



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 30 301 T2 2006.02.02

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 960 335 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 30 301.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/00801

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 903 515.9

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/032017

(86) PCT-Anmeldetag: 15.01.1998

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 23.07.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 01.12.1999

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 25.05.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.02.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/53 (2006.01)**  
**G01N 33/68 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

784854	15.01.1997	US
784855	15.01.1997	US
784857	15.01.1997	US
825269	27.03.1997	US
916088	21.08.1997	US

(73) Patentinhaber:

Telik Inc., South San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

KAUVAR, M., Lawrence, San Francisco, US;  
SPORTSMAN, Richard, Palo Alto, US; VILLAR, O.,  
Hugo, Newark, US; SPEVAK, R., Wayne, Albany,  
US; KOHANSKI, A., Ron, New York, US; SATYAM,  
Apparao, Freemont, US; KOEHLER, Ryan,  
Hayward, US

(54) Bezeichnung: **MODULATOREN VON INSULINREZEPTOR-AKTIVITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Technisches Gebiet

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Modulierung der Glukoseaufnahme und der Insulinrezeptor-Aktivität im allgemeinen. Genauer gesagt betrifft die Erfindung ein in-vitro-Verfahren zur Modulation der Kinaseaktivität des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Insulinaktivierung des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Stimulation der zellulären Glukoseaufnahme durch Insulin oder zur Stimulation der Glukoseaufnahme in Zellen, die den Insulinrezeptor zeigen. Zusätzlich betrifft die Erfindung eine spezifische Verbindung und eine Zusammensetzung, die dieselbe umfasst.

## Stand der Technik

**[0002]** Unter den vielen Funktionen, die von Peptiden und Proteinen im Stoffwechsel ausgeübt werden, befindet sich die Fähigkeit, Rezeptoren auf Zelloberflächen zu stimulieren, um intrazelluläre Folgen zu bewirken, die für den Erhalt und die Entwicklung des Organismus wichtig sind. Peptid- und Proteinhormone treten mit Rezeptoren in Wechselwirkung, die für sie spezifisch sind, so dass die Aktivität des Hormons bei bestimmten Zellen, die diese Rezeptoren aufweisen, ausgeübt wird. Der Insulinrezeptor ist auf im wesentlichen allen Zellen vorhanden und in hohen Konzentrationen auf den Zellen der Leber, der Skelettmuskeln und des Fettgewebes. Die Stimulation des Insulinrezeptors mit Insulin ist ein essenzielles Element beim Kohlenhydrat-Stoffwechsel und der Lagerung.

**[0003]** Diabetikern fehlt entweder eine ausreichende endogene Sekretion des Insulinhormons (Typ I) oder sie weisen einen Insulinrezeptor-vermittelten Signalweg auf, der bis zu einem bestimmten Grad gegenüber endogenem oder exogenem Insulin resistent ist, entweder durch primäre oder posttranskriptionale Strukturveränderungen, reduzierte Anzahl oder geringe Kopplung unter den Signalkomponenten (Typ II). Alle Typ I-Diabetiker und ebenfalls viele Typ II-Diabetiker müssen Injektionen verwenden, um eine verstärkte Aktivität der (noch) vorhandenen Insulinrezeptoren zu erhalten, da endogenes Insulin zur Zeit nur durch eine alternative Zufuhr von Insulin selbst ersetzt werden kann, das früher aus nativen Quellen isoliert wurde und jetzt rekombinant erzeugt wird. Während die rekombinante Produktion von Insulin ermöglicht, dass eine weniger immunogene Form bereitgestellt wird und eine zuverlässige Zufuhr der benötigten Mengen sicherstellt, bleibt aufgrund der Instabilität der Peptide und Proteine im Verdauungstrakt die Notwendigkeit, das Hormon durch Injektion zu verabreichen. Es war lange das Ziel, Peptidliganden, einschließlich Insulin, durch kleine Moleküle zu ersetzen, die nicht verdaut werden und direkt in den Blutstrom absorbiert werden können. Bis jetzt konnten jedoch noch keine Nicht-Peptidsubstanzen, die die Wirkung von Insulin auf einen Rezeptor ausüben, entdeckt werden.

**[0004]** Es gab viele Fälle, worin das Nicht-Peptidmaterial zur Inhibition von Enzymen, deren native Substrate Peptide sind, verwendet wurde. R.I. Brinkworth et al., Biochem Biophys Res Comm (1992) 188:624-630 beschreiben z.B. die Inhibition der HIV-1-Proteinase durch verschiedene Aryldisulfonate. Die Fähigkeit von Triazin-Farbstoffen zur Bindung der NADH-Oxidase von *Thermus thermophilus* wurde von J. Kirchberger et al., J Chromatog A (1994) 668:153-164 untersucht.

**[0005]** Es wurde auch gezeigt, dass bestimmte Nicht-Peptidkomponenten die Agonisteneigenschaften eines Peptidhormons verstärken. Die Fähigkeit bestimmter Thiazolidindione, wie z.B. Pioglitazon, die Adipozyten-differenzierung durch Stimulierung der Wirkung von Insulin zu erhöhen, wurde z.B. von R. F. Kletzien et al., Mol Pharmacol (1992) 41:393-398 beschrieben. Diese repräsentieren eine Klasse potenziell antidiabetischer Verbindungen, die an einer unbekannten Stelle stromabwärts vom Insulinrezeptor selbst wirken und die Reaktion von Zielgeweben auf Insulin erhöhen. M. Kobayashi, Diabetes (1992) 41:476-483. Es ist nun bekannt, dass die meisten der Thiazolidindione an PPAR $\gamma$  binden und so bestimmte nukleäre Ereignisse auslösen, die zu einer verstärkten Empfindlichkeit der Zielzellen gegenüber Insulin führen. Der vollständige Mechanismus ist jedoch noch nicht entdeckt.

**[0006]** Beträchtliche Informationen stehen in Bezug auf den Insulinrezeptor selbst zur Verfügung. Die Struktur des Insulinrezeptors und einige Aspekte seiner Wirkungsweise, wie sie zur Zeit verstanden werden, sind in [Fig. 1](#) illustriert. Der Rezeptor besteht aus vier getrennten Untereinheiten, bestehend aus zwei identischen  $\alpha$ - und zwei identischen  $\beta$ -Ketten. Die beiden  $\beta$ -Ketten enthalten eine Kreuzmembrandomäne; die  $\alpha$ -Teile sind in der extrazellulären Domäne und nehmen die Bindung von Insulin entgegen. Die Illustration in [Fig. 1](#) zeigt die Stelle, an der Insulin an den Rezeptor bindet. Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten eine Tyrosinkinase-Aktivität, dargestellt als weiße Inserts in die Untereinheiten und die Kinase einer  $\beta$ -Untereinheit bewirkt die Phosphorylierung der komplementären  $\beta$ -Untereinheit, wie dargestellt; der Rezeptor, wie dargestellt in [Fig. 1](#) befindet sich

in seiner aktivierte Form, wenn die Tyrosinreste (Y) phosphoryliert sind. Die  $\beta$ -Untereinheiten enthalten ebenfalls ATP-Bindungsstellen. Die insulinstimulierte Phosphorylierung des Rezeptors selbst ist für die darauffolgende Aktivität nötig und so stellt die Demonstration der Fähigkeit einer Verbindung zur Bewirkung einer Phosphorylierung der  $\beta$ -Untereinheiten ein Mittel bereit, die Aktivierung des Rezeptors zu prüfen.

**[0007]** R.A. Kohanski, Biochemistry (1993) 32:5773-5780 hat die Verteilung der phosphorylierten Tyrosinreste auf den Zytoszplasma- $\beta$ -Kettendomänen des Insulinrezeptors (IR) beschrieben. **Fig. 3** dieses Artikels ist als **Fig. 2** in der gegenwärtigen Anmeldung wieder abgebildet und zeigt die etlichen Domänen, die phosphoryliertes Tyrosin enthalten, wenn der Rezeptor durch Insulin aktiviert ist. Diese beinhalten die Juxtamembran (JM)-Domäne; die zentrale (katalytische) Domäne (CD) und die C-terminale Domäne (CT).

**[0008]** Die Lokalisierung dieser Regionen ist auch hier in **Fig. 1** angegeben. So befinden sich die phosphorylierten Tyrosine an den Positionen **965, 972, 1158, 1162, 1163, 1328** und **1334** der menschlichen  $\beta$ -Kette. Die zentrale Domäne scheint für die Autophosphorylierung der Tyrosinreste auf der komplementären Kette verantwortlich zu sein.

**[0009]** Zusätzlich beschreiben S.R. Hubbard et al., Nature (1994) 372:746-754 die Kristallstruktur der Tyrosinkinase (Aktivierungs)-Domäne des Rezeptors. Die Autoren schließen weiterhin, dass Tyrosin an Position **1162** in der aktiven Stelle des Enzyms vorliegt und die Inhibition der Kinaseaktivität bewirkt. Bei Phosphorylierung besetzt Tyrosin **1162** die aktive Stelle nicht länger.

**[0010]** H.K. Kole et al., J Biol Chem (1996) 271:31619-31626 zitieren frühere Arbeiten, die angeben, dass die Kinaseregulierung durch Sequenzen innerhalb des Carboxyterminus der Insulinrezeptor- $\beta$ -Kette an der Definition der Spezifität von stromabwärts gelegenen Signaleignissen beteiligt sein könnten. Antikörper, die gegen Epitope in der Region 1294 bis 1317 gerichtet sind (Nummerierung gemäß A. Ulrich et al., Nature (1985) 318:756-761) inhibieren *in vitro* die Kinaseaktivität im Hinblick auf ein exogenes Substrat. Die in dem Kole-Artikel dargestellte Arbeit zeigt, dass ein Peptid, das die Aminosäurepositionen 1293 bis 1307 repräsentiert, die Fähigkeit von Insulin zur Aktivierung des Rezeptors *in vitro* unter Verwendung teilweise gereinigter Insulinrezeptoren aus CHO/HIRc-Zellen mit einem Maximum im Bereich zwischen 50 bis 100  $\mu$ M Konzentration des Peptids verstärken könnte. Diese Fähigkeit zur Verstärkung der Insulinaktivierung des Rezeptors konnte auch *in vivo* unter Verwendung von semipermeabel gemachten CHO/HIRc-Zellen dargestellt werden. Indem das Peptid lipophiler gemacht wird, indem es mit einem Stearylrest derivatisiert wird, konnte derselbe Effekt in intakten Zellen dargestellt werden. Die Lokalisierung der Bindung des Peptids wurde unter Verwendung semipermeabel gemachter CHO/EI-Zellen, 50  $\mu$ M biotinyliertem Peptid und Aussetzen gegenüber 0,2 mM BSO-COES, einem bifunktionalen Vernetzungsreagenz, gefolgt von einer Immunpräzipitation mit anti- $\alpha$ -IR und Nachweis unter Verwendung von Streptavidin konjugiertem Enzym als auf der  $\beta$ -Kette liegend dargestellt. Die Assoziation des biotinylierten Peptids mit einem 95 kD Protein legt eine Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit nahe. Das Experiment wurde unter Verwendung eines mutierten Insulinrezeptors, dem 43 Aminosäuren vom Carboxyterminus fehlten, wiederholt; die Bindung des Peptids wurde auf einem höheren Niveau als bei den CHO/EI-Zellen beobachtet. So schließen die Autoren, dass das Peptid (1293-1307) spezifisch an die  $\beta$ -Untereinheit in einer anderen Region als den carboxyterminalen 43 Aminosäuren bindet.

**[0011]** Trotz der Kenntnis von der Struktur dieses Rezeptors, einschließlich dem zitierten Kole-Artikel, war es bis jetzt noch nicht möglich, einfache Moleküle zu verwenden, um die Wirkung eines Peptidhormons durch Stimulierung der Rezeptoraktivität unabhängig von der Peptidhormon-Bindungsstelle bereitzustellen. Eine Anzahl der hier offenbarten Verbindungen sind jedoch in der Lage, den Insulinrezeptor an einer anderen Stelle als derjenigen, die normalerweise durch Insulin aktiviert wird, zu binden. Etliche Aryl-Di- oder Polysulfonatverbindungen, die sich bestimmte übliche Strukturmerkmale teilen, sind in der Lage, eine Stimulierung des Insulinrezeptors zu bewirken, um die Autophosphorylierungsaktivität zu aktivieren, die für eine Signaltransduktion benötigt wird. Die Verfügbarkeit dieser Verbindungen ermöglicht die Konstruktion von Assays und Vergleichsverfahren für die Bewertung zusätzlicher Kandidatenverbindungen, wie auch das Design und die Synthese von Therapeutika für die primäre Behandlung einer Insulinresistenz und Diabetes mit den geeigneten Strukturmerkmalen. Es wurde nun festgestellt, dass verschiedene Stellen auf der  $\beta$ -Kette in der Bindungsregion für solche Verbindungen beinhaltet sind und dass diese Verbindungen die Konformation der Kernzytosplasma-Kinasedomäne der  $\beta$ -Kette (CKD) verändern, die sich ins Zytosplasma erstreckt. Diese Erkenntnisse öffnen die Tür zu Verfahren für eine Identifizierung von Verbindungen, die bei der Regulation des Stoffwechsels allgemein nützliche Eigenschaften aufweisen.

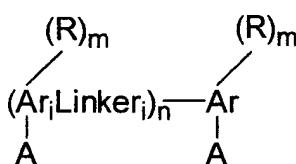
## Offenbarung der Erfindung

**[0012]** Es wurde gezeigt, dass Substanzen, die die Aktivität des IR modulieren, die Konformation der zweiseitigen Form der CKD verändern. Dies stellt die Basis für Screening-Assays für Verbindungen, die den Rezeptor modulieren, bereit. Die Anmelder wollen nicht an eine spezifische Theorie gebunden sein, es erscheint jedoch, dass Verbindungen, die den "Gürtelbereich" der zweiseitigen CKD binden, wie weiter unten beschrieben, den Grenzflächenkontakt zwischen den beiden Lappen der  $\beta$ -Rezeptorkette essenziell verändern. Alternativ könnte die Konformationsveränderung eine sekundäre Wirkung einer Phosphorylierung sein, erleichtert durch Bindung einer aktivierenden Verbindung. Was auch immer die dynamische Abfolge sein mag, ist diese Veränderung der dreidimensionalen Struktur, die eng mit einer Aktivierung assoziiert ist, aufgrund geeigneter Wege zur Messung von Veränderungen der Konformation für eine Bewertung der Fähigkeit einer Testsubstanz zur Modulation der Rezeptoraktivität geeignet.

