. Предпочита се, субстратът да бъде избран от групата, състояща се от завършваща с азот киназа 1 (JNK1), завършваща с азот киназа 2 (JNK2), завършваща с азот киназа 3 (JNK3), ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 и хомолога от бозайници AEX-3, както и основни субстрати на Ser/Thr протеинови кинази, като например, миелинов основен протеин (MBP). Активността на протеина може, също така, да бъде определена чрез измерване на активността на субстрата на протеина, количеството на субстрата на протеина, или mRNA, кодираща субстрата на протеина. Активността на протеина може, също така, да бъде определена чрез *in vitro* анализ на киназата или свързващ анализ.

Предпочита се, клетките да бъдат първични ембрионални мотоневронни клетки, клетки със свръхпроявление на протеина на киназата с много на брой редове, или нервни клетки, но могат да бъдат каквито и да са клетки или техни екстракти. Клетките включват, също така, но без да е ограничение, такива, които са въввлечени във възпалението, като например, известни на специалистите лимфоцити, макрофаги и други бели кръвни клетки. Предпочита се, съединенията, които директно се свързват с протеина на киназата с много на брой редове, да бъдат идентифицирани.

Настоящото изобретение се отнася и до методи за лечение на бозайник, притежаващ или подозиран, че притежава невродегенеративно

нарушение, характеризиращи се с това, че включват администриране върху бозайника на съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназа с много на брой редове. Съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназа с много на брой редове, включва, но без да е ограничение, съединения с формули I, II, III и IV. Предпочитаните съединения включват описаните по-горе съединения по отношение на метода за изследване на съединенията, които изменят активността на протеина на киназа с много на брой редове и спомагат или за оживяване на клетките или за умиране на клетките. Предпочитаният бозайник е човек. Индивидът може да бъде подозиран, че притежава невродегенеративно нарушение, ако индивидът има симптоми на отделна невродегенеративна болест, попада във високорискова група, или е фамилно обременен с невродегенеративна болест.

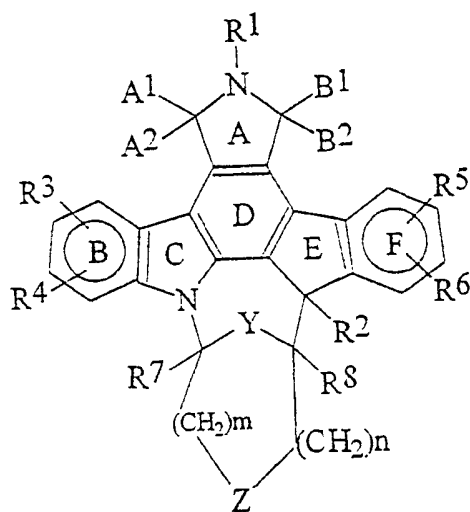
Настоящото изобретение се отнася и до методи за лечение на бозайник, притежаващ възпаление, характеризиращи се с това, че включват администриране върху споменатия бозайник на съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназа с много на брой редове. Съединение, което инхибира или понижава активността на протеина на киназа с много на брой редове, включва, но без да е ограничение, съединения с формули I, II, III и IV. Предпочитаните съединения включват описаните по-горе съединения по отношение на метода за изследване на съединенията, които изменят активността на протеина на киназа с много на брой редове и спомагат или за оживяване на клетките или за умиране на клетките. Предпочитаният бозайник е човек.

Контактът със съединенията с формули от I до IV може да се осъществява в известни на специалистите буфери или среди. Или пък, контактът може да се осъществи чрез администриране на фармацевтичен състав, включващ изпитваното съединение и фармацевтично приемлива сол, носител или разредител върху подходящо животно или бозайник, като

например, мишка или друго, известно на специалистите, подходящо животно. Освен това, могат да се използват различен брой клетки и концентрации на изпитваните съединения. Клетките, които взаимодействат с изпитваните съединения могат да бъдат клетки от бозайник. Предпочитат се нервни клетки. Предпочита се, клетките да са включени в невродегенеративна болест, като болест на Alzheimer, мотоневронна болест, амиотрофна латерална склероза, болест на Parkinson, цереброваскуларна болест, исхемични състояния, AIDS деменция, епилепсия, болест на Huntington и увреждания на главния мозък или на гръбначния мозък вследствие сътресения или проникване. Съединенията с формула I и методите за получаването им са описани в U.S. Patent 5,705,511, даден за сравнение. Съединенията с формула III и методите за получаването им са описани в U.S. Patent 5,741,8098; 5,621,100; 5,621,101; 5,461,146 и 5,756,494 и WO 97/46567, дадени за сравнение. Съединенията с формула IV и методите за получаването им са описани в U.S. Patent 5,741,8098; 5,621,100; 5,621,101; 5,461,146 и 5,756,494 и WO 97/46567, дадени за сравнение.

Съединенията с формула II включват диастереомери и енантиомери около въглеродните атоми, с които са свързани заместителите R^2 , R^7 и R^8 .

Предпочитаните мостови инденопиролокарбазоли са представени с формула II:



II

В някои предпочитани аспекти на съединенията с формула II, R^1 е водород. В други предпочитани аспекти, R^2 е водород, хидроксил или незаместен алкил.

В други предпочитани аспекти, R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо един от друг са водород, заместен или незаместен алкил, халоген, заместен или незаместен алкокси, заместен или незаместен amino или заместен или незаместен арил. В други предпочитани аспекти, R^7 и R^8 независимо един от друг са водород, или заместен или незаместен алкил.

В някои предпочитани аспекти, Y е кислород. В други предпочитани аспекти, Z е връзка, кислород, сяра или заместен или незаместен азот. В други предпочитани аспекти, m и n, независимо един от друг, са 1 или 2. В някои особено предпочитани аспекти, Y е кислород, Z е връзка или кислород и m и n, независимо един от друг, са 1 или 2.

В други предпочитани аспекти, A^1A^2 и B^1B^2 са =O или H,H.

В някои особено предпочитани аспекти, всеки от R^1 , R^4 , R^6 и R^7 е водород, Y е =O, n е 1, A^1A^2 и B^1B^2 са =O или H,H, R^2 е водород, хидрокси или нисш алкил, R^3 е водород или заместен алкил, всеки от R^5 и R^6 е водород или алкокси, като се предпочита метокси, Z е връзка или кислород и m е 1 или 2.

Някои особено предпочитани разновидности на съединенията с формула II са съединенията 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 и II-12, показани в Таблица 1, *infra*.

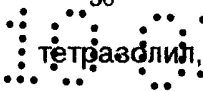
Съединенията, представени с формула II, в настоящото изобретение се наричат Съединение (II).

Използваният в настоящото изобретение термин “карбоцикличен” се отнася до циклични групи, в които пръстенната част е изградена само от въглеродни атоми. Термините “хетероцикло” и “хетероцикличен” се отнасят до циклични групи, в които пръстенната част включва поне един хетероатом, като кислород, азот или сяра.

Използваният в настоящото изобретение термин "алкил" означава правоверижна, циклична или разклонена алкилова група, притежаваща от 1 до 8 въглеродни атома, като метил, етил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, sec-бутил, tert-бутил, пентил, изоамил, неопентил, 1-етилпропил, хексил, октил, циклопропил и циклопентил. Алкиловата част на алкилсъдържащите групи, като алкокси, алкоксикарбонилови и алкиламинокарбонилови групи, има същото значение като дефинирания по-горе алкил. Нисшите алкилови групи, които се предпочитат, са алкилови групи, както са дефинирани по-горе, които съдържат от 1 до 4 въглеродни атоми. Използваният в настоящото изобретение термин "алкенил" включва правоверижни или разклонени въглеводородни вериги, притежаващи поне една въглерод-въглеродна двойна връзка. Примерите за алкенилови групи включват етенилови и пропенилови групи. Използваният в настоящото изобретение термин "алкинил" включва правоверижни или разклонени въглеводородни вериги, притежаващи поне една въглерод-въглеродна тройна връзка. Примерите за алкинилови групи включват етинилови и пропилинови групи.

Ациловата част на ацилсъдържащите групи, като ацилоксигрупи, включва правоверижна или разклонена алканоилова група, притежаваща от 1 до 6 въглеродни атома, като формил, ацетил, пропаноил, бутирил, валерил, пивалоил или хексаноил.

Използваният в настоящото изобретение термин "арил" включва алканоилова група, притежаваща от 6 до 12 въглеродни атома, като фенил, бифенил и нафтил. Предпочитаните арилови групи включват незаместени или заместени фенилови и нафтилови групи. Използваният в настоящото изобретение термин "хетероарил" означава арилова група, в която един или повече пръстенни въглеродни атоми са заменени с хетеро (т.е. различен от въглерод) атом, като кислород, азот или сяра. Предпочитаните хетероарилови групи включват пиридил, пиримидил, пиролил, фурил, тиенил,

имидазолил, триазолил, ³⁶  тетразолил,  хинолил, изохинолил, бензоимидазолил, тиазолил, пиразолил и бензотиазолил.

Използваният в настоящото изобретение термин “аралкил” (или “арилалкил”) означава група, притежаваща от 7 до 15 въглеродни атома, състояща се от алкилова група, от която се създава арилова група. Примерите за аралкилови групи включват бензил, фенетил, бензхидрил и нафтилметил.

Алкиловите групи и алкиловите части, съдържащи се в заместителните групи, като аралкил, алкокси, арилалкокси, хидроксиалкокси, алкоксиалкокси, хидроксиалкилтио, алкоксиалкилтио, алкилкарбонилкокси, хидроксиалкил и ацилокси, могат да бъдат заместени или незаместени. Заместената алкилова група притежава от 1 до 3 независимо избрани заместителя, за предпочитане, хидрокси, нисш алкокси, нисш алкоксиалкокси, заместен или незаместен арилалкокси-нисш алкокси, заместен или незаместен хетероарилалкокси-нисш алкокси, заместен или незаместен арилалкокси, заместен или незаместен хетероциклоалкокси, халоген, карбоксил, нисш алкоксикарбонил, нитро, amino, моно- или ди-нисш алкиламино, диоксолан, диоксан, дитиолан, дитион, фуран, лактон или лактам.

Всеки заместен арил, заместен хетероарил и заместен аралкил притежава от 1 до 3 независимо избрани заместителя, за предпочитане, нисш алкил, хидрокси, нисш алкокси, карбокси, нисш алкоксикарбонил, нитро, amino, моно- или ди-нисш алкиламино и халоген.

Хетероцикличните групи, формирани с азотен атом, включват пиролидинил, пиперидинил, пиперидино, морфолинил, морфолино, тиоморфолино, N-метилпиперазинил, индолил, изоиндолил, имидазол, имидазолин, оксазолин, оксазол, триазол, тиазолин, тиазол, пиразол, пиразолон и триазол. Хетероцикличните групи, формирани с кислороден атом, включват фуран, тетраhydroфуран, пиран и тетраhydroпиран.

“Хидроксикарбонилните” групи представляват алкилови групи, към които е закачена хидроксилна група.

Халогените включват флуор, хлор, бром и йод.

Използваният в настоящото изобретение термин “хетероаралкил” означава арилалкилова група, която съдържа хетероатом. Терминът “окси” означава наличие на кислороден атом. Следователно, “алкокси” групите са алкилови групи, които са закачени през азотен атом, а “карбонилокси” групите са карбонилови групи, които са закачени през азотен атом.

Терминът “хетероциклоалкокси” означава алкоксигрупа, която притежава хетероциклогрупа, закачена към нейната алкилова част, а терминът “арилалкокси” означава алкоксигрупа, която притежава арилова група, закачена към нейната алкилова част. Терминът “алкилкарбонилокси” означава група с формула $-O-C(=O)-$ алкил.

Използваният в настоящото изобретение термин “алкилоксиалкокси” означава алкоксигрупа, която съдържа алкилокси заместител, закачен към нейната алкилова част. Терминът “алкоксиалкилтио” означава алкилтиогрупа (т.е. група с формула $-S-$ алкил), която съдържа алкокси заместител, закачен към нейната алкилова част. Терминът “хидроксикарбонилтио” означава алкилтиогрупа (т.е. група с формула $-S-$ алкил), която съдържа хидрокси заместител, закачен към нейната алкилова част.

Използваният в настоящото изобретение термин “монозахарид” има значение на обикновена захар.

Използваният в настоящото изобретение термин “аминокиселина” означава молекула, съдържаща както аминогрупа, така и карбоксилна група. Разновидностите на аминокиселините включват α -аминокиселини; т.е. карбонови киселини с обща формула $HOOC-CH(NH_2)-$ (странична верига).

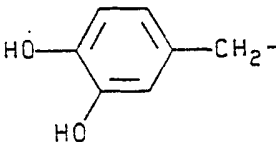
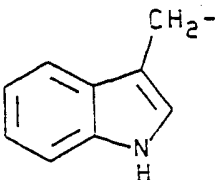
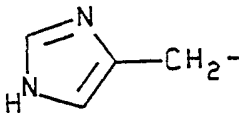
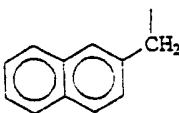
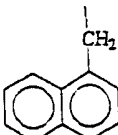
Страничните вериги на аминокиселините включват природни и неприродни части. Неприродните аминокиселинни странични вериги са части, които се използват вместо природните аминокиселинни странични

вериги, например, аминокиселини, аналози. Виж, например, Lehninger, *Biochemistry*, Second Edition, Worth Publishers, Inc., 1975, p. 73-75, даден за сравнение.

Предпочитаните α -аминокиселини включват глицин, аланин, пролин, глутаминова киселина и лизин, притежаващи D конфигурация, L конфигурация или като рацемат.

Страничните вериги на примерни α -аминокиселини са представени в Таблица 1 по-долу.

Таблица 1

CH ₃ -	HS-CH ₂ -
HO-CH ₂ -	HO ₂ C-CH(NH ₂)-CH ₂ -S-S-CH ₂ -
C ₆ H ₅ -CH ₂ -	CH ₃ -CH ₂ -
HO-C ₆ H ₄ -CH ₂ -	CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -
	CH ₃ -CH ₂ -S-CH ₂ -CH ₂ -
	HO-CH ₂ -CH ₂ -
	CH ₃ -CH(OH)-
	HO ₂ C-CH ₂ -NHC(=O)-CH ₂ -
	
	HO ₂ C-CH ₂ -CH ₂ -
	NH ₂ C(=O)-CH ₂ -CH ₂ -
	(CH ₃) ₂ -CH-
	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -
	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -
	H ₂ N-C(=NH)-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -
	H ₂ N-C(=O)-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -
	CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-
	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -
	H ₂ N-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -

В някои предпочитани аспекти, заместителните групи за съединенията с формула II включват остатъци от аминокиселини, получени след отделяне на хидроксилната част от карбоксилната група, т.е. групи с формула $-C(=O)-CH(NH_2)-$ (странична верига).

Функционалните групи, присъстващи в съединенията с формула II, могат да съдържат защитаващи групи. Например, аминокиселинните страничноверижни заместители на съединенията с формула II могат да бъдат заместени със защитаващи групи, като бензилоксикарбонилови или t-бутоксикарбонилови групи. Защитаващите групи са известни като химични функционални групи, които могат селективно да бъдат добавени и отстранени от функционалности, като хидроксилни групи и карбоксилни групи. Тези групи присъстват в химичното съединение за да може функционалността да остане инертна спрямо условията на химично взаимодействие, на които е подложено съединението. Някои защитаващи групи могат да бъдат прилагани, съгласно настоящото изобретение. Една такава защитаваща група е бензилоксикарбониловата (Cbz; Z) група. Други предпочитани защитаващи групи, съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат намерени в Greene, T.W., Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" 2nd Ed., Wiley&Sons, 1991.

Мостовите инденопиролокарбазолови съединения притежават доказана важна функционална фармакологична активност, която намира приложение в редица области, включващи както изследователска, така и терапевтична област. Тези производни са ефикасни като терапевтични средства. Активността на съединенията показва положителни ефекти върху функциите и/или оцеляването на клетките, отговорни за трофичния фактор. Ефектът върху функциите и/или оцеляването на клетките, отговорни за трофичния фактор, например, нервни клетки, е определен посредством някой от следващите анализи: (1) анализ на холин ацетилтрансфераза ("ChAT") от култивиран гръбначен мозък; или (2) анализ за активността на

холин ацетилтрансфераза (ChAT) от култивиран основен неврон на преден мозък.

Използваният в настоящото изобретение термин “ефект”, когато се използва за изменение на термините “функция” и “оживяване”, означава положително или отрицателно изменение или промяна. Ефект, който е положителен, може в настоящото изобретение да означава “подобрене” или “подобряващ”, а ефект, който е отрицателен, може в настоящото изобретение да означава “инхибиране” или “инхибиращ”.

Използваните в настоящото изобретение термини “подобрява” или “подобряващ”, когато се използват за изменение на термините “функция” и “оживяване”, означават, че присъствието на мостово инденопирокарбазолово съединение има положителен ефект върху функцията и/или оцеляването на клетка, отговорна за трофичния фактор, в сравнение с клетка в отсъствие на съединението. Например, но без да се счита за ограничение, по отношение на оцеляване на, например, холинергичен неврон, съединението би доказало подобрене на оцеляването на холинергичната невронална популация с риск за смърт (който се дължи на нараняване, болестно състояние, холинергична невронална популация в отсъствие на такова съединение, ако третираната популация притежава сравнително по-голям период на функционалност от нетретираната популация).

Използваните в настоящото изобретение термини “инхибира” и “инхибиране” означават, че специфичната реакция на означения материал (например, ензимна активност) е сравнително понижена в присъствие на мостово инденопирокарбазолово съединение.

Използваният в настоящото изобретение термин “*trk*” се отнася до семейството на неотрофинови рецептори с голям афинитет, включващи *trkA*, *trkB* и *trkC*, и други мембранно свързани протеини, към които може да се закачи неотрофин.

Съгласно настоящото изобретение, инхибирането на VEGFR намира приложение при, например, болести, в които ангиогенезата играе важна роля, като рак на твърди тумори, ендометриоза, диабетична ретинопатия, псориазис, хемангиобластома, както и други очни болести и ракови заболявания.

Инхибирането на *trk* намира приложение при, например, болести на простатната жлеза, като рак на простатната жлеза и доброкачествена простатна хиперплазия, и при облекчаване на болка от възпаление.

Инхибирането на Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) намира приложение при, например, различни форми на неоплазия, ревматоиден артрит, пулмонарна фиброза, миелофиброза, абнормално заздравяване на рани, болести с кардиоваскуларен край, като атеросклероза, рестеноза, постангиопластична рестеноза и т.н.

Съгласно настоящото изобретение, термините “рак” и “раков” се отнасят до злокачествена пролиферация на клетки при бозайници. Примерите включват рак на простатната жлеза, доброкачествена простатна хиперплазия, рак на яйчника, на гърдата, на мозъка, на белия дроб, на панкреаса, на дебелото черво, на червата, на стомаха, твърди тумори, рак на главата и врата, невробластома, карцинома на ренални клетки, лимфома, левкемия, други различни злокачествени образувания на хематопоеитичната система и други ракови заболявания.

Съгласно настоящото изобретение, термините “неврон”, “клетка с невронален ред” и “нервна клетка” включват, но без да се счита за ограничение, хетерогенна популация на нервни видове, притежаващи единични или множество трансмитери и/или единични или множество функции; за предпочитане, холинергични и сензорни неврони. Съгласно настоящото изобретение, фразата “холинергичен неврон” означава неврони на централната нервна система (CNS) и на периферната нервна система (PNS), чиито невротрансмитер е ацетилхолин; примери са основни неврони

на преден мозък, набраздени неврони и неврони на гръбначния мозък. Съгласно настоящото изобретение, фразата “холинергичен неврон” означава неврони, отговорни за околната среда (например, температура, движение) от, например, кожата, мускулите и ставите; например неврон от дорсален коренен ганглий.

Съгласно настоящото изобретение, терминът “клетка, отговорна за трофичен фактор” означава клетка, която включва рецептор, към който специфично може да се свърже трофичен фактор; примерите включват неврони (например, холинергични и сензорни неврони) и клетки, различни от нервните клетки (например, моноцити и неопластични клетки).

Описаните в настоящото изобретение мостови инденопиролокарбазолови съединения намират приложение, както в изследователска, така и в терапевтична област за, например, инхибиране на ензимна активност. Например, в научните среди, съединенията могат да бъдат използвани в разработване на анализи и модели за по-нататъшно подобрене на разбирането за ролята, която играе инхибирането на серин/треонин или тирозин протеин киназата (например, PKC, *trk* тирозин киназа) в аспектите на свързаните нарушения и болести. В терапевтично отношение, съединенията, които инхибират тази ензимна активност, могат да се използват за инхибиране на вредните последствия на тези ензими, по отношение на болести, като рак.

Както показват дадените по-долу примери, инхибирането на ензимната активност при използване на мостови инденопиролокарбазолови съединения може да бъде определено при използване, например, на следните анализи:

1. Анализ за инхибиране на активността на *trkA* тирозинкиназата;
2. Инхибиране на NGF-стимулираното *trk* фосфорилиране в цялата клетка;

3. Анализ за инхибиране на Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) киназата;

4. Анализ за инхибиране на активността на PKC;

5. Анализ за инхибиране на PDGFR.

Описаните мостови инденопиролокарбазолови съединения могат да бъдат използвани за повишаване на функцията и/или оживяването на клетките с невронален ред при бозайници, например, човек. В този контекст, съединенията могат да бъдат използвани самостоятелно или с други кондензирани пиролокарбазоли и/или индолокарбазоли, или в комбинация с други ефикасни молекули, които са доказали способността си за въздействие на функцията и/или оживяването на посочените клетки.

Редица неврологични заболявания се характеризират с нервни клетки, които умират, увреждат се, изменят функциите си, претърпяват аксонална дегенерация, рискови са за смърт, и т.н. Тези нарушения включват, но без да е ограничение, болест на Alzheimer, мотоневронна болести (например, амиотрофна латерална склероза), болест на Parkinson, цереброваскуларна болест (например, удар, исхемия), болест на Huntington, AIDS деменция, епилепсия, множествена склероза; периферна невропатия (например, такива, действащи на DGR невроните в периферна невропатия, свързана с химиотерапия), включваща диабетична невропатия и AIDS периферна невропатия; нарушения, предизвикани от стимулиращи аминокиселини; и нарушения, свързани с увреждания на главния мозък или на гръбначния мозък вследствие сътресения или проникване.

ChAT катализира синтеза на невротрансмитера ацетилхолин и той се счита за ензимен маркер за функционален холинергичен неврон. Функционалният неврон е, също така, способен да оцелява. Оцеляването на неврона се анализира чрез количествено определяне на специфична проба и ензимно превръщане на багрило (например, калцеин AM) от живи неврони.

Поради разнообразието им приложение, описаните в настоящото изобретение съединения, включващи тези съединения, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи, намират приложение за разнообразни цели. Съединенията могат да бъдат използвани в разработване на *in vitro* модели на оцеляване, функциониране, идентифициране на нервни клетки или за изпитване на други синтетични съединения, които действат по същия начин, както описаните в настоящото изобретение съединения, или съединения, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи. Описаните в настоящото изобретение съединения, както и тези, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи, могат да бъдат използвани за научни цели за изследване, дефиниране и определяне на молекулните мишени, свързани с функционални реакции. Например, мястото, с което се свързва производното, може да бъде идентифицирано, изолирано и пречистено за охарактеризиране, посредством радиционно маркиране на мостово инденопиролокарбазолово съединение, или съединение, идентифицирано по описаните в настоящото изобретение методи, свързано със специално клетъчно функциониране (например, митогенеза).

Съединенията, описани в настоящото изобретение, както и тези, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи са ефикасни, освен другото, не само за подобряване на активността на трофично отговорните клетки, индуцирана от трофичния фактор, например, холинергични неврони, но могат и да функционират като средства, спомагащи за оцеляването на други видове нервни клетки, например, допаминергични или глутаматергични. Растежният фактор може да регулира оцеляването на невроните посредством сигнализиращи каскади на късите GTP свързващи протеини, които включват, но без да е ограничение, *ras*, *rac* и *cdc42* (Denhardt, *Biochem. J.*, **1996**, 318, 729). Специфично, активирането на *ras* води до фосфорилиране и активиране на извънклетъчно рецепторно

активирана киназа (ERK), която е свързана с биологичния растеж и процесите на диференциация. Стимулирането на *rac/cdc42* води до повишаване на активността на завършваща с азот киназа (JNK) и p38, отговори, които са свързани със стрес, апоптоза и възпаление. Въпреки че отговорите на растежния фактор са главно през ERK пътя, въздействието върху последните процеси може да доведе до алтернативни механизми на невронно оцеляване, което може да имитира растежния фактор, подобряващ свойствата на оцеляване (Xia et al., Science, 1995, 270, 1326). Съединенията могат да функционират, също така, като средства, спомагащи оцеляването на нервни и други клетки по механизми, свързани с, но и разграничаващи се от, регулирано от растежния фактор оцеляване, например, инхибиране на пътищата на завършващата с азот киназа (JNK) и p38, което може да доведе до оцеляване посредством инхибиране на процеса на апоптозно клетъчно умиране.

Съединенията, съгласно настоящото изобретение са ефикасни при лечение на нарушения, свързани с понижена ChAT активност или смърт, увреждане на мотоневроните на гръбначния мозък, а също намират приложение и при, например, болести, свързани с апоптозно умиране на клетки на централната и периферната нервна система, имунната система и възпалителни болести.

Описаните в настоящото изобретение съединения могат да намерят приложение и при лечение на болестни състояния, включващи злокачествена клетъчна пролиферация, като ракови заболявания.

Фармацевтично приемливите соли на съединенията, описани в настоящото изобретение, както и тези съединения, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи, включват фармацевтично приемливи киселинни присъединителни соли, метални соли, амониеви соли, органични аминни присъединителни соли и аминокиселинни присъединителни соли. Примери за киселинни присъединителни соли са

неорганични киселинни присъединителни соли, като хидрохлорид, сулфат и фосфат, и органични киселинни присъединителни соли, като ацетат, малеат, фумарат, тартарат, цитрат и лактат; примери за метални соли са соли на алкални метали, като литиева сол, натриева сол и калиева сол, соли на алкалоземни метали, като магнезиева сол и калциева сол, алуминиева сол и цинкова сол; примери за амониеви соли са амониева сол и тетраметиламониева сол; примери за органични аминни присъединителни соли са соли с морфолин и пиперидин; и примери за аминокиселинни присъединителни соли са соли с глицин, фенилаланин, глутаминова киселина и лизин.

Съединенията, съгласно настоящото изобретение, включващи такива, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи, могат да бъдат включени в състава на фармацевтични състави чрез смесване с фармацевтично приемливи нетоксични ексципиенти и носители. Тези състави могат да бъдат приготвени за приложение в парентерално администриране, по-специално, под формата на течни разтвори или суспензии; или в орално администриране, по-специално, под формата на таблетки или капсули; или в интранасално администриране, по-специално, под формата на прахове, капки за нос или аерозоли; или в дермално администриране, посредством, например, трансдермални пластири.

Съставът може да се администрира в единична дозична форма и може да се приготви по някой, известен на фармацевтите метод, например, както е описано в *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Съставите за парентерално администриране могат да включват, като обичайни ексципиенти, стерилна вода или салин, полиалкиленгликоли, като полиетиленгликол, растителни масла, хидрирани нафталени и други. По-специално, биосъвместим, биоразградим лактиден полимер, лактид/гликолид съполимер, или полиоксиетилен-полиоксипропилен съполимери могат да бъдат ефикасни ексципиенти за контролиране на

освобождаването на активните съединения. Други потенциално приложими парентерални доставящи системи за тези активни съединения включват етилен-винилацетат съполимерни частици, осмотични помпи, имплантируеми инфузионни системи и липозоми. Съставите за инхалационно администриране включват като ексципиенти, например, лактоза или водни разтвори, включващи, например, полиоксиетилен-9-лаурилетер, гликохолат и деоксихолат, или маслени разтвори за администриране под формата на капки за нос, или като гел за интранасално приложение. Съставите за парентерално администриране могат, също така, да включват гликохолат за букално администриране, салицилат за ректално администриране, или лимонена киселина за вагинално администриране. Предпочита се, съставите за трансдермални пластири да бъдат липофилни емулсии.

Съединенията, съгласно настоящото изобретение, могат да се прилагат като самостоятелно активно средство във фармацевтичния състав. Или пък, те могат да се използват заедно с други активни ingredienti, например, други растежни фактори, които улесняват невронното оцеляване или аксоналната регенерация при болести и болестни нарушения.

Съединенията, съгласно настоящото изобретение, и техните фармацевтично приемливи соли, могат да бъдат администрирани орално или по друг начин, например, като мехлем или инжекция. Концентрациите на съединенията, съгласно настоящото изобретение, в терапевтичния състав могат да варират. Концентрацията зависи от фактори, като общата доза на лекарството, което ще се администрира, химичните характеристики (например, хидрофобност) на използваното съединение, начина на администриране, възрастта, телесното тегло и симптомите на пациента, и т.н. Съединенията, съгласно настоящото изобретение, обикновено се прилагат във воден физиологичен буферен разтвор, съдържащ от около 0.1 до 10% тегл./об. за парентерално администриране. Обикновено границите

на дозата са от около $1 \mu\text{g/kg}$ до около 1 g/kg телесно тегло дневно; предпочитаната доза е от около 0.01 mg/kg до 100 mg/kg телесно тегло дневно, като още повече се предпочита, от около 0.1 mg/kg до 20 mg/kg телесно тегло веднъж до четири пъти дневно. Предпочитаната доза на лекарството за администриране зависи от редица променливи, като вида и напредване в развитието на болестта или нарушението, общия здравен статус на отделния пациент, относителната биологична ефикасност на избраното съединение, избор на ексципиента на съединението и начина на администриране.

Съединенията, съгласно настоящото изобретение, включващи изпитваното съединение и съединенията, идентифицирани по описаните в настоящото изобретение методи, и техните фармацевтично приемливи соли, могат да бъдат администрирани самостоятелно или под форма на различни фармацевтични състави, според фармакологичната активност и целта на администрирането. Фармацевтичните състави, съгласно настоящото изобретение, могат да бъдат получени чрез хомогенно смесване на ефективно количество от съединението или неговата фармацевтично приемлива сол, като активен ингредиент, с фармацевтично приемлив носител. Носителят може да бъде под различна форма, съгласно вида на състава, подходящ за администриране. Желателно е, такива фармацевтични състави да се приготвят в единична дозична форма, подходяща за орално или друго администриране. Формите за различно от оралното администриране включват мехлем и инжекция.

Таблетки могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на ексципиенти, като лактоза, глюкоза, сукроза, манитол и метилцелулоза, дезинтегриращи средства като нишесте, натриев алгинат, калциева карбоксиметилцелулоза и кристална целулоза, лубриканти, като магнезиев стеарат и талк, свързващи вещества, като желатин, поливинилов алкохол, поливинилпиролidon, хидроксипропилцелулоза, повърхностно-

активни вещества, като естери на сукроза и мастна киселина и естери на сорбитол и мастна киселина, и други. Предпочита се, всяка таблетка да съдържа 15-300 mg активен ингредиент.

Гранули могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на ексципиенти, като лактоза и сукроза, дезинтегриращи средства като нишесте, свързващи вещества, като желатин и други. Прахове могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на ексципиенти, като лактоза и манитол, и други. Капсули могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на желатин, вода, сукроза, гума арабика, сорбитол, глицерин, кристална целулоза, магнезиев стеарат, талк и други. Предпочита се, всяка капсула да съдържа 15-300 mg активен ингредиент.

Сиропи могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на захари, като сукроза, вода, етанол и други.

Мехлем може да бъде приготвен по конвенционален начин при използване на бази за мехлем, като вазелин, течен парафин, ланолин и макрогол, емулгатори, като натриев лауриллактат, бензалкониев хлорид, естер на сорбитан и мономастна киселина, натриева карбоксиметилцелулоза и гума арабика, и други.

Състави за инжектиране могат да бъдат приготвени по конвенционален начин при използване на разтворители, като вода, физиологичен салин, растителни масла (например, зехтин и фъстъчено масло), етилолеат и пропиленгликол, солубилизиращи средства, като натриев бензоат, натриев салицилат и уретан, средства за изотоничност, като натриев хлорид и глюкоза, консерватни, като фенол, крезол, p-хидроксибензоен естер и хлорбутанол, антиоксиданти, като аскорбинова киселина и натриев пиросулфит и други.

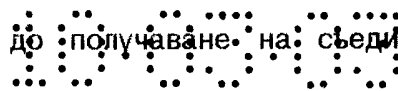
Примери за изпълнение на изобретението

Дадените по-долу примери илюстрират настоящото изобретение. Те са дадени и конструирани без да ограничават обхвата на настоящото изобретение.

Пример 1: Общо описание на синтетичните методи и примери

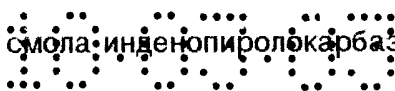
Общият синтетичен метод, използван за получаване на мостовите инденопиролокарбазоли, съгласно настоящото изобретение, притежаващи формула II, е показан на Фигури 1 и 2. Общите методи за синтез на инденопиролокарбазоли (III)/(VIII) може да се приложи, както е описано в U.S.Patent No. 5,705,511, даден за сравнение. Когато R¹ е водород, азотът от лактама на инденопиролокарбазолите (III)/(VIII) е защитен с подходяща защитаваща група, която води до (IV)/(IX). Защитеното съединение се третира с подходяща база в безводен органичен разтворител(и), при което се получава тъмночервен разтвор, който се счита, че е карбанион. При взаимодействие на карбаниона с бифункционален реактив (V) се извършва електрофилно присъединяване към C=Y връзката на (V), водещо до междинно съединение (VI)/(X). При третиране на междинно съединение(я) (VI)/(X) и/или (VII)/(XI) или със сулфонова киселина, или с Люисова киселина, например, борен трифлуоридетерат, се получават мостовите инденопиролокарбазоли (I)/(II).

Защитата на азота на лактама (показана на Фигури 3 и 4) може да се осъществи посредством катализиран от киселина или от база процес. Катализираната от киселина реакция може да бъде проведена с реактив, свързан със смола, позволяващ имобилизиране на инденопиролокарбазолите (III)/(VIII) към полимерен носител, като полистирен, Rink киселинна смола (XII) (Фигура 3), до получаване на (XIII). Или пък, катализираната от киселина реакция може да бъде проведена с

разтворим реактив, до получаване на съединение (XIV) (Фигура 4).

 Защитеното със силил съединение (XV) се получава при базично катализиране (Фигура 4).

На Фигура 5 са описани няколко метода за получаване на междинно съединение (V). Метод (а) описва превръщането на различни ацетали (XVI) в (XVII, Z=връзка). Например, естер-ацетал/кетал (XVI, D=COOR) напълно се редуцира до съответния алкохол и след това се окислява (например, окисление на Swern или Dess-Martin) до алдехид-ацетал/кетал (XVII, R⁸=водород). Или пък, естер-ацетал/кетал (XVI, D=COOR) частично се редуцира с DIBAL до директно получаване на алдехид-ацетал/кетал (XVII, R⁸=водород). По същия начин, при редукция на нитрил-ацетал (XVI, D=CN) с DIBAL се получава алдехид-ацетал/кетал (XVII, R⁸=водород). Кето-ацетали/кетал се получават посредством прибаване на Гринярови реактиви към Weinreb амид-ацетал/кетал (XVI, D=CON(OMe)Me).

Междинното съединение (XVII, Z=връзка) може, също така, да бъде получено по двуетапен метод, показан в Метод (b). При прибавяне на органометален реактив (XIX) към ацетал/кетал (XVIII) се получава алкен (XX), от който при озонлиза, последвана от редуциране, се получава кето-ацетал/кетал (XVII). Получаването на междинно съединение (XVII, Z=хетероатом) по двуетапен метод е показано в Метод (c). При куплиране на ацетал (XXII) с алкен (XXI), последвано от озонлиза (с редуциране) на получения алкен, се получава кето-ацетал/кетал (XVII). Или пък, междинно съединение (XVII, Z=хетероатом) се получава по двуетапен метод, показан в Метод (d). Взаимодействие на съединението (XXIV) с ацетал/кетал (XVIII) води до получаване на (XXV), който се трансформира в кето-ацетал/кетал (XVII), както е описано в Метод (a). Кондензацията на кето-ацетал/кетал (XVII) с хидроксиламини, хидразини, N-алкил-N-алкоксиамини и амини води до получаване на междинно съединение (XXVI) с електрофилна C=N функционалност.



Свързаният със смола инденопиролокарбазол (XIII) (Фигура 6, Метод А) се третира с излишък от Гринярдов реактив като база, което води до получаване на тъмночервен разтвор, който се счита, че е карбанион. При следващо взаимодействие с (V) се получават продукти вследствие електрофилно присъединяване към $C=Y$ групата. При взаимодействие с вода и отцепване на продукта(ите) с разредена киселина (1% трифлуороцетна киселина в метиленхлорид) от смолата, се изолира съединението(ата) (XXVII) и/или (XXVIII). При третиране на междинно съединение(я) (XXVII) и/или (XXVIII) със сулфонова киселина, или с Люисова киселина, например, борен трифлуоридетерат, се получават мостовите инденопиролокарбазоли (II).

Подобна процедура се използва за взаимодействие на разтворимо, защитено с лактам междинно съединение, например, (XV) (Фигура 7, Метод В). Обаче, в този случай, междинно съединение (XV) се третира с Тритон В в пиридин като база, вместо с Гринярдов реактив. Междинно съединение(я) (XXIX) и/или (XXX) може да бъде изолирано с лактамова защитаваща група, която е податлива на хроматографско пречистване. Както при Метод А, (Фигура 6), при третиране с Люисова киселина (като борен трифлуоридетерат) се получават мостовите инденопиролокарбазоли (II), в които $R^1 = \text{водород}$.

Въвеждането на групи R^3 , R^4 , R^5 и R^6 може да бъде проведено, както е описано в US Patents Nos. 5,705,511 и 4,923,986, дадени за сравнение. Иначе, група R^3 може да бъде въведена след получаване на мостовите инденопиролокарбазоли, както е показано на Фигура 8. Третата позиция на пръстена В се бромтира с NBS до получаване на съединение (XXXI). След това се въвежда въглероден фрагмент при прилагане на катализирани с паладий реакции на Stille, Suzuki, Heck, Kumada или Castro-Stephens до получаване на съединения от типа (XXXII), (XXXIII) и т.н. Освен това, от съединение (XXXI) лесно могат да се получат съединения, в които бромната

група е заменена с хетероатом, например, група на базата на амин при използване на катализирано с паладий аминиране на Buchwald.

При окислителен процес, може да бъде въведена свързана с кислород група при инденовия въглерод на пръстен E, както е показано на Фигура 9, съединение (XXXIV). При този химизъм става окисление на метиленовата група на лактама (пръстен A) до получаване на амидно производно, както е показано.

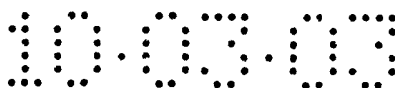
Пример 2: Получаване на Rink свързани със смола междинни съединения

(XIII-A), (XIII-B) и (XIII-C) (Фигура 3)

Пример 2-A

Тригърлена облодънна колба, снабдена с пусната отгоре механична бъркалка и Dean-Stark затвор, последователно се зарежда с Rink киселинна смола XII (10.00 g, 0.64 mmol/g), 1-метил-2-пиролидинон (80 ml), бензен (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) и p-толуенсулфонова киселина (1.00 g). Реакционната смес се нагрява при кипене на обратен хладник в продължение на 20 часа, след което се филтрува. Сместа се промива с тетраhydroфуран (5x175 ml) и филтратът се отделя. След това смолата последователно се промива с диметилсулфоксид (4x100 ml), 2% воден разтвор на натриев бикарбонат (4x100 ml), вода (4x100 ml), диметилсулфоксид (2x200 ml), тетраhydroфуран (4x100 ml) и етилацетат (4x100 ml). След това смолата се суши под вакуум (24 часа) до получаване на 11.70 (0.47 mmol/g) свързано със смола междинно съединение VIII-A, (XIII-A).

След първоначалното промиване с тетраhydroфуран, филтратът се изпарява, остатъкът се разрежда с вода (750 ml) и получената утайка се филтрува и последователно се промива с вода, 2% воден разтвор на натриев бикарбонат (4x100 ml) и вода (4x100 ml). След сушене под вакуум се възстановява междинно съединение VIII-A (1.28 g).

Пример 2-Б

По същия начин, междинно съединение 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) се куплира с Rink киселинна смола XII (1.52 g) до получаване на 1.58 g свързано със смола междинно съединение VIII-B (XIII-B).

Пример 2-В

По същия начин, междинно съединение VIII-C ($A^1, A^2 = H_2$, $B^1, B^2 = O$, $R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = 10-OMe$) (1.02 g) куплира с Rink киселинна смола XII (3.12 g) до получаване на 3.70 g (0.46 mmol/g) свързано със смола междинно съединение VIII-C (XIII-C) заедно с възстановено съединение VIII-C (0.44 g).

Пример 3: Получаване на Съединение (II-1), Съединение (II-2), Съединение (II-3), Съединение (II-4a), Съединение (II-4b), Съединение (II-6) и Съединение (II-8) (Метод А, Фигура 6)

Пример 3-А

Към суспензия на (XIII-A) (1.25 g) в тетраhydroфуран (24 ml) се прибавя 1.0M разтвор на етилмагнезиев бромид (6.25 ml в тетраhydroфуран) и реакционната смес се разбърква в продължение на 1 час преди прибавянето на HMPA (5.0 ml). След разбъркване в продължение на 10 минути се прибавя диетоксибутиралдехид (3.0 g) (получен съгласно метод, описан в Paquette, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9662-71) и реакционната смес се разбърква в продължение на 20 часа. Реакционната смес се фиксира с 10% воден разтвор на амониев хлорид (5 ml) и се филтрува. Смолата успешно се промива с 10% воден разтвор на амониев хлорид (3x10 ml), вода (3x10 ml), тетраhydroфуран (3x10 ml), диметилформамид (3x10 ml), вода (3x10 ml), тетраhydroфуран (3x10 ml) и етер (3x10 ml). Смолата се суши под вакуум, поставя се в метиленхлорид (15 ml) и се третира с трифлуороцетна киселина (0.15 ml). След разбъркване в

продължение на 1 час реакционната смес се филтрува и филтратът се изпарява. Полученият остатък се поставя в метиленхлорид (20 ml) и се третира с пиридиниев тосилат (50 mg) и полученият разтвор се разбърква в продължение на 4 часа. След това реакционната смес се промива с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат и разсол и се суши над магнезиев сулфат.

След филтруване и изпаряване на разтворителя, остатъкът се пречиства посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 4x25 cm, елуиране с 60% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина). Подходящите фракции се неутрализират с натриев бикарбонат, екстрахират се с метиленхлорид (3x50 ml) и се сушат над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя, се получават 70.2 mg от съединение II-1 като бял прах, който има следните характеристики:

^{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=7.9, 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, 1H), 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) изчислено: 379; наблюдавано: 379.

Посредством препаративна високоефективна течна хроматография, от тази смес на реакционни продукти се изолира също и съединение II-2 (0.5 mg), което има следните характеристики:

^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), 7.44-7.26 (m, 3H), 6.81 (d, J=6.0, 1H), 5.43-5.33 (m, 1H), 4.42 (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) изчислено: 407; наблюдавано: 407.

Пример 3-Б

По същия начин, както е описано по-горе за съединение II-1, смола (XIII-A) (70.3 mg) се третира с 1,1-диетокси-2-пентанон (0.75 ml) (получена съгласно Sworin, *et al.*, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4894-6) до получаване на съединение II-3 (3.5 mg), което се изолира посредством тънкослойна хроматография (силикагел, елуиране с 50% етилацетат/толуен) и има следните характеристики:

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 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, 1H), 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 ($M+H$) изчислено: 393; наблюдавано: 393.

Пример 3-В

По същия начин, смола (XIII-A) (74.3 mg) се третира с 1,1-диетокси-2-хексанон (0.75 ml) (получена съгласно Brenner, *J. Org. Chem.*, **1961**, 26, 22-7) до получаване на съединение II-4a (2.10 mg) и съединение II-4b (1.06 mg), които се изолират индивидуално посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 4x25 cm, елуиране с 65% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина).

Съединение II-4a има следните характеристики: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 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, 1H), 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), други алифатни сигнали, припокриващи се с пиковите на разтворителя; MS m/z ($M+H$) изчислено: 407; наблюдавано: 407. Съединение II-4b има следните характеристики: ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 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), други алифатни сигнали, припокриващи се с пиковите на разтворителя; MS m/z ($M+H$) изчислено: 407; наблюдавано: 407.

Пример 3-Г

По същия начин, (XIII-C) (1.00 g) се третира с диетоксибутиралдехид (3.65 g) до получаване на съединение II-6 (87.8 mg), което се изолира посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 2.5x25 cm, елуиране с 65% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина) и има следните характеристики:

^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 (M+Na) изчислено: 431; наблюдавано: 431.

Пример 3-Д

По същия начин, (XIII-B) (153.2 mg) се третира с диетоксибутиралдехид (1.5 ml) до получаване на съединение II-8 (3.6 mg), което се изолира посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 2.5x25 cm, елуиране с 65% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина) и има следните характеристики:

^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 (M+H) изчислено: 379; наблюдавано: 379.

Пример 4: Получаване на Съединение II-7a и Съединение II-7b (Метод А,Фигура 6)Пример 4-А: Получаване на (1,1-диетоксиетокси)ацетон

Към студена (0°C) суспензия на натриев хидрид (2.68 g, 60%) в тетраhydroфуран (150 ml) се прибавя разтвор на 1,1-диетоксиетанол (който се получава, съгласно описан в литературата метод на Zirkle, *et al.*, *J. Org.*

Chem., 1961, 26, 395-407) (6.00 g) в тетраhydroфур (20 ml) и реакционната смес се разбърква при стайна температура в продължение на 1 час преди да се прибави металилхлорид (8.0 ml). Реакционната смес се нагрява при кипене на обратен хласник в продължение на една нощ, охлажда се и се филтрува през пласт от селит. Разтворителят се отделя при ротационно изпаряване и остатъкът се пречиства посредством колонна хроматография (силициев двуокис, 20% етер/хексан) до получаване на 1,1-диетоксиетилметалилов етер (11.5, 90%). Озонолизата на изстуден (-30°C) разтвор на този етер (6.00 g) в етилацетат (80 ml) се провежда, докато никакъв изходен материал не се открива посредством тънкослойна хроматография (1 час). След това реакционната смес се продухва с кислород, третира се с паладиев хидроксид (150 mg) и се разбърква в атмосфера на водород в продължение на една нощ. Катализаторът се отфилтрува и филтратът се концентрира посредством ротационно изпаряване. Полученият остатък се пречиства посредством колонна хроматография (силициев двуокис, 20% етилацетат/хексан) до получаване на съединението от заглавието (4.53 g, 82%).

Пример 4Б

Съгласно Метод А (Фигура 6), смола (XIII-A) (230.2 mg) се третира с етилмагнезиев бромид (1.25 ml), последван от (1,1-диетоксиетокси)ацетон (Пример 3-A) (1.2 ml). След обработване и отцепване от смолата, част от суровата реакционна смес на продукти (10.5 mg) се поставя в метиленхлорид (20 ml) и се третира с борен флуоридетерат (20 ul). След разбъркване в продължение на 2.5 часа, разтворът се промива с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат и разсол преди сушенето над магнезиев сулфат. След филтруване и отделяне на разтворителя, полученият остатък се пречиства посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 4x25 cm, елуиране с 65% MeCN/вода тегл./

0.1% трифлуороцетна киселина) до получаване на съединение II-7a (2.34 mg) и съединение II-7b (1.34 mg). Съединението II-7a има следните характеристики:

^1H NMR (CDCl_3) 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), 5.50-4.85 (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 ($M+H$) изчислено: 409; наблюдавано: 409.

Съединението II-7b има следните характеристики:

^1H NMR (CDCl_3) 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 ($M+H$) изчислено: 409; наблюдавано: 409.

Пример 5: Получаване на Съединение II-5 (Фигура 8)

Към разтвор на съединение II-1 (8.1 mg) в тетраhydroфуран (2 ml) се прибавя NBS (4.6 mg) и реакционната смес се разбърква в продължение на една нощ. Прибавя се допълнително количество NBS (4.5 mg) и реакционната смес се разбърква в продължение на 2.5 часа. Неразтворимият материал се филтрува и филтратът се концентрира посредством ротационно изпаряване. Полученият остатък се пречиства посредством колонна хроматография (C-18, 65% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина). Подходящите фракции се неутрализират с натриев бикарбонат и се екстрахират с метиленхлорид (3x20 ml) и се сушат над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя се получава съединение II-5 (5.1 mg) като бял прах, който има следните характеристики:

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 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 (M+H) изчислено: 457/9 (1:1); наблюдавано: 457/9 (1:1).

Пример 6: Получаване на Междинно съединение XV (Фигура 4)

Към разтвор на VIII-A ($A^1, A^2 = H_2$, $B^1, B^2 = O$, $R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$) (1.05 g) в диметилформамид (25 ml) се прибавят триетиламин (0.75 ml) и t-бутилдиметилсилилхлорид (TBS-Cl) (0.65 g). След разбъркване в продължение на 3 часа, реакцията се спира с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат и се екстрахира с етилацетат. Органичният слой се промива с вода и разсол и се суши над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя, полученият остатък се тритурира с етер до получаване на съединение XV (848 mg). Промивните води се изпаряват докато остане остатък, който се пречиства посредством колонна хроматография (силициев двуокис, 1% етилацетат/дихлорметан) и се получава допълнителен продукт (502 mg, общ добив 94%) който има следните характеристики:

¹H NMR (DMSO-d₆) 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 (M+H) изчислено: 425; наблюдавано: 425.

Пример 7: Получаване на Съединение II-1 по Метод В (Фигура 7)

Разтвор на Тритон В в пиридин (0.45M) се получава при разтваряне на 40% разтвор на Тритон В в метанол (10 ml) в пиридин (10 ml). Разтворителят се отделя при понижено налягане (20 mm Hg) до краен обем, приблизително 8 ml. Остатъкът се разрежда с пиридин до 50 ml, филтрува се и се съхранява под азот. Разтвор на междинно съединение XV (20.3 mg) в пиридин (2.0 ml) се продухва с аргон и се третира с 300 μ l Тритон В (0.45M в пиридин) и

диетоксибутиралдехид (50 μ l). След разбъркване в продължение на 2 часа, реакционната смес се екстрахира с етилацетат, промива се с 1N водна солна киселина и разсол, и се суши над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя, полученият адукт се поставя в дихлорметан (10 ml) и се третира с борен флуоридетерат (10 μ l). След разбъркване в продължение на 2 часа, разтворът се промива с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат и разсол, след което се суши над магнезиев сулфат. При отделяне на разтворителя посредством ротационно изпаряване се получава остатък, който се пречиства посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 2.5x25 cm, елуиране с 65% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина). Подходящите фракции се неутрализират с натриев бикарбонат и се екстрахират с метиленхлорид (3x20 ml) и се сушат над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя се получава съединение II-1 (11.8 mg, 65% добив), на което протонният ядрено-магнитен резонанс, мас-спектралният анализ и времето на задържане при високоефективната течна хроматография са същите, както за съединението, получено и изолирано по метод А, описан в Пример 3-А.

Пример 8: Получаване на Съединение II-9 (Фигура 8)

Към суспензия на бромно съединение II-5 (6.2 mg) в 1-пропанол (4.0 ml) се прибавя 3-аминофенилборна киселина (3.8 mg). След разбъркване в продължение на 0.25 часа, последователно се прибавят паладиев ацетат (2.0 mg), трифенилфосфин (4.8 mg), натриев карбонат (2.8 mg) и вода (2.0 ml). Сместа се нагрява при кипене на обратен хладник в продължение на 0.75 часа, охлажда се, екстрахира се с дихлорметан и се промива с вода и разсол. Органичният слой се суши над магнезиев сулфат и разтворителят се отделя посредством ротационно изпарение до получаване на остатък, който се пречиства посредством препаративна високоефективна течна

хроматография (Zorbax RX-8, 2.5x25 cm, елуиране с 50% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина). Подходящите фракции се неутрализират с натриев бикарбонат и се екстрахират с метиленхлорид (3x20 ml) и се сушат над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя се получава съединение II-9 (3.1 mg, 49% добив), което има следните характеристики:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.22 (d, J=7.5, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.00-7.25 (m, 2H), 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 (M+H) изчислено: 470; наблюдавано: 470.

Пример 9: Получаване на Съединение II-10 (Фигура 9)

Към разтвор на съединение II-1 (5.0 mg) в диметилсулфоксид (1 ml) се прибавя натриев цианид (4.3 mg) и реакционната смес се нагрява при 145°C в продължение на 1 час. Сместа се охлажда, екстрахира се с етилацетат и се промива с вода (3x20 ml) и разсол. Органичният слой се суши над магнезиев сулфат, филтрува се и се изпарява до получаване на остатък, който се пречиства посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 2.5x25 cm, елуиране с 55% MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина). Подходящите фракции се неутрализират с натриев бикарбонат и се екстрахират с метиленхлорид (3x20 ml) и се сушат над магнезиев сулфат. След филтруване и изпаряване на разтворителя се получава съединение II-10 (2.7 mg, 50% добив), което има следните характеристики:

^1H NMR (DMSO- d_6) 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).

Пример 10: Получаване на Съединение II-11 (Метод А, Фигура 6)

Съгласно Метод А, смола (XIIIa) (150.2 mg) се третира с етилмагнезиев бромид (1.0 ml), последван от 2,5-диоксопентаноат (Schmidt, *et al.*, *Synthesis*, 1993, 809) (1.5 ml). След обработване и отцепване от смолата, суровата реакционна смес на продукти се поставя в метиленхлорид (20 ml) и се третира с борен флуоридетерат (20 μ l). След разбъркване в продължение на 2.5 часа, разтворът се промива с наситен воден разтвор на натриев бикарбонат и разсол преди сушенето над магнезиев сулфат. След филтруване и отделяне на разтворителя, полученият остатък се пречиства посредством препаративна високоефективна течна хроматография (Zorbax RX-8, 4x25 cm, елуиране с 55%-75% градиент MeCN/вода тегл./ 0.1% трифлуороцетна киселина) до получаване на съединение II-11 (6.4 mg), което има следните характеристики:

^1H NMR (DMSO- d_6) 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, J=7.1, 3H), 1.25-0.63 (m, 2H).

Пример 11: Получаване на Съединение II-12

Разтвор на съединение II-11 (3.4 mg) в тетраhydroфуран (2 ml) се третира с 2M разтвор на литиев борхидрид (1.0 ml в тетраhydroфуран) и реакционната смес се разбърква в продължение на 1.5 часа. Реакцията се спира чрез прибавяне на 1N водна солна киселина (4 ml). След разбъркване в продължение на 20 минути се прибавя 10% водна натриева основа (15 ml) и сместа се екстрахира с метиленхлорид (3x10 ml). След сушене над магнезиев сулфат сместа се филтрува и разтворителят се изпарява до получаване на съединение II-12 (0.32 mg), което има следните характеристики:

^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), 1.25-0.60 (m,2H). MS m/z (M+H) изчислено: 409; наблюдавано: 409.

Пример 12: Повишаване на активността на ChAT от гръбначен мозък

ChAT е специфичен биохимичен маркер за функционални холинергични неврони. Холинергичните неврони играят главна роля при навлизане в образуването на коремче на мозъка, обонятелното ядро, ядрото на стъбълцето, мозъчната кора, сливиците и частите на таламуса. В гръбначния мозък, мотоневроните са холинергични неврони, които съдържат ChAT (Phelps, *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, **1988**, 273, 459-472). Активността на ChAT се използва за изучаване на действието на невротрофините (например, NGF или NT-3) върху оцеляването и/или функцията на холинергичните неврони. Анализът на ChAT служи също и за индикация на регулирането на нивата на ChAT в холинергичните неврони.

Методи: Отделят се клетки от гръбначен мозък на ембрион на плъх и експериментите се провеждат, както е описано в Smith, *et al.*, *J. Cell Biology*, **1985**, 101, 1608-1621, Glicksman, *et al.*, *J. Neurochem.*, **1993**, 61, 210-221. Клетките се отделят от гръбначен мозък на плъхове (ембрионален ден 14-15) по стандартни методи за отделяне на трипсин (Smith, *et al.*, *supra*). Клетките се поставят в концентрация 6×10^5 клетки/cm² върху покрити с поли-1-орнитин пластмасови гнезда с тъканна култура в среда на серум, несъдържащ азот, снабден с 0.05% волски серумен албумин (BSA) (Bottenstein, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, 76, 514-517). Културите се инкубират при 37°C във влажна атмосфера от 5% въглероден двуокис в 95% въздух в продължение на 48 часа. Активността на ChAT се измерва след 2 дни *in vitro* при използване на модификация по метода на Fonnum (Fonnum, *Neurochem.*, **1975**, 24, 407-409) съгласно McManaman *et al.* и Glicksman, *et al.* (McManaman *et al.*, *Develop. Biol.*, **1988**, 125, 311-320; Glicksman, *et al.*, *J. Neurochem.*, *supra*).