**[0013]** In bestimmten Formen können solche Assays für ein Hochdurchsatzscreening angepasst werden.

**[0014]** Zusätzlich oder alternativ betrifft die Erfindung Assays, die auf einer Identifizierung der Bindungsstellen in den  $\beta$ -Ketten für kleine Moleküle basieren, die den Rezeptor modulieren, entweder direkt oder zusammen mit einer Insulinstimulierung oder beides. Ein kleines Molekül, TER16998, wie unten beschrieben, kann den Insulinrezeptor durch Wechselwirkung nur mit den  $\beta$ -Ketten aktivieren. Diese Aktivierung wird durch spezifische Peptide inhibiert, die Teile der  $\beta$ -Kette repräsentieren. Vermutlich wirken diese Peptide als "Schwamm", um mit TER16998 in Wechselwirkung zu treten und verhindern so seine Wechselwirkung mit den Rezeptor- $\beta$ -Ketten per se. Eine Kartierung dieser Peptide auf die Stellen, die sie auf den  $\beta$ -Ketten des Rezeptors besetzen, identifiziert Bindungsregionen. Zusätzlich stellt die Aktivierung des Rezeptors durch TER16998 ein Ergebnis bereit, worin die Tyrosine, die in der Regel bei Insulinaktivierung in der JM-Domäne phosphoryliert sind, nicht phosphoryliert werden und wobei die Phosphorylierung dieser Reste selbst in Gegenwart von Insulin verhindert wird, wenn TER16998 vorliegt. Die verbleibenden fünf Tyrosinreste, die in dem aktivierte Rezeptor phosphoryliert werden und die die Aktivität des Rezeptors vermitteln, werden in Gegenwart von Insulin, TER16998 und in Gegenwart von sowohl Insulin als auch TER16998 phosphoryliert. Dieses Ergebnis kann zeigen, dass die JM-Domäne ein effektives Aktivierungsziel ist. Die Regionen, die als Bindungsstellen identifiziert sind, können effektiv zur Identifizierung von Substanzen verwendet werden, die die Aktivität dieses Rezeptors modulieren.

**[0015]** Gemäß einem Aspekt ist die Erfindung auf in vitro Verfahren zur Modulation der Kinaseaktivität des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Insulinaktivierung des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Stimulierung der zellulären Glukoseaufnahme durch Insulin und/oder zur Stimulierung der Aufnahme von Glucose in Zellen, die den Insulinrezeptor darstellen gerichtet, wobei das Verfahren das Kontaktieren des Insulinrezeptors oder von dessen Kinaseanteil oder der Zellen mit einer Verbindung umfasst, die die folgende Formel umfasst:



Formel (1)

worin:

jedes Ar unabhängig ein aromatischer Bestandteil ist, gewählt aus Benzol, Naphthalin, Pyridin, Chinolin oder Benzothiazol;

jedes A ist unabhängig  $-SO_3X$ ,  $OP(OX)_3$ ,  $-COOX$ , worin X ein Wasserstoffatom oder ein Kation ist;

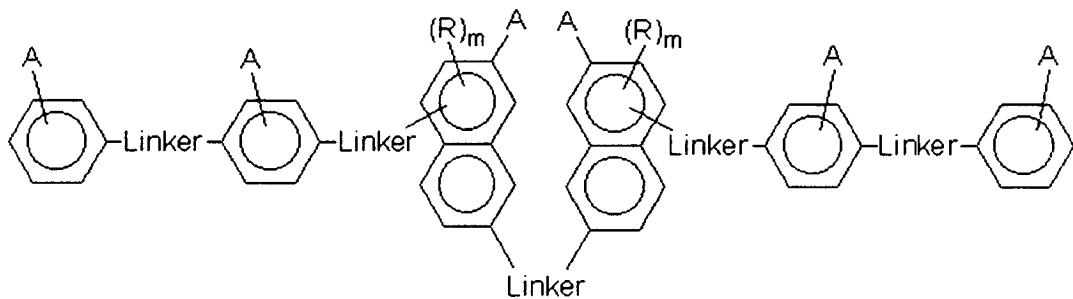
jedes R ist unabhängig ein substituierter oder unsubstituierter, verzweigter oder unverzweigter, cyclischer, aromatischer oder nicht-aromatischer Hydrocarbylbestandteil, worin nicht-verzweigte Hydrocarbylketten durch ein oder mehrere Heteroatome unterbrochen sein können; oder jedes R ist unabhängig  $OR'$ ,  $NR'_2$  oder  $SR'$ , worin  $R' H$  oder R, wie oben definiert, ist;

m ist 0, 1 oder 2; n ist 1 bis 6; und

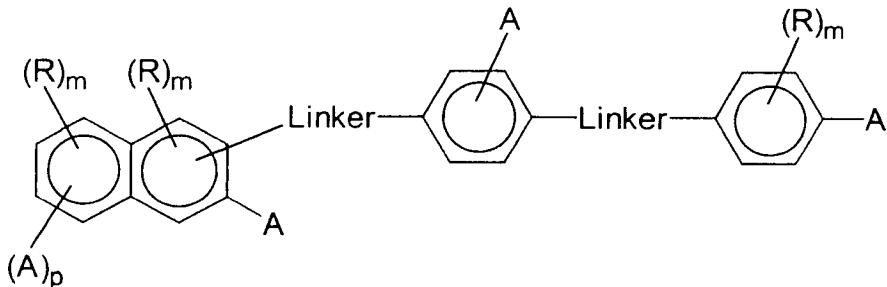
jeder Linker ist unabhängig  $-CH_2-$ ,  $-N=N-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-NHCO-$  oder  $-NHCONH-$  oder ein Isoster davon, wobei wenn n 1 ist, mindestens ein Ar mindestens 2 fusionierte aromatische Ringe umfasst.

**[0016]** Bei diesen Verfahren können die Zellen in einem Subjekt enthalten sein und mit den Verbindungen der Formel (1) durch Verabreichung dieser Verbindungen an das Subjekt kontaktiert werden.

[0017] In bestimmten Ausführungsformen hat die Verbindung der Formel (1) die folgende Formel



worin jeweils R, A, Linker und m wie oben definiert sind oder die Formel



Formel (3)

worin R, A, Linker und m jeweils wie oben definiert sind und worin p 0 ist oder 1.

[0018] Gemäß anderen Aspekten ist die Erfindung auf Verfahren zum Design und der Synthese von Molekülen gerichtet, die den Insulinrezeptor aktivieren, basierend auf den relevanten charakterisierenden Eigenschaften der Verbindungen der Formel (1).

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0019] [Fig. 1](#) zeigt ein schematisches Diagramm des Insulinrezeptors und seine Aktivierung durch Insulin.

[0020] [Fig. 2](#) zeigt die Stellungen der Tyrosinreste auf der IR- $\beta$ -Kette, die bei Aktivierung des IRs durch Insulin phosphoryliert werden.

[0021] Die [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3D](#) zeigen die Konformationsveränderung in dem doppellappigen CKD-Bereich des Insulinrezeptors, wenn er aktiviert ist im Vergleich mit dem inaktiven Zustand.

[0022] [Fig. 3A](#) zeigt ein Raumfüllmodell des basalen Zustands und den aktivierten Zustand der CKD. Der N-Terminus, die ATP-Schleife, die Aktivierungsschleife und der katalytische Boden sind markiert.

[0023] [Fig. 3B](#) zeigt ein vereinfachtes Schema der CKD, wie dargestellt in [Fig. 3A](#). Wenn der Rezeptor aktiviert ist, bewegt sich die Aktivierungsschleife dramatisch, wenn die Tyrosine phosphoryliert werden; die ATP-Bindungsstelle dehnt sich aus; die Helix rotiert nach unten, wenn der obere Lappen nach außen von der Ebene des Papiers rotiert und die katalytische Stelle, enthaltend Aspartat, markiert D in [Fig. 3B](#), ist exponiert.

[0024] [Fig. 3C](#) und [Fig. 3D](#) zeigen Stereoansichten des Grund- bzw. des aktivierten Zustands. Die Tyrosine 1158, 1162 und 1163 sind als weiße Kugeln und Asparaginsäure 1132 durch eine dunkle Kugel dargestellt.

[0025] [Fig. 4A](#) zeigt die Struktur von TE16998;

[0026] [Fig. 4B](#) zeigt die Fähigkeit von TER16998 zur Stimulierung der Autophosphorylierung des IRs;

[0027] [Fig. 4C](#) zeigt die Fähigkeit von TER16998, die insulinstimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1-Zellen zu verstärken.

[0028] [Fig. 5](#) zeigt die Fähigkeit von TER16998, die ATPase-Aktivität der zweilappigen CKD-Region des menschlichen Insulinrezeptors zu stimulieren.

[0029] [Fig. 6](#) zeigt das HPLC-Muster eines Trypsinverdaus der phosphorylierten  $\beta$ -Kette von IR. Spur A zeigt den Verdau der Gesamtlängen-CKD; Spur B repräsentiert den Verdau einer verkürzten Version, der 10 kD am C-Terminus fehlen.

[0030] [Fig. 7](#) zeigt den Syntheseweg für fotoaffinitätsmarkiertes TER16998.

[0031] Die [Fig. 8A](#) bis [Fig. 8E](#) zeigen die Strukturen etlicher Verbindungen, die für die Erfindung relevant sind, die den Insulinrezeptor aktivieren.

[0032] [Fig. 8A](#) zeigt die Struktur von TER3935.

[0033] [Fig. 8B](#) zeigt die Strukturen von TER17004 und 17005.

[0034] [Fig. 8C](#) zeigt die Struktur von TER17003.

[0035] [Fig. 8D](#) zeigt die Struktur von TER12, Cibacron Brilliant Red 3BA.

[0036] [Fig. 8E](#) zeigt die Struktur von TER3938, Direct Yellow 27.

[0037] [Fig. 9](#) zeigt einen Syntheseweg für TER12.

[0038] [Fig. 10](#) zeigt die Wirkung vom Komponente A auf die Insulininduzierte Aufnahme von Glukose durch Adipozyten.

[0039] [Fig. 11](#) zeigt den Syntheseweg für TER16998.

[0040] [Fig. 12](#) zeigt die Wirkung von TER16998, allein und in Kombination mit Insulin, auf die Autophosphorylierung des IR-Rezeptors.

[0041] [Fig. 13](#) zeigt die Wirkung von TER16998 auf die Insulininduzierte Glukoseaufnahme bei Adipozyten.

[0042] [Fig. 14](#) zeigt die Wirkung von TER16998 auf Blutglukoseniveaus bei einem Diabetes-Maus-Modell.

[0043] [Fig. 15](#) zeigt das Syntheseverfahren für die Präparation von Analogen von TER3935 mit alternativen Bindungen.

[0044] [Fig. 16](#) zeigt die Synthese von TER17003.

[0045] [Fig. 17](#) zeigt die Synthese von TER17004 und TER17005.

[0046] [Fig. 18A](#) und [Fig. 18B](#) zeigen die Lokalisierung des menschlichen Insulinrezeptors von Peptiden, die die Aktivierung von TER16998 inhibieren, auf der CKD.

[0047] [Fig. 19](#) zeigt die Ergebnisse eines Experiments, das demonstriert, dass TER16998 von Zellen aufgenommen wird und mit der Fähigkeit von TER16998 konsistent ist, die Stimulierung der Glukoseaufnahme durch Insulin durch direkte Wechselwirkung mit der CKD zu verstärken.

[0048] [Fig. 20](#) zeigt die Insulin sensibilisierende Wirkung von TER16998 bei Diabetes-Mäusen.

#### Ausführungsformen der Erfindung

[0049] Die Erfindung ist auf Verfahren gerichtet, Subjekte mit Diabetes durch Verabreichung von Verbindungen zu regulieren und zu behandeln, von denen durch die Assays der Erfindung festgestellt wurde, dass sie den IR modulieren. Diese Verbindungen wirken direkt auf die Kern-Kinase-Domäne des Rezeptors und kompetitieren nicht mit dem Insulin um die Bindung an der Insulin-Bindungsstelle, noch beeinflussen sie die Aktivierung des Rezeptors durch einen ähnlichen Mechanismus, wie der von Insulin gezeigte. Die erfinderischen Verbindungen können die Kinase des Rezeptors zur Autophosphorylierung direkt aktivieren, und potenzieren so die Wirkung von Insulin auf den Rezeptor, um die Kinasefunktion des Rezeptors bei der Phosphorylierung exogener Substrate zu aktivieren, die erhöhte Aufnahme von Glukose durch Adipozyten und auch durch Insulinrezeptortragende Zellen im allgemeinen bewirken und das Blut-Glukose-Niveau bei Diabetespatienten zu er-

niedrigen.

**[0050]** Die Erfindung ist mit einer Modulation (Aktivierung) des Insulinrezeptors befasst. Wie oben dargestellt, sind die allgemeinen physiologischen Aspekte, die sich aus der Aktivierung des Rezeptors ergeben, bekannt: der aktivierte Rezeptor hat eine Kinaseaktivität, die Insulinaktivierung stimuliert die zelluläre Glukoseaufnahme und wenn sich die Zelle von einem-Säugersubjekt ableitet, wird die Blutglukose erniedrigt. Die mit der Aktivierung assoziierten stromabwärts gelegenen Ereignisse sind ebenfalls bekannt. Diese beinhalten die oben dargestellten plus einer Phosphorylierung von IRS-1, einer Stimulierung der Kinaseaktivität relativ zu Phosphoinositol (PI3-Kinaseaktivität) und schließlich eine Bewirkung einer GLUT-4-Glukose-Transportertranslokation zu der Zelloberfläche. So wirken, wie unten beschrieben, die durch das Verfahren der Erfindung identifizierten Verbindungen und die unten beschriebenen spezifischen Verbindungen direkt auf die Insulinrezeptor CKD und führen zu diesen stromabwärts gelegenen Ereignissen.

**[0051]** Die Kristallstruktur des Insulinrezeptors wurde bestimmt und die allgemeine Konformation des Rezeptors ist in den [Fig. 3A](#) bis [Fig. 3D](#) dargestellt. Details der Kristallstruktur der basalen Form sind in S.R. Hubbard et al., (1994, *supra*, durch Inbezugnahme inkorporiert) dargestellt und für die aktivierte Insulinrezeptor-Tyrosinkinase in einem Komplex mit einem Peptidsubstrat und einem ATP Analog in S.R. Hubbard EMBO J (1997) 16:5572-5581. Die dreidimensionale Struktur des Rezeptors kann unter Verwendung der Biosym-Software zur Modellierung von Veränderungen der Konformation im aktivierte Zustand untersucht werden.

**[0052]** Die Konformationsveränderungen, die auftreten, wenn der Rezeptor aktiviert ist, ergeben sich aus diesen Figuren. Wie dargestellt, bewegt bei Aktivierung die Aktivierungsschleife (AL in [Fig. 3B](#)) ihre Position dramatisch, wenn die Tyrosine phosphoryliert werden, wie in dem Diagramm angezeigt.

**[0053]** Zusätzlich dehnt sich die ATP-Bindungsstelle aus und die Helix-Reste **1038** bis **1051**, oben rechts dargestellt, rotieren nach unten, wenn der obere N-terminale Lappen relativ zu dem unteren C-terminalen Lappen rotiert. Schließlich ist das Aspartat an Position **1132** in der katalytischen Domäne exponiert.

#### Screening-Assays für IR-Modulatoren

**[0054]** Die Erfindung zieht einen Vorteil aus der Konformationsveränderung, die in der zweilappigen CKD-Region des Insulinrezeptors bei Aktivierung auftritt. Um eine effektive Verwendung dieser Eigenschaft sicherzustellen, muss ein Assay angepasst werden, der einen Nachweis dieser Veränderung ohne zeitaufwendige Anforderungen ermöglicht, wie z.B. einen direkten Nachweis durch Röntgenkristallographie. Die Konformationsveränderung kann tatsächlich in einem Hochdurchsatzassay durch Bewertung sekundärer Maßstäbe des Auftretens nachgewiesen werden. Diese beinhalten die Verwendung der zweilappigen CKD in fluoreszenzmarkierter Form; die Lappen werden mit einem Donor und Empfängerfluorophoren markiert und die Entfernung zwischen Donor und Rezeptor kann durch Standard-Fluoreszenzenergietransfer-Bestimmungstechniken gemessen werden. Jedes einer Vielzahl von Fluorophoren ist kommerziell für die Durchführung dieser Technik erhältlich und eine Bestimmung der Entfernung durch Fluoreszenzenergietransfer ist ein wohlbekanntes Laborverfahren.