Описаните в примерите съединения с формула II са дадени в Таблица

2. Стойностите за R¹, R⁴, R⁶ и R⁷ са водород; Y е кислород и n е 1.

Таблица 2

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

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

Киназата с много на брой редове 3 (MLK3) се клонира, както е описано в Lee, *et al.*, *Oncogene*, **1993**, 8, 3403-3410; Ezoe, *et al.*, *Oncogene*, **1994**, 9, 935-938. cDNA се получава от 200 ng полиаденилиран меланоцит mRNA и 5% от реакционната смес служи за еталон за разширяване на репертоара на PTK cDNA при използване на смеси или на два или на четири силно дегенерирани олигонуклеотидни праймери, получени от последователности на консервирани Vib и IX поддомени на известни PTK: PTK1, 5'-CGGATCCACMGIGAYYT-3' (SEQ ID NO:1); PTK2, 5'-GGAATTCCAAGGACCASACRTC-3' (SEQ ID NO:2); PTK3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYYTIGCIGCIMGIAA-3' (SEQ ID NO:3); PTK4, 5'-GGAATTIAYIGGAWAIGWCCAIAACRTCISW-3' (SEQ ID NO:4). Проведени са 40 цикъла PCR при използване на Taq DNA полимераза (AmpliTaq; Perkin-

Elmer/Cetus) и автоматичен DNA термичен цилиндър; всеки цикъл се състои от 40 секунди при 94°C, 2 минути при 37°C и 3 минути при 63°C. Продуктите от осем PCR се събират, третират се с DNA полимераза (Klenow), отцепват се с BamH1 плюс EcoR1 и се подлагат на електрофореза с 5% полиакриламиден гел. Идентифицира се преимуществена, оцветена с етидиев бромид, 200-230 bp ивица, която се възбужда, елуира и се клонира в M13mp18. В един експеримент, част от cDNA усиlena с PCR не се отцепва, но вместо това, се клонира в M13mp18, който се отцепва с Sma1. Нуклеотидните последователности се определят по метода на последователното завършване на веригата.

Една cDNA, идентифицирана като PTK1, се използва като мостра за изследване на човешка меланома и меланоцитни cDNA библиотеки. Клон, означен като PTK1-3.2, включва цялата рамка от 2541 nt, кодиращ за протеин с 847 аминокиселини. Тази cDNA е отрязана с Nco1, притъпен с DNA полимераза (Klenow), отново се отрязва с EcoR1 и се свързва във вектор pCDNA3-EE, отрязан с BamH1, притъпен и след това отрязан с EcoR1. Векторът pCDNA3-EE е конструиран чрез вмъкване в мястото HindIII/BamH1 на олиго, който кодира изходния кодон, последван от EE епитоп, MEEEEYMPME (SEQ ID NO:5) (Grunssenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 7952-7954). Разновидността на киназата с много на брой редове 3 (MLK3) с мъртва киназа е получена при формиране на мутацията K144R при използване на PCR, съгласно публикуван метод (Chen, *et al.*, *Biotechniques*, **1994**, *17*, 657-659). Първият, мутагенен олиго представлява 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCGCCAG-3' (SEQ ID NO:6), а вторият олиго е 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (SEQ ID NO:7). При използване на кината с много на брой редове 3 (MLK3) като еталон, тези олиго, се използват в PCR за създаване на фрагмент на 806bp и се прилагат във втора PCR реакция, при използване на T7 праймер като друг усилвател, и киназа с много на брой редове 3 (MLK3) като еталон, за създаване на фрагмент на 1285bp.

Фрагментът се отделя при електрофореза с агарозен гел, изолира се, клонира се в pGEM-5 (Promega) и се удължава. Фрагментът се отрязва с HindIII и HpaI и се вмъква в pCDNA3-EE-MLK3 отреза с HindIII и HpaI. Друга мутация се открива при нуклеотид 1342. За корекция, Pf1M1 фрагмента (nt 1093-1418) се отрязва от необлагороден вид кината с много на брой редове 3 и се използва за заменяне на идентичния фрагмент в киназата с много на брой редове 3 (MLK3), мутирана с K144R.

Пример 14: pFB-FLAG-MLK3

Към получения протеин на киназата с много на брой редове 3 (MLK3), се клонира cDNA във вектор с бакуловирусно изразяване pFB-FLAG. Киназата с много на брой редове 3 (MLK3) се отделя от PTK1-3.2 при асимилиране с NcoI, притъпяване с DNA полимераза (Klenow), отрязва се отново с NotI и се свързва с pFB-FLAG, асимилиран със StuI и NotI. pFB-FLAG се получава от pFB (Life Technology) и притежава кодиращата последователност за FLAG епитоп (Hopp, *et al.*, *Biotechnology*, **1988**, 6, 1205-1210) с изходен кодон, MDYKDDDDK (SEQ ID NO:8), прибавен към полилинкер на BamHI мястото.

Пример 15: pFB-GST-MLK3 (KD)

Бакуловирусно изразяване на киназен домен на киназата с много на брой редове 3 (MLK3) се постига при отделяне на фрагмент на киназата с много на брой редове 3 (MLK3) от pGEXKG-MLK3 (KD) при използване на EcoRI и XhoI и свързването му с pFB вектор, отрязан с EcoRI и XhoI, където кодиращата последователност за глутадиион S-трансфераза (GST) е клонирана срещу потока. Това се осъществява чрез получаване на GST кодиращата последователност и полилинкер от pGEXKG вектор посредством PCR при използване на вектора като еталон (Guan, *et al.*, *Anal. Bioch.*, **1991**, 192, 262-267). 5' олио за PCR, създава BglII ограничително място в 5' края на

фрагмента. След това този изолиран фрагмент се асимилира с Bgl2 и HinD3 и се свързва с pFB, асимилиран с BamH1 и HinD3.

Пример 16: pGEXKG -MLK3 (KD)

cDNA фрагмент, включен както в домен на киназата с много на брой редове 3 (MLK3), така и в част на леуцинов цип (nt 736-1791), се получава посредством PCR при използване на PTK1 cDNA. Изолираният фрагмент се асимилира с ограничените места на ензимите EcoR1 и Xho1, които са включени в PCR олио и са клонирани в pGEX-KG, асимилиран с EcoR1 и Xho1. Този фрагмент в pGEX-KG след това се скъсява посредством PCR само за въвеждане на киназен домен (nt 736-1638).

Пример 17: pKH3-MLK2, pKH3-MLK2 (KA)

Киназата с много на брой редове 2 (MLK2) се клонира при използване на дегенериран PCR (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, 213, 701-710; Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 234, 492-500). Сегментите на cDNA, кодиращи каталитични субдомени на протеин кинази, изразени в епителиалната туморна клетъчна линия Colo 16, се удължават от RNA посредством обратима транскриптаза PCR. Дегенеративните PCR праймери са в основата на последователности, кодиращи консервирани мотиви в субдомени V и VIII на каталитични домени на киназата от рецептора на епидермалния растежен фактор. Последователностите на праймерите са следните: едноръчен праймер: 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G(A) ACC(T)T-3' (SEQ ID NO:9), обратен праймер: 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTC CAG(C)ACATC-3' (SEQ ID NO:10). Различни PCR продукти се клонират в M13 и се подреждат при използване на T7 Super-Base sequencing kit (Bresatec). Един 216-bp PCR продукт се използва като молекула за изследване на човешки колон λ gt11 cDNA библиотека (Clontech, каталог #HL 10346). Фрагментът се маркира, хибридизирането протича при 65°C и филтрите се промиват до недостиг на

0.2 X натриев хлорид/цитрат (150 mM натриев хлорид, 15 mM натриев цитрат, pH 7.0) и 0.5% SDS при 65°C. Филтрите се авторадомаркират в продължение на 16 часа при 70°C върху филм Kodak XAR-5. Изолират се четири клона и най-дългият, 1.2 kb, отново се използва за мостра на същата библиотека при прилагане на същите условия. Подбират се още четири клона, като един от тях е означен като 1034 bp фрагмент на киназата с много на брой редове 2 (MLK2). Този клон се използва за еталон на човешката мозъчна λ gt10 библиотека. Изследвани са приблизително 500,000 клона и е изолиран един 3454 bp клон, представящ цялата кодираща област на киназата с много на брой редове 2 (MLK2).

Киназата с много на брой редове 2 (MLK2) се клонира, от ATG до полиА опашка, във вектор pKH3 между BamH1 и EcoR1 местата в два етапа, като съществува BamH1 място в средата на последователността на киназата с много на брой редове 2 (MLK2). Векторът pKH3 е изграден посредством вмъкване на три копия на HA епитопния край, последвано от BamH1 място между Xba1 и EcoR1 местата на pRK7 полилинкера. За получаване на мутагенната разновидност, K125A, MLK2 5' BamH1 фрагментът се клонира в Promega pAlter вектор и се мутира, съгласно предписанията на производителя. След това фрагментът обратно се клонира в MLK2 pKH3 вектор.

Пример 18: pcDNA3-HA-JNK1

JNK1 cDNA се получава, както е описано (Coso, *et al.*, *Cell*, 1995, 81, 1137-1146). cDNA се получава посредством PCR при използване на еталон човешки скелетен мускул cDNA (Invitrogen) и се клонира в Bgl2/Sal1 места на pcDNA3-HA, модифицирано pcDNA3 изразяване плазмид, кодиращ HA епитоп (Wilson, *et al.*, *Cell*, 1984, 37, 767-778). След това, той се отрязва от pcDNA3, включвайки HA епитоп, и се свързва с pGEX-4T3 (Pharmacia). JNK1 cDNA се отрязва от pGEX-4T3, изграден като Bgl2/Sal1 фрагмент и се

свързва с pcDNA3-HA, вектор с HA епитоп, прибавен в Hind3/BamH1 мястото на pcDNA3.

Пример 19: pFLAG-DLK

DLK се клонира във вектор на изразяване pcDNA3 с FLAG епитоп, прибавен, както е описано (Holzman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 30808-30817). Фрагмент на cDNA за DLK се изолира при дегенеративно клониране на базиран на олигонуклеотид PCR. Цялата рибонуклеинова киселина се екстрахира от бъбреци на ембрионален ден 13.5 (32 органа) и бъбреци на ембрионален ден 17.5 (16 органа) при използване на реактив търговски фенол/гуанидин изотиоцианат, получен съгласно предписанията на производителя (TRIzol Reagent, Life Technology, Inc.). Следвайки асимилирането с DNaseI, свободна от RNase, цялата рибонуклеинова киселина се обръща, записана с RNase-H обратима транскриптаза (Superscript, Life Technology, Inc.), от олио (dT) синтетичен олигонуклеотиден праимер в единична cDNA. Дегенеративни олигонуклеотидни праимери, съответстващи на каталитични субдомени Vib и IX на протеина на тирозин киназата, първоначално описани от Wilks (Wilks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1989**, 86, 1603-1607), се модифицират до 5' EcoRI и HindIII местата, съответно (5'-ATAATTC (GT)GC(TAGC)GCCA(GA)GTC(TAGC)CGGTG-3' (SEQ ID NO:11), 5'-ATAAGCTTCC(TC)(AG)T(GC)AAGTGGA(TC)(GC)GC(AGC)CC(CT)GA-3' (SEQ ID NO:12). Четиридесет PCR цикъла се провеждат в продължение на 1.5 минути при 37°C и 3 минути при 63°C. Прибавят се пресни реактиви и се провеждат още 40 цикъла преди крайното 10 минутно удължаване при 72°C. Полученият 200-210-bp DNA удължен продукт се изолира гелово, клонира се в получен pGEM7zf(+) плазмид (Promega) и се трансформира в *Escherichia coli*. Минипреп плазмид DNA се получава от трансформирани бактерии и порция, асимилирана с EcoRI и HindIII ограничителни ендонуклеази; подреждат се клоните, съдържащи вмъквания.

195-bp DLK cDNA фрагментът, получен от дегенеративна PCR, се маркира радиационно и се използва за изследване на приблизително 1×10^6 рекомбинанта на Uni-ZAPII (Stratagene, La Jolla, CA), олио(dT)-мозък на възрастна мишка cDNA библиотека (Holzman, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1990, 10, 5830-5838). Филтрите се хибридизират в буфер, състоящ се от 50% формамид, 5 x SSC, 3 x разтвор на Denhardt, 0.25% SDS, 1 mg/ml полиаденилова киселина и 200 mg/ml DNA от сперма на съомга при 42°C. Филтрите се промиват еднократно при стайна температура в 2 x SSC, 0.2% SDS и двукратно в продължение на 30 минути при 65°C. Идентифицирани са 25 уникални клона; 10 клона се пречистват до хомогенност, отрязват се *in vivo*, съгласно протокол на производителя и се съставя карта на ограниченията. Двата най-дълги клона (съответно, 3401 и 3395 bp, различаващи се само по 5' завършването) се подреждат по дължина на двата елемента по цялата им дължина.

Целият фрагмент NotI-XhoI DLK cDNA (3401 bp) се клонира във вектор с евкариотно изразяване pcDNA3 на базата на цитомегаловирусен промотор (Invitrogen, San Diego, CA) (конструкция, означена като pcDNA3 DLK). След това се прави конструкция (pFLAG-DLK) с край NH₂-Met FLAG епитоп (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:13). PCR се използва за удължаване на фрагментите на cDNA, които кодират 5' HindIII мястото, последователността на DLK на Kozak, включваща ATG, FLAG епитоп и DLK cDNA рамка на последователностите, удължавани от нуклеотид 88 до EcoRI място на нуклеотид 758. (Пречистените посредством високоефективна течна хроматография синтетични олигонуклеотиди използват еквимоларни количества от 5'-ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACTACAAGGACGACGARGAC AAGGCCTGCCTCCATGAAACCCGAACA-3' (SEQ ID NO:14) за изграден с FLAG чувствителен праймер и 5'-GACAGGGCGGCCGGCTCT-3' (SEQ ID NO:15) за нечувствителен праймер.) Гелово пречистените HindIII и EcoRI асимилирани удължени фрагменти се клонират в HindIII-EcoRI за получаване на pcDNA3-

DLK плазмид. Конструкциите се нареждат по дължината на двата фрагмента до доказване на Taq полимераза и задържане на прочитната рамка.

Пример 20: pcDNA3-MLK1

5' частта на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) се получава от EST база данни (прираст #AA160611). Този клон се кондензира между киназата с много на брой редове 1 (MLK1) и друга cDNA с неизвестна идентичност. Той съдържа непубликувана досега 5' последователност на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) заедно с част от публикуван киназен домейн на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *213*, 701-710). cDNA последователността на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) от EST клона е следната:

```
GAATTCGGCACGAGAGGACTCGCAGGTGTCCGGCGACGAG
GGCTGGTGGACCGGGCAGCTGAACCAGCGGGTGGGCATCTTCCCCAGCAA
CTACGTGACCCCGCGCAGCGCCTTCTCCAGCCGCTGCCAGCCCGGCGGCG
AGGACCCAGTTGCTACCCGCCCATTCAGTTGTTAGAAATTGATTTTGCG
GAGCTCACCTTGGAAGAGATTATTGGCATCGGGGGCTTTGGGAAGGTCTA
TCGTGCTTTCTGGATAGGGGATGAGGTTGCTGTGAAAGCAGCTCGCCACG
ACCCTGATGAGGACATCAGCCAGACCATAGAGAATGTTCCGCAAGAGGCC
AAGCTCTTCGCCATGCTGAAGCACCCCAACATCATTGCCCTAAGAGGGGT
ATGTCTGAAGGAGCCCAACCTCTGCTTGGTCATGGAGTTTGCTCGTGGAG
GACCTTTGAATAGAGTGTTATCTGGGAAAAGGATTCCCCCAGACATCCTG
GTGAATTGGGCTGTGCAGATTGCCAGAGGGATGAACTACTTACATGATGA
GGCAATTGTTCCCATCATCCACCGCGACCTTAAGTCCAGCAAC (SEQ ID NO:16).
This translates to: NSAREDSQVS GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTPRSAFSS
RCQPGGEDPS CYPPIQLLEI DFAELTLEEI IGIGGFGKVY RAFWIGDEVA
VKAARHDPDE DISQTIENVR QEAKLFAMLK HPNIIALRGV CLKEPNLCLV
MEFARGGPLN RVLSGKRIPP DILVNWAVQI ARGMNYLHDE AIVPIIHRDL KSSN
(SEQ ID NO:17).
```

3' частта на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) първоначално се клонира посредством дегенеративен PCR, както е описано (Dorow, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1993, 210, 701-710). Протоколът за клониране на 3' частта на киназата с много на брой редове 1 (MLK1) е описан по-горе, както за киназата с много на брой редове 2 (MLK2) със следните изменения. От четирите клона, получени при постарно анализиране на библиотеката с 1.2 kb клон, три от четирите клона представляват кината с много на брой редове 1 (MLK1). Никой от клоновете не включва цял киназен домен, който е получен посредством PCR.

Фаг от 1 μ л аликвотни части на усилени библиотеки (cDNA линии на нормални човешки колонни епителни клетки и човешки T84 колонни карциномни клетки в λ Uni-ZAPXR (Stratagene, cat #937204) се разтварят чрез суспендиране в 20 μ л вода и се замразяват. Проба от 5 μ л на разтворения фаг се използва като PCR мостра в две реакционни смеси за всяка библиотека. Праймери, представящи векторите се взимат от нуклеотидни последователности, граничещи с местата за клониране. В случай на библиотека на линия на T84 колонни клетки, се използват T3 и T7 праймери (Promega). За всяка реакция, един праймер е от 3'-5' нишката на MLK1 гена, приблизително 100 bp 5' края на известната последователност. Вторият праймер е един от двата векторни праймера. PCR реакционните смеси съдържат 1 x PCR буфер, 2.5 mM магнезиев хлорид, 1 U *taq* полимераза (зачинки от Bredatec), 0.2 mM dNTP и 0.4 mM от всеки праймер общо в 50 μ л. Реакционните условия са 60 секунди при 95°C, 90 секунди при 52°C, 90 секунди при 72°C за 30 цикъла с 15 минути удължено време в последния цикъл. PCR продуктите се клонират и се навързват, както е показано по-горе. Най-дългият клон от библиотеката и PCR фрагмент, които включват допълнителна MLK1 се свързват заедно до получаване на 1.08 kb MLK1 cDNA в pUC18.

MLK1 клонът от EST базата данни се получава във вектора pBluecript (Stratagene). MLK1 cDNA от колонната библиотека се свързва с този клон при разлагане на предишния с EcoRI, завършен с Klenow и след това съкратен с AflIII. Този изолиран фрагмент се клонира в MLK1 cDNA от EST базата данни, съкращава се с XhoI, завършва се с Klenow и след това се съкращава с AflIII. Тази нова конструкция след това се отрязва от pBluecript посредством разлагане с NotI и ApaI и се свързва в pcDNA-EE, също съкратен с NotI и ApaI. Всички връзки на последователността са потвърдени.

Пример 21: D. coli изразяване на GST-MLK3_{CD}

pcEXHG-MLK3(KD) се трансформира в *E. coli* щам BL21 посредством електропорация. Бактериите, съдържащи плазмид, се инокулират в 15-литров апарат за ферментация Applikon в 10-литра обем на оладната обогатена среда: 1.95 g/l кисел пикапиев фосфат, 0.9 g/l кисел калиев фосфат, 0.1 g/l ампицилин, 0.3 g/l амониев сулфат, 0.92 g/l магнезиев сулфат x 7H₂O, 42.7 mg/l натриев цитрат, 21.8 mg/l железен сулфат x 7H₂O, 0.5 ml Pichia белязани метали (Higdis, et al., *Methods Molecular Biology*, 1998, 103-149-177), 20 g/l касаминокиселини, 40 g/l глицерол, 25.5 mg/l калциев хлорид. Бактериите растат една нощ при 800 оборота за минута/68% разтворен кислород/30°C докато културата достигне OD₆₀₀ = 4.4. Отделянето на рекомбинантен протеин се индуцира чрез прибавяне на 1 mM изопропил-β-D-тиогалактозид, с продължаваша ферментация при 25°C в продължение на до 6 часа. След това бактериите се възстановяват чрез центрофугиране и клетъчната паста се съхранява замразена при -20°C докато се пречисти.

Пример 22: Пречистване на бактериална GST-MLK3_{CD}

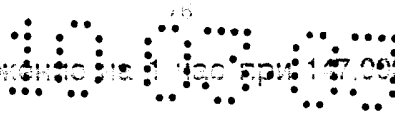
Частично пречистена GST-MLK3_{CD} се получава при соникиране на 100 ml бактериална клетъчна паста в 100 mM Tris-солна киселина, 150 mM



натриев хлорид, 1 mM EDTA, 5 mM дитиотреитол (DTT), pH 7.5 (буфер А). Разтворът се прави със 100 ml вода, след което се разбоква върху лед в продължение на 1 час. Супернатантният разтвор след центрофугиране в продължение на 45 минути при 20,000 x g се смесва в продължение на 1 час върху лед с 10 ml глутатион Sepharose 4B смола (Pharmacia) уравновесен в буфер А. Пелетизираната смола се промива два пъти с 12.5x обема буфер А, след което се елуира с 20 ml 100 mM Tris-солна киселина, 150 mM натриев хлорид, 5 mM дитиотреитол (DTT) (буфер В), съдържащ 20 mM глутатион, pH 7.5. Протектът се подлага на диализа в продължение на една нощ спрямо буфер В и се съхранява в аликвотни части при -80°C.

Пример 23: Бакуловирусно изразяване на FLAG-MLK3 и GST-MLK3_{kin}

Рекомбинантни бакуловируси, изразяващи FLAG-MLK3 и GST-MLK3_{kin} се получават от техните съответни трансферни вектори, pFB-FLAG-MLK3 и pFB-GST-MLK3_{kin} при използване на BAC-TO-BAC система (Life Technologies) съгласно ръководството с инструкции. Суспензионни култури на Sf21 клетки (Vaughn, et al., *In Vitro*, 1977, 13, 213-217) растат при 27°C (120 оборота за минута в обогатена среда на Grace (Hink, *Nature*, 1970, 226, 466-467) с 10% топлинно инактивиран ембрионален волски серум (FBS). За да се получат рекомбинантни FLAG-MLK3, Sf21 клетки с плътност 1.5×10^6 клетки на милилитър, обогатена среда на Grace, съдържаща 5% ембрионален волски серум (FBS), се заразява с множество инфекции (MOI) на 3.1 и се отделя 39 часа след инфектирането. За да се получат рекомбинантни GST-MLK3_{kin}, Sf21 клетки с плътност 1.5×10^6 клетки на милилитър, обогатена среда на Grace, съдържаща 5% ембрионален волски серум (FBS), се заразява с множество инфекции (MOI) на 2 и се отделя 41 часа след инфектирането. И в двата случая, пелетизираните клетки отново се суспендират в буфер, съставен от 10 mM HEPES, 50 mM натриев хлорид, 0.5 mM Petabloc SC, 5 µM пепотатин, 10 µg/ml аprotинин, 10 µg/ml леупептин, pH 7.4. Супернатантният разтвор след



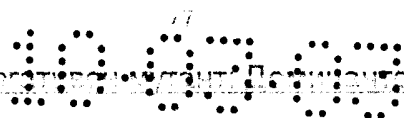
центрифугиране в продължение на 1 час при 147.000 xg отново се регулира до pH 7.4 с 3M Tris база и след това се съхранява при -70°C преди да се пречисти.

Пример 24: Пречистване на бакуловирусна GST-MLK3_{KB}

Частично пречистена бакуловирусна GST-MLK3_{KB} се получава при хроматография за афинитет към глутатион. За 10 ml клетъчен екстракт (26.6 mg общ протеин), се прибавя глутатион Sepharose 4B смола (Pharmacia), уравнивоваща с 10 mM HEPES, 150 mM натриев хлорид, pH 7.4 (буфер C) и се оставя протеинът да се свърже в продължение на 45 минути при 4°C. След това смолата се промива в колона с 30 колонни обема от буфер C, след което се елуира с 5 колонни обема от буфер C, съдържащ 20 mM глутатион. Смесеният краен продукт се подлага на диализа в продължение на една нощ по отношение на буфер C и се съхранява в аликвотни части при -70°C .

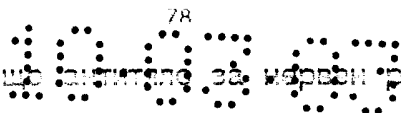
Пример 25: Пречистване на бакуловирусна FLAG-MLK3

Частично пречистена бакуловирусна FLAG-MLK3 се получава при хроматография за афинитет към антитяло. Протеинът от 15 ml клетъчен екстракт (19.5 mg общ протеин) с допълнително 0.1M натриев хлорид се свързва върху 0.25 ml колона на антитяло на M2 моноклонален FLAG пептид, свързан към агарозна смола (Sigma) за повторено зареждане (общо три пъти). Смолата е уравнивоваща с 5 колонни обема течност за промиване (1. 50 mM Tris-содна киселина, 150 mM натриев хлорид, pH 7.4 (TBS); 3 колонни обема течност за промиване на 0.1M глицин, pH 3.3, последвани от други 5 колонни обема течност за промиване с TBS, преди хроматографирането. Рекомбинантният протеин главно се елуира с 5 колонни обема 0.2 mM FLAG пептид (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C (SEQ ID NO.10) в TBS. Протеинът се съхранява в аликвотни части при -80°C преди анализиране.



Пример 26: Доминантен негативен мутант. Доминантен негативен мутант на семейството на киназата с много на брой редове MLK блокира утирането във видоизменени PC12 клетки, вследствие на отстраняване на нервнен растежен фактор

PC-12 клетъчна линия, получена от феохромоцитомен тумор от плъх и често се използва като невронален клетъчен модел за изследване на молекулните изменения, водещи до невронална смърт (Troy, *et al. Adv Neurobiol*, 1997, 103-111). Нервният растежен фактор (NGF) индуцира PC-12 клетките да се видоизменят в симпатетичен невронален фенотип (Greene, *Cell Biol*, 1978, 78, 747-753). Видоизменените с нервнен растежен фактор (NGF) PC-12 клетки зависят от нервния растежен фактор (NGF) за оцеляване и претърпяват морфологично описана апоптотична смърт при отстраняване на нервния растежен фактор (NGF) от културната среда. За определяне на ефекта на мембраните на смесеното семейство на кинасите върху утирането на PC-12 клетките, последван от отделяне на нервния растежен фактор (NGF), се разработва клетъчна система. PC-12 клетките се заразяват с cDNA код за доминантен негативен (DN) мутант на киназата с много на брой редове MLK-3 при използване на Rix липидна пренасяща система, както препоръчват производителите (Invitrogen, Carlsbad, CA). Стабилна капка от заразител, изразяващ DN-MLK-3 се подбира при използване на G419 сулфат (Mediatech Inc. Herndon VA). Приблизително 30% клетки в тези капки изразяват доминантен негативен (DN) мутант на киназата с много на брой редове MLK-3 (DN-MLK-3), както е определено от имунохистохимията. Капки от клетки, стабилно изразяващи мутантната киназа, се поставят върху плочка с 96 гнезда с тъканна култура, покрита с полиорнитин/ламинин (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ всяка във фосфатно буфериран салин) с плътност 2×10^4 клетки/гнездо и се третират с 100 ng/ml нервнен растежен фактор (NGF, в продължение на 7 дни. Средата, съдържаща нервнен растежен фактор (NGF), се отделя, клетъчният монослой се промива с фосфатно буфериран салин и среда



поддържаща/неутрализиращо антитяло за нервния растежен фактор (NGF) (cat #N6655; Sigma, St. Louis, MO) при крайно разреждане 1:1000 в продължение на 15 дни. Жизнеспособността на клетката се определя количествено посредством анализ за определяне на жизнеспособността на клетки, при използване на конверсията на тетразолиевата сол, MTS, в оцветен формазан, който се разчита при потъждане 570 nm на CytoFluor 2050 (Millipore Bedford, MA) както изисква производителят (Promega, Madison, WI). Стабилни калки, изразяващи доминантен негативен (DN) мутант на киназата с много на брой редове MLK-3 (DN-MLK 3), частично се спасяват от клетъчна смърт, причинена от отделянето на нервния растежен фактор (NGF) (Фигура 10).