**[0055]** Andere, indirektere Messungen der Konformationsveränderungen können ebenfalls verwendet werden. Es sollte festgehalten werden, dass die Konformationsveränderung, die immer mit einer Aktivierung assoziiert ist, nicht die anfängliche Reaktion auf einen Aktivator sein kann, sondern die Folge von anderen, inizierenden Veränderungen des Rezeptors. Zum Beispiel kann eine aktivierende Verbindung zwei CKDs dimerisieren, was zu einer höheren lokalen Dichte der katalytischen Stelle und der Aktivierungsschleife führt, was dann zu der anfänglichen Phosphorylierung führen würde, die wiederum zu der Konformationsveränderung führt. Die Konformationsveränderung würde zu einer messbaren Kinaseaktivität führen, die an exogenen Substraten überprüft werden kann. Alternativ kann die aktivierende Verbindung so einen Keil in die CKD treiben, dass die Aktivierungsschleife gegenüber einem Lösungsmittel exponiert wird und so einer Phosphorylierung unterliegt, ohne eine Rotation der zwei Lappen relativ zueinander zu induzieren, bis zu einem späteren Zeitpunkt. Jedenfalls ist klar, dass während der Aktivierung des Rezeptors Konformationsveränderungen auftreten und dies kann wie oben beschrieben gemessen oder auf indirektere Weise, wie unten beschrieben, gemessen werden.

**[0056]** Zum Beispiel kann die ATPase-Aktivität der zweilappigen CKD gemessen werden. Dies wurde unter Verwendung von TER16998 als typischer Aktivator des Rezeptors illustriert, der direkt mit der CKD in Wechselwirkung tritt. Tatsächlich bestätigt die Fähigkeit dieses Aktivators zu einer ATPase-Aktivität zu führen die Existenz einer Konformationsveränderung, da der basale IR nur eine geringe ATPase-Aktivität ausübt. So wur-

die die katalytische Stelle als Resultat der Aktivierung exponiert.

**[0057]** Es wurde bestätigt, dass TER16998 ein Aktivator des Rezeptors ist, wie dargestellt in **Fig. 4**. **Fig. 4A** zeigt die Struktur von TER16998. **Fig. 4B** zeigt die Fähigkeit von TER16998, den löslichgemachten Rezeptor direkt in vitro zu aktivieren, wie dargestellt durch die verstärkte Phosphorylierung der Tyrosinreste. **Fig. 4C** illustriert die Fähigkeit von TER16998, die Wirkung von Insulin auf den Rezeptor zur Stimulation der Glukoseaufnahme durch die Zellen zu verstärken. Ansteigende Mengen von TER16998 in Gegenwart von Insulin zeigen eine Dosisreaktionskurve, die mit dieser Stimulierung übereinstimmt.

**[0058]** Die Fähigkeit des etablierten Aktivators TER16998 kann dann bestätigt werden, die Konformationsveränderung zu bewirken, die zu einem Exponieren der katalytischen ATPase-Stelle führt, wie dargestellt in **Fig. 5**. Die menschliche Insulinrezeptor CKD zeigt nur eine geringe ATPase-Aktivität in Abwesenheit von TER16998, weist diese Aktivität jedoch in seiner Gegenwart auf. Die Ergebnisse in **Fig. 5** wurden unter Verwendung eines HPLC-Verfahrens zur Bewertung der Wirkung von TER16998 auf die ATPase-Aktivität erhalten. Die Reaktionsmischung enthält 25 mM Tris pH 7,4, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µg/ml menschliches IR-CKD und 5 mM ATP bei 30°C. Die Reaktion wird in Gegenwart und Abwesenheit von 2 µg/ml TER16998 durchgeführt. Die Reaktionsmischung wird über eine Rainin Microsorb-MV-Säule (4,6 × 150 mm) in einem Puffer, enthaltend 120 mM Ammoniumphosphat und 11,9 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, pH 6,5 in Methanol platziert. Die Hydrolyserate wurde unter Verwendung der Peakbereiche ADP/(ADP+ATP) und ATP/(ADP+ATP) berechnet und dann als Prozent ATP wie verblieben gegenüber der Zeit aufgetragen.

**[0059]** Alternativ kann die Konformationsveränderung indirekt durch Messen des Zustands der Phosphorylierung auf der doppelappigen CKD gemessen werden. Eine Ausführungsform dieses Assays ist eine modifizierte Form von der in H. Hagino et al., Diabetes (1994)43:274-280 beschriebenen. Kurz gefasst werden menschliche Insulinrezeptoren (hIR) teilweise aus Plazentaextrakten oder von der Zelllinie IM-9 gereinigt. Die teilweise gereinigten hIRs werden auf Mikrotiterplatten durch Inkubation für 90 Minuten mit Vertiefungen gefangen, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen hIR beschichtet sind. Die Vertiefungen werden dann mit verschiedenen Dosisniveaus Insulin und/oder Testverbindungen für 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt; dann wurde ATP (10 µM) zugefügt, um das Fortschreiten der Kinaseaktivität zu ermöglichen. Nach 60 Minuten wurden die Vertiefungen gewaschen und dann 60 Minuten mit einem biotinylierten Antikörper behandelt, gerichtet gegen Phosphotyrosin (PY-20) und ungebundene Materialien wurden wieder weggewaschen. Die Vertiefungen wurden dann mit einem konventionellen Streptavidin-Peroxidasesystem 30 Minuten inkubiert, um das Niveau des phosphorylierten Tyrosins zu bewerten. Wenn in diesem Assay getestet wurde, ergab das Insulin eine Dosisreaktionskurve, die einen EC50 von ungefähr 0,3 nM und eine maximale Aktivität bei ungefähr 100 nM zeigte. Der EC50 ist ähnlich zu dem, der für eine Bindung von markiertem Insulin an verschiedene Zellen und Gewebe erhalten wird.

**[0060]** Die Kinaseaktivität eines doppelappigen CKD kann auch auf exogenen Substraten gemessen werden, als sekundäre Konsequenz der Konformationsveränderung. In einer Ausführungsform kann poly(G1u4Tyr) als Substrat für die Phosphorylierung verwendet werden. Der Einbau von markiertem Phosphat von γ-markiertem ATP wird gemessen, folgend auf eine Aktivierung des Rezeptors, hergestellt wie oben oder durch Substitution einer rekombinant erzeugten β-Kette, der die Insulinbindungsdomäne fehlt (zur Verfügung gestellt von Stratagene, Inc.) für den menschlichen Insulinrezeptor. Diese Assays können in nicht-radioaktiver Form mit hohem Durchsatz durch beispielsweise einen Fluoreszenzpolarisierungs-Displacement-Assay durchgeführt werden.

**[0061]** Die Konformationsveränderung in der zweilappigen CKD-Region ist eng mit der Aktivierung des Rezeptors assoziiert, unabhängig davon, ob sie das ursprüngliche oder selbst sekundäre Ergebnis der Assoziation eines Aktivatormoleküls ist.

**[0062]** Die oben dargestellten Verfahren können, wenn sie allgemein zum Screening auf Modulatoren von dem IR verwendet werden, durch Verwendung eines Satzes maximal divergierender Kandidatenverbindungen in den anfänglichen Screenings optimiert werden. Dieses Verfahren umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform das Kontaktieren von jedem Mitglied eines Satzes maximal divergierender Kandidatenverbindungen mit dem Rezeptor oder insbesondere dessen doppelappigem CKD-Bereich; Nachweis einer Konformationsveränderung oder einer Kinaseaktivität oder Phosphorylierung von Tyrosin auf der CKD, kontaktiert mit jedem Mitglied des Satzes und Identifikation von mindestens einem Mitglied des Satzes als erfolgreichen Kandidaten, bei dem eine Konformationsveränderung oder Kinaseaktivität oder erhöhte Menge von Tyrosinphosphat relativ zu dem unbehandelten Rezeptor in der CKD nachgewiesen wird, mit dem er kontaktiert wird.

**[0063]** Im allgemeinen können, sobald eine Verbindung mit einer mindestens moderaten Fähigkeit zur Aktivierung des Insulinrezeptors identifiziert wurde, zusätzliche Verbindungen durch Vergleich der Eigenschaften der Kandidaten mit denjenigen von Verbindungen mit bekannter Aktivität identifiziert werden. Eine besonders nützliche Eigenschaft zum Vergleich ist der Affinitätsfingerabdruck der Verbindung gegen ein Referenzpanel von Proteinen, was eine erste Annäherung von Bindungsmodi aller Proteine bereitstellt, wie beschrieben im US-Patent Nr. 5,587,293. Weiterhin wird die Analyse von Verbindungen, von denen gezeigt wurde, dass sie den Insulinrezeptor aktivieren unter Verwendung von Standard-Struktur-Aktivitätsanalysen, zu zusätzlichen Verbindungen, die sich als Aktivatoren verhalten, führen. Eine Rezeptormutagenese und Fotoaffinitätsanaloge, wie unten beschrieben, können ebenfalls verwendet werden, um die Rezeptorstellen, die die Verbindungen finden, z.B. in einem rationalen Arzneimitteldesign, zu identifizieren.

**[0064]** Die Aktivatorverbindungen sind in der Lage, die Konformation der zweilappigen CKD zu verändern und/oder allein die durch IR-Kinase katalysierte Phosphorylierung zu stimulieren, d.h. sich als Agonisten im Hinblick auf den Rezeptor zu verhalten und/oder sind in der Lage, die Fähigkeit von Insulin zur Bewirkung einer Phosphorylierung des Rezeptors zu verstärken. Jede dieser Wirkungen kann als Aktivierung des Insulinrezeptors betrachtet werden. So wird unter "Aktivierung" des Insulinrezeptors entweder die Fähigkeit, sich als Agonist zu verhalten gemeint, oder die Fähigkeit, die Stimulierung durch Insulin oder andere Agonisten der Rezeptoraktivität zu verstärken. Beide dieser Wirkungen können durch Konformationsveränderung und/oder Auto-phosphorylierung des Rezeptors und/oder seine Kinaseaktivität unter Beweis gestellt werden.

#### Identifizierung kritischer Stellen

**[0065]** Die Erfindung ist auch auf die Identifizierung der anscheinend aktiven Stellen in der Zytosplasmadomäne gerichtet, betroffen durch Wechselwirkung mit einem Modulator/Aktivator des Rezeptors. Die Identifizierung solcher Stellen ist nützlich, um Assays zu entwerfen, um Verbindungen zu identifizieren, die eine Vielzahl von Stoffwechselwirkungen aufweisen werden, alle betreffend die Modulation der Aktivierung des Insulinrezeptors. Mindestens zwei Assay-Arten können entworfen werden, basierend auf der Identifikation einer Stelle, die direkt an der Aktivierung beteiligt ist. Zunächst können die Aminosäuresequenzen, die mit dieser Stelle assoziiert sind, direkt in Assays verwendet werden, um die Bildung von Komplexen mit potenziellen Modulatoren des Rezeptors zu messen. Eine Weise, auf die die Modulatoren den Rezeptor aktivieren können, ist die direkte Bindung dieser Stellen. Eine zweite Assay-Art involviert modifizierende Stellen, die für die Aktivierung kritisch sind und den Vergleich der Wirkung von Kandidatenverbindungen auf den nativen Rezeptor im Vergleich mit der modifizierten Form. Die gemessene Interaktion kann eine einfache Bindung sein oder ein anderes Maß einer Rezeptorreaktion, wie z.B. eine Kinaseaktivität.

**[0066]** Wie unten weiter beschrieben, wurden etliche Stellen auf der  $\beta$ -Kette des Rezeptors als direkt an der Aktivierung des Rezeptors beteiligt identifiziert. Diese beinhalten drei Domänen, abgeleitet aus Experimenten, wobei Peptide, die diese Regionen auf der CKD repräsentieren, als nachweislich an der Bindung des Modulators TER16998 durch ihre Fähigkeit zur Inhibition der Aktivierung der CKD durch diese Verbindung beteiligt gezeigt wurden. Diese Domänen umfassen die Positionen 1089 bis 1105, 1120 bis 1137 und 1235 bis 1252. Eine andere Domäne, die an der Aktivierung beteiligt ist, ist die Juxtamembran (JM) -Domäne, die die aktivierende Verbindung direkt binden kann oder die aus der katalytischen Stelle durch die Konformationsveränderung, die bei Aktivierung auftritt, entfernt werden kann.

**[0067]** Wie unten beschrieben, kann TER16998 oder eine alternative Verbindung, von der bekannt ist, dass sie direkt  $\beta$ -Ketten aktiviert, per se bei der Lokalisierung der Bindungsstelle verwendet werden, die für die Aktivierung relevant ist oder es kann ein Derivat dieser Verbindung verwendet werden. Unter "Derivat" wird eine chemisch modifizierte Form der aktivierenden Verbindung verstanden, die die Bindungsaktivitäten gegenüber dem Insulinrezeptor beibehält, die von der Elternverbindung gezeigt werden. Insbesondere sind wichtige Derivate diejenigen, die ein Mittel zur kovalenten Bindung durch Fotoaktivierung bereitstellen. Andere Derivate beinhalten markierte Formen, die bei einem Nachweis der Bindungsstelle helfen können und geringfügige Modifikationen der Struktur, die nicht mit der Interaktion der Verbindung mit der Bindungsstelle der Elternverbindung in den IRs eingreifen.

**[0068]** Sobald die Bindungsstelle identifiziert ist, können Verbindungen, die den Rezeptor aktivieren, durch direkte Bestimmung ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung mit diesen Stellen identifiziert werden oder durch Bestimmung aus der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors der kritischen Reste, die an der Aktivierung des Rezeptors durch Bindung dieser Art teilnehmen, gefolgt von Mutationen dieser Reste, so dass eine differenzielle Wirkung der Bindung auf Mutanten gegenüber dem nativen Rezeptor bestimmt werden kann und durch Komplementarität zu der dreidimensionalen Struktur der Bindungsregion.

**[0069]** Bei der Bestimmung der Fähigkeit einer Kandidatensubstanz zur Wechselwirkung mit der identifizierten Stelle werden typischerweise tatsächliche physikalische Experimente verwendet. Alternativ kann jedoch auch die virtuelle Interaktion bewertet werden. So beinhaltet das "Kontaktieren" der identifizierten Stelle des Rezeptors mit einer Testzusammensetzung nicht nur den physikalischen Kontakt, sondern auch den virtuellen Kontakt – d.h. das Andocken eines abgeleiteten Pharmakophors an Reste, die in der Kristallstruktur oder einer modellierten Vergrößerung davon identifiziert sind. So können, wie unten beschrieben, die relevanten Merkmale der Zielstelle in den geeigneten Regionen durch Bewertung der Kristallstruktur und der Eigenheiten der Bindung einer Modellverbindung, wie TER16998 an diese Domäne bestimmt werden. Dementsprechend kann die dreidimensionale Zielstelle modelliert werden und die Merkmale des Pharmakophors können von der Komplementarität zum Ziel abgeleitet werden. Das Pharmakophor wird im Hinblick auf Parameter, wie elektrostatische Potenzialverteilung definiert werden – d.h. die allgemeine Form des Elektronenwolkenmusters. Das so beschriebene Pharmakophor kann auch verwendet werden, um ein Modell für ins Auge fallende Merkmale der Strukturen bekannter Moleküle bereitzustellen. Diese Information kann mit den, wie unten beschrieben, für diese Moleküle erhaltenen Fingerabdrücken, verwendet als Vergleichsstandard, kombiniert werden, um zusätzliche Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften zu wählen.

**[0070]** Es wurde bestimmt, dass relevante Bereiche der IR- $\beta$ -Kette, die an der Bindung modulierender Verbindungen teilnehmen, durch die Positionen 1089 bis 1105 repräsentiert sind, auch durch die Positionen 1120 bis 1137 und 1235 bis 1252 und – durch Ableitung – die dazu räumlich benachbarten Reste (siehe Beispiel 7). Diese kritischen Domänen wurden durch Konstruktion einer Reihe von 14 Peptiden identifiziert, die verschiedene Domänen der CKD der menschlichen Form des Insulinrezeptors repräsentieren und durch Testen der Fähigkeit dieser Peptide zur Inhibition der Aktivierung der CKD-Kinaseaktivität durch TER16998. Im allgemeinen werden Peptide, die in der Lage sind, die aktivierende Verbindung zu binden, diese Aktivität inhibieren, und zwar aufgrund ihres Verhaltens als Lockvogel oder Schwämme für den Aktivator. So können im allgemeinen Positionen, die Aktivatoren binden, durch Konstruktion von Peptiden identifiziert werden, korrespondierend zu den relevanten Domänen auf der  $\beta$ -Kette und Testen dieser Peptide im Hinblick auf ihre Fähigkeit als Schwämme in einem *in vitro* Assay zu wirken, wobei die Fähigkeit eines bekannten Aktivators zur Bewirkung der Konformationsveränderung in der zweilappigen CKD durch jeden geeigneten Assay, wie oben beschrieben, bestimmt wird. Peptide, die eine Stelle enthalten, die an der Bindung des Aktivators teilnimmt, werden die Aktivierung inhibieren. Zusätzlich zu den in den Peptiden selbst enthaltenen Stellen nehmen Reste, die zu der Bindungsstelle räumlich benachbart sind, identifiziert im inhibierenden Peptid in der dreidimensionalen Struktur der CKD ebenfalls an der Bindung des Aktivators teil.

**[0071]** Zusätzlich zu den oben aufgeführten Domänen soll die JM-Domäne auch an der Aktivierung, ausgelöst durch Verbindungen wie TER16998 beteiligt sein, durch Demonstration, dass die in der JM-Domäne enthaltenen Tyrosine nicht phosphoryliert sind, wenn der Rezeptor durch TER16998 aktiviert wird.

**[0072]** Die JM-Domäne wird gemäß der Illustration in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) definiert. Wie in [Fig. 1](#) dargestellt, ist die JM-Domäne im Zytoplasma, direkt benachbart zum Transmembranbereich der IR- $\beta$ -Ketten, enthalten. Das Ausmaß dieser Region wird durch Kohanski definiert, unter Verwendung der Nummerierung von Y. Ebina et al., *Cell* (1985) 40:747.

**[0073]** Die JM-Domäne enthält zwei Tyrosine, die autophosphoryliert sind, wenn der Rezeptor durch Insulin aktiviert wird, und zwar in den Positionen **965** und **972**. Das Tyrosin in Position **984** ist anscheinend nicht phosphoryliert.

**[0074]** Der Phosphorylierungsstatus der verschiedenen Regionen der Zytoplasmadomäne unter verschiedenen Bedingungen wird durch das Verfahren von Kohanski (1993, *supra*) unter Verwendung eines Trypsinverdaus des phosphorylierten Zytoplasmabereichs bestimmt. Wie durch Kohanski dargestellt und in [Fig. 6](#) hier illustriert (die [Fig. 4](#) des Kohanski-Papiers ist), wird die Abtrennung der Trypsinfragmente von hoch auflösender HPLC verwendet, um Tyrosinreste zu identifizieren, die phosphoryliert wurden. Spur A zeigt den Verdau von Gesamtlängen-CKD; Spur B zeigt den Verdau einer abgekürzten Version, der 10 kD am C-Terminus fehlen.

**[0075]** Kurz gefasst ist in Kohanski's Arbeit die Zytoplasmadomäne in Gegenwart von  $\gamma$ -markiertem ATP phosphoryliert. Die Bedingungen beinhalten 1 bis 10 mM  $Mn^{2+}$ , 10  $\mu M$  Gesamt-ATP, 10  $\mu g/ml$  CKD bei einer Inkubation bei 25°C für 2 Stunden. Bei einer Überprüfung von TER16998 oder Insulin oder beiden wird löslich gemachter intakter Rezeptor, enthaltend sowohl  $\alpha$ -als auch  $\beta$ -Ketten verwendet. Die phosphorylierte  $\beta$ -Kette, enthaltend die Zytoplasmakinasedomäne (CKD), markiert mit radioaktivem Phosphat, wird dann wiedergewonnen und unter Verwendung von SDS-PAGE gereinigt. Nach einer Lokalisierung der markierten CKD durch Au-

toradiogramme aus dem feuchten, nicht fixierten Gel direkt nach Elektrophorese werden die relevanten Segmente aus dem Gel ausgeschnitten und in Wasser 30 Minuten eingeweicht. Die Segmente werden zerkleinert und mit Trypsin bei 0,1 mg/ml, zugefügt in 50 mM N-Ethylmorpholin-Essigsäure (pH 7) für 15 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die Trypsinfragmente werden dann durch Filtration gewonnen und einer HPLC in zwei Schritten unterzogen. Die Verdaus werden zunächst einem Anionenaustausch auf SynChropak AX300 schwachem Anionenaustausch unterzogen und gradienteneluiert; die Fraktionen werden gemäß der Verteilung der Radioaktivität gesammelt.

**[0076]** Jeder Pool wird dann einer HPLC auf einer Spherisorb C8-Umkehrphasensäule unterzogen und nach einer Gradientenelution werden individuelle Fraktionen gewonnen. Die Fraktionen werden durch Vergleich mit Vergleichs-HPLC-Läufen des ursprünglichen Trypsinverdaus identifiziert. Individuelle Fraktionen werden dann sequenziert, um die Lokalisierung der phosphorylierten Tyrosine zu bestimmen.

**[0077]** Dieses Verfahren wurde auf einer phosphorylierten CKD von einem intakten Rezeptor verwendet, der mit und ohne TER16998 und/oder Insulin behandelt wurde.

**[0078]** Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Bestimmung:

	Tabelle 1						
	Juxtamembran		zentrale Domäne			C-terminal	
pY-Stellen	965	972	1158	1162	1163	1328	1334
Ruhezustand	X	X	X	X	X	X	X
Mit Insulin	P	P	P	P	P	P	P
Mit TER16998	X	X	P	P	P	P	P
Mit TER16998 und Insulin	X	X	P	P	P	P	P

**[0079]** In Tabelle 1 zeigt "X", dass das relevante Tyrosin nicht phosphoryliert ist; "P" zeigt, dass es phosphoryliert ist.

**[0080]** Es ergibt sich aus den Ergebnissen der Tabelle 1, dass die Insulinaktivierung des Rezeptors zu einer Phosphorylierung in allen Bereichen führt; eine Aktivierung durch TER16998 kann Phosphorylierungen in der Zentraldomäne und der C-terminalen Domäne durch die eigene Wechselwirkung mit der JM-Domäne bewirken, da wenn sowohl Insulin als auch TER16998 in Kombination verwendet werden, die JM-Tyrosinstellen nicht phosphoryliert verbleiben, während die verbleibenden Stellen, charakteristisch für den aktivierte Rezeptor, in Phosphotyrosin umgewandelt werden.

**[0081]** Die Zusammensetzung oder Substanz, die als Agonist für den Insulinrezeptor wirken kann, durch Modulation der JM-Region, muss nicht notwendigerweise das Elektronenwolkenmuster der phosphorylierten Reste in diesem Bereich nachahmen, da es scheint, dass die JM-Tyrosine nicht notwendigerweise ein Phosphat aufnehmen müssen, um den Rezeptor zu aktivieren. Dies ist bekannt, da die Mutation der JM-Tyrosine nicht zu einer Unfähigkeit von Insulin zur Aktivierung des Rezeptors führt, während eine Mutation der Tyrosine in der katalytischen Domäne die Insulinaktivierung des Rezeptors zerstört. Die JM-Tyrosine werden anscheinend in einer cis-Kinasereaktion phosphoryliert, was wiederum eine Transkinasereaktion an den verbleibenden Tyrosinresten erleichtert.

**[0082]** Wie oben dargestellt, kann die Bindungslokalisierung von TER16998 oder einem anderen Aktivator weiter durch Umwandlung der nicht-kovalenten Assoziation des Aktivators zu der CKD-Region in eine kovalente, z.B. durch Verwendung eines Fotoaffinitätsmarkers, gefolgt von Lokalisieren der kovalent gebundenen Marker durch Sequenzieren definiert werden. Wenn so der Aktivator mit dem Zielbereich assoziiert ist, führt eine leichte Aktivierung zu einer kovalenten Bindung. [Fig. 7](#) zeigt eine illustrative Synthese von Fotoaffinitäts sonden für die Bindung von TER16998. Sowohl Nitren als auch Radikal bildende Ausführungsformen sind dargestellt, obwohl die Fotoaktivität der Azobindungen in TER16998 selbst ebenfalls verwendet werden könnte. Wie dargestellt, wird der Naphthylhydroxy-Substituent unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimid (NHS) verestert, um zu einer Anbindung des fotoaktivierenden Bestandteils zu führen. Bei Aktivierung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird das TER16998-Derivat dann kovalent an die assoziierte Position auf dem Rezeptor, wie dargestellt, gebunden werden. Dies ermöglicht eine genauere Definition des Punkts, an den TER16998 assoziiert ist. Alternativ kann TER16998 per se verwendet werden, gefolgt von einer Behandlung mit bifunkti-

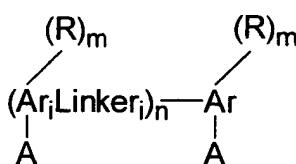
onalen Linkern, wie z.B. denjenigen, die von der Pierce Chemical Company, Rockford, IL, erhältlich sind, um eine kovalente Anbindung von TER16998 an die geeignete Stelle zu bewirken.

**[0083]** Die Verfügbarkeit der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors ermöglicht eine Identifizierung von Resten, die wichtige Beiträge zur Bindung der Aktivatoren an den CKD-Bereich beisteuern. Mutationen dieser Reste können einfach bereitgestellt werden, aufgrund der Verfügbarkeit des Gens, das den Rezeptor kodiert. M. Dillalba et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:7848-7852. Eine ortsgerichtete Mutagenese wird so modifizierte Formen des Proteins bereitstellen, worin die erfolgreiche Bindung an eine Testverbindung für die Fähigkeit, eine IR-Aktivierung zu zeigen, irrelevant ist und ein Verlust der Bindung an eine Verbindung durch einen mutierten IR für die IR-Aktivierung relevant ist. So können diese Mutanten als Differenzialscreening-Substrate in Kombination mit dem nativen Protein oder irrelevanten Mutanten zur Unterscheidung zwischen Verbindungen verwendet werden, die den Rezeptor einfach binden und denjenigen, die zu einer Aktivierung durch Bindung an den CKD-Bereich in der Lage sind.

**[0084]** Unter den Substanzen, die den Insulinrezeptor aktivieren, werden Antikörper oder Fragmente davon beinhaltet sein, die für die identifizierten Aktivator-Bindungsstellen, wie weiter unten beschrieben, immunospezifisch sind, da solche Antikörper spezifisch diesen Bereich binden werden, von dem dargestellt ist, dass er an der Aktivierung des Rezeptors beteiligt ist. Die Herstellung solcher Antikörper wird einfach durch gut etablierte Verfahren bewirkt, typischerweise unter Beteiligung einer Immunisierung eines Säugers oder eines anderen Wirbeltiers mit dem Peptid, das die Stelle darstellt, optional gekoppelt mit einem immunogenen Träger. Antikörper können direkt aus dem Plasma des immunisierten Tiers erhalten werden oder können vorzugsweise monoklonale Antikörper sein, erhalten unter Verwendung von konventionellen Hybridomverfahren. Solche Hybridome sind auch geeignete Quellen für die Gene, die die jeweiligen relevanten monoklonalen Antikörper kodieren, die dann manipuliert werden können, um diese oder modifizierte Antikörper zu erhalten, wobei rekombinante Verfahren verwendet werden. Dies ermöglicht die Herstellung nicht nur der Antigen-Bindungsfragmente des Antikörpers (die direkt aus den polyklonalen Antiseren erhalten werden könnten oder von den monoklonalen Antikörpern, die von den Hybridomen sezerniert werden, durch enzymatische Spaltung), sondern ermöglicht auch die Erzeugung einzelkettiger Formen, wie z.B.  $F_v$ -Formen. Alternativ können statistische Bibliotheken von rekombinanten  $F_v$ -Formen mit Screening durchsucht werden. Die Verfügbarkeit der Gene ermöglicht auch die Modifikationen der Antikörper zur Untersuchung der Wichtigkeit der variablen Region zur Erhellung der Nuancen der Wechselwirkung mit dem Rezeptor. Solche Antikörper repräsentieren so nicht nur Verbindungen, die den Rezeptor direkt aktivieren können, sondern sind auch nützliche Handwerkszeuge zum Entwurf kleiner Moleküle, die an die identifizierten Stellen binden.

#### Verbindungen, die den Insulinrezeptor aktivieren

**[0085]** Eine Anzahl von Verbindungen, die zur Aktivierung des Insulinrezeptors durch direkte Interaktion mit der CKD in der Lage sind, wurden identifiziert. Diese Klasse von Verbindungen hat die allgemeine Formel



**Formel (1)**

worin jedes Ar unabhängig ein aromatischer Bestandteil ist;  
jedes A ist unabhängig ein Protonen akzeptierender Substituent;

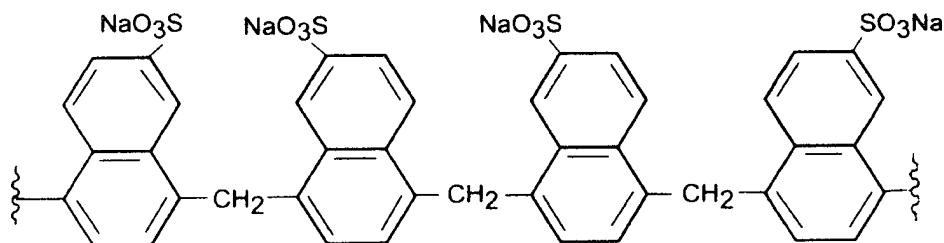
jedes R ist unabhängig ein nicht beteiligter Substituent;

m ist 0, 1 oder 2;

n ist 1 bis 6; und

jeder Linker ist unabhängig  $-CH_2-$ ,  $-N=N-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-NHCO-$  oder  $-NHCONH-$  oder ein Iosster davon, worin wenn n 1 ist, mindestens ein Ar mindestens 2 fusionierte aromatische Ringe umfassen muss.