Пример 27: Анализ на ензимната активност на рекомбинантен MLK протеин

За да се покаже, че протеинът на киназата с много на брой редове MLK, проявен или в бакуловирус или в бактериална система, е ензимно активен, се използват няколко анализа. Протеинът на киназата с много на брой редове MLK може да бъде в пълна конструкция или да бъде киназен помех изразен или в бакуловирус или в бактериална система. Този анализ може да се базира на антитяло, като анализ на имуносорбент, свързан с ензим (ELISA), флуоресцентен анализ (TRF) или флуоресцентна поляризация (FP). Антитялото може да бъде моноклонално или поликлонално с реактивоспособност спрямо фосфосерин, фосфотreonин или фосфо специфичен субстрат. Или пък може да се използва метод, който не се базира на антитяло, като радиоактивен анализ на база гел (Фигура 11), утайтелен анализ на трихлороцетна киселина (TCA) (Фигура 12), сцинтилационен анализ за съседство (SPA), или анализ на фосфоцелулозен филтър (Фигура 13). Анализът може да бъде конструиран директно да следи фосфорилирането на субстрата или на купдиращата система при използване на низходящи кинази в сигнализиращия път. Субстратът може да бъде

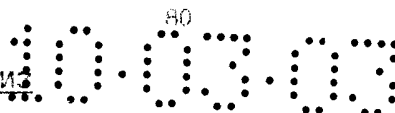
специфичен субстрат, като SEK-1, и неспецифичен субстрат, като миелинов основен протеин (MBP).

Пример 28: Анализи на киназа:

(1) Анализи на киназа, базиран на радиоактивен гел

Активността на киназата на MLK-3 се анализира чрез проследяване на въвеждането на ^{32}P от [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]-ATP в субстрат на киназа с много на брой редове (MLK) (например, непроизвеждащ киназа SEK-1, миелинов основен протеин). Смес за анализ от 50 μl , съдържаща Буфер А (20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -глицеролфосфат, 5 mM EGTA, 1 mM натриев ортованадат, 1 mM дитиотреитол), 15 mM магнезиев хлорид, 100 μM ATP, 10 μCi [^{32}P] ATP и 0.1 μg непроизвеждащ киназа SEK-1 субстрат (Stressgen, Inc.) свързана с глутатион S-трансфераза-SEK-1 (GST-SEK-1) се освобождава от глутатион-агарозните върна с 10 mM глутатион, pH 8.0) или 25 μg MBP (Sigma Chemical Co.). Реакцията се инициира чрез прибавяне на протеин на киназа с много на брой редове (киназен домен или препарат, съдържащ както киназа с пълна верига, така и киназен домен) или контролен протеин. Сместа се инкубира в продължение на 30 минути при 30 $^{\circ}\text{C}$. В края на реакцията се прибавя 2x буфер, редуциращ пробата. Сместа се нагрява при кипене в продължение на 5 минути, поставя се или върху 12% SDS-PAGE гел (при използване на MBP като субстрат) или върху 8% гел (SEK-1 като субстрат). След електрофореза гелът се изсушава. Количественото определяне на въведения в субстрата фосфат, SEK-1, се извършва на Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, CA). Резултатите от експериментите показват ензимната активност на бакуловирус изразената MLK-3 (завършена с FLAG киназа с пълна дължина или завършен с GST киназен домен) при използване на непроизвеждащ киназа GST-SEK-1 или MBP като субстрат, както е показано на Фигури 11A и 11B.

(2) Western Blot анализ



Активността на киназата на бакуловиус-изразената MLK-3 се определя посредством анализ на имунопетно. Смес за анализ от 20 μ l съдържа Буфер А, 15 mM магнезиев хлорид, 100 μ M ATP и 0.1 μ g непроеждащ киназа SEK-1 субстрат. Реакционната смес се оставя в продължение на 30 минути при 30°C, след което се фиксира с 10 μ l 1% редуциращ пробата буфер. Протеините се отделят върху 8% Tris-глицинов гел и електрофорезно се пренасят в Immobilon-P NDT мембрана. Мембраната се инкубира с антитело на фосфорилиращ SEK-1 (Thr222) (New England Biolabs, Inc.), последвано от маркиран с horseradish пероксидаза кози антизаяски IgG (Bio-Rad). Откриването на имунореактивните пикци се осъществява посредством усилена хемилуминесценция (Amersham). Фосфорилирането на непроеждащ киназа GST-SEK-1 с FLAG-MLK-3 протеин (бакуловирусен препарат, съдържащ както киназа с пълна верига, така и киназен домен) е илюстрирано на (Фигура 12).

(3) Многофункционален утайтелен анализ на трихлороцетна киселина

(TCA)

Активността на киназата на бакуловиус-изразената GST-MLK-3 се определя посредством анализ на Millipore многофункционална трихлороцетна киселина (TCA) в плочка, както е описано от Pitt, et al., *J. Biomol. Screening*, 1996, 1, 47-51. Анализът се провежда в многофункционални Durapore плочки (Millipore) с 96 гнезда. Сместа за анализ от 30 μ l съдържа 20 mM Перес, pH 7.4, 20 mM магнезиев хлорид, 20 mM манганов хлорид, 2 mM DTT, 0.1 mM натриев ванадат, 1 μ Ci [γ -³²P] ATP и 30 μ g MyrN субстрат. Реакцията се инициира чрез прибавяне на протеин на киназа с много на брой редове и се оставя в продължение на 15 минути при 37°C. Реакцията се спира с 25 μ l 50% трихлороцетна киселина (TCA). Плочките се оставят за уравновесяване в продължение на 30 минути при 4°C.



тава извършва се чрез изпит с радиоактивно трифосфатна киселина (TCA). Към пробите се прибавя сцинтилационен коктейл и се определя радиоактивността чрез използване на Wallac MicroBeta 1450 PLUS сцинтилационен брояч. Образуването на вирус на ^{32}P -маркиран MBP, съответстващ на дозата протеин, е показано на Фигура 13.

(4) Филтърен анализ на фосфоцелулоза

Анализът на киназата се извършва в реакционна смес от 50 μl , съдържаща 20 mM Нарес, pH 7.4, 20 mM магнезиев хлорид, 20 mM манганов хлорид, 2 mM DTT, 0.1 mM натриев ванадат, 1 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP и 30 μl MBP субстрат. Реакцията се инициира чрез прибавяне на протеин на киназа с много на брой редове и се оставя в продължение на 15 минути при 37°C. Реакцията се спира със 75 μl 75 mM фосфорна киселина. Аликвотна част от фиксирания разтвор се зарежда директно върху фосфоцелулозна мембрана (Pierce) или пък могат да се използват фосфоцелулозни многофункционални плочки (Millipore) с 96 гнезда. Мембраните се промиват със 75 mM фосфорна киселина. Съвършеният ^{32}P -маркиран фосфорилиран MBP се отделя с епруветки чрез прибавяне на 1M натриев хидроксид. Радиоактивността се определя посредством броене на Cerenkov в Beckman сцинтилационен брояч (Somerset, NJ). Получаването на фосфорилиран MBP с повишена концентрация на бактериално изразен GST-MLK-3 киназен домен, е показано на Фигура 13.

Пример 23. Анализ за определяне на свързването на съединения към рекомбинантни смайства кинаси с много на брой редове

K-252a (Съединение III-3, виж Таблица 4), индолокарабозолов метаболит на вида *Mucardia*, свързан с различни серинови/треонинови и тирозинови кинази (Angeles, et al., *Anal. Biochem.*, 1996, 236, 49-55; Knight, et al., *Anal. Biochem.*, 1997, 247, 376-381). Тритиран K-252 лиганд се използва за оценка



на свързването към човешкия рецептор тип 1A. Кинеза с моното на брой редове 3 (MLK-3) с пълна дължина от суров препарат на клетки, заразени с бакуловирус. [³H]K-252a специфично се маркира с триптий в трета и девета позиции през връзка с NEN Research products (Billerica, MA) с висока специфична активност 40 Ci/mmol. Реакциите на свързване се осъществяват в обем 1 ml в плочка с 96 гнезда. Реакционната смес съдържа 50 mM MORF буфер, pH 7, 150 mM натриев хлорид, 5 mM манганов двухлорид, 1 mg/ml BSA, 1% диметилсулфоксид и 0.25 nM [³H]K-252a. Пробите се получават трикратно в концентрация от 5 µg/ml сурова бакуловирусна кинеза с моното на брой редове 3 (MLK-3). Неспецифичното свързване се дефинира като свързване в присъствие на немаркиран 1.2 µM 252a и се изважда от общото свързване до получаване на специфичното свързване. За това разреждане, 12-15% от общия брой са неспецифични връзки към протеин и 75-85% от този брой са специфично свързани към киназата с моното на брой редове 3 (MLK-3) (Фигура 14). Всички експерименти се провеждат в продължение на 2 часа при 4°C. [³H]K252a/MLK-3 комплексите се събират върху GF/C Whatman филтри при използване на уреди на Brandel, промиват се със студен буфер от MORF/натриев хлорид и се броят с помощта на Wallac micro Beta брояч. Сатурационното свързване се провежда до получаване на K_d за K252a. Пример от резултатите от един от тези експерименти е даден на Фигура 14. Получава се K_d 0.89 nM (Конфиденциални граници: от 0.2 до 1.5 nM).

Пример 30: Цялостен клетъчен анализ

(A) CGS 7 свързваща система

Материали

K-252a и производни на това съединение се доставят от Kyowa-Nakko Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) (Kawabe et al., 1997). Съединенията се разтварят в клетъчна култура с диметилсулфоксид и се съхраняват на тъмно при 4°C. Всички разреждания на съединението се правят в среда на Eagle



модифицирана с Dulbecco (DMEM), съдържаща 10% волски серумен албумин. Хемаглутининово антигяло (HA) се доставя от NIBCO (Gaithersburg, MD), а X-100 (Triton X-100) субстрат се доставя от Promega (Madison, WI). ^{32} P-ATP (3000 Ci/mmol) се доставя от Amersham (Arlington Heights, IL).

COS 7 клетъчна култура

COS 7 бъбречни клетки от Green Monkey се получават от ATCC (Rockville, Maryland (CRL 1651) и се държат в среда на Eagle модифицирана с Dulbecco (DMEM), съдържаща 10% волски серум, 2 mM глутамин, 1 mM пиридат, 50 U/ml пеницилин/стрептомицин при 37°C в атмосфера на 10% въглероден диоксид и 90% въздух. COS 7 клетките се отделят чрез прибавяне на 0.25% трипсин.

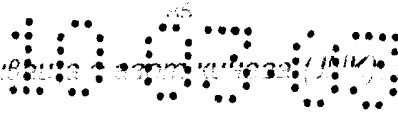
- (1) Свърхизразяване на членове на семейството на киназата с много на брой редове (MLK) и на завършващата с азот киназа 1 (JNK1) в COS 7 клетките

COS 7 клетките се поставят при 80% оливане и се заразяват с 2 μ g всяка с cDNA конструкция, при използване на липофектамин, който се изисква от снабдителя (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). cDNA в пълна дължина от човешка киназа с много на брой редове 3 (MLK-3), човешка киназа с много на брой редове 2 (MLK-2) или MLK от мишка или от човешка киназа с много на брой редове 1 (MLK-1), както е описана по-горе, и завършващата с азот киназа 1 (JNK1) с краен Хемаглутинин А, любезно предоставени от J. Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD), се субклонират в pcDNA3 вектор (Invitrogen, San Diego, CA). След пренасяне на заразата в продължение на 48 часа, клетките се третират с 0.025% диметилсулфоксид или 500 nM с посочените съединения в продължение на 2 часа, последвано от разтваряне в 0.4 ml Triton буфер (1% Triton X-100, 50 mM натриев хлорид, 10 mM Tris (pH 7.6), 0.1% волски серумен албумин, 30 mM натриев пирофосфат, 50 mM натриев флуорид, 20 μ g/ml аprotинин, 1 mM

радиометилсулфонилфлуорид, 1 mM натриев ацетат). Активността на завършващата с азот киназа (JNK) от лизата се анализира посредством описания по-долу анализ за имунопресипитация и киназа.

(2) Анализ за имунопресипитация и киназа от цели клетки

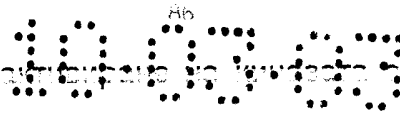
Лизат от COS 7 клетки се измерва за концентрация на протеин при използване на Micro BCA kit от Pierce (Rockford, IL) и радиометричен протеин се имунопресипитира с Хемагутининово антитело (HA) в продължение на 1 час при 4°C. Имунопресипитатите се пелетират чрез центрофугиране в микроцентрифуга в продължение на 30 секунди, отново се ресуспендират в титон буфер, промиват се чрез центрофугиране още два пъти след което се промиват с киназен буфер (20 mM HEPES, pH 7.4, 30 mM магнезиев хлорид, 2 mM дитиотреитол, 0.1 mM натриев ацетат). Имунопресипитатите отново се суспендират в киназен буфер, съдържащ 1 mM ATP и 5 μ Ci [^{32} P]ATP и субстрат (1 μ g/проба от AP-1) и се инкубират в продължение на 15 минути при 30°C. Киназната реакция се спира чрез добавяне на редуциращ пробата буфер (Laemmli, Nature 1970.227, 680-685). Пробите се нагреват до 80°C в продължение на 5 минути и се поставят върху 10% SDS-полиакриламидни гелове. Протеините се отделят чрез електрофореза. Гелът се суши и радиоактивността в AP-1 субстрата се определя количествено с помощта на Molecular Dynamics Phosphorimager (Bioscience, Cal.). Резултатите от експериментите, при които киназите с много висок брой редова MCK 0, MCK 2 и CLK се проявяват съвместно с HA-JNK1, са инкубират в отсъствие или в присъствие на K-252a са показани на фигури 16A и 16B. Обратно, производно на изходното K-252a съединение, наречено Съединение III-3 (виж Таблица 1), което е по-селективен инхибитор на киназа, няма отношение към пътя на завършващата с азот киназа (JNK), активиран с друг MAPKKK възходящ поток на завършващата с азот киназа (JNK), JNK1 (Фигура 16B).



(5) Анализ на свързваща + азот киназа (MLK) активирана с киназа с много на брой редове (MLK) за цялостна клетка

Опитите за получаване на клонове, съвместно изразяващи семейството на киназата с много на брой редове (MLK) са били неуспешни, установявайки че свързаноизразяването на киназите с много на брой редове (MLK) може да влияе на клетъчното оцеляване (Bergerson et al., *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**, 231: 153-155; Nagata, et al. *EMBO J*, **1998**, 17: 149-158). Следователно, при разработване на анализа на цялостна клетка за проследяване на индуцираните от киназа с много на брой редове (MLK) биохимични проявления, може да е необходима клетъчна линия, съдържаща индуцируем промотор, който да преработва на киназа. Например, 2C12 клетъчна линия се изразява с транзактиватор, контролиран от тетрациклин. Когато след това клетките се инфектират с ген посредством индуцируем промотор *tetO*, проявлението на този ген добре се контролира от тетрациклин в средата (Shockett et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, 92: 6522).

За количествено определяне на активността на киназата с много на брой редове (MLK) може да се измери фосфорилирането на низходящите субстрати като киназа с много на брой редове 4 (MLK4), завършваща с азот киназа (MLK) или с-jun, посредством многострачен анализ, както е описано по-горе. Друг начин за количествено определяне на активността на киназата с много на брой редове (MLK) в цели клетки е да се използва аналитична активност, като с-jun луцифераза система, търговски продукт PathDefect system (Stratagene, LaJolla, CA). В тази система тетрациклин-индуцируемата клетъчна линия се инфектира с два плаزمиди. Единият плазмид изразява кондензиране на транзактивиращ домен на завършваща с аминокиселина с-jun с подкъса GAL4 DNA свързващ домен (GAL4 DBD кондензиран протект). Другият плазмид носи кодиращите последователности за луцифераза от светилка, състоящи се от пет последователни повтарящи се звена на мястото



се свързва GAL4. При активация на инхибитора много на брой редовно изразяващият ензим, свързващ се с азот киназа (NCK) с GAL4 кондензиран протеин, се фосфорилира, свързва се с местата на свързване GAL4 и индуцира копирането на люциферазния ген. Люциферазата лесно се анализира чрез прибавяне на нейн ензимат (Promega, Madison, WI) и измерване на хемилуминесценцията.

Пример 31. Свързване на инхибирането на членове на семейството на киназата с много на брой редове (MLK) с мотоневронното оцеляване

Свързване на обектите с мотоневронна култура от гръбначния мозък на плъхове

Гръбначни мозъци се взимат от ембриони на Sprague-Dawley плъхове (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) на ембрионална възраст (E) 14.5-15. Отделят се клетки само от вентралната част на гръбначния мозък и се обогатяват с мотоневрони чрез центрофугиране с градиент 6.5% метризамина, както е вече описано (Henderson, et al., 1993) и се анализират за степен на чистота посредством оцветяване с неотрофиново рецепторно антиген с висок афинитет (IgG 192, Boehringer-Mannheim) (данните не са показани). Клетките се посаждат в плочки с 96 гнезда, предварително покрити с поли-L орнитин и ламинин (всеки от 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) с плътност от 6×10^4 клетки/ cm^2 в химично дефинирана среда, свободна от сыворотки (Wopenstein, et al., 1979, *supra*). За разграничаване на свързването от ефектите на оцеляване, прибавянето на съединенията към културите се извършва след първоначален период на свързване в продължение на 1-2 часа. Невронното оцеляване се оценява след 4 дни при използване на калцеин AM (Molecular Probes, Eugene, OR) във флуорометричен анализ на жизнеспособността (Bozyczko-Coyne, et al., 1993, *supra*). Микроскопското броене на невроните корелира директно с относителните флуоресцентни

стенности. Накратко, културните средини се разтваря в Wyssos фосфатно буферизиран салин (DPBS) и крайна концентрация от 6 μ M калцеин АМ се прибавя към всяко гнездо на плочката. Плочките се инкубират в продължение на 30 минути при 37°C, след което сериално се разреждат в Wyssos фосфатно буферизиран салин (DPBS). Флуоресцентният сигнал се рачита при използване на петляц флуориметър на Millipore (Cytofluor 2250) при възбуждане 485 nm и излъчване 538 nm. За всяка плочка, специален фон, получен от гнездата, получили калцеин АМ, но не съдържащи клетки, се изважда от всичките стойности. Линейността на флуоресцентния сигнал се потвърждава от концентрацията и времето за инкувиране за материална и клетъчни плътности при тези експерименти. Пример за процентното оцеляване в сравнение с контролните мотоневрони в присъствие на изпитваните съединения при 250 nm, е показан в Таблица 3.

Синяване на кортикални неврони

Церебрални кори се взимат от ембриони на на плъхове на 18-ия ембрионален ден и ензимно се разлагат до получаване на суспензия на единични клетки. Клетките се посаждат с плътност 1.56×10^5 клетки/cm² в чашки, по-късно с 36 гнезда с тъканна култура, покрити с полиорнитин/ламинин, в свободна от сывум Neural Basal среда, съдържаща B27 добавки. Плочките се покриват с разтвор на полиорнитин/ламинин (всяка 8 µg/ml) в PBS поне в предишния ден на два часа при 37°C. На 5-7-ия ден, кортикалните неврони се излагат на Ab25-35 (20 µM) или в присъствие или в отсъствие на тестваните съединения. Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) основни разтвори (1 µM) се приготвят в стерилна дейонизирана дестилирана вода. Относителното оцеляване на невроните се определя 48 часа след приобщаването на пептид. При изпитване на безбензидиновата лактат дехидрогеназа (LDH) като индикатор за цялостта на плазматичната мембрана/оцеляване на клетките. Лактат дехидрогеназата (LDH) се измерва при използване на Cytochrome

100

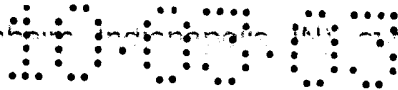

 Detection Kit (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) съгласно инструкциите на производителя. Данните са изразени в процентно инхибиране на забавящата DAPI по отношение на културите, третираны само с PBS (0).

Таблица 3

Формула	Кортикални неврони	Мотоневрони		Със 7 клетки	Със 7 клетки	Със 7 клетки	Със 7 клетки
	Оцеляване	Оцеляване	%JNK	DLK	MLK1	MLK2	MLK1
	% Контрол	% Контрол	Или @	%JNK	%JNK	%JNK	%JNK
	@ 350 nm	@ 350 nm	500 nm	Или @	Или @	Или @	Или @
				500 nm	500 nm	500 nm	500 nm
II ¹	40, 36	330	30	99,70	99,99	99,97	97,90
III ²	47, 90	315	99	99,99, 99	99, 99	99, 99	99, 99
I ³	22, 04	177	88	20, 20	94, 30	0	99, 20
IV ⁴	30, 30	185	97	99, 10, 99, 0	99, 99, 99	0	99, 99

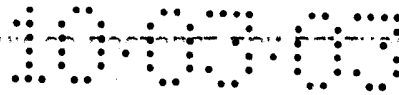
¹Обединението има формула II, в която Z₁, Z₂, R₁ и R₂ са водород, X е SO₂ или NH, Y е хидроксил.

²Обединението има формула III, в която Z₁ и Z₂ са водород; X е SO₂ или NH, Y и R₁ са хидроксил, и R₂ е хидроксил.

³Обединението има формула I, в която A₁, A₂, R₁, R₂, R₃ и R₄ са водород, B₁ и B₂ заедно представляват кислород, R₅ е /CH₂CH₂/ или R₅ е CH₂CH₂ и R₆ е SO₂.

⁴Обединението има формула I, в която A₁, A₂, R₁, R₂, R₃ и R₄ са водород; B₁ и B₂ заедно представляват кислород; R₅ е водород; R₆ е SO₂ или 2-пиримидинил; и X е SO₂.

Пример 32: Имунореспитация на ендогенната активност на забавящата с активност (JNK) от мотоневронна култура в отсъствие или присъствие на индолакарбазоли или кондензирани пиролокарбазоли



Прочистени мотоневронни клетки се разпределят в 96-well плати (както в Таблица 3) и пламнето го 100% клетките се оставят да се съединят в продължение на 24-72 часа. Преди пропускане, клетките се третират или с 0.005% асиметричен сулфоксид или с 500 nM съединение в продължение на 2 часа в среда на азот. След това клетките се изплакват с леденостуден буфериран с фосфат салин и се разтварят в 0.1 ml Triton буфер, както е описано по-горе в Пример 40. Излизатът от мотоневронни култури се анализира да наблюдават брой клетки и се имунопресинтизира с антигено на свързваща с азот киназа 1 (MLK1) (cat. #sc-474) разтварена от Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Активността на свързващата с азот киназа (MLK) се имунопресинтизира се анализира с присъединяване на ^{32} P-ATP и с филтър, както е описано по-горе. Сравнява се профилът на инхибиторната активност на 4 изпитвани съединения в мотоневроните и в Cos7 клетките, свързани с азот киназа или MLK 1, MLK 2 или MLK 3 (Таблица 3).

Пример 30: Корелацията между инхибиране на активността на свързваща с азот киназа 1 (MLK1) и инхибиране на активността на киназа на бързи редове (MLK) в Cos7 клетки и на активността на коинциденция трансферази и трансферини

За да се определи дали инхибирането на пътя на свързващата с азот киназа (MLK) регулирано от тези кинази корелира с неограничени съединения, две съединения, които са били изпитвани за инхибиране на свързващата с азот киназа (MLK) в Cos7 клетки, свързани с азот киназа 1 (MLK) и киназа с много на брой редове 3 (MLK3). След 48 часа период на пропускане на инхибитора, клетките се третират с 0.005% асиметричен сулфоксид или с 500 nM съединение в продължение на 2 часа, наблюдавано от клетъчно развиващо. Клетките се имунопресинтирират и активността на киназата се определя, както е описано по-горе. Резултатите са дадени като процентна инхибиране на контролната проба, в която контролата е активност на свързващата с

свободна киназа (МК) в присъствието на флутигидрофосид. Таблица 4 може да се види че най-много от съединенията, които са активни при спазване на критерия за пробна и контролна (средна стойност на инхибитори) на МК-3 активизират на завършването с آزاد киназа (МК).

Таблица 4

Влияние на индоло- и инденокарбозоли върху активността на завършващата с آزاد киназа (МК) в 500 пиктол, свръхизразяващи киназа с много на бр. ретард 2 (МК 2)

Съединение	Хелинадритрансфераза активност		10 Инхибитори на МК активност (средна)
	Горначен мозък	Гребен мозък	МК-3 в 500 пиктол
11-1	+	+	84
11-2 ⁸	-	-	98
11-3 ⁷	+	+	94
11-4	+	+	88
11-5 ⁵	+	+	83
11-6 ⁶	+	+	92.5
11-7	-	+	84
11-8 ⁹	-	+	90
11-10	-	+	95.5
11-11 ¹	-	+	86
11-12	-	+	98
11-13 ¹⁰	-	+	90
11-14 ⁴	+	-	88
11-15 ¹¹	+	-	94
11-16 ¹²	+	+	98.5
11-17 ¹³	-	-	70
11-18	-	-	88
11-19 ¹⁴	+	-	98
11-20 ¹⁵	+	-	92.5
11-21 ¹⁶	+	-	88
11-22 ¹⁷	-	-	44
11-23 ¹⁸	-	-	9

Съединение с формула 1, в която А, А', R, R', R'' и R, са водород, R и R' могат да представляват кислород, R'' е водород, R' е 5-метил-2-тиримидинил.

*Съединения с формула I, в която А, А', В, В', В'', В''' и В₄ са водород, Н и Н₂ заедно представляват кислород, га е $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{N}$, и X е CN .

Abstract

активизирането на кинезита е много на брой редове (MKC) може да доведе до индуциране на с-тип копиране като се получава повече с-тип протони. Подвижността на кинезита на с-тип протони е около 10^{-10} cm/sec. Според стандартен график известен като график Габриел от *Nature* (Gabriel *et al.*, 1954, стр. 304-306), даден за сравнение. Силномерът на

А. А. ПОПОВ

Мотоневроните (ембрионален ден 3.5) се изолират по имунологичен метод, описана пръввинуа. Понасно в Black-Schagda et al. (Development, 1991, 111, 221-232) падено за сравнение с изменения, както е описано в Wang, et al., Neuron, 1990, 5, 1071-1081, дадено за сравнение. Преместени мотоневрони се култивират в реду следата в специфична култура (2 ml/ml) поддържащо покрита с поли-D-лизинов и поли-D-лизин (1 mg/ml, Upstate Biotech). Културната среда е L15 с натриев бикарбонат (225 mg/l), глюкоза (20 mg/ml), прогестерон (2×10^{-6} M), натриев селенит (2×10^{-6} M), кофалибамин (0.1 mg/ml), тиоминал (0.1 mg/ml), пермийдиумтетрафеномидин и 10% fetal calf serum.

C

C

Учене (Фигура 101.2) Случаи на карбид на ниво 10% извършват пробни с по-добри и по-закривени изразности в сравнение с контролните кълмове (Фигура 11.2). След четирин дни, активността на сдвигането с 10% извършват карбид на ниво 10% (Фигура 11.2). Средното Δ е 60%, извършват, контролирана с растежен фактор 141%, симпатични ганглии нервни (Fol) извършват Δ е 63%, контрола, третирана с фактора на растежа на корените

Убеждение, что подбросил орудиями на пулевики эмоционально
Мотивация с добротой от похвалы

1. (Фигура 10А). Това изследване показва, че при моторния към някои аспекти на активността на Свединения III. Морфологичните, метаболитните, третираните със Свединение III показани резултати изобщо не са способни да доведат тези параметри, които са малко повлияни от тези метаболитни с мускулен екстракт (фигура 11). След 4 дни в култура, 55% от метаболитите са живи със Свединение III в сравнение с 42% с мускулен екстракт. При 300 нм, метаболите третираните със Свединение III, оценяват III нм в продължение на поне една седмица (фигура 12).

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΠΡΟΣΧΕΔΙΑΖΟΝΤΑΣ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

поеждовоременно забременявали оплохове от вида *Spizella monticola* (Linn.) (Muller, 1931, 1932). Момчето излиза от инкубатор, окончателно покълнало, със самостоятелно излизане от гнездото през 10-12 дни.

Половото поведение като се започне от деня на разклатване (24) и забременяване (25) на P10 или P20, първоначално протича в кръста се обвива в упоритизирани кривави оплователи в областта от гръбначния мозък, съдържаща полов диморфични гръбначни здръ на bulbosacrogenus (BNB) и периферната област, съдържаща microcaernus (BC) и levator ani (LA) мускули се отявяват след перфорация на мембраната на яйцата на фруакта. Областта от гръбначния мозък, съдържаща гръбначни здръ на bulbosacrogenus (BNB) се компресира, сокотата се с паралич, мембраната се повтотат и се съветва с clesmestri vlogi (Muller, 1931, 1932, 1933, 1934, 1935, 1936, 1937, 1938, 1939, 1940, 1941, 1942, 1943, 1944, 1945, 1946, 1947, 1948, 1949, 1950, 1951, 1952, 1953, 1954, 1955, 1956, 1957, 1958, 1959, 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969, 1970, 1971, 1972, 1973, 1974, 1975, 1976, 1977, 1978, 1979, 1980, 1981, 1982, 1983, 1984, 1985, 1986, 1987, 1988, 1989, 1990, 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558,

Свързаната криза се додиробутира в продължение на 5 минути при
стайна температура; след това плазмата се отлепя и се замразява при -20°C.
Посредством радиационен имунологичен анализ се измерва нивото на
свръхмалите тестостерон (10^{-7} нг/мл/тест/група). Резултатите от метода идват от
Kilbuck et al. Steinhilb, 1972, 26, 311-321, дадено за сравнение.

[illegible]

Journal of Management Inquiry 18(6) 709–724

[illegible]

През време на ранния перинатален живот на женските дръхове (кбс) емоционален стап до поствнатален ден 14 (14), 4. повече от 90% от мотоневроните в ОМБ са от мотоневроните (OMN) (Bardwell, J. M., 1996, 17, 157-170).
Падено за сравнение: при мъжките животни мотоневроните в ГВР са по-малко стимулират изразените пенилни мускули, въпреки че те са по-малко чувствителни за рефлекси. Тесткуларното отделяне на ендокринни вещества регулира ОМН мотоневронната смърт в мъжките животни и предотвратява в голяма



C



Несколько лет применялся препарат ¹²⁵I-антитело к галактопротеину, который индуцирует иммунорезистентность. Однако исследования показали, что стимуляция в зависимости от дозы приводит к снижению иммунореактивности в интактных и трансплантатных животных. Таким образом, антитело к галактопротеину, введенное в дозе 0,1 мг/кг, стимулирует иммунореактивность в трансплантатах, в дозе 0,2 мг/кг – в интактных животных. Таким образом, дозу 0,2 мг/кг можно считать оптимальной для стимуляции иммунореактивности. Исследования с использованием ретрансплантационных контролей (фигура 17Б и Таблица 1) показали, что дозировка, вызывающая максимальное образование антител, не вызывает подавления иммунореактивности в ретрансплантатах. Однако в дозе 0,2 мг/кг антитело вызывает подавление иммунореактивности в ретрансплантатах, но в дозе 0,1 мг/кг антитело не вызывает подавления иммунореактивности в ретрансплантатах.



Таблица 2

1. ПОДПОЗИТИВНА МОТОЦЕРРОНИА

Treeingland	n	Interval, Mean (SD)	SD	95% CI for mean
Canada	2	20/244 13/457	12.65 4.33	1.13
England III-2	2	55/420 70/770	10.10 10.60	12.27
Germany III-2	2	90/987 170/1012	10.51 22.12	11.43

Измерват се нивата на фосфорилираната MKK4 при използване на фосфо-MKK4 специфично антитяло (New England Biolabs, Beverly, MA), което разпознава монофосфорилираната форма на MKK4 или чрез имунопетно (Фигура 22Б) или чрез ELISA (Фигура 22В). Администрирането на MPTP повишава нивата на фосфорилирана MKK4 в substantia nigra до пет пъти над контролните нива (Фигура 22Б). Издигането на пиковите става 4 часа след администриране на MPTP и съвпада с пиковите CNS нива на MPP⁺. Фосфорилирането на MKK4 с помощта на MPTP се усилва при предварително третиране с 1-депренил, което показва, че това фосфорилиране протича с помощта на MPP⁺ (Фигура 22В). Още повече, фосфорилирането на MKK4 частично се инхибира от предварително третиране с Съединение III-3 в доза (1 mg/kg), която предизвиква защита спрямо индуцирана от MPTP нигронабраздена допаминергична загуба (Фигура 22В). Тези данни показват, че MPTP (MPP⁺) активира MKK4, низходящ субстрат на киназата с много на брой редове 3 (MLK-3). Още повече, тези данни показват, че известен инхибитор на киназата с много на брой редове 3 (MLK-3) инхибира активирането на пътя на тази киназа *in vivo*.

Пример 37: Възпаление

Индуциране на IL-1 и TNF- α посредством LPS в THP-1 клетки и действие на индолокарбазоли и пиролокарбазоли върху тяхната индукция

Избират се клетки на имунната система, тъй като много кинази са свързани в регулирането на редица имунологични функции, например, индуциране на синтеза на цитокини и индуциране на биологичния отговор на цитокините. Окорозна работа (Hambleton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2774-2778, дадена за сравнение) показва, че третирането клетъчна линия, получена от моноцит с LPS причинява бързо активиране на активността на завършващата с азот киназа. Когато моноцитите влизат в

контакт с бактериални ендотоксини, като липополизахарид (LPS), те продуцират възпалителните цитокини IL-1 и TNF- α . Инхибирането на продуцирането на тези два цитокина може да бъде ефективно третиране на някои възпалителни нарушения на имунната система. Тези цитокини могат лесно да се измерят посредством ELISA. Ние направихме опити да определим (1) дали индоло- и кондензираните пиролокарбазоли могат да инхибират синтеза на IL-1 и TNF- α в нашата моноцитна клетъчна линия THP-1, (2) дали завършващата с азот киназа се активира от липополизахарид (LPS) в THP-1 клетки, и (3) дали активирането на завършващата с азот киназа посредством липополизахарид (LPS) може да бъде инхибирано посредством индоло- и кондензирани пиролокарбазоли.

Експериментални методи

THP-1 клетките нарастват в RPMI 1640 среда, обогатена с 10% ембрионален волски серум. Липополизахарид (LPS) (*E. coli* serotype 0111:B4, TCA екстрахиран) се доставя от Sigma и се разтваря в PBS. ELISA набор за анализиране на IL-1 и TNF- α се доставя от Boehringer-Mannheim и анализите на THP-1 културната среда се извършват, според изискванията на производителя. От всеки анализ се получават стандартни криви, съгласно направленията.

Експериментите се провеждат в плочка за култури с 12 гнезда, или с 1 или с 2 ml THP-1 клетки при концентрация 4×10^5 клетки/ml. IL-1 и TNF- α се индуцират при прибавяне на липополизахарид (LPS) към културната среда и средата се отделя по различно време след това за анализ на цитокини. Клетките се отделят чрез центрофугиране и супернатантите се замразяват при -70°C докато се анализират. За да се минимизират разходите, експериментите се извършват на дублирани култури и дублираните супернатанти се отделят чрез центрофугиране. Всеки супернатант се анализира двукратно. Основните разтвори на индоло- и кондензираните

пиролокарбазоли в 100% диметилсулфоксид се разреждат до желаните концентрации или в среда, съдържаща 10% ембрионален волски серум, или в среда, съдържаща 0.5 mg/ml BSA. Ако не е казано друго, съединенията се прибавят към THP-1 клетките един час преди прибавянето на липополизахарид (LPS).

Анализите за активност на завършващата с азот киназа се провеждат след имуноутаяване на протеина на завършващата с азот киназа от екстракт на разтворени THP-1 клетки. Пелетизираните THP-1 клетки се разтварят върху лед, в продължение на 15 минути в 500 μ l Frac буфер (10 mM Tris HCl, pH 7.5, 50 mM натриев хлорид, 30 μ M натриев пирофосфат, 1 mg/ml BSA, 1% Triton-X-100). Екстрактът се центрофугира в продължение на 10 минути при 14K и към супернатанта се прибавят 5 μ l анти тяло на завършваща с азот киназа (Santa Cruz). Екстрактът се подлага на ротация в продължение на 60 минути при 4°C, прибавят се 75 μ l промит протеин А Сефароза (20% тегл./об. във Frac) и екстрактът се подлага на ротация в продължение на още 30 минути за да може комплексът на анти тялото да се свърже с протеин А Сефарозата. Протеин А Сефарозата се промива два пъти с Frac буфер, веднъж с 20 mM Hepes, pH 7.6, 20 mM магнезиев двухлорид, 2 mM DTT, след което се инкубира в продължение на 15 минути при 30°C в 30 μ l киназен буфер (20 mM Hepes, 20 mM магнезиев двухлорид, 2 mM DTT, 1 μ g рекомбинантен c-jun и 2 μ M ATP- γ -³²P, 2 μ Ci. Реакцията се спира чрез прибавяне на 10 μ l 4 x SDS гелово натоварен буфер, нагрява се в продължение на 3 минути при 80°C и протеините се анализират върху 10% SDS гел. Гелът се суши, излага се на радиоактивен фосфор върху плочка и радиоактивните ивици се анализират.

Резултатите от първоначалните експерименти показват, че липополизахарид (LPS) в концентрация 2 μ g/ml дава максимален добив на IL-1 и тази концентрация на липополизахарид (LPS) се използва във всички следващи експерименти. Минималното време след прибавянето на

липополизахарид (LPS) за максимален добив на цитокини се определя при взимане на аликвотни части от средата за анализ по различно време след прибавянето на липополизахарид (LPS). Първият експеримент показва, че и IL-1, и TNF- α достигат максимален добив при по-малко от 5 часа след прибавянето на липополизахарид (LPS). Тъй като на ранното време за събиране е 2.4 часа при първия експеримент, вторият експеримент се провежда със средно събиране, започващо 15 минути след прибавянето на липополизахарид (LPS). Резултатите от този експеримент бяха такива, че когато се анализира само TNF- α , максимален добив се достига 3 часа след прибавянето на липополизахарид (LPS). Незначително количество TNF- α в средата се постига 90 минути след прибавянето на липополизахарид (LPS).

Бързото достигане на максимален добив показва много добро регулиране на синтеза на 2-citoкините – бърз синтез и бързо регулиране. Културите от клетки се третират в продължение на 30 минути преди прибавянето на липополизахарид (LPS) или с актиномицин D, инхибитор на синтеза на RNA, или с циклохексимид, инхибитор на синтеза на протеина. Средата се отделя 3 часа след прибавянето на липополизахарид (LPS) и TNF- α се анализира. Синтез на нова рибонуклеинова киселина и синтез на нов протеин се изискват за индуциране на TNF- α , тъй като никаква TNF- α не е открита в средата от клетки, третирани с инхибитор. Следващите експерименти се провеждат за да се определи, дали Съединение III-3 ще инхибира индуцирането на IL-1 и TNF- α . Съединение III-3 инхибира индуцирането и на IL-1, и на TNF- α със стойности на IC₅₀ 267 nM и 139 nM, респективно. Резултатите от тези експерименти са получени с клетки в среда, съдържаща 10% ембрионален волски серум. Тъй като анализът с тъкани от гръбначен мозък и основен преден мозък за неотрофичната активност на съединенията се провежда в среда, свободна от серум (500 μ g/ml BSA), интересно беше да се определят стойностите на IC₅₀ за инхибиране на IL-1 и TNF- α в среда, свободна от серум. Когато THP-1

клетките се третират със Съединение III-3 в среда, свободна от серум (500 μ g/ml BSA). IC50 се намалява 10 пъти от 269 nM на 23 nM. Ако не е казано друго, всички експерименти, съгласно настоящото изобретение, се провеждат в среда, свободна от серум. При инхибирането на индуцирането на IL-1 и TNF- α в THP-1 клетки посредством Съединение III-3 може да се предположи, че Съединение III-3 може да бъде ефикасно като терапевтично средство при лечение на патологични състояния, причинени от продуциране на гореспоменатите количества от тези цитокини. Септичният шок е също болестно състояние. Септичният шок се причинява от растежа на грам-негативни бактерии при циркулацията, която обратно освобождава големи количества ендотоксин, липополизахарид (LPS). След това липополизахарид (LPS) стимулира главно моноцитите и макрофагите до получаване на големи количества IL-1 и TNF- α , които след това причиняват масивно увреждане на тъканите и, в много случаи, смърт.

Различни съединения са изпитвани за способност да инхибират TNF- α и са сравнени със способността да инхибират завършващата с азот киназа. Резултатите са показани в Таблица 6.

Таблица 6

Съединение	THP-1 клетки		Свърхизразяване на MLK-3 в Cos 7 клетки
	TNF- α IC50 nM	JNK %инх. 500 nM	JNK %инх. 500 nM
III-1	49.4	93.5	83.8
III-3	29	93	94
I-2	>5000	79.5	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
III-4	462.5	81	66

III-5	4	110	96
III-7	590.5	84.5	54
III-8	11.5	51	94
III-10	4298	48	59
I-10	4500	62	94
I-11	686	51	92.5

Ефект на Съединение III-3 върху индуцирането на IL-2 в Jurkat клетки

Експериментите се провеждат за да се определи, дали Съединение III-3 инхибира индуцирането на IL-2 в Jurkat клетки.

Експериментални методи

Jurkat клетките нарастват в RPMI 1640 среда, обогатена с 10% ембрионален волски серум. TNF- α се доставят от Promega и анти CD3 и анти CD28 антителата се доставят от Pharmigen. Jurkat експериментите се провеждат в 200 μ l в плочка с 96 гнезда. IL-2 се измерват с ELISA набор, доставен от Boehringer Mannheim. Антителата на CD3 и CD28 се оставят да се свържат с пластмасата на плочката с 96 гнезда (18 часа в PBS) преди прибавянето на Jurkat клетките. Клетките се третират със съединения 1 час преди прибавянето на плочката, покрита с анти тяло. Антителата на CD3 и CD28 се използват за активиране на Т клетъчния рецептор и индуциране на IL-2. IL-2 се освобождават от Jurkat клетките между 6-тия и 24-тия час след инициране на индуцирането (Фигура 23A). Не се наблюдават съставни IL-2 (Фигура 23A CNT). Оценява се действието на Съединение III-3 (1 час третиране със Съединение III-3 преди индуциране) върху индуцирането на IL-2 (Фигура 23Б). Съединение III-3 в концентрация 500 nM инхибира индуцирането на IL-2 повече от 80% (Фигура 23Б). Експеримент за отговор на по-голяма доза се провежда със Съединение III-3 и със Съединение I-4, които показват стойности на IC₅₀ 139 nM за Съединение III-3 и 207 nM за Съединение I-4 (Фигура 23В).

Счита се, че всеки от патентите, заявките и отпечатаните публикации, споменати в настоящото изобретение, са дадени за сравнение.

Както могат да разберат специалистите в областта, могат да бъдат направени редица промени и модификации на предпочитаните аспекти на настоящото изобретение без да се напуска духа на настоящото изобретение. Счита се, че всички варианти се намират в обхвата на настоящото изобретение.

1. Метод за идентифициране на съединение, ефикасно при лечение на AIDS периферна невропатия, характеризиращ се с това, че включва клетка или клетъчен екстракт, съдържащ протеин на киназа с много на брой редове със съединение и определяне дали споменатото съединение понижава активността на споменатия протеин на киназа с много на брой редове.

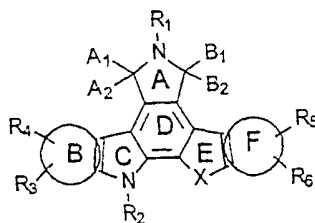
2. Метод, съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че споменатият протеин на киназа с много на брой редове се подбира от групата, състояща се от киназа с много на брой редове 1, киназа с много на брой редове 2, киназа с много на брой редове 3, киназа, създаваща леуцинов цип, киназа, създаваща двоен леуцинов цип и киназа с много на брой редове 6.

3. Метод, съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че активността на споменатия протеин се определя чрез измерване на активността или фосфорилираното състояние на субстрат на споменатия протеин, като споменатият субстрат се подбира от групата, състояща се от JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, Jun, ATF2, ELK1 и хомолога при бозайници AEX-3.

4. Метод, съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че активността на споменатия протеин се определя чрез измерване на активността на субстрат на споменатия протеин, количеството субстрат на споменатия протеин или mRNA, кодираща споменатия субстрат на споменатия протеин.

5. Метод за лечение на човек с AIDS периферна невропатия, характеризиращ се с това, че включва администриране върху споменатия човек на съединение, което инхибира протеин на киназа с много на брой редове във фармацевтично приемлива сол или разредител.

6. Метод, съгласно претензия 5, характеризиращ се с това, че споменатото съединение има формула



в която:

пръстен В и пръстен F, независимо един от друг, и всеки, заедно с въглеродните атоми, с които са свързани, образуват или

ненаситен шестчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в който от 1 до 3 въглеродни атома могат да бъдат заместени с азотни атоми;

ненаситен петчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в който или един въглероден атом е заместен с кислороден, азотен или серен атом; или

два въглеродни атома са заместени със серен и азотен атом, кислороден и азотен атом, или два азотни атома;

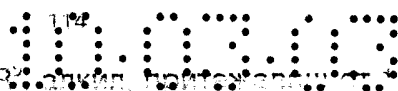
A¹ и A² заедно представляват кислород, и B¹ и B² заедно представляват кислород;

R¹ е водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен), арил, арилалкил, хетероарил и хетероарилалкил; COR⁹, където R⁹ е алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен) или арил, за предпочитане, фенил или нафтил; -OR¹⁰, където R¹⁰ е водород или алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен); -CONH₂, -NR⁷R⁸, -(CH₂)_nNR⁷R⁸, където n е от 1 до 4 (включен); или -O(CH₂)_nNR⁷R⁸; и или

R⁷ и R⁸ независимо един от друг са водород или алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен); или

R⁷ и R⁸ заедно образуват свързваща група с обща формула

-(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂-, в която X¹ е кислород, сяра или CH₂;



R^1 е водород, SO_2R^2 , CO_2R^2 , COR^2 , алкил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), за предпочитане, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен), алкенил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), за предпочитане, алкенил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен), или алкинил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), за предпочитане, алкинил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен) или монозахарил, притежаващ от 5 до 7 въглеродни атома (включен), където всяка хидроксилна група на монозахарида независимо от другите е или незаместена, или е заменена с водород, алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен), алкилкарбонилокси, притежаващ от 2 до 5 въглеродни атома (включен), или алкокси, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен); и или

всеки алкил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), алкенил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), или алкинил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен) е незаместен; или

всеки алкил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), алкенил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), или алкинил, притежаващ от 1 до 8 въглеродни атома (включен), независимо от другите е заместен с 1-8 арил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома (включен), за предпочитане, фенил или нафтил; хетероарил, флуор, хлор, бром, йод, циано, нитро, хидрокси, $-\text{OR}^7$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{NH}^+\text{R}^8$, $-\text{OCOR}^8$, $-\text{OCONHR}^8$, O -тетрахидропиранил, амино, NR^7R^8 , $\text{NR}^{10}\text{COR}^9$, $\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$, $\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{NHG}(\text{=NH})\text{NH}_2$, $-\text{NR}^7\text{SO}_2\text{R}^8$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$, където R^{11} е водород или алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, арил, притежаващ от 6 до 10 въглеродни атома, за предпочитане, фенил или нафтил, или хетероарил, и у 1 или 2, $-\text{SR}^{11}$, $-\text{CO}_2\text{R}^8$, $-\text{CONR}^7\text{R}^8$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}^7$, $-\text{CH}_2\text{OR}^7$, $-\text{CH=NNR}^{11}\text{R}^{12}$, $\text{OH}-\text{NOR}^{11}$, CH=NR^8 , $\text{CH=NNHCH}(\text{N=NH})\text{NH}_2$, $-\text{SO}_2\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$, $\text{PO}(\text{OR}^{11})_2$ или OR^7 , където R^{12} е остатък от аминокиселина след като се отдели хидроксилната група от карбоксилната група, и или

116

незаместен алкилен, притежаващ от 1 до 3 въглеродни атома (включен), или

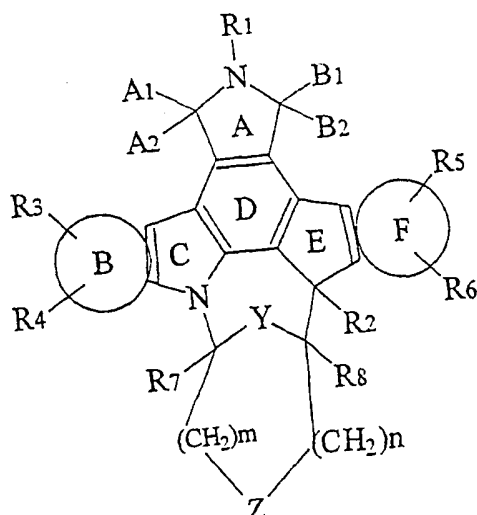
X е алкилен, притежаващ от 1 до 3 въглеродни атома (включен), заместен с една R^2 група, за предпочитане, OR^{10} , $-SR^{10}$, R^{15} , където R^{15} е алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома (включен), фенил, нафтил, арилалкил, притежаващ от 7 до 14 въглеродни атома (включен), за предпочитане, бензил; или

X е $-CH=CH-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-C(R^{10})_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})-$, $-C(OR^{11})(R^{11})-$, $-C(=O)CHR^{15}-$, $-CHR^{15}C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})CHR^{15}-$, $-CHR^{15}C(=NOR^{11})-$, $-CH_2Z-$, $-ZCH_2-$, $-CH_2ZCH_2-$, където Z е R^9 ; $C(OR^{11})(R^{11})$, O, S, $C(=O)$, $C(=NOR^{11})$, или NR^{11} ; или

A^1 и A^2 независимо един от друг са H, H; H, $-OR^{11}$, H, $-SR^{11}$; H, $-N(R^{11})_2$; или заедно представляват $=S$ или $=NR^{11}$; B^1 и B^2 заедно представляват кислород; и всеки от R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и X са, както са дефинирани по-горе; A^1 и A^2 заедно представляват кислород и B^1 и B^2 независимо един от друг са H, H; H, $-OR^{11}$, H, $-SR^{11}$; H, $-N(R^{11})_2$; или заедно представляват $=S$ или $=NR^{11}$; и всеки от R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 и X са, както са дефинирани по-горе.

7. Метод, съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 и R_6 са водород; B_1 и B_2 заедно представляват кислород; R_2 е CH_2CH_2OH ; и X е CH_2 .

8. Метод, съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че споменатото съединение има формула



10.03.03

в която:

пръстен B и пръстен F, независимо един от друг, и всеки, заедно с въглеродните атоми, с които са свързани, се подбират от групата, състояща се от:

(а) ненаситен шестчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в които от 1 до 3 въглеродни атома могат да бъдат заместени с азотни атоми;

(б) ненаситен петчленен карбоцикличен ароматен пръстен; и

(в) ненаситен петчленен карбоцикличен ароматен пръстен, в които, или

1) един въглероден атом е заместен с кислороден, азотен или серен атом;

2) два въглеродни атома са заместени със серен и азотен атом, кислороден и азотен атом, или два азотни атома; или

3) три въглеродни атома са заместени с три азотни атома;

R^1 е избран от групата, състояща се от:

а) водород, заместен или незаместен алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен арил, заместен или незаместен арилалкил, заместен или незаместен хетероарил, или заместен или незаместен хетероарилалкил;

б) $-C(=O)R^9$, където R^9 е избран от групата, състояща се от алкил, арил или хетероарил;

в) $-OR^{10}$, където R^{10} е избран от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома;

г) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ и $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, където p е от 1 до 4; и, където, или

1) R^{11} и R^{12} независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от водород и алкил, притежаващ от 1 до 4 въглеродни атома; или

2) R^{11} и R^{12} заедно образуват свързваща група с формула

$(\text{CH}_2)_p$, където X е избран от групата, състояща се от $-\text{O}-$, $-\text{S}-$ и $-\text{C}(=\text{O})-$.

R^1 е избран от групата, състояща се от водород, алкил, притежаваш от 1 до 4 въглеродни атома, хидроксилна група, алкокси, притежаваш от 1 до 4 въглеродни атома, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, заместен или незаместен арилалкил, притежаваш от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или незаместен хетероарилалкил;

R^3 , R^4 , R^5 и R^6 независимо един от друг са избрани от групата, състояща се от:

а) водород, арил, хетероарил, флуор, хлор, бром, йод, циано, CF_3 , нитро, хидроксид, $-\text{OR}^9$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{12}\text{R}^1$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{10}$, $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NR}^{10}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$;

б) $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$, където R^{14} е остатък от аминокиселина, след като хидроксилната група от карбоксилната група се отдели;

в) $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$ или $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$, където R^{2A} е същия като R^2 ;

г) $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^2$, $-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$, където y е 0, 1 или 2;

д) алкил, притежаваш от 1 до 6 въглеродни атома, алкенил, притежаваш от 2 до 6 въглеродни атома и алкинил, притежаваш от 2 до 8 въглеродни атома, където

1) всеки алкил, алкенил или алкинил е незаместен; или

2) всеки алкил, алкенил или алкинил е заместен с от 1 до 6 групи, избрани от групата, състояща се от арил, притежаваш от 6 до 10 въглеродни атома, хетероарил, арилалкокси, хетероциклоалкокси, хидроксиалкокси, алкилоксиалкокси, хидроксиалкилтио, алкоксиалкилтио, флуор, хлор, бром, йод, циано, нитро, хидроксид, $-\text{OR}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$,



$X^2/(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^8$, $-\text{OCCONHR}^6$, $-\text{O}$ -тетра-хидропиранил,
 $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$,
 $-\text{NR}^{10}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{10}$,
 $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-\text{CH}=\text{NNHCH}(\text{N}=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^2\text{R}^{2A}$,
 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{10})_2$, $-\text{OR}^{14}$ и монозахарид, притежаваш от 5 до 7 въглеродни атома,
 където всяка хидроксилна група на монозахарида, независимо една от
 друга, е или незаместена, или е заменена с водород, алкил, притежаваш от 1
 до 4 въглеродни атома, алкилкарбонилокси, притежаваш от 2 до 6
 въглеродни атома или алкокси, притежаваш от 1 до 4 въглеродни атома;

X^2 е кислород, сяра или NR^{10} ;

R^7 и R^8 независимо един от друг са подбрани от групата, състояща се от
 водород, алкил, притежаваш от 1 до 4 въглеродни атома, алкокси,
 притежаваш от 1 до 4 въглеродни атома, заместен или незаместен
 арилалкил, притежаваш от 6 до 10 въглеродни атома и заместен или
 незаместен хетероарилалкил, $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$ и

$(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$; или R^7 и R^8 заедно образуват свързваща група с формула

$-\text{CH}_2-\text{X}^3-\text{CH}_2-$, където X^3 е X^2 или връзка;

m и n , независимо един от друг, са 0, 1 или 2;

Y е подбран от групата, състояща се от $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{N}(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}(\text{OR}^{10})-$
 и $-\text{CH}_2-$;

Z е подбран от групата, състояща се от връзка, $-\text{O}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})-$,

$-\text{CH}(\text{OR}^{10})-$, $-\text{N}(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}(\text{OR}^{10})-$, $\text{CH}(\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{17})-$, $-\text{N}(\text{R}^{17})\text{C}(=\text{O})-$,

$-\text{N}(\text{S}(\text{O})_2\text{R}^9)-$, $-\text{N}(\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$, $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{17})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})-$, $-\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{R}^{10})-$,

$-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$ и $-\text{CH}(\text{O}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^9))\text{CH}(\text{O}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{9A}))-$, където R^{9A} е същия като
 R^9 ;

R^{15} и R^{16} независимо един от друг са подбрани от групата, състояща се от
 водород, хидрокси, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{10}$, $-\text{O}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^9)$, хидроксиалкил и $-\text{CO}_2\text{R}^{10}$;

R^{17} е подбран от групата, състояща се от водород, алкил, арил и хетероарил;

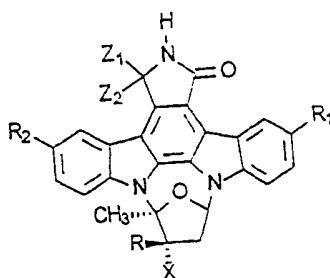
A^1 и A^2 са подбрани от групата, състояща се от H, H ; H, OR^2 ; H, SR^2 ; $\text{H}, \text{N}(\text{R}^2)_2$; и

група, в която A^1 и A^2 заедно образуват част, подбрана от групата, състояща се от $=O$, $=S$ и $=NR^2$;

B^1 и B^2 са подбрани от групата, състояща се от H, H ; H, OR^2 , $H, -SR^2$; $H, -N(R^2)_2$; и група, в която B^1 и B^2 заедно образуват част, подбрана от групата, състояща се от $=O$, $=S$ и $=NR^2$;

при условие, че поне една от двойките A^1 и A^2 или B^1 и B^2 образуват $=O$.