**[0086]** Ein spezifisches Beispiel für die Verbindung der Formel (1) wird durch Komponente A der folgenden Formel dargestellt:



## Komponente A

**[0087]** In den Verbindungen der Formel (1) können die Protonen akzeptierenden Substituenten, dargestellt durch "A" anionisch sein oder können ausreichend nukleophil sein, um ein Proton bei physiologischem pH zu akzeptieren. Besonders bevorzugte Ausführungsformen von A beinhalten  $-\text{SO}_3\text{X}$ ,  $\text{OP}(\text{OX})_3$  und  $-\text{COOX}$ , worin X ein Wasserstoffatom oder ein Kation ist, abhängig vom pH. Geeignete Kationen beinhalten anorganische Kationen, wie Natrium, Kalium, Calcium und ähnliche oder können organische Kationen sein, wie z.B. diejenigen, die von organischen Basen bereitgestellt werden, z.B. Koffein. Ebenfalls in den Ausführungsformen von A beinhaltet sind Aminosubstituenten, einschließlich primären, sekundären und tertiären Aminen. Typische Bi- oder Oligostere von anionischen Liganden sowie Tetrazolringe, selbst wenn sie nicht geladen sind.

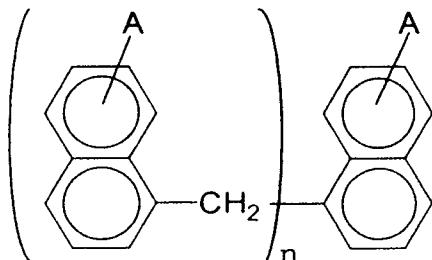
**[0088]** Die durch Ar dargestellten aromatischen Bestandteile sind monocyclische oder bicyclische aromatische Systeme wie Benzol oder Naphthalin oder enthalten ein oder mehr Heteroatome, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus O, S und N. So sind unter den aromatischen Systemen Benzothiazole, Chinoline, Pyridin und ähnliche beinhaltet. Besonders bevorzugt werden Naphthylenreste.

**[0089]** Die nicht eingreifenden Substituenten an den Naphthylbestandteilen in Formel (1) können vorliegen oder nicht – d.h. jedes m ist unabhängig 0 oder 1. Die Position von R ist in jedem Fall willkürlich; bevorzugte Ausführungsformen von R beinhalten substituierte oder unsubstituierte Hydrocarbylbestandteile, egal ob linear, verzweigt oder cyclisch und ob aromatisch oder nicht aromatisch. Unter diesen sind Alkylsubstituenten mit 1-6C, Alkenylsubstituenten mit 1-6C und Alkyl- oder Alkenylsubstituenten beinhaltet, worin die Kohlenstoffkette durch ein oder mehr Heteroatome wie O, N oder S unterbrochen ist, jedoch nicht auf diese begrenzt. Substituenten können auch die Formel  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'_2$  und  $-\text{SR}'$  aufweisen, worin  $\text{R}'$  H ist oder R wie oben definiert. Besonders bevorzugte Ausführungsformen beinhalten Alkyl (1-6C).

**[0090]** In den Verbindungen der Formel (1) ist jeder Linker unabhängig ein Isoster von  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , so wie z.B.  $-\text{N}=\text{N}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-$  oder  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  oder  $-\text{NHCH}_2-$  oder  $-\text{CH}_2-$ , so wie NH oder O oder von  $-\text{NHCO}-$ , so wie  $-\text{OCO}-$  oder  $-\text{COO}-$ . Allgemeine Verfahren zur Bildung von all diesen Bindungen zwischen aromatischen Systemen sind auf dem Gebiet wohlbekannt.

**[0091]** Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (1) sind diejenigen, worin jedes R Alkyl (1-6C) ist. Ebenfalls bevorzugt werden Verbindungen der Formel (1), worin jedes m 0 ist.

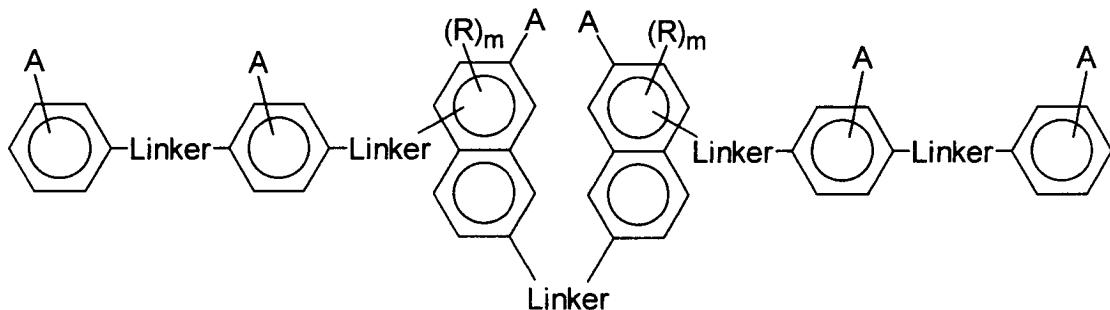
**[0092]** Auch bevorzugt sind Ausführungsformen, worin die Verbindung der Formel (1)



ist, worin n 4 bis 6 und A wie in Anspruch 1 definiert ist.

**[0093]** Besonders bevorzugt ist die als Komponente A dargestellte Verbindung.

**[0094]** Eine andere bevorzugte Form der Verbindungen von Formel (1) wird durch Formel (2) dargestellt:



Formel (2)

worin jeweils R, A, Linker und m wie oben definiert sind.

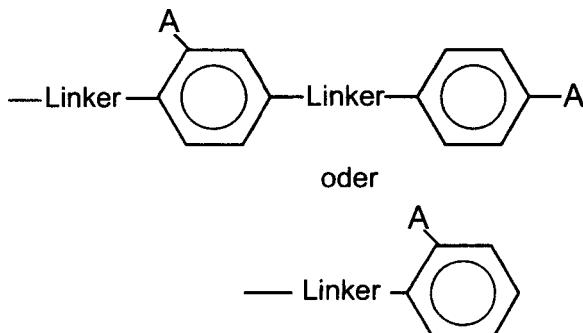
**[0095]** Bevorzugt werden Verbindungen, worin jedes n unabhängig 0, 1 oder 2 ist und jeder Linker unabhängig ein Isoster von -NHCONH- oder von -N=N- oder von -NHCO- ist.

**[0096]** Bei den Verbindungen der Formel (2) können die Protonen akzeptierenden Substituenten, wie dargestellt durch "A" anionisch sein oder können ausreichend nukleophil sein, um ein Proton bei physiologischem pH zu akzeptieren. Besonders bevorzugte Ausführungsformen von A beinhalten  $-\text{SO}_3\text{X}$ ,  $\text{OP}(\text{OX})_3$  und  $-\text{COOX}$ , worin X ein Wasserstoffatom oder ein Kation ist, abhängig vom pH. Geeignete Kationen beinhalten anorganische Kationen, wie Natrium, Kalium, Calcium und ähnliche oder können organische Kationen sein, wie z.B. diejenigen, die von organischen Basen bereitgestellt werden, z.B. Koffein. Ebenfalls in den Ausführungsformen von A beinhaltet sind Aminosubstituenten, einschließlich primären, sekundären und tertiären Aminen, wie auch typische Bioisostere von anionischen Liganden, wie Tetrazolringe, selbst wenn sie nicht geladen sind.

**[0097]** Die nicht eingreifenden Substituenten an den Naphthylbestandteilen in Formel (2) können vorliegen oder nicht – d.h. jedes n ist unabhängig 0, 1 oder 2. Die Position von R ist in jedem Fall willkürlich; bevorzugte Ausführungsformen von R beinhalten substituierte oder unsubstituierte Hydrocarbylbestandteile, egal ob linear, verzweigt oder cyclisch und ob aromatisch oder nicht aromatisch. Unter diesen sind Alkylsubstituenten mit 1-6C, Alkenylsubstituenten mit 1-6C und Alkyl- oder Alkenylsubstituenten beinhaltet, worin die Kohlenstoffkette durch ein oder mehr Heteroatome wie O, N oder S unterbrochen ist, jedoch nicht auf diese begrenzt. Substituenten können auch die Formel  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'_2$  und  $-\text{SR}'$  aufweisen, worin  $\text{R}'$  H ist oder R wie oben definiert. Besonders bevorzugte Ausführungsformen beinhalten -OH und zusätzliche aromatische Bestandteile, enthaltend Protonen akzeptierende Substituenten.

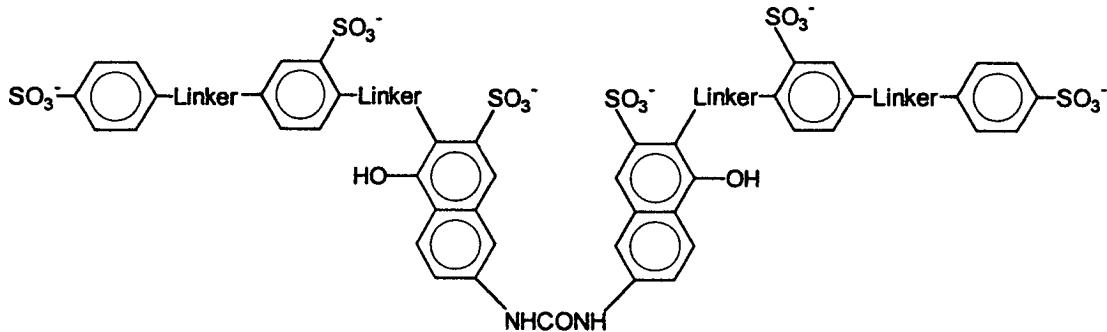
**[0098]** In den Verbindungen der Formel (2) ist jeder Linker unabhängig ein Isoster von -NHCONH-, so wie -NHCNH- oder -NHCOO- oder kann ein Isoster von -N=N-, so wie  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-$  oder  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  oder  $-\text{NHCH}_2-$  sein. Die Linker können auch Isostere von -NHCO- sein, wie z.B. -OCO- oder -COO-. Allgemeine Verfahren zur Bildung all dieser Bindungen zwischen aromatischen Systemen sind auf dem Gebiet wohlbekannt.

**[0099]** Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (2) sind diejenigen, worin jedes R unabhängig OH ist oder

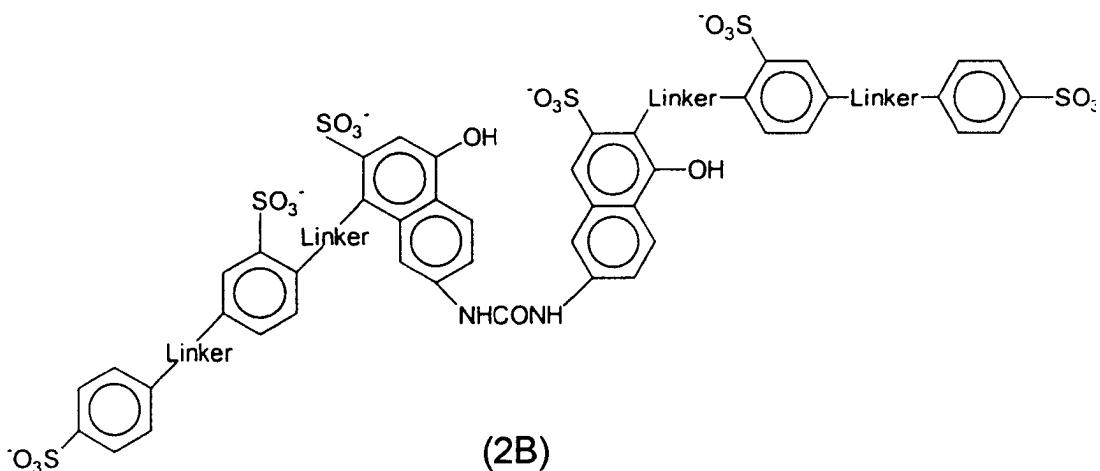


ist, worin der Linker wie oben definiert wird. Ebenfalls bevorzugt werden Verbindungen der Formel (2), worin jedes n 0 oder 1 ist, insbesondere worin jedes R unabhängig OH ist.

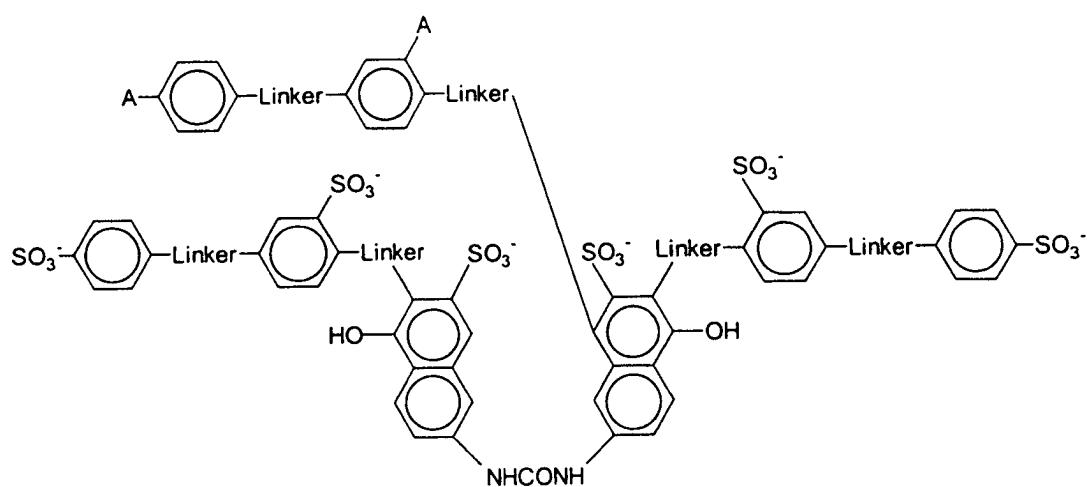
[0100] Ebenfalls bevorzugt sind Ausführungsformen, bei denen die Verbindung der Formel (2) ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus



(2A), z.B. TER3935



(2B)

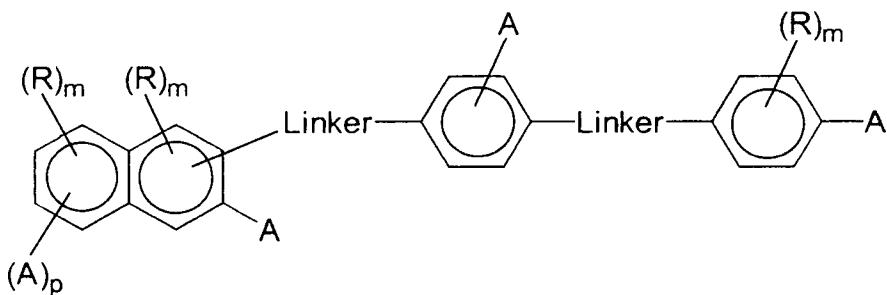


(2C), z.B. TER17005

worin jeder Linker unabhängig entweder -N=N- oder -NHCO- ist.

[0101] Besonders bevorzugt werden TER16998 und die Verbindungen, wie dargestellt in den [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#).

[0102] Ebenfalls unter den Verbindungen der allgemeinen Formel (1) bevorzugt werden diejenigen der Formel (3):



Formel (3)

worin jeweils R, A, Linker und m wie oben definiert sind und p ist O oder 1.

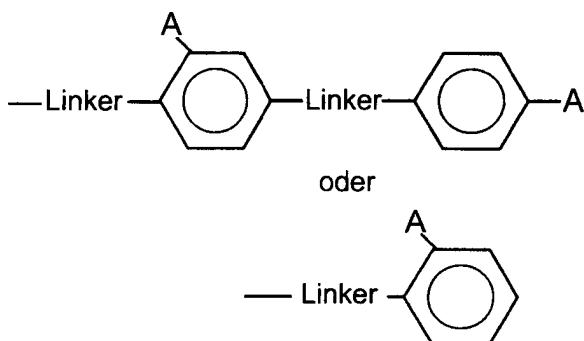
**[0103]** Bevorzugt werden Ausführungsformen, worin m O oder 1 ist; n ist 0, 1 oder 2 und jeder Linker ist unabhängig ein Isoster von -N=N- oder von -NHCO-.

**[0104]** In den Verbindungen der Formel (3) können die durch "A" dargestellten Protonen akzeptierenden Substituenten anionisch sein oder können ausreichend nukleophil sein, um ein Proton bei physiologischem pH zu akzeptieren. Besonders bevorzugte Ausführungsformen von A beinhalten  $-\text{SO}_3\text{X}$ ,  $\text{OP}(\text{OX})_3$  und  $-\text{COOX}$ , worin X ein Wasserstoffatom oder ein Kation ist, abhängig vom pH. Geeignete Kationen beinhalten anorganische Kationen, wie Natrium, Kalium, Calcium und ähnliche oder können organische Kationen sein, wie z.B. diejenigen, die von organischen Basen bereitgestellt werden, z.B. Koffein. Ebenfalls in den Ausführungsformen von A beinhaltet sind Aminosubstituenten, einschließlich primären, sekundären und tertiären Aminen, wie auch typische Bioisostere von anionischen Liganden, wie Tetrazolringen, selbst wenn sie nicht geladen sind.

**[0105]** Die nicht eingreifenden Substituenten an den Naphthylbestandteilen in Formel (3) können vorliegen oder nicht – d.h. jedes n ist unabhängig 0, 1 oder 2. Die Position von R ist in jedem Fall willkürlich; bevorzugte Ausführungsformen von R beinhalten substituierte oder unsubstituierte Hydrocarbylbestandteile, egal ob linear, verzweigt oder cyclisch und ob aromatisch oder nicht aromatisch. Unter diesen sind Alkylsubstituenten mit 1-6C, Alkenylsubstituenten mit 1-6C und Alkyl- oder Alkenylsubstituenten beinhaltet, worin die Kohlenstoffkette durch ein oder mehr Heteroatome wie O, N oder S unterbrochen ist, jedoch nicht auf diese begrenzt. Substituenten können auch die Formel  $-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'_2$  und  $-\text{SR}'$  aufweisen, worin  $\text{R}'$  H ist oder R wie oben definiert. Besonders bevorzugte Ausführungsformen beinhalten -OH und zusätzliche aromatische Bestandteile, enthaltend Protonen akzeptierende Substituenten.

**[0106]** In den Verbindungen der Formel (3) ist jeder Linker unabhängig ein Isoster von -NHCONH-, so wie  $-\text{HCNHNH}-$ ,  $-\text{NHCOO}-$  oder  $-\text{OCOO}-$  oder kann ein Isoster von -N=N-, so wie  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{N}-$  oder  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  oder  $-\text{NHCH}_2-$  sein. Die Linker können auch Isostere von -NHCO- sein, wie z.B.  $-\text{OCO}-$  oder  $-\text{COO}-$ . Allgemeine Verfahren zur Bildung all dieser Bindungen zwischen aromatischen Systemen sind auf dem Gebiet wohlbekannt.

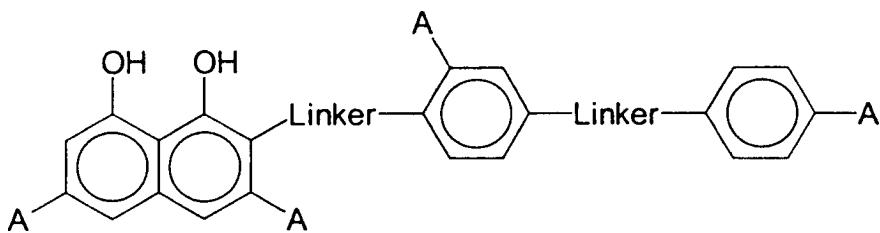
**[0107]** Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel (3) sind diejenigen, worin jedes R unabhängig OH ist oder



ist, worin Linker wie oben definiert ist. Ebenfalls bevorzugt werden Verbindungen der Formel (3), worin n jeweils 0 oder 1, insbesondere worin jedes R unabhängig OH ist.

**[0108]** Ebenfalls bevorzugt sind Ausführungsformen von denjenigen Verbindungen, worin jeder Linker unabhängig entweder -N=N- oder -NHCO- ist.

[0109] Noch bevorzugter werden Verbindungen der Formel



worin jeder Linker unabhängig -CH=CH- oder -NHCO- ist.

[0110] Besonders bevorzugt werden die in [Fig. 8C](#) und [Fig. 8D](#) hier dargestellten Verbindungen.

[0111] Die Identifizierung der vorstehenden Verbindungen wurde wie folgt bewirkt: Eine Bibliothek von Verbindungen, beschrieben im US-Patent Nr. 5,587,293, hier durch Inbezugnahme inkorporiert, enthaltend die Fingerabdrücke von 10.000 Verbindungen, erhalten gegen ein Panel von 18 Referenzproteinen, wurde so sortiert, dass Cluster von Fingerabdrücken mit ähnlichen Eigenschaften gruppiert wurden, um 50 repräsentative Verbindungen als "Trainingssatz" zu wählen. Jede dieser 50 repräsentativen Verbindungen wurde im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung des Insulinrezeptors hin überprüft. Eine Probe, von der man annahm, dass sie nur aus TER12, wie dargestellt in [Fig. 8D](#) bestand, deren Fingerabdruck sich nicht gruppieren ließ und die kein Mitglied eines Clusters war, war die einzige überprüfte Verbindung, die unter Verwendung des in Beispiel 1 dargestellten Assays erfolgreich bei der Aktivierung dieses Rezeptors war. Obwohl später festgestellt wurde, dass die Komponente der überprüften Probe, die die Struktur von TER12 aufwies, nicht so aktiv in diesem Assay war wie eine Komponente, die bei niedrigerer Konzentration vorlag, nämlich Komponente A sind die strukturellen Ähnlichkeiten von TER12 und Komponente A offensichtlich und ausreichend, um es sowohl Komponente A als auch TER12 zu ermöglichen, dass sie als Fingerabdruck-Vergleichsstandard verwendet werden können.

[0112] Das vorstehende Verfahren kann generalisiert werden, in Kombination mit dem in Beispiel 1 unten beschriebenen Assay-Verfahren, um nach Verbindungen zu suchen, die jeden Rezeptor aktivieren, der einer Autophosphorylierung unterliegt. Im allgemeinen umfasst das Verfahren die Identifizierung einer Verbindung, die einen Rezeptor aktiviert, enthaltend einen Kinaseanteil durch Autophosphorylierung. Das Verfahren umfasst das Kontaktieren von jedem Mitglied eines Satzes von maximal unterschiedlichen Kandidatenverbindungen mit dem Rezeptor oder dem Kinaseanteil des Rezeptors und dem Nachweis der Gegenwart oder Abwesenheit von Tyrosinphosphat auf dem Rezeptor oder dem Kinasebereich. Ein erfolgreicher Kandidat wird als Mitglied des Satzes identifiziert, wobei ein erhöhtes Niveau Tyrosinphosphat im Vergleich mit einem Grundniveau bei dem Rezeptor oder der Kinase, mit der kontaktiert wird, nachgewiesen wird.

[0113] Chemikalienkataloge wurden im Hinblick auf Verbindungen mit strukturellen Merkmalen ähnlich zu denjenigen von TER12 durchsucht, oder die bei einer Überprüfung Fingerabdrücke aufwiesen, die essenziell übereinstimmende Merkmale zeigten. Von 42 Verbindungen, die als ähnliche Unterstrukturen aufweisend identifiziert wurden, zeigten vier eine Aktivität im Hinblick auf den Rezeptor; unter diesen befand sich eine Probe, enthaltend TER3938, wie dargestellt in [Fig. 2B](#), obwohl später gezeigt wurde, dass die meiste Aktivität auf Komponente A zurückzuführen war, ein strukturell verwandter Bestandteil, der in niedrigerer Konzentration vorlag. So können die Fingerabdrücke dieser im Hinblick auf Standardreferenzpanels (unten weiter beschrieben) identifizierten Verbindungen als Standards zum Vergleich mit Fingerabdrücken von Kandidatenverbindungen verwendet werden, von denen vermutet wird, dass sie dieselben Aktivitäten aufweisen.

[0114] Die US-Patente 5,217,869, 5,300,425 und 5,587,293, deren Inhalt hier durch Inbezugnahme inkorporiert ist, beschreiben Verfahren zur Identifikation von Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften durch Vergleich ihrer Fingerabdrücke. So bezieht sich, wie hier verwendet, ein "charakterisierender Fingerabdruck" auf ein Bindungsprofil, wie beschrieben im US-Patent Nr. 5,587,293, der ausreichende Informationen über die Bindungsaktivität einer bestimmten Verbindung zur Verfügung stellt, um sie zu charakterisieren. Typische Profile werden z.B. in [Fig. 2C](#) von diesem Patent illustriert, das ein Profil gegen ein Panel mit nur neun Mitgliedern illustriert. Höhere Zahlen an Mitgliedern des Panels werden bevorzugt, jedoch können typischerweise Panels mit 12, 16 oder 18 Mitgliedern verwendet werden. Unter einem "ähnlichen" Bindungsprofil wird verstanden, dass das für eine Verbindung erhaltene allgemeine Muster mit einem "ähnlichen" Profil dasselbe ist wie das allgemeine Muster, das die Referenz zeigt, z.B. TER16998.

[0115] Kurz gefasst wird ein Fingerabdruck für eine einzelne Verbindung (der sie charakterisiert) erhalten, in-

dem die Bindung oder Reaktivität der Verbindung im Hinblick auf ein Referenzpanel von Substanzen überprüft wird, bei denen es sich z.B. um Antikörper, allgemein Proteine oder andere Substanzen handeln kann, die variierende Reaktivitätsgrade im Hinblick auf die meisten Verbindungen aufweisen. Die Referenzpanel werden so gewählt, dass sie im wesentlichen die Gesamtheit des chemischen Raums repräsentieren, d.h. ein Satz von Substanzen, der sich in seinen räumlichen und Ladungseigenschaften so unterscheidet, dass die Fähigkeit zur Reaktion mit irgendeiner anderen Substanz mindestens irgendwie innerhalb des Panels enthalten ist. Jede mit dem Panel umgesetzte Verbindung ergibt dann ein charakteristisches Muster von Reaktivitäten, das als Fingerabdruck angesehen werden kann. Verbindungen, die ähnliche Fingerabdrücke zeigen, haben ähnliche Reaktivitätsmuster und Eigenschaften. Wenn also so von einem Zielrezeptor bekannt ist, dass er einen spezifischen Liganden bindet, kann man eine Verbindung identifizieren, die ebenfalls an den Rezeptor bindet, indem eine Verbindung gewählt wird, deren Fingerabdruck ähnlich demjenigen des bekannten Liganden ist. Hier werden die Fingerabdrücke von Kandidaten, z.B. aus Bibliotheken von Verbindungen, mit den korrespondierenden Fingerabdrücken von TER12, TER3938 oder anderen Verbindungen verglichen, identifiziert als Aktivatoren des Rezeptors, vorzugsweise Komponente A und TER16998. Es wird auch festgehalten, dass es keinerlei Konsequenzen hat, dass TER12 und TER3938 später selbst sich als weniger aktiv in den IR-Kinase-Assays erwiesen haben als andere Komponenten, enthalten in Proben dieser Verbindungen im Hinblick auf ihre Nützlichkeit ihrer Fingerabdrücke zur Identifizierung von Verbindungen, die eine IR-Kinaseaktivität aufweisen, da die aktiven Kontaminanten chemisch ähnlich sind.

**[0116]** Aufgrund der modularen Natur der aktiven Verbindungen unter wiederholter Verwendung ähnlicher Motive, ist eine Synthese von Varianten, die in die in Formel (1) dargestellte Gattung fallen, unter Verwendung von standardkombinatorischen Chemieverfahren besonders günstig. Typischerweise ermöglicht eine parallele Synthese von Verbindungen mit einer Vielzahl alternativer Baublocks, verwendet in jedem aufeinanderfolgenden Schritt, dass etliche Varianten schnell hergestellt werden können. Üblicherweise, aber nicht notwendigerweise werden die parallelen Arbeitsschritte auf Festphasen-immobilisierten Vorläufern durchgeführt. Die resultierenden Bibliotheken von Verbindungen haben ihre Konformität mit der in Formel (1) dargestellten Struktur gemein und sind nützlich, um neue aktive Verbindungen zu identifizieren und ebenfalls, pharmakologisch relevante Merkmale der aktiven Bestandteile zu etablieren, die dann weiter kombiniert werden können.

**[0117]** Die Bewertung der strukturellen Merkmale einer individuell aktiven Verbindung, insbesondere denjenigen, die von etlichen aktiven Verbindungen geteilt werden, gegenüber z.B. den Verbindungen, die den Insulinrezeptor nicht aktivieren, ermöglicht auch den Entwurf geeigneter Kandidaten für die Synthese und die Tests. Verfahren für eine solche Analyse und Identifizierung solcher struktureller Merkmale sind auf dem Gebiet bekannt. Siehe z.B. S. Nesnow et al., J Toxicol Environ Health (1988) 24:499-513, das die Zuordnung struktureller Merkmale in einer Gruppe von 36 Arylazo-Farbstoffen als mit ihrer Fähigkeit in Bezug stehend beschreibt, durch eine Rattenleber-mikrosomale Azoreduktase reduziert zu werden.

**[0118]** Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrieren, jedoch nicht begrenzen.

#### Beispiel 1

##### Anscheinende Wirkung von TER12 auf die Insulinrezeptor-Kinase-Autophosphorylierung

A. Dieser Assay ist eine modifizierte Form von dem in H. Hagino et al., Diabetes (1994) 43:274-280 beschriebenen. Kurz gefasst wurden menschliche Insulinrezeptoren (hIR) teilweise aus Plazentaextrakten oder aus der Zelllinie IM-9 gereinigt. Die teilweise gereinigten hIRs wurden in Mikrotiterplatten-Vertiefungen durch Inkubation für 90 Minuten mit Vertiefungen, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen hIR beschichtet waren, gefangen. Die Vertiefungen wurden dann mit verschiedenen Dosisniveaus Insulin und/oder Testverbindungen 15 Minuten bei Raumtemperatur behandelt; dann wurde ATP (10  $\mu$ M) zugefügt, um der Kinaseaktivität das Fortschreiten zu ermöglichen. Nach 60 Minuten wurden die Vertiefungen gewaschen und dann 60 Minuten mit biotinyliertem Antikörper behandelt, gerichtet gegen Phosphotyrosin (PY-20) und nicht-gebundene Materialien wurden wieder weggewaschen. Die Vertiefungen wurden dann mit einem konventionellen Streptavidin-Peroxidase-System für 30 Minuten inkubiert, um das Niveau des phosphorylierten Tyrosins zu bewerten.

Wenn Insulin in diesem Assay getestet wurde, ergab es eine Dosisreaktionskurve mit einem EC50 von ungefähr 0,3 nM und eine maximale Aktivität bei ungefähr 100 nM. Der EC50 ist ähnlich zu demjenigen, der für die Bindung von markiertem Insulin an verschiedene Zellen und Gewebe erhalten wird.