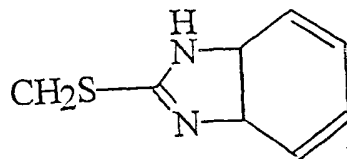
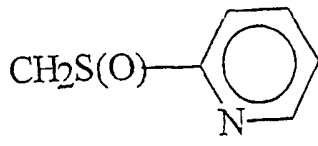
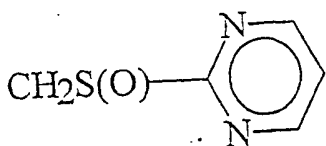
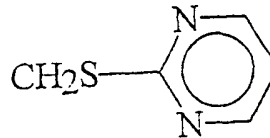
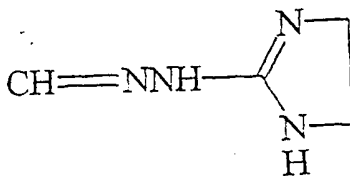
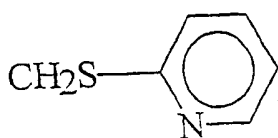
9. Метод, съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че споменатото съединение има формула



в която:

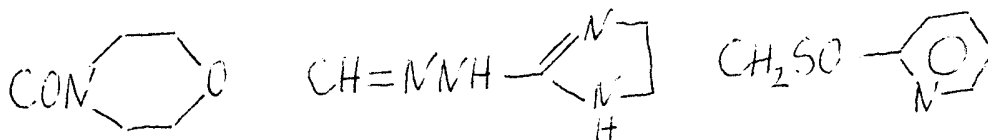
Z_1 е водород и Z_2 е водород, или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=O$;

R_1 е подбран от групата, състояща се от водород, хлор, $CH_2SO_2C_2H_5$, бром, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2n-C_4H_9$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, хидрокси, O - n -пропил, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-триазин)]$, $CH_2CH_2SCH_3$,



R_2 е избран от групата, състояща се от водород, бром, хлор, йод, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-триазин)]$, $CH_2CH_2SCH_3$ и CH_2OH ;

X е избран от групата, състояща се от водород, CH_2OH , CH_2NH -серин, CO_2CH_3 , $CONHC_6H_5$, $CH_2NHCO_2C_6H_5$, $CH_2NHCO_2CH_3$, CH_2N_3 , $CONHC_2H_5$, CH_2NH -глицин, $CON(CH_3)_2$, $-CH_2NHCO_2^-$, $CONH_2$, $CONHC_3H_7$, CH_2NH -серин, CH_2SOCH_3 , $CH=NOH$, CH_2NH -пролин, $CH_2CH_2(2-пиридил)$, $CH=NNHC(=NH)NH_2$, $CONH(CH_2)_2OH$, $CH=NNHCONH_2$, CH_2OCOCH_3 , $-CH_2OC(CH_3)_2O-$, $CH_2SC_6H_5$, $CH_2SOC_6H_5$, CO_2n -хексил, $CONHCH_3$; $CO_2(CH_2)_4CH_3$;



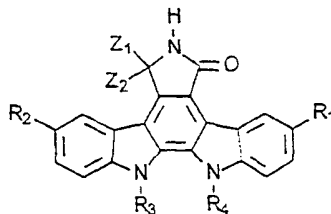
и

R е избран от групата, състояща се от хидрокси и OCH_3 .

10. Метод, съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че Z_1 и Z_2 са водород; X е CO_2CH_3 ; и R е хидрокси.

11. Метод, съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че Z_1 и Z_2 са водород; X е CO_2CH_3 ; и R_1 и R_2 са $CH_2SCH_2CH_3$; и R е хидрокси.

12. Метод, съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че споменатото съединение има формула



в която:

Z_1 е водород и Z_2 е водород, или Z_1 и Z_2 заедно образуват $=O$;

R_1 е водород или бром;

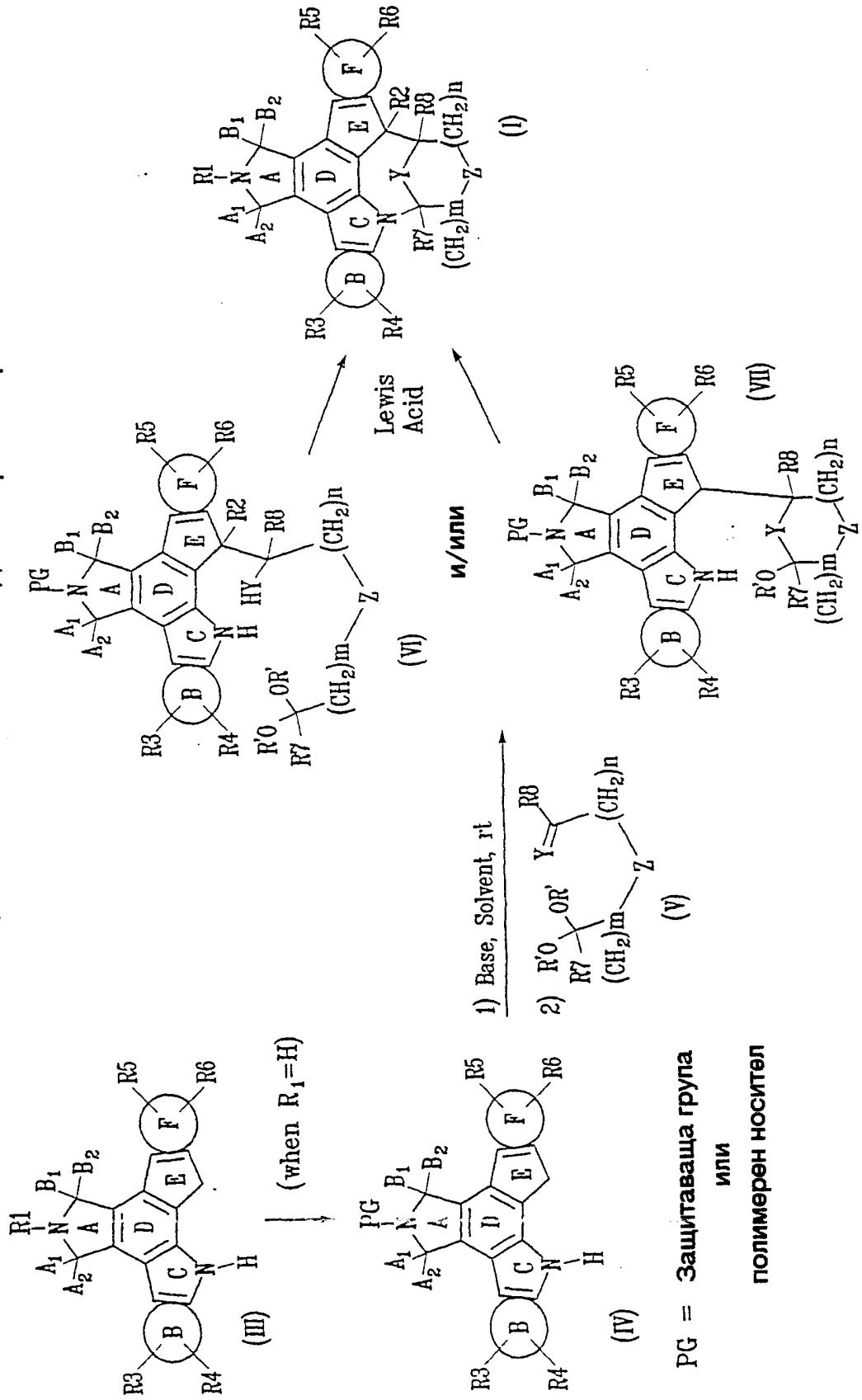
R_2 е водород;

R_3 е водород, $CH_2CH=CH_2$, $CH_2CH_2CH_2OH$ или $CH_2CH_2CH_2-N$ (where N is part of a 7-membered ring with an oxygen atom);

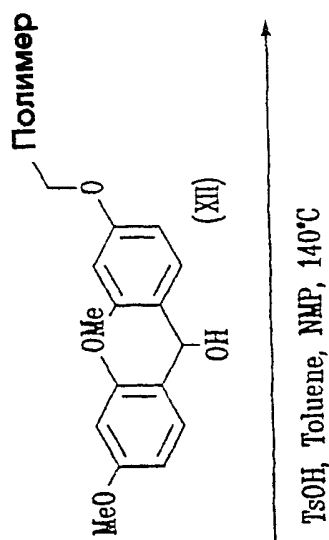
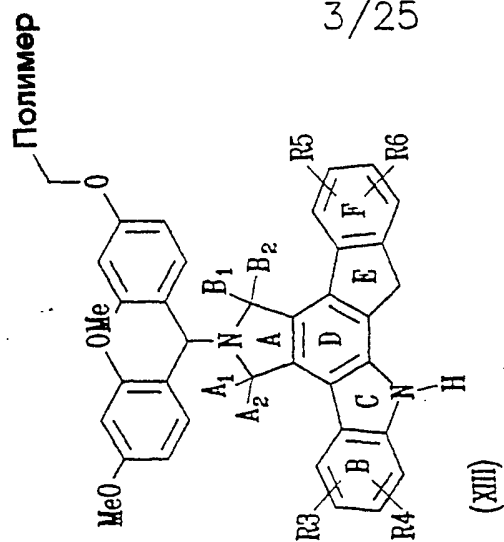
и

R_4 е водород, $CH_2CH=CH_2$ или $CH_2CH_2CH_2OH$.

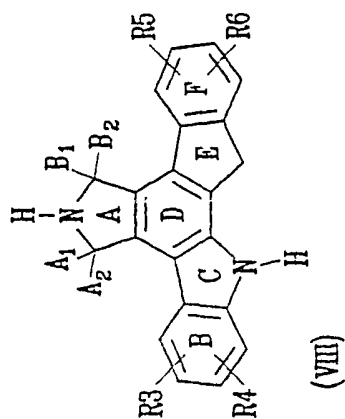
ФИГУРА 1
Общ синтез на мостови инденопилокарбазоли



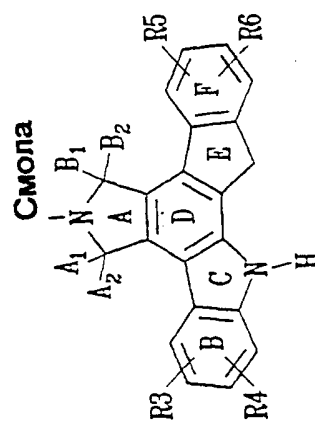
ФИГУРА 3
Получаване на свързани със смола инденопилокарбазоли



TsOH, Toluene, NMP, 140°C



(Полимер=съполистирен-1% дивинилбензен)



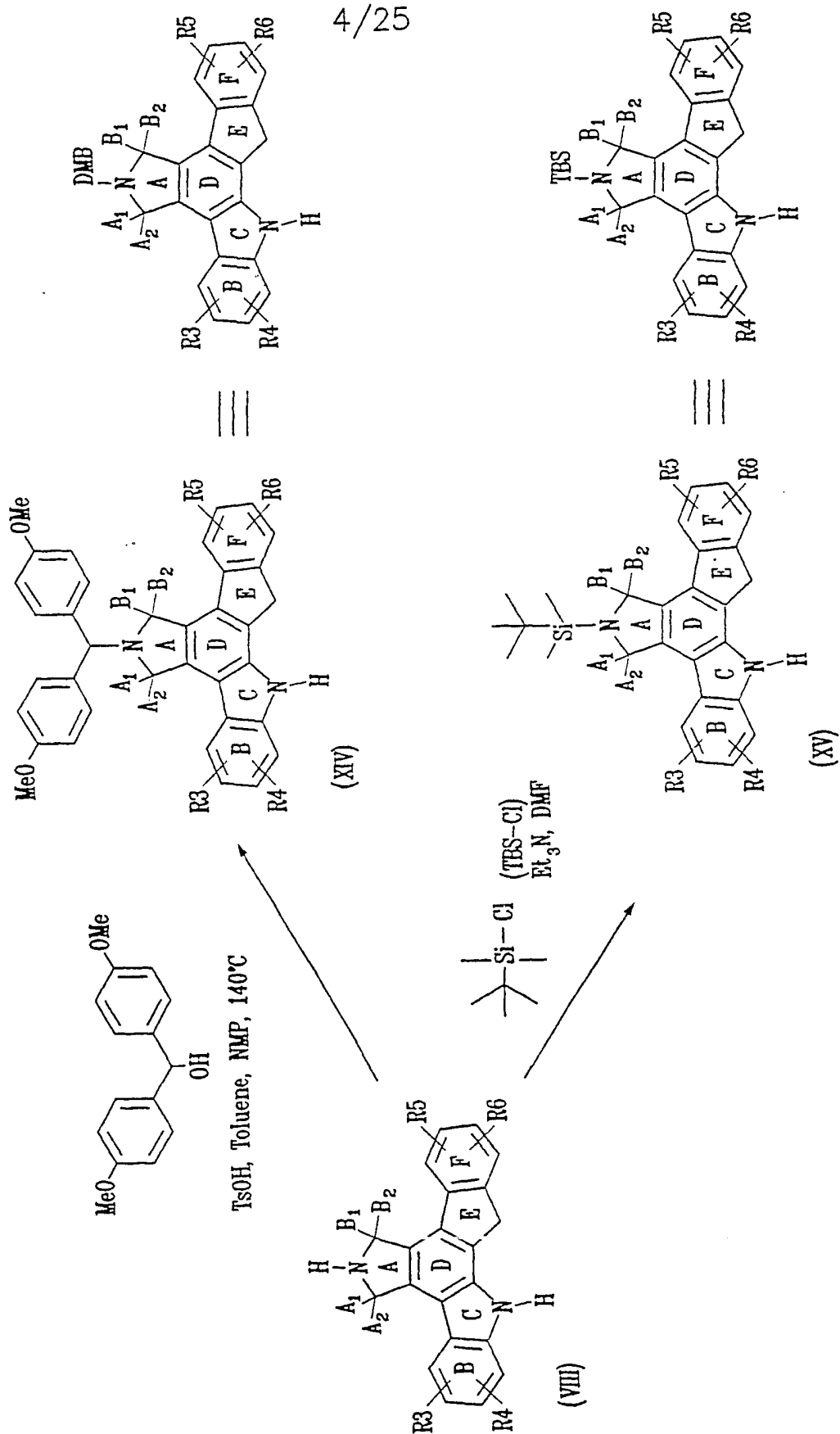
Смола

10.03.13

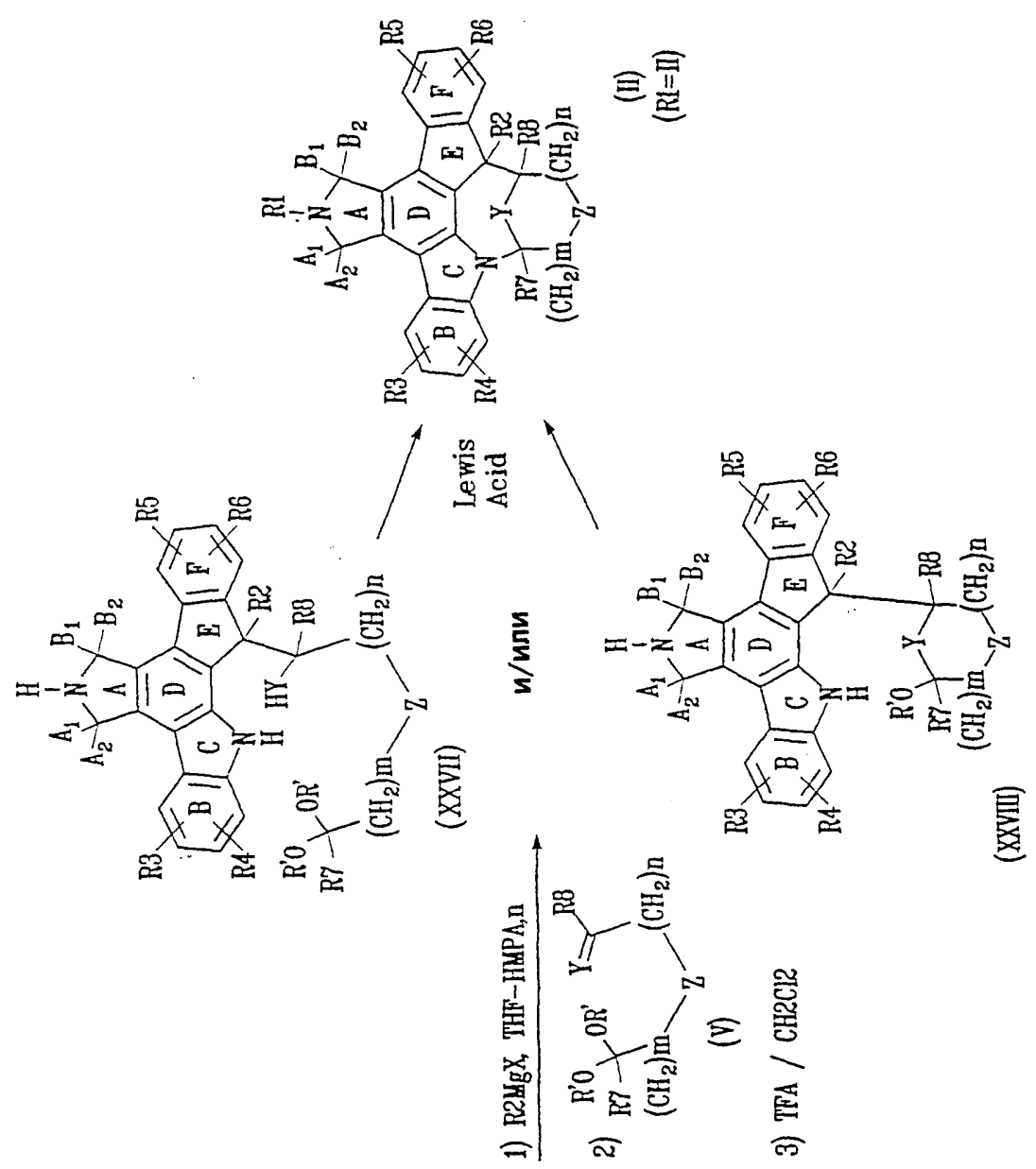
4/25

ФИГУРА 4

Получаване на защитени, разтворими инденопилокарбазоли



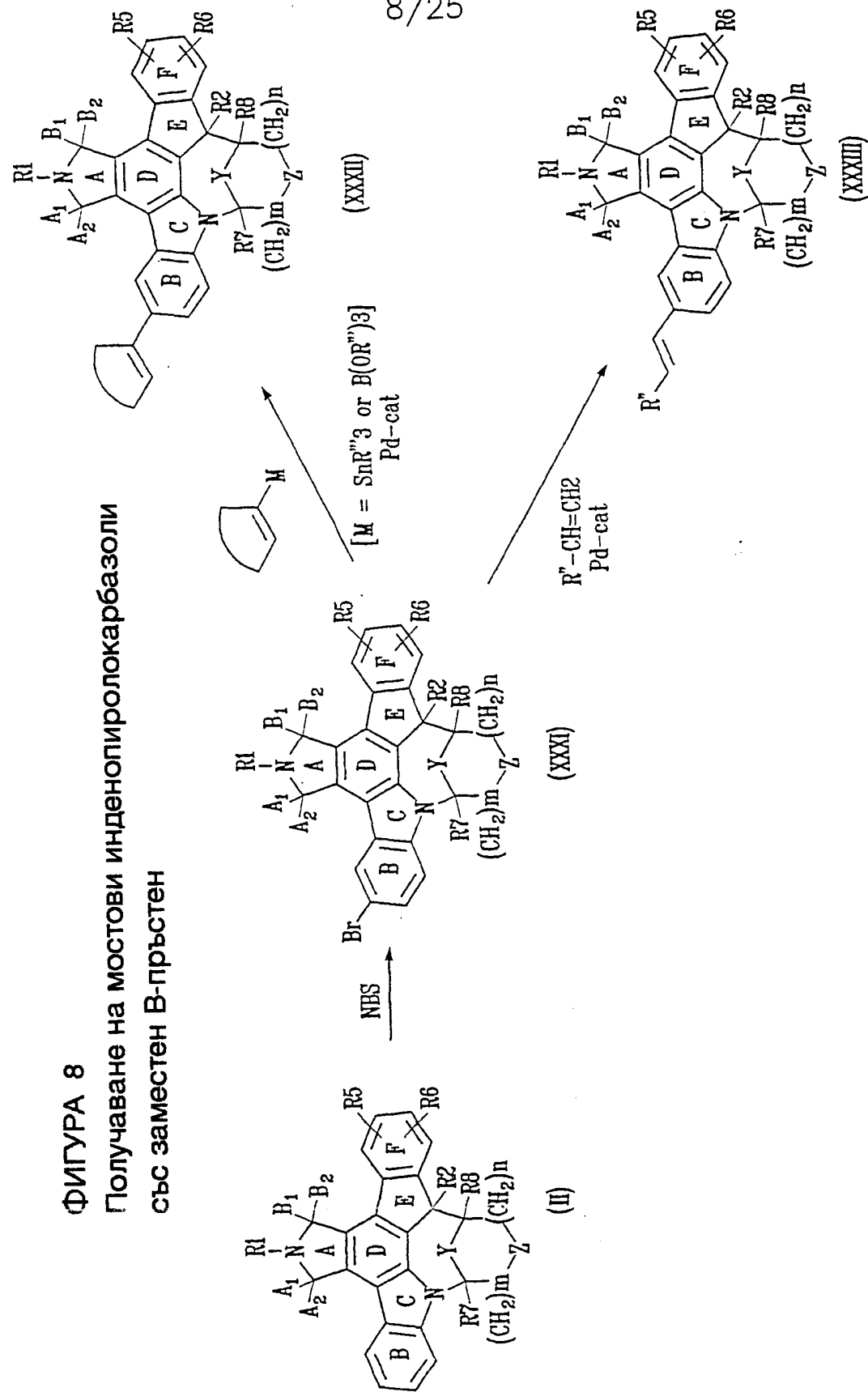
ФИГУРА 6
Получаване на мостови
инденопилокарбазоли
Метод А



10.03.03

8/25

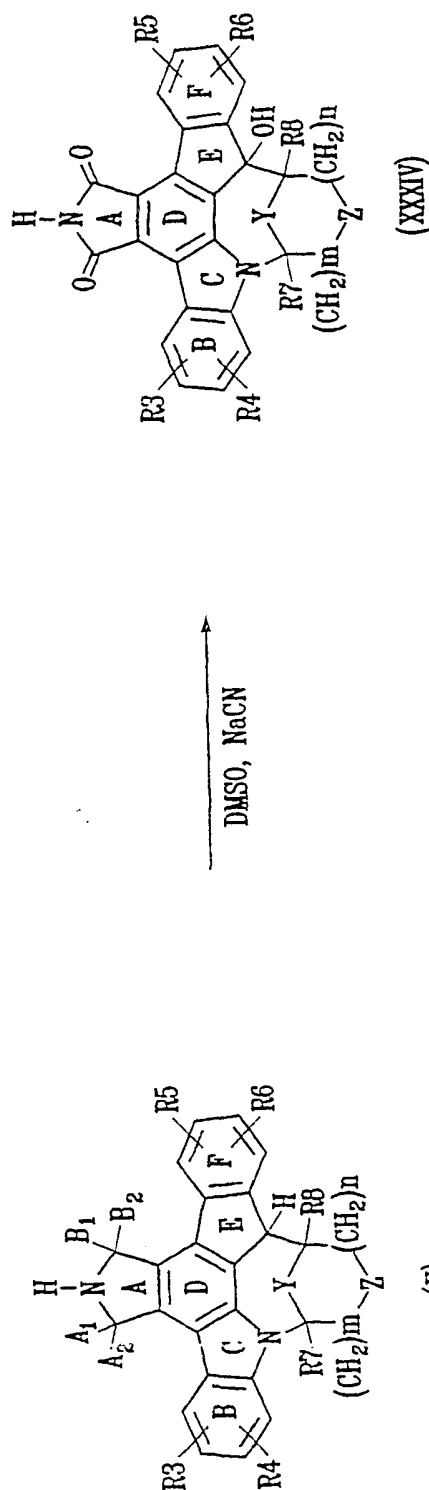
ФИГУРА 8
Получаване на мостови инденопилокарбазоли
със заместен В-пръстен



10.03.03

9/25

ФИГУРА 9
Получаване на Е-пръстен на мостови инденопилокарбазоли



when

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

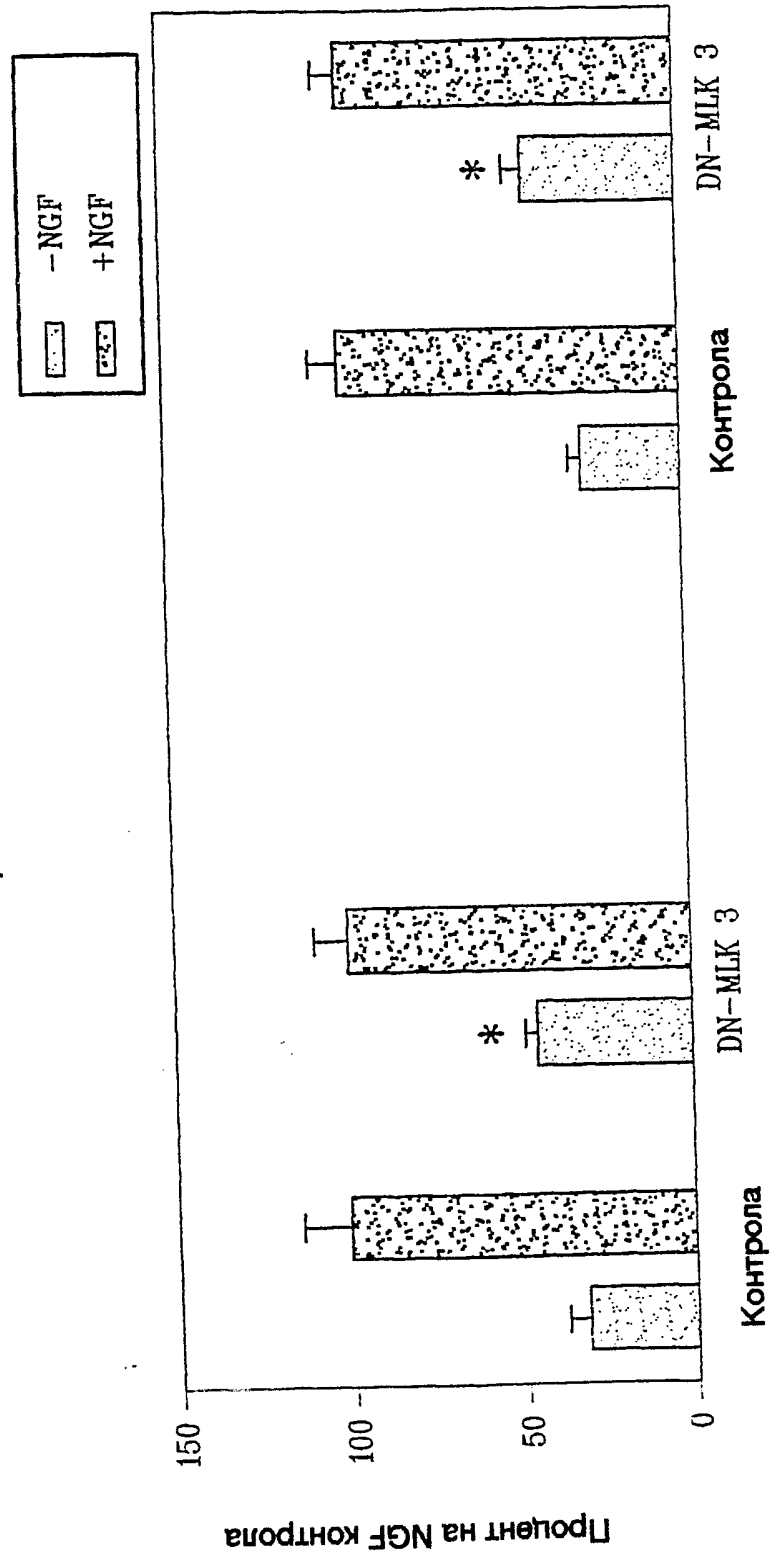
or

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

10.03.03

10/25

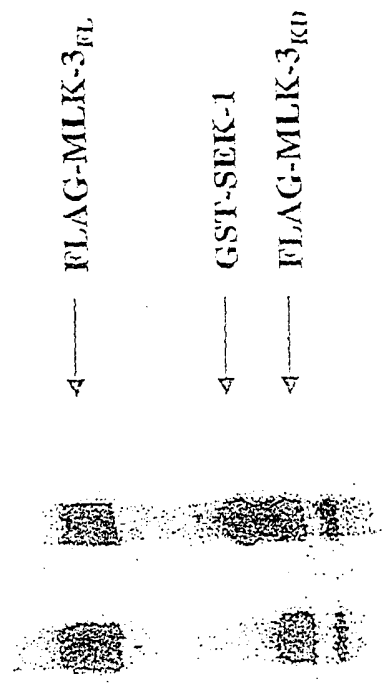
ФИГУРА 10



*статистическа разлика между контролата и DN-MLK-3 в отсъствие на NGF
($p < 0.05$ T-тест 2-анализ)