Zwei Sätze von Verbindungen mit jeweils 50 Mitgliedern, die so gewählt waren, dass sie maximal divers waren, wie definiert in US-Patent 5,300,425, hier durch Inbezugnahme inkorporiert, wurden in dem vorstehenden Assay durch Screening untersucht. Von diesen 100 Verbindungen zeigte nur eine Probe, die im we-

sentlichen aus TER12 bestand (siehe [Fig. 8C](#)), eine anscheinende Agonistenaktivität. In Abwesenheit von Insulin stimulierten 20  $\mu$ M dieser Probe eine Autophosphorylierung über das Fünffache (0,3 nM Insulin stimuliert die Phosphorylierung ungefähr in diesem Ausmaß). So ist die Aktivität von Insulin bei ungefähr 0,3 nM ungefähr äquivalent zu der von dieser Probe bei ungefähr 20  $\mu$ M gezeigten und eine Komponente dieser Probe zeigt die Fähigkeit, die Autophosphorylierung direkt zu stimulieren.

Zusätzlich erhöhte die Probe die Fähigkeit des Insulins, die Autophosphorylierung zu stimulieren. Die Zugabe von 60  $\mu$ M Probe zu hIR, kontaktiert mit 0,3 nM Insulin, führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung um ungefähr das Dreifache und zu einem Maximalniveau, wie gezeigt von einer Insulinstimulierung bei höheren Konzentrationen. Der EC50 für diese Wirkung (Erhöhung der Insulinstimulierung) wurde in zusätzlichen Experimenten als bei ungefähr 20  $\mu$ M der als TER12 kalkulierten Probe liegend gezeigt. Diese Ergebnisse wurden auch durch einen Western-Blot-Assay bestätigt.

B. In einer zusätzlichen Demonstration der Aktivität einer Komponente in der Probe, enthaltend TER12, wurde das künstliche Substrat, poly(G1u4Tyr) als Substrat für die Phosphorylierung verwendet. Der Einbau von markiertem Phosphat von  $\gamma$ -markiertem ATP wurde folgend auf eine Aktivierung des wie in Paragraph A hergestellten Rezeptors gemessen. Ungefähr 20  $\mu$ M der Probe, kalkuliert als TER12, stellten 75 % der maximalen insulinstimulierten Aktivität bereit; dies erhöhte auch die Fähigkeit von 0,5 nM und 5,0 nM Insulin, eine Phosphorylierung zu bewirken; 0,5 nM Insulin allein zeigte 60 % der maximalen Phosphorylierung; die Zugabe von 20  $\mu$ M der TER12-Probe erhöhte dies auf 120 %; in Gegenwart von 5 nM Insulin stieg die Phosphorylierung von 95 % des Maximums auf 140 %.

C. Wenn im Hinblick auf die Insulinrezeptor-agonistische Aktivität an ganzen Zellen hin getestet, d.h. an der menschlichen Lymphozyten-Zelllinie IM-9, erhielt sich die Probe, enthaltend TER12, ihre Fähigkeit, den Rezeptor zu stimulieren. In diesem Assay wurden  $2 \times 10^7$  Zellen mit und ohne diese Probe behandelt und mit und ohne Insulin für 5 Minuten, gefolgt von drei Waschgängen in isotonischem Medium, um die Probe, enthaltend TER12, zu entfernen. Die Zellen wurden dann in 0,5 % Tween 20 lysiert und Lysate in einem ELISA-Assay, wie in Paragraph A beschrieben analysiert, ohne die Inkubationsschritte mit ATP. Nach 5 Minuten einer Aussetzung gegenüber einer Probe, die 20  $\mu$ M TER12 enthielt, war die basale Insulinrezeptor-Kinaseaktivität um das Zweifache angestiegen und die insulinstimulierte Insulinrezeptor-Kinaseaktivität war um das Fünffache angestiegen.

D. Der in Paragraph B beschriebene Assay wurde durchgeführt, wobei anstelle des menschlichen Insulinrezeptors eine rekombinant erzeugte  $\beta$ -Kette verwendet wurde, der die Insulin-Bindungs-Domäne fehlte (zur Verfügung gestellt von Stratagene, Inc.). Die Fähigkeit dieser Kinase, ein Substratpeptid (Raytide from Oncogene Sciences) zu phosphorylieren, wird durch TER12 bei 25  $\mu$ M stimuliert. (Zusätzlich inhibiert auch ein bekannter Inhibitor, von dem angenommen wird, dass er auf die ATP-Stelle auf der Kinase wirkt, diese modifizierte Form des Rezeptors.)

E. Insulin ist in der Lage, die Differenzierung von 3T3-L1-Fibroblastenzellen zu einer Adipozyten-ähnlichen Morphologie zu induzieren, gemessen durch Oil Red O-Aufnahme. Die Probe, die nur TER12 enthielt, schien keine Differenzierung zu bewirken; bei einer Konzentration von 20  $\mu$ M erhöht sie jedoch die Differenzierungswirkung des Insulins. Diese Aktivität ist ähnlich zu derjenigen, die von Pioglitazon ausgeübt wird, wie oben beschrieben. Insulin erhöht auch den Glucosetransport in diese Zelllinie. Wiederum konnte die Probe allein den Glucosetransport nicht signifikant stimulieren, erhöhte jedoch die Fähigkeit von Insulin, dies zu tun.

## Beispiel 2

### Zusätzliche Verbindungen mit TER12-ähnlicher Aktivität

**[0119]** Unter Verwendung einer Substruktursuche, basierend auf dem TER12-Molekül, wurden 42 Kandidatenverbindungen erhalten und gemäß dem Verfahren von Beispiel 1 überprüft.

**[0120]** Eine Probe, die TER3938 enthielt, wie dargestellt in [Fig. 8E](#), zeigte ebenfalls eine agonistische Aktivität. TER3938, dargestellt in [Fig. 8E](#) und als Direct Yellow Nr. 27 bekannt, zeigte in diesem in-vitro-Assay einen EC<sub>50</sub> von 8  $\mu$ M; es erhöhte auch die Aktivität des Insulins bei der Stimulierung der Autophosphorylierung des Insulinrezeptors auf intakten IM-9-Zellen. Zusätzlich war eine Probe, die TER3935 enthielt, dargestellt in [Fig. 8A](#), in dem IR-Kinase-Assay aktiv.

## Beispiel 3

### Identifizierung einer aktiven Komponente von TER 12- und TER3938-haltigen Proben

**[0121]** TER12 wurde durch das in [Fig. 9](#) dargestellte Reaktionsschema synthetisiert. TER12, das unter Ver-

wendung dieses Schemas synthetisiert wurde und TER12, extensiv aus kommerziellen Quellen gereinigt, waren in den in Beispiel 1 dargestellten Assays aktiv.

**[0122]** Zusätzlich erhielt sich eine Probe, enthaltend TER3938, ebenfalls aus kommerziellen Quellen erhalten, und auf eine 95%ige Reinheit durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, ihre Aktivität; wenn diese Probe jedoch mit wässrigem Natriumcarbonat gewaschen wurde, war die in [Fig. 8E](#) als TER3938 dargestellte unlösliche Verbindung in dem IR-Kinase-Assay weniger aktiv; die wässrige Schicht behielt jedoch die volle Aktivität bei. Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass etwas von der Aktivität, die in den Proben gezeigt wird, die angeblich nur TER12 und TER3938 enthielten, einem Nebenbestandteil zuzuschreiben war. Dieser Nebenbestandteil wurde als Komponente A postuliert. Komponente A, erhalten aus kommerziellen Quellen, wurde durch C-18-Umkehrphasen-präparative HPLC gereinigt und erhielt sich ihre Aktivität im IR-Kinase-Assay. Komponente A wurde darauffolgend als Nebenkomponente in Proben dargestellt, enthaltend sowohl TER12 als auch TER3938. Es wurde keine Komponente A in TER3935 angetroffen, das nach extensiver Reinigung aktiv ist.

**[0123]** Komponente A, gereinigt aus kommerziell zur Verfügung gestellten Proben, erhöht die Glucoseaufnahme in differenzierten 3T3-L1-Zellen und die Aktivität hängt nicht von der Gegenwart von Insulin ab. Sie hängt jedoch von der Aktivität der PI-3-Kinase ab, was bestätigt, dass die Glucoseaufnahme durch den Insulin-Signalweg vermittelt wird. Die Fähigkeit von 16 µg/ml Konzentrationen der Komponente A, die Glucoseaufnahme bei verschiedenen Insulinkonzentrationen zu erhöhen, ist in [Fig. 10](#) dargestellt.

**[0124]** In dem Assay wurden 3T3-L1-Prä-Adipozyten zur Differenzierung in einer Adipozyten-Morphologie unter Verwendung von Standardprotokollen induziert. Fünf Tage nach der Induktion wurden die Zellen mit 16 µg/ml Komponente A in Gegenwart verschiedener Insulinniveaus 30 Minuten behandelt. Die Glucoseaufnahme wurde unter Verwendung von <sup>14</sup>C-Glucose als Markierung gemessen. Wie dargestellt, bewirkt 16 µg/ml Komponente A allein die Aufnahme von ungefähr dem Niveau, wie dargestellt durch 20 µM Konzentrationen Insulin in Abwesenheit dieser Konzentration der Komponente A.

#### Beispiel 4

##### Zusätzliche Verbindungen mit Verwandtschaft zu TER3935

**[0125]** Eine zusätzliche Verbindung mit einer Struktur, regiosommer zu der von TER3935, TER16998, wurde durch präparative Umkehrphasenchromatographie aus der Reaktionsmischung isoliert, erzeugt durch das Syntheseschema, wie dargestellt in [Fig. 11](#). Spektraldaten bestätigen, dass die isolierte Verbindung die in [Fig. 5A](#) dargestellte Formel aufwies.

**[0126]** TER16998 aktiviert die Insulinrezeptor-Kinase direkt, verstärkt die Autophosphorylierung und die Substrat-Phosphorylierung, die durch den Insulinrezeptor vermittelt werden, potenziert den Glucosetransport und erniedrigt die Blutglucose in dem db/db-Mausmodell der Diabetes. Diese Ergebnisse wurden wie folgt erhalten: Der in Beispiel 1 beschriebene Assay, Paragraph A, wurde mit einer Kontrolle durchgeführt, der irgendwelche Zugaben fehlten, in Gegenwart von nur Insulin mit 1 nM, in Gegenwart von TER16998 mit 2 µM und in Gegenwart einer Kombination dieser Komponenten mit den angegebenen Konzentrationen. Wie in [Fig. 12](#) dargestellt, ist TER16998 allein in der Lage, die Autophosphorylierung des Rezeptors bei dieser Konzentration zu aktivieren, wie auch die Wirkung von Insulin zu potenzieren.

**[0127]** Zusätzlich erzeugte TER16998 in einem Assay für die Glucoseaufnahme durch 3T3-L1-Adipozyten, beschrieben in Beispiel 3, eine akute Wirkung einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber Insulin. Dies wurde, wie erwartet, durch 5 µM Wortmannin inhibiert, das die PI-3-Kinase inhibiert und was bestätigt, dass TER16998 seine Wirkung durch den Insulin-Signalweg ausübt. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 13](#) dargestellt. Wie dargestellt, potenziieren 40 µM TER16998 die Wirkung von Insulin in einem Bereich von Konzentrationen.

**[0128]** Signifikanterweise war TER16998 nicht in der Lage, die Phosphorylierungsaktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in einem EGF-Rezeptor-Kinase-Assay zu stimulieren.

**[0129]** Die Wirkung von TER16998, von Komponente A und von Insulin auf die Verteilung des Glut4-Transporters in 3T3-L1-Adipozyten wurde durch Inkubation der Zellen für 15 Minuten mit Insulin oder einer dieser Verbindungen bestimmt, woraufhin die Zellen fixiert und mit einem Anti-Glut4-Antikörper gefärbt wurden, gefolgt von einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper. Die Ergebnisse wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Ergebnisse zeigten, dass Insulin und Komponente A eine dramatische Um-

verteilung von Glut4 zu den Membranoberflächen erzeugen, während bei unbehandelten Zellen ein diffuses Muster erhalten wird. TER16998 hatte eine ähnliche Wirkung, aber weniger dramatisch als die von Insulin oder Komponente A.

#### Beispiel 5

##### Wirkung von TER16998 bei Diabetes-Mäusen

**[0130]** Mäuse, die Standardmodelle für Typ-II-Diabetes sind, db/db-Mäuse, ließ man ad libitum essen und ihnen wurde TER16998 mit 10 mg/kg und 40 mg/kg oder ein Vehikel als Kontrolle verabreicht. **Fig. 14** zeigt die Wirkung dieser Verbindung auf die Glucosekonzentration im Blut dieser Tiere. Wie in **Fig. 14** dargestellt, vermindern 10 mg/kg etwas und 40 mg/kg in deutlichem Ausmaß die Blutglucose über eine Periode von 24 Stunden nach der Verabreichung.

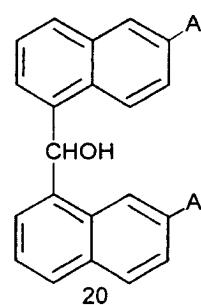
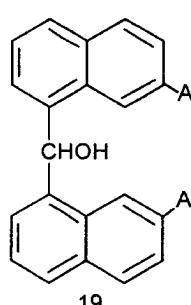
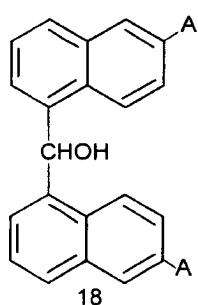
#### Beispiel 6

##### Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen

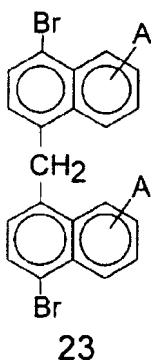
**[0131]** Im allgemeinen werden die polymeren aromatischen Verbindungen der Erfindung entweder unter Verwendung von Lösungsphasen- oder Festphasensynthesen synthetisiert. Für die Festphasensynthese werden die Monomere z.B. mit einem phenolischen Harz der Formel (10), wie dargestellt in **Fig. 9**, gekoppelt. Dieses phenolische Harz wird durch Oxidation des korrespondierenden Boronsäureester-Polystyrolharzes, beschrieben von M.J. Farrall und J.M.J. Frechet J Org Chem (1976) 41:3877, hergestellt. Das phenolische Harz wird mit einem initialen Monomer, 11, wie dargestellt, kondensiert. Das Kondensationsprodukt, 12, wird mit N-Bu-tyllithium behandelt, um das Bromoniumion durch Lithium zu ersetzen und dieses Intermediat wird mit einem Monomer kondensiert, z.B. der Formel (13), um das fest gestützte Dimer 14 bereitzustellen. Die Bindung -CHOH- kann, falls gewünscht, zu -CH<sub>2</sub>- reduziert werden. Darauffolgende Kondensationen in Gegenwart von Formaldehyd und konzentrierter Schwefelsäure führen zu Polymeren der gewünschten Länge, die dann von dem Harz in Natriummethoxid entfernt werden können. Dieses Verfahren ist in **Fig. 9** angegeben.

**[0132]** Die Synthese kann durch Veränderung der Natur des Monomers oder Dimers, das zu der gestützten Ausgangsgruppe zugefügt wird, variiert werden.