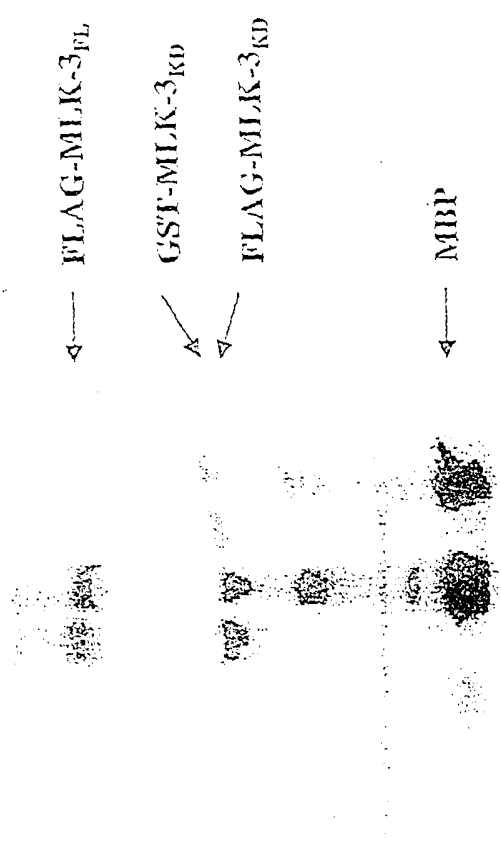
ФИГУРА 11А

FLAG-MLK-3
Kinase-dead GST-SEK-1
FLAG-MLK-3 + Kinase-dead SEK-1



ФИГУРА 11Б

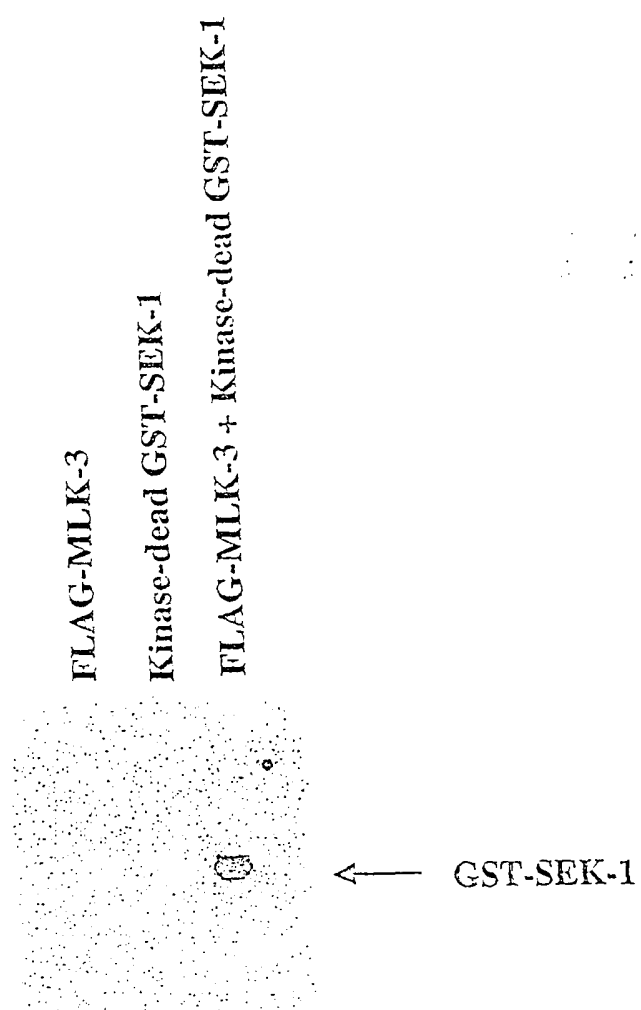
MBP
Control
Control + MBP
FLAG-MLK-3
FLAG-MLK-3 + MBP
GST-MLK-3^{KD}
GST-MLK-3^{KD} + MBP



10.03.03

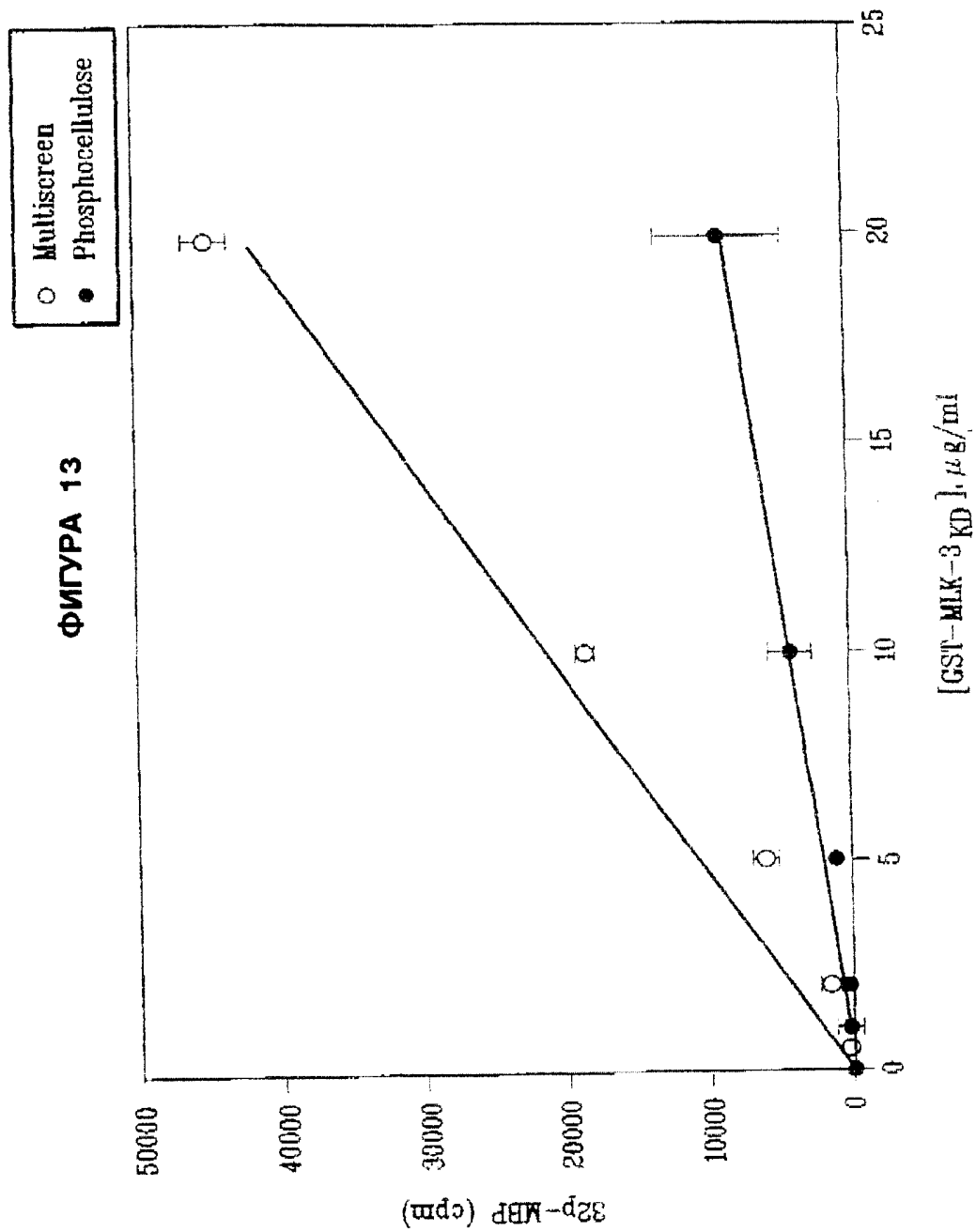
12/25

ФИГУРА 12



10.03.03

13/25

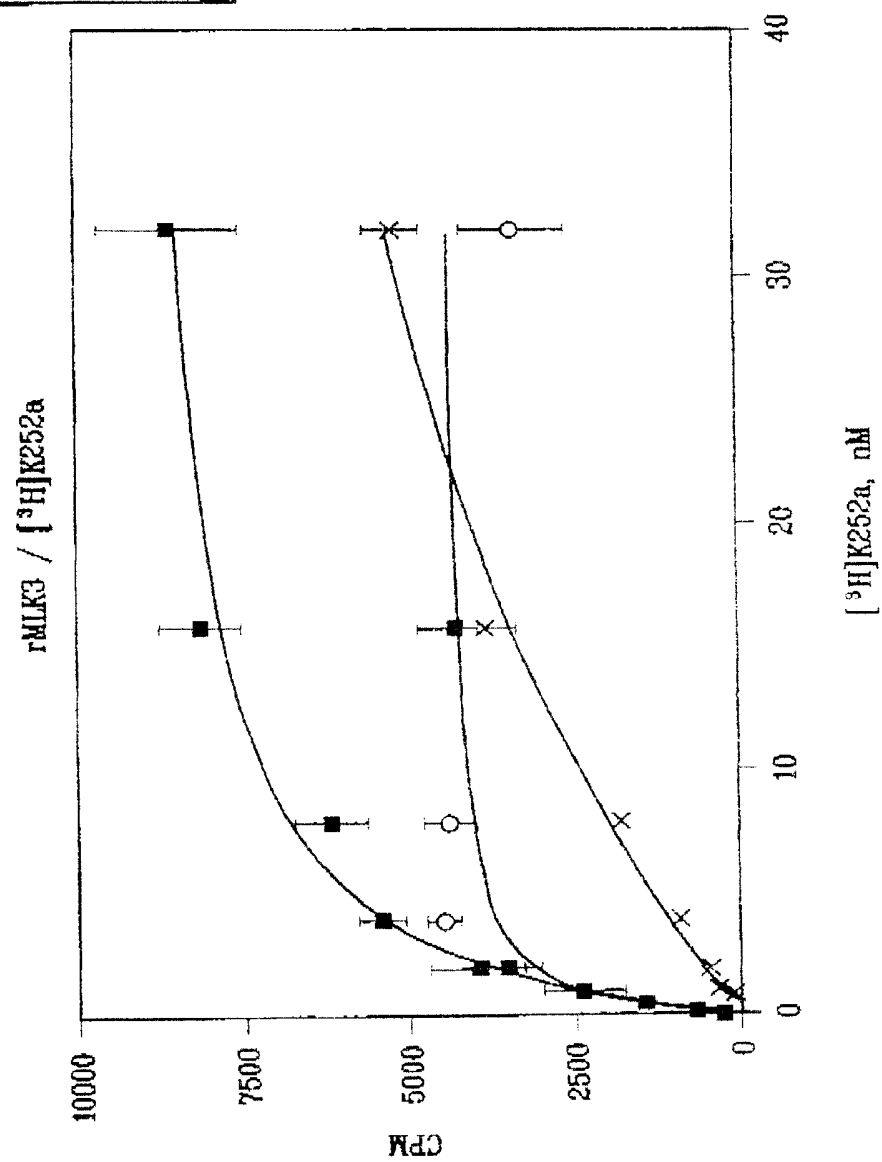


10.03.03

14/25

ФИГУРА 14

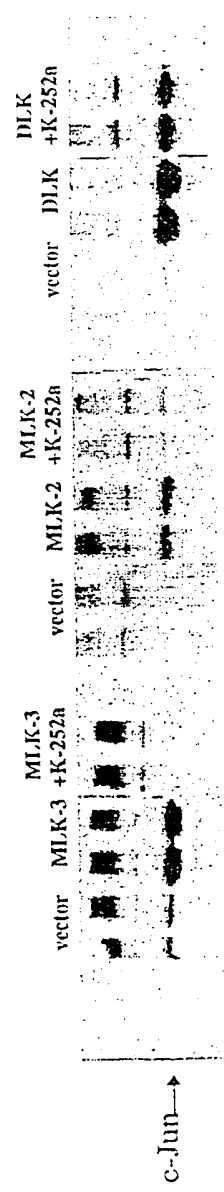
■ Total Binding
× NonSpecific Binding
○ Specific Binding
 $K_d = 0.89 \text{ nM}$
 $B_{max} = 4514 \text{ CPM}$



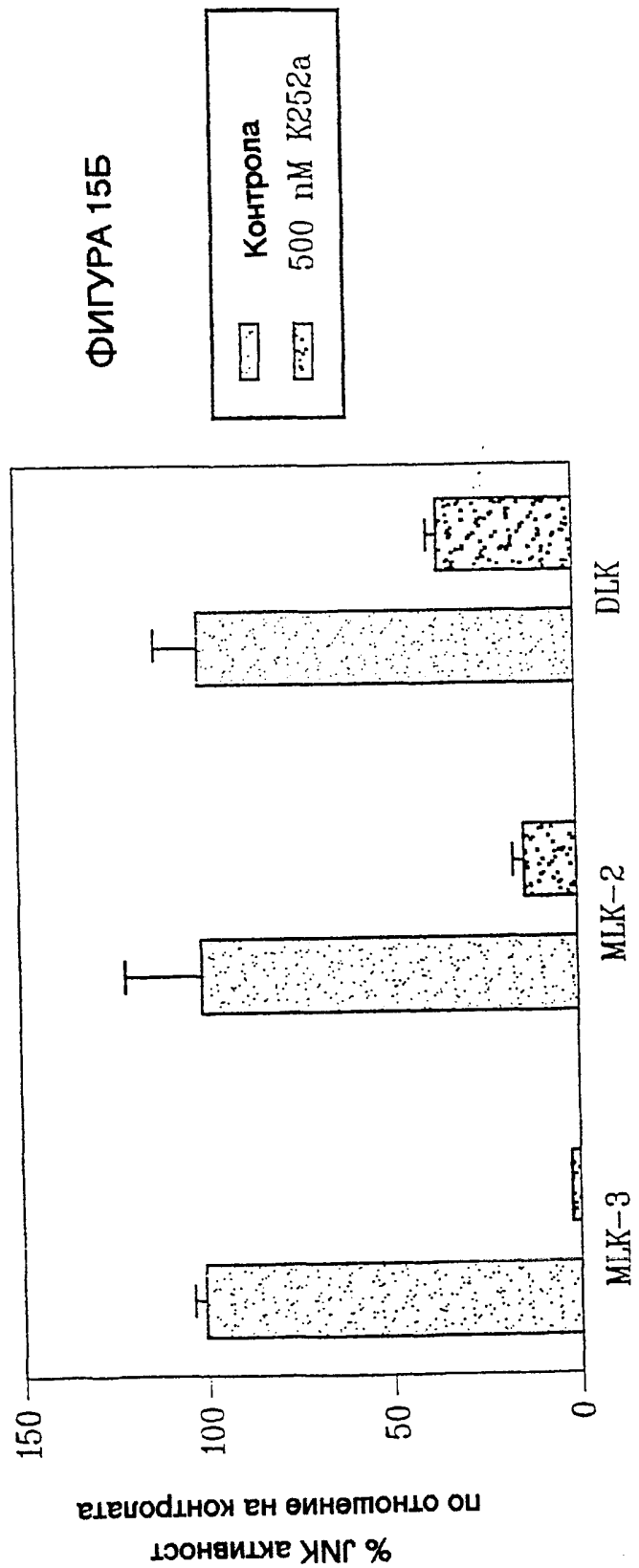
10.03.03

15/25

ФИГУРА 15А



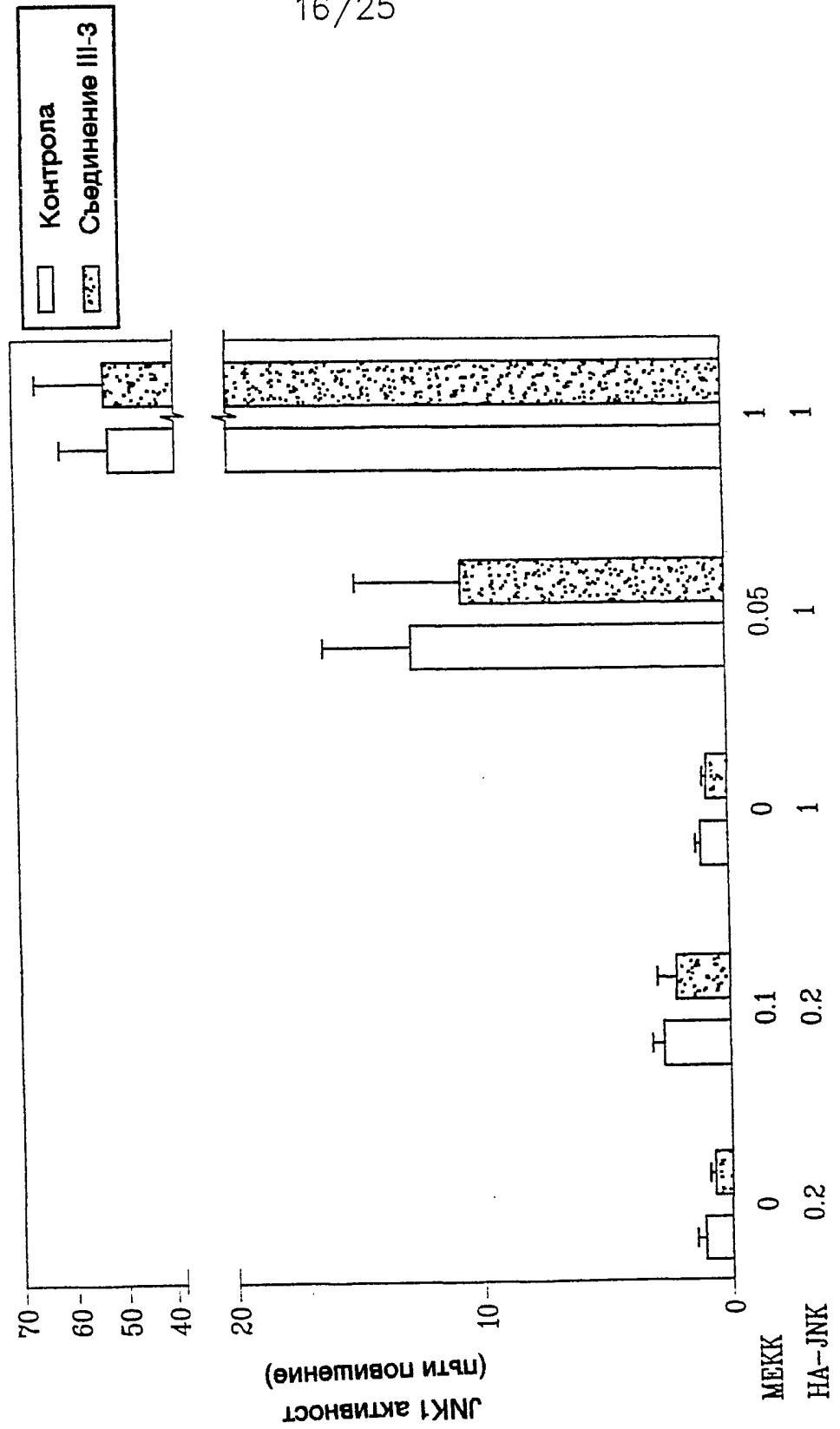
ФИГУРА 15Б



10:03:03

16/25

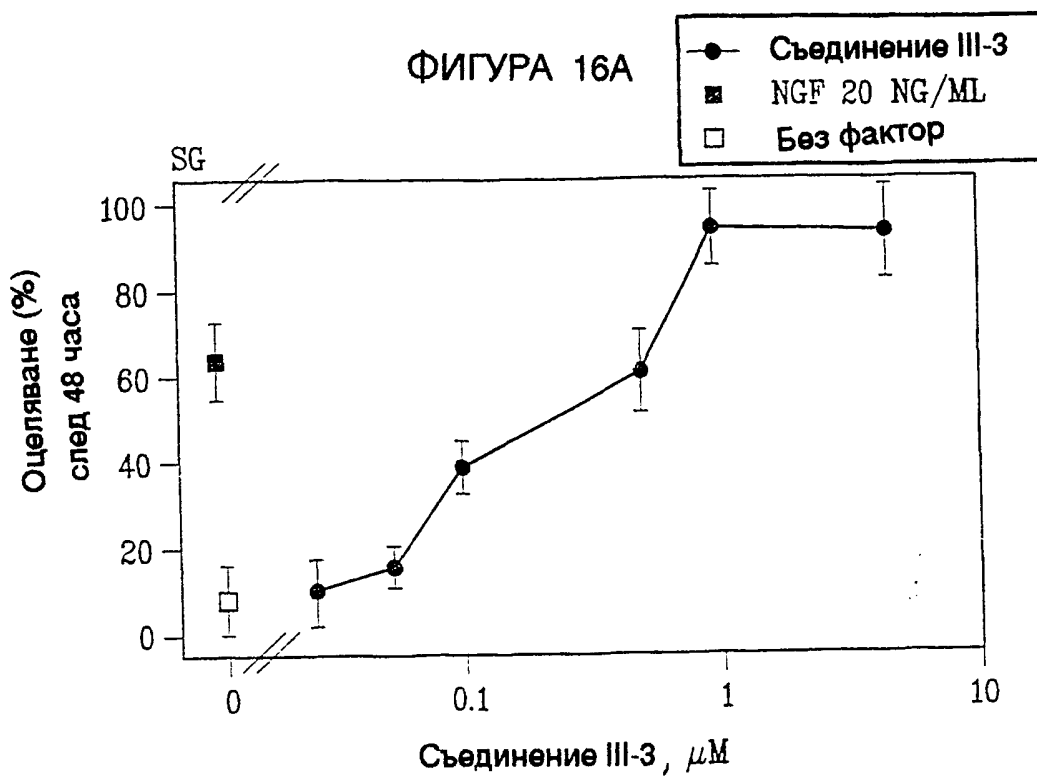
ФИГУРА 15В



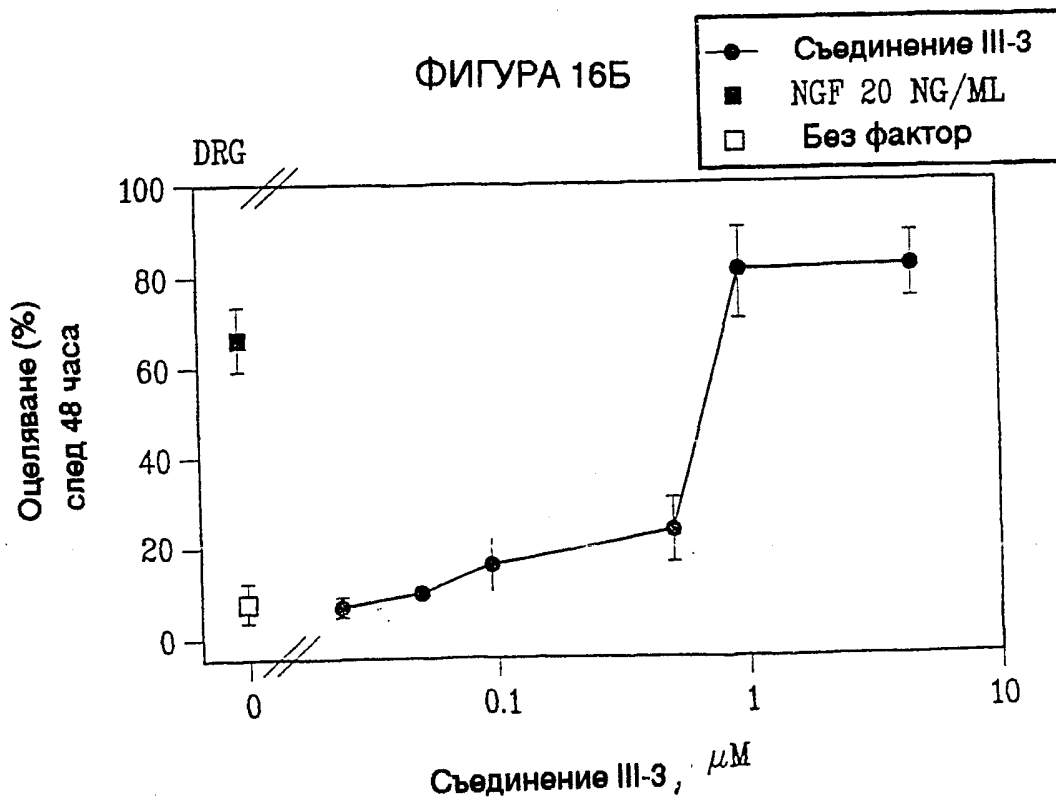
10:03:03

17/25

ФИГУРА 16А



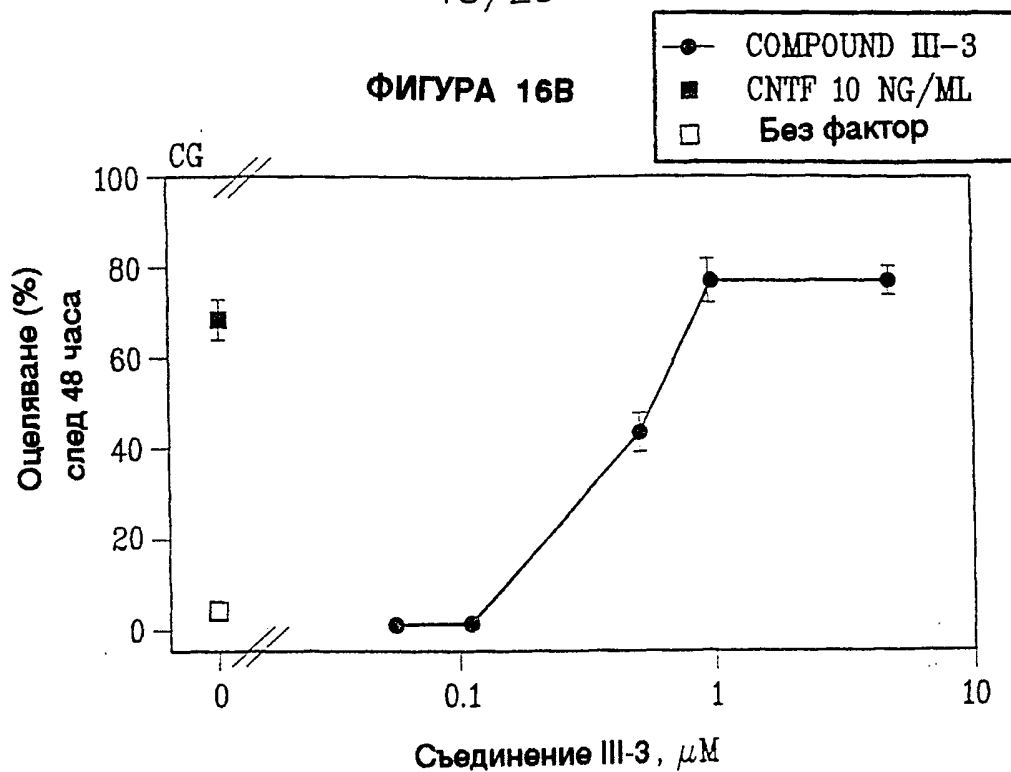
ФИГУРА 16Б



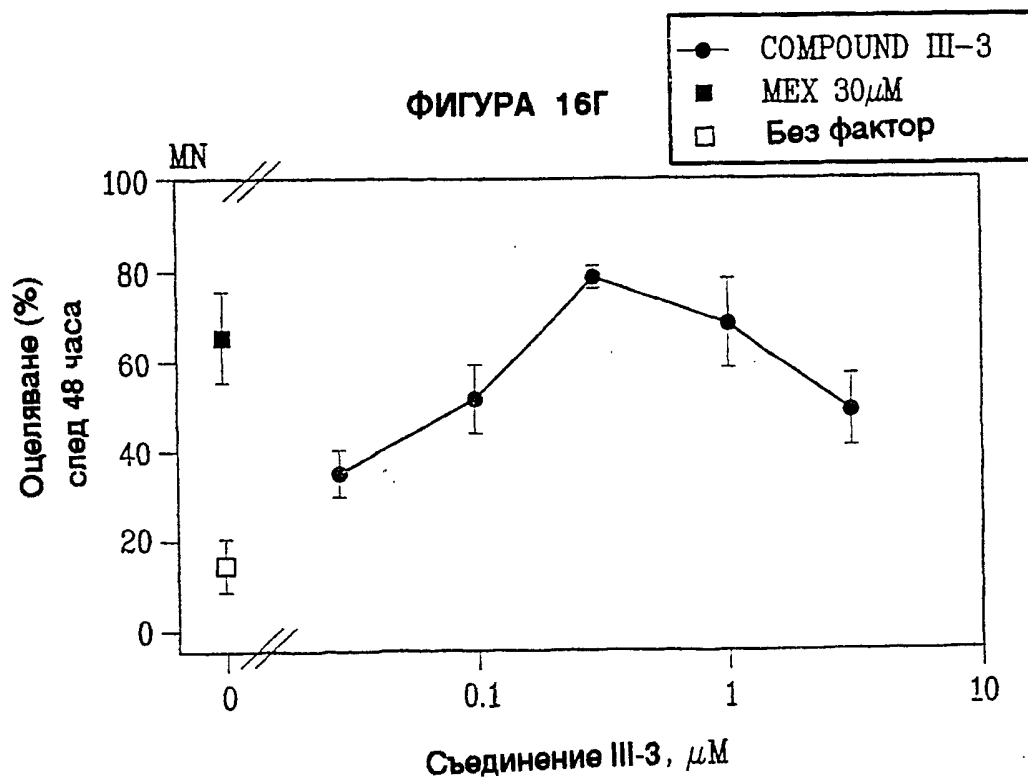
10.03.03

18/25

ФИГУРА 16В



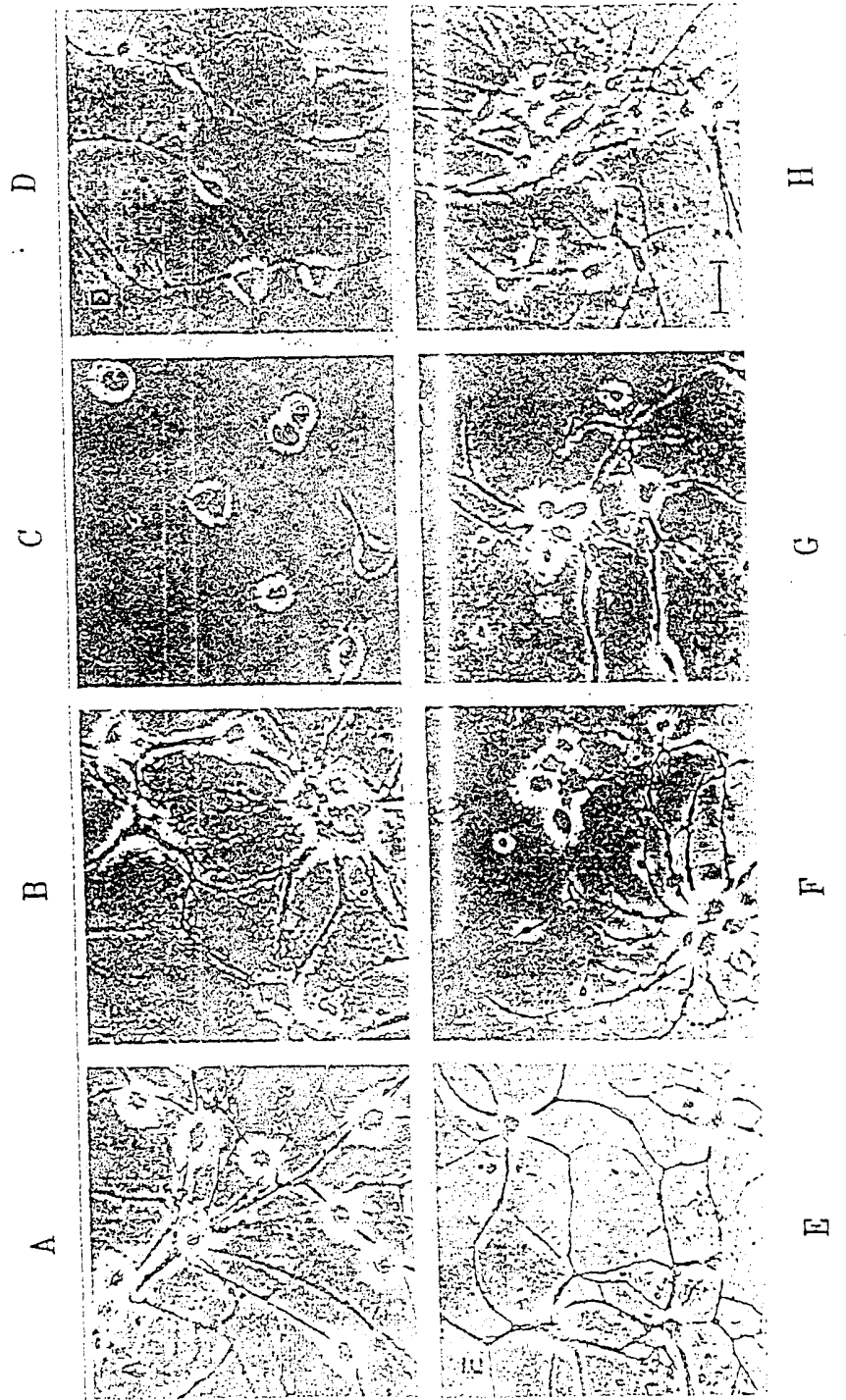
ФИГУРА 16Г



10.03.03

19/25

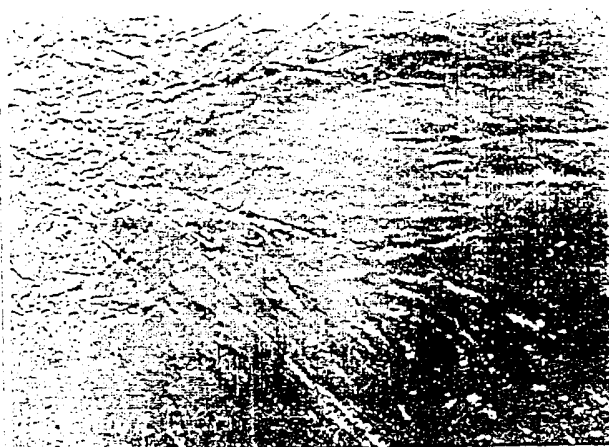
ФИГУРА 17



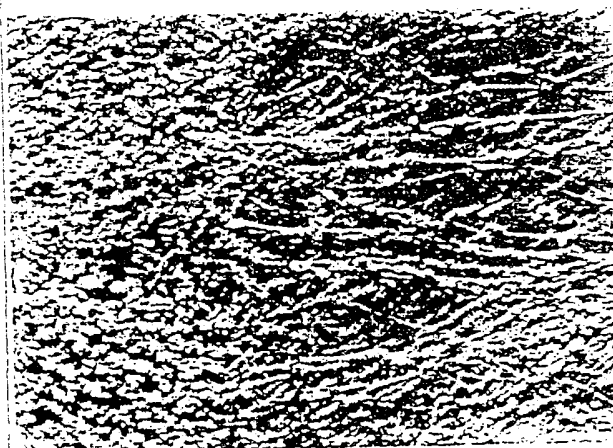
10.03.03

20/25

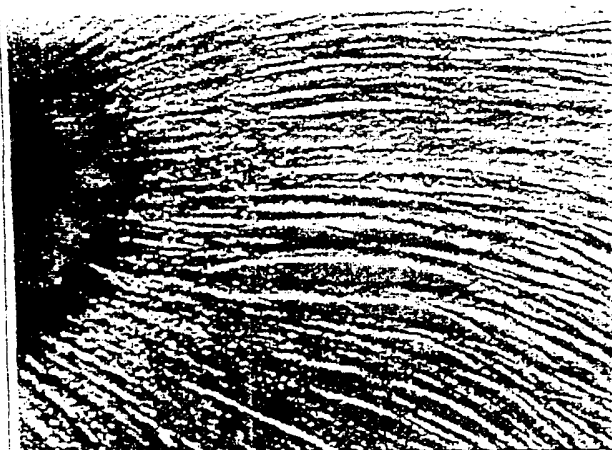
ФИГУРА 18



Контрола



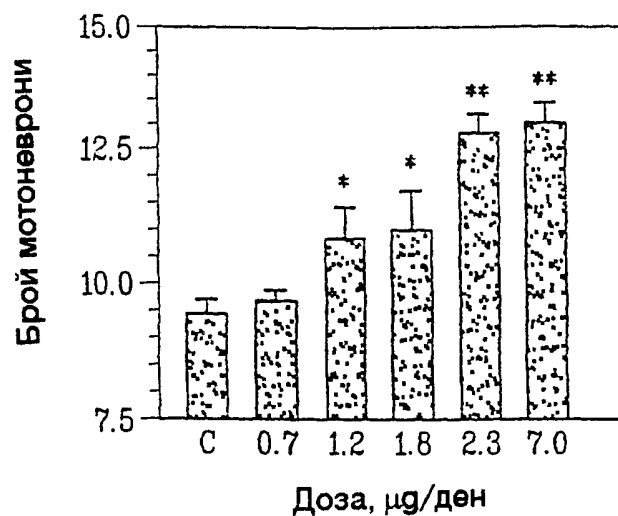
NGF



Съединение III-3

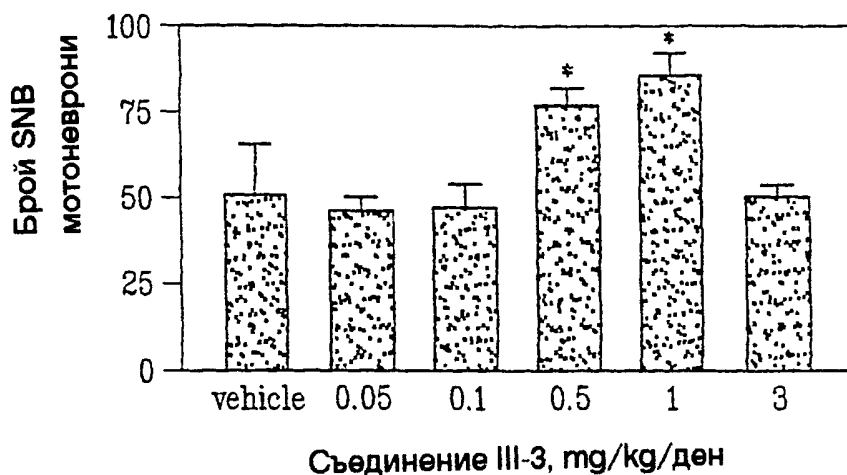
10.03.03

21/25

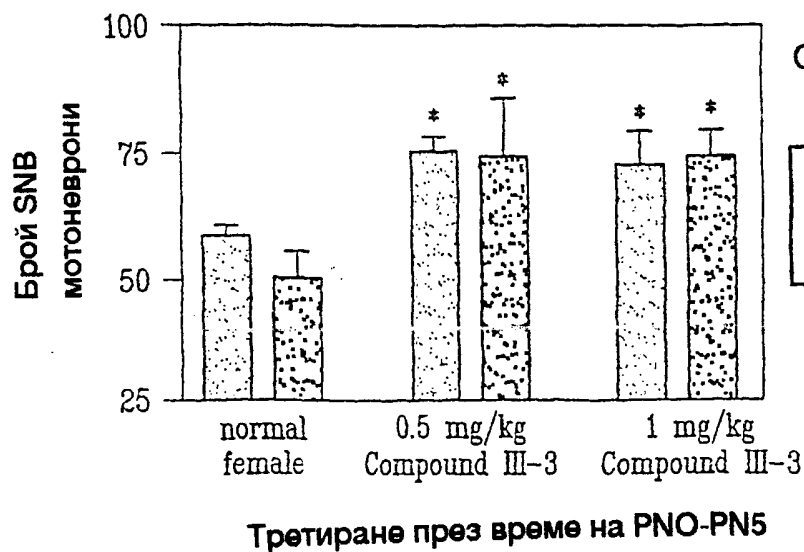


ФИГУРА 19

*p < 0.01
**p < 0.001



ФИГУРА 20А

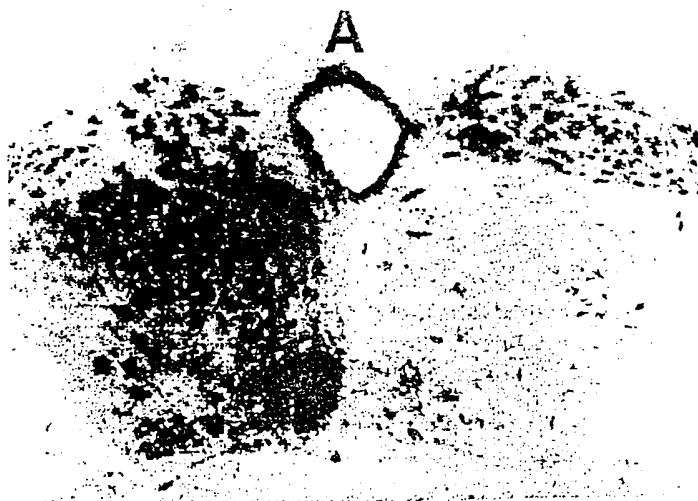


ФИГУРА 20Б

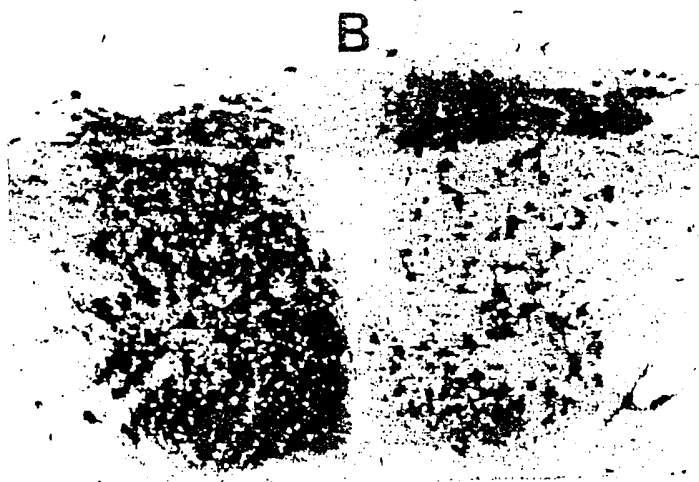
P10
P60

10.03.03

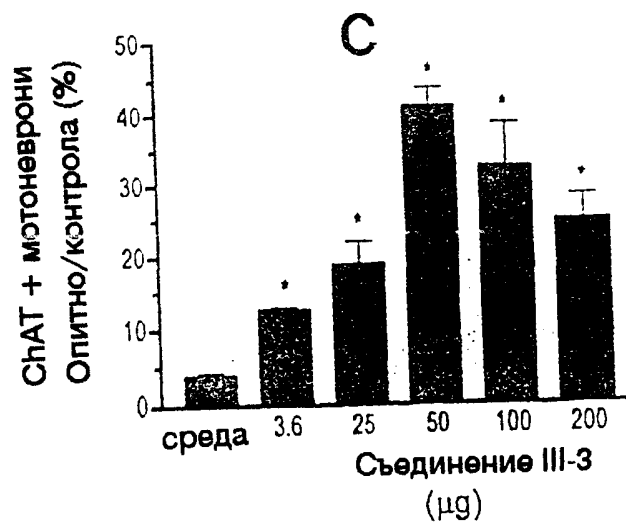
22/25



ФИГУРА 21А



ФИГУРА 21Б

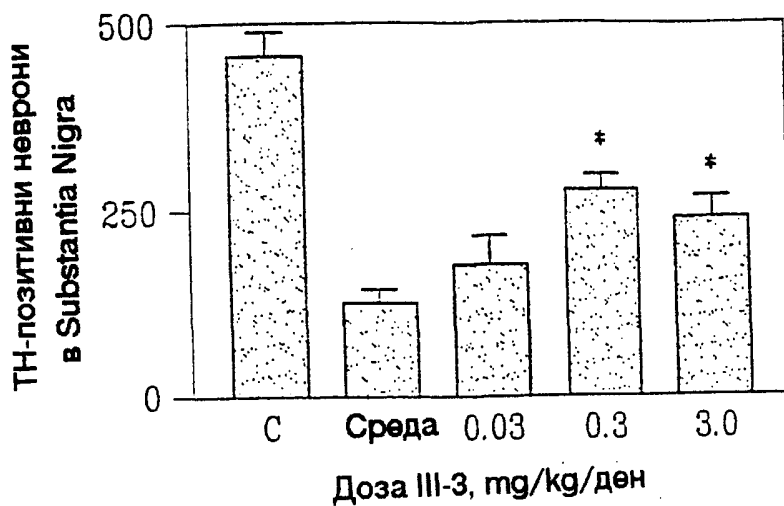


ФИГУРА 21В

10.03.03

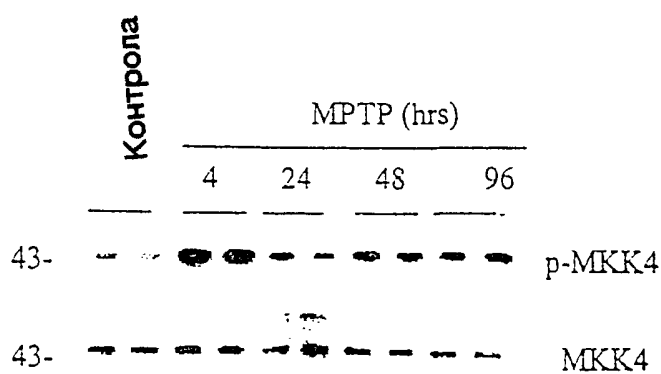
23/25

Броење на TH-позитивни клетки в Substantia Nigra

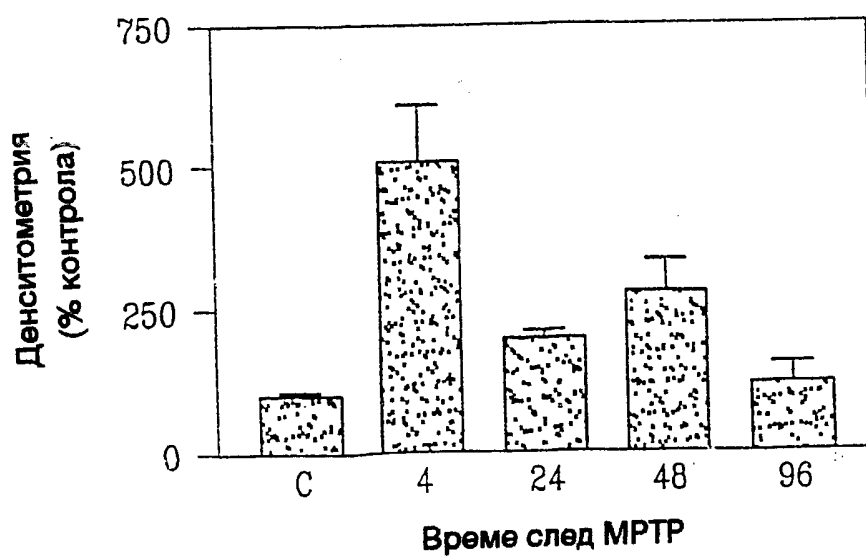


ФИГУРА 22А

*Показва статистически разлики ($p < 0.05$) от третирани с MPTP контролни среди



ФИГУРА 22Б



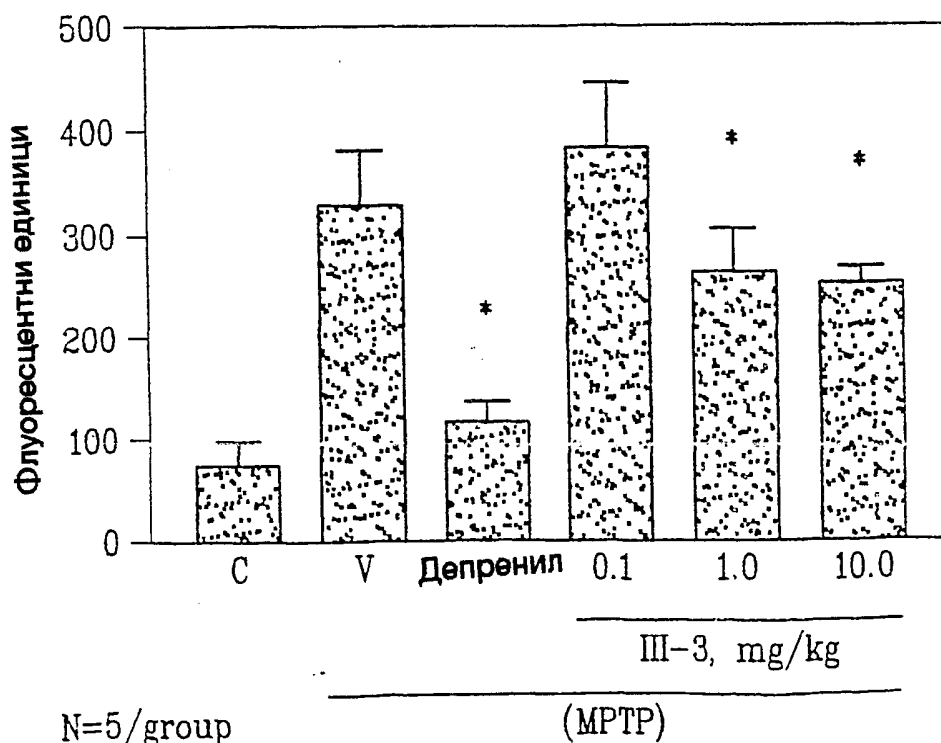
10.03.03

24/25

Substantia Nigra
MPTP (40 mg/kg)

Контрола	Среда	L-депренил	III-3 (mg/kg; sc)		
			0.1	1.0	10

ФИГУРА 22В



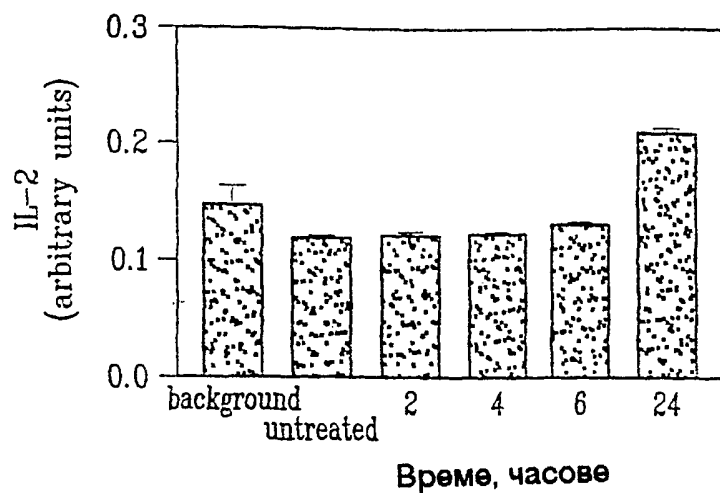
N=5/group

*P < 0.05

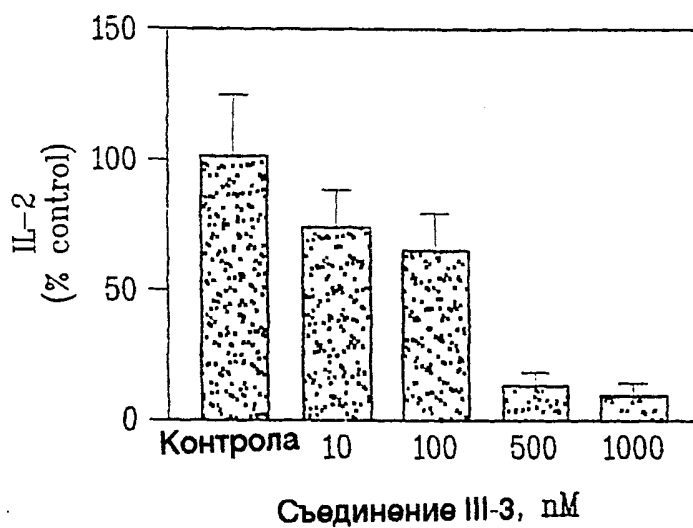
ANOVA post-hoc Dunnett's test

10.03.03

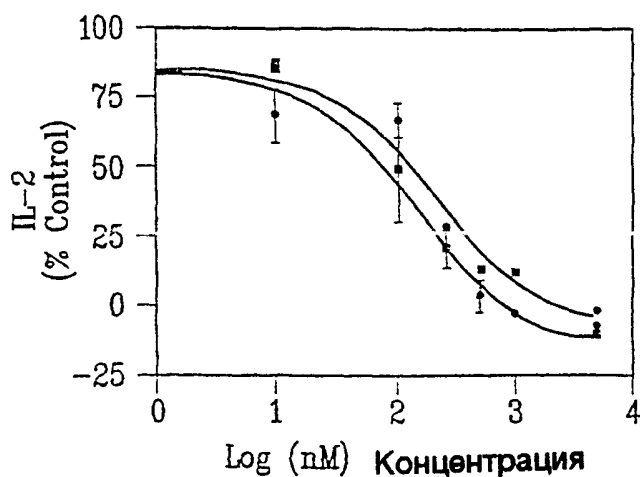
25/25



ФИГУРА 23А



ФИГУРА 23Б



ФИГУРА 23В

IC50	
• Cmpd III-3	139 nM
▪ Cmpd 1-4	207 nM

10.03.03

СПИСК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

<110> Cephalon, Inc.
Maroney, Anna
Walton, Kevin M.
Dionne, Craig A.
Neff, Nicola
Knight, Jr., Ernest
Glicksman, Marcie A.

<120> Методи за изменение на протеините на киназа с много на брой редове и изследване на съединенията, които изменят протеините на киназата

<130> CEPH1989

<150> 60/097,980

<151> 1998-08-26

<150> 09/376,894

<151> 1999-08-18

<150> 09/637,854

<151> 2000-08-11

<150> PCT/US01/24822

<151> 2001-08-08

<160> 18

<170> Патентна версия 3.2

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Човек

<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

10:03:03

<213> Човек

<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> Човек

<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> Човек

<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> Човек

10.03.03

<400> 5

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

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Человек

<400> 6

gtggctgtgc gggcagctcg ccag 24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Человек

<400> 7

gagaccctgg atctcgcgct t 21

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Человек

<400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Человек

<400> 9

cggatccgtg acaccagtcg gaacctt 27

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Человек

<400> 10

10.03.03

ggaattcacc agtaagctcc agcacatc

28

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Человек

<400> 11
 ataattcgtg ctagcgccag agtctagccg gtg

33

<210> 12
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Человек

<400> 12
 ataagcttcc tcagtgcaag tggatcgcgc agcccctga

39

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Человек

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 14
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Человек

<400> 14
 ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa 60
 acccgaaca 69

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Человек

<400> 15
 gacagggcgg ccggctct

18

10.03.03

<210> 16
 <211> 583
 <212> DNA
 <213> Човек

<400> 16
 gaattcggca cgagaggact cgcaggtgtc cggcgacgag ggctggtgga ccgggcagct 60
 gaaccagcgg gtgggcatct tccccagcaa ctacgtgacc ccgcgcagcg cttctccag 120
 ccgctgccag cccggcggcg aggaccccag ttgtaccgg cccattcagt tgttagaaat 180
 tgattttgcg gagctcacct tggaagagat tattggcatc gggggctttg ggaagggtcta 240
 tcgtgctttc tggatagggg atgagggttc tgtgaaagca gctcgccacg accctgatga 300
 ggacatcagc cagaccatag agaatgttcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctgaa 360
 gcacccaac atcattgccc taagaggggt atgtctgaag gagcccaacc tctgcttggg 420
 catggagttt gctcgtggag gacctttgaa tagagtgtta tctgggaaaa ggattccccc 480
 agacatcctg gtgaattggg ctgtgcagat tgccagaggg atgaactact tacatgatga 540
 ggcaattgtt cccatcatcc accgcgacct taagtccagc aac 583

<210> 17
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Човек

<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

10:03:03

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> 400ek

<400> 18

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