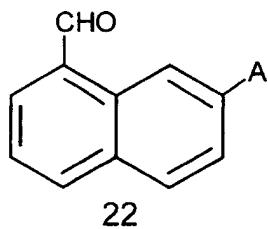
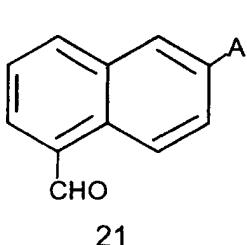
**[0133]** Die Synthese geeigneter Oligomere wird ebenfalls in Lösungsphase durchgeführt. In einem Reaktionssatz ist die Synthese eine Variante zu der von A. Arduini et al., Tetrahedron (1990) 46:3607-3613 beschriebenen. Intermediatdimere oder Trimere werden durch Kondensation eines aromatischen Aldehyds mit einem aromatischen Bromid erhalten und im weiteren wird eine Kondensation in Gegenwart von Formaldehyd und Schwefelsäure bewirkt. Dimere, wie dargestellt in den Formeln 18, 19 und 20, die den Protonen akzeptierenden Substituenten in allen möglichen Konfigurationen enthalten, können durch Kondensation des geeigneten Naphthyllithiums mit einem Naphthyl-Formyl-Derivat erhalten werden, erhalten durch Behandlung des Naphthyllithiums mit Dimethylformamid (DMF). Falls gewünscht, können die Verbindungen 18, 19 und 20 mit HSiEt<sub>3</sub>/TFA zu den korrespondierenden Methylen-Brücken-Dinaphthylenen reduziert werden.



**[0134]** Das Dibromdimer der Formel 23 wird, wie von A. Arduini (supra) beschrieben erhalten, durch Kondensation des korrespondierenden Naphthylbromids mit Formaldehyd in Gegenwart von Schwefelsäure.



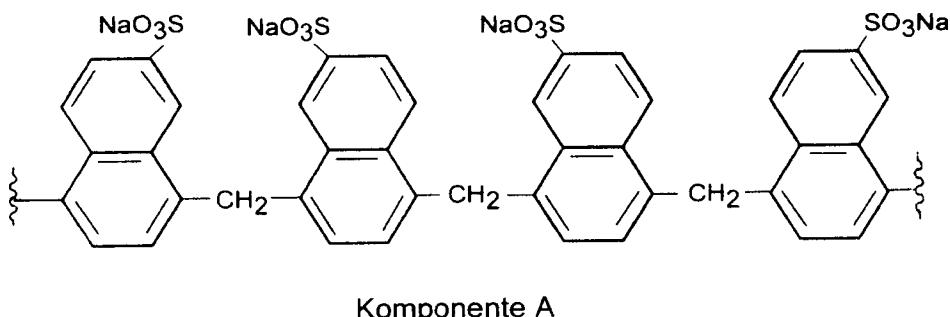
**[0135]** Die korrespondierenden Trimere können durch Behandlung solcher bromsubstituierter Dimere mit N-Butyllithium und dann mit einem Aldehyd der Formel 21 oder 22 erhalten werden.



**[0136]** Die Oligomere können auch durch Kopplung von Naphthyl oder anderen aromatischen Bestandteilen mit Dialdehyden, z.B. 4,4'-Biphenyldicarboxaldehyd oder Terephthalaldehyd verlängert werden.

**[0137]** Durch geeignete Wahl der Position des Protonen akzeptierenden Substituenten A und der reaktiven Substituenten an den aromatischen Bestandteilen können die gewünschten Oligomere synthetisiert werden.

**[0138]** Wie oben dargestellt, ist das Polymer der Formel



in dem oben beschriebenen Insulinrezeptor-Kinase-Assay aktiv und übt die Fähigkeit zur Potenzierung einer Insulinaktivierung und Glucoseaufnahme aus.

**[0139]** Die Verbindung TER17003 wird, wie in [Fig. 16](#) dargestellt, synthetisiert.

**[0140]** TER17003 wurde in dem in Beispiel 1, Paragraph A, dargestellten IR-Kinase-Assay überprüft und hat sich in diesem Assay als aktiv erwiesen.

**[0141]** Die Verbindungen TER17004 und TER17005 ersetzen bestimmte Azolinker von TER3935 durch die korrespondierenden Amidlinker. Diese Verbindungen werden, wie in [Fig. 17](#) dargestellt, synthetisiert.

**[0142]** Die resultierenden Verbindungen, TER17004 und TER17005 wurden in dem IR-Kinase-Assay, wie dargestellt in Beispiel 1, Paragraph A, getestet und erwiesen sich in diesem Assay als aktiv.

#### Beispiel 7

Peptide, die mit dem Rezeptor um eine Bindung an TER16998 kompetitieren

**[0143]** Um zusätzliche Regionen der CKD zu identifizieren, an die TER16998 bindet, wurde eine Reihe von

14 Peptiden ("Ryan-Peptide") synthetisiert. Diese Peptide wurden so gewählt, dass sie zu distinkten Oberflächenelementen der CKD korrespondierten, dargestellt durch Röntgenstruktur. Kollektiv bedeckten die 14 Peptide 85 % der oberflächenexponierten Reste. Diese Peptide wurden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Inhibition der Aktivierung des Insulinrezeptors durch TER16998 getestet. Die Assays wurden wie folgt durchgeführt: Die Reaktionsmischung enthält 10 µl von 50 mM Tris, pH 7,5, 100 mM NaCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 9 µM menschliche IR-CKD, 4 mM ATP und 14,5 µM TER16998. Kontrollmischungen enthalten keine Peptide; die getesteten Peptide lagen bei 20 µM oder 100 µM vor. Die Reaktionen wurden 5 oder 15 Minuten inkubiert und dann mit einem Gel-Probenpuffer, enthaltend EDTA, auf 50 mM Endkonzentration gestoppt. Die Proben wurden auf ein 10 % natives Polyacrylamidgel geladen und man ließ sie 2 Stunden bei 15 mA laufen. Die Gele wurden mit Coomassieblau gefärbt und der Grad der Autophosphorylierung durch Vergleich mit Kontrollsputen unter Verwendung der Bandenpositionen im nativen Gel als Indikation der Phosphorylierung gemessen.

**[0144]** Von den 14 Peptiden erwiesen sich nur 3 als dazu in der Lage, die Aktivierungswirkung von TER16998 zu vermindern. Diese Peptide waren die folgenden:

"Ryan 3", das sich von Met1120 zu Asn1137 erstreckt und so zu dem katalytischen Stellenboden am Ende von Helix E korrespondiert;

"Ryan 6", das sich von Pro1235 zu Thr1252 erstreckt, d.h. Helix H und Helix I und

"Ryan 9", das sich von Arg1089 zu Thr1105 erstreckt.

**[0145]** Tabelle 1 unten zeigt die Lokalisierung und Aminosäuresequenz der 14 hergestellten Peptide.

<b>Tabelle 2</b>		
<b>Ryan Nr.</b>	<b>Region</b>	<b>Sequenz</b>
1	Asn1033-Thr1055	NESASLRERIEFLNEASVMKGFT
2	Met1079-Pro1099	MAHGDLKSYLRLSLRPEAENNP
3	Met1120-Asn1137	MAYLNAKKFVHRDLAARN
4	Glu1201-Gly1225	EITSLAEQPYQGLSNEQVLKFVMDG
5	Asn1014-Ala1028	NARDIIKGEAETRVA
6	Pro1235-Thr1252	PERVTDLMRMCWQFNPKM
7	Ser992-Ser1006	SREKITLLRELGQGS
8	His1057-Gln1070	HHVVRLLGVVSKGQ
9	Arg-1089-Thr1105	RSLRPEAENNPGRPPPT
10	Gly1100-Gln1111	GRPPPTLQEMIQ
11	Gly1163-Gln1174	RKGGKGLLPVR
12	Pro1178-Ser1190	PESLKDGVFTTSS
13	Gln1217-Asn1233	QVLKFVMDGGYLDQPDN
14	Arg1253-Ser1270	RPTFLEIVNLLKDDLHPS

**[0146]** Die Lokalisation der aktiven Peptide im Hinblick auf die dreidimensionale Struktur der CKD ist in den [Fig. 18A](#) und [Fig. 18B](#) dargestellt. [Fig. 18A](#) zeigt die Lokalisation der Peptide im Grundzustand; [Fig. 18B](#) zeigt die Position dieser Peptide, wenn der Rezeptor aktiviert ist. Es kann festgestellt werden, dass diese Peptide einen groben "Gürtel" um den Rezeptor bilden.

#### Beispiel 8

##### Zollpenetration von TER16998

**[0147]** Es soll bewertet werden, ob TER16998, das die Insulinstimulation des Insulinrezeptors potenziert, wenn ganze Zellen in dem Assay verwendet werden, durch seine Fähigkeit zum Eintritt in die Zellen effektiv ist. Dies wird in dem unten beschriebenen Protokoll etabliert:

JM-9-Zellen wurden mit TER16998 (40 µM) in Gegenwart und Abwesenheit von Insulin behandelt und dann wiederholt mit 10%igem fötalem Rinderserum in PBS gewaschen, um alles TER16998 zu entfernen, das an den Zellen anhaftet. Wenn in den Waschungen kein weiteres TER16998 mehr nachweisbar war, wurden die Zellen lysiert und die Verbindung ließ sich in dem Lysat durch Spektrophotometrie nachweisen. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 19](#) dargestellt.

**[0148]** Wie dargestellt, wurde TER16998 in dem Lysat gefunden. So ist deutlich geworden, dass diese Verbindung in die Zellen eindringt und direkt mit dem CKD-Bereich in Wechselwirkung tritt.

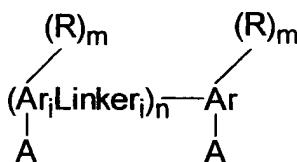
### Beispiel 9

Fähigkeit von TER16998 zur Verstärkung der Wirkung von Insulin auf Blutglucose-Niveaus

**[0149]** In dieser Studie wurde die Glucoseaufnahme bei Diabetes-db/db-Mäusen in Gegenwart und Abwesenheit von Insulin und in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mg/kg TER16998 bestimmt. In diesem Beispiel mussten, anders als in Beispiel 5, die Tiere fasten. In Abwesenheit von Insulin verblieb die Glucose im Blut auf hohen Niveaus. In Gegenwart von Insulin nahmen die Glucoseniveaus, wie erwartet, ab, stiegen jedoch wiederum nach ungefähr einer Stunde an. In Gegenwart von TER16998 waren die Glucoseniveaus jedoch drastischer erniedrigt und waren noch nicht auf die Niveaus zurückgekehrt, die bei nur mit Insulin behandelten Mäusen nach 4 Stunden gezeigt wurden. Diese Ergebnisse sind in [Fig. 20](#) dargestellt, wobei die ausgefüllten Diamanten und Dreiecke Mäuse angeben, die mit einem Plazebo bzw. nur mit TER16998 behandelt wurden. Die ausgefüllten Quadrate zeigen Blutglucose-Niveaus für Mäuse, die nur mit Insulin behandelt wurden und die "X"-Daten zeigen Blutglucose-Niveaus für Mäuse, die sowohl mit Insulin als auch TER16998 behandelt wurden.

### Patentansprüche

1. In-vitro-Verfahren zur Modulation der Kinaseaktivität des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Insulinaktivierung des Insulinrezeptors und/oder zur Verstärkung der Stimulierung der zellulären Glukoseaufnahme durch Insulin oder zur Stimulierung der Aufnahme von Glucose in Zellen, die den Insulinrezeptor darstellen, wobei das Verfahren das Kontaktieren des Insulinrezeptors oder von dessen Kinaseanteil oder der Zellen mit einer Verbindung umfasst, die die folgende Formel umfasst:



### Formel (1)

worin:

jedes Ar unabhängig ein aromatischer Bestandteil ist, gewählt aus Benzol, Naphthalin, Pyridin, Chinolin oder Benzothiazol;

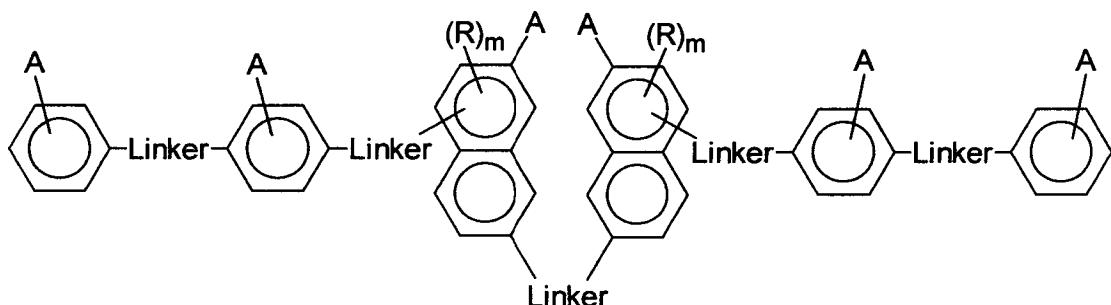
jedes A ist unabhängig  $-SO_3X$ ,  $OP(OX)_3$ ,  $-COOX$ , worin X ein Wasserstoffatom oder ein Kation ist;

jedes R ist unabhängig ein substituierter oder unsubstituierter, verzweigter oder unverzweigter, cyclischer, aromatischer oder nicht-aromatischer Hydrocarbylbestandteil, worin nicht-verzweigte Hydrocarbylketten durch ein oder mehrere Heteroatome unterbrochen sein können, nämlich O, N oder S; oder jedes R ist unabhängig  $OR'$ ,  $NR'_2$  oder  $SR'$ , worin  $R'$  H oder R, wie oben definiert, ist;

m ist 0, 1 oder 2; n ist 1 bis 6; und

jeder Linker ist unabhängig  $-CH_2-$ ,  $-N=N-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-NHCO-$  oder  $-NHCONH-$  oder ein Ioster davon, wobei wenn n 1 ist, mindestens ein Ar mindestens 2 fusionierte aromatische Ringe umfasst.

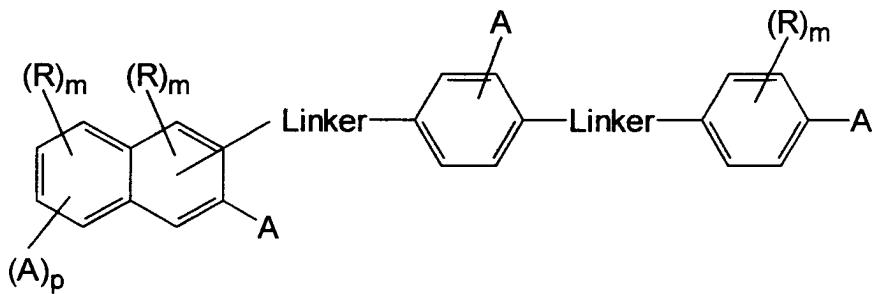
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die Verbindung der Formel (1) die folgende Formel aufweist:



### Formel (2)

worin jedes R, A, Linker und m wie in Anspruch 1 definiert sind.

3. Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die Verbindung der Formel (I) die folgende Formel aufweist:

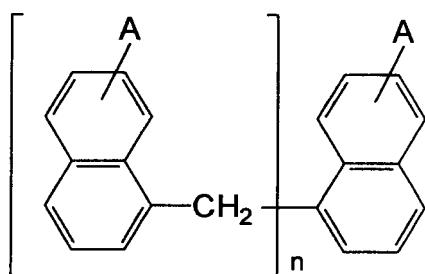


Formel (3)

worin jedes R, A, Linker und m wie in Anspruch 1 definiert sind und worin p 0 oder 1 ist.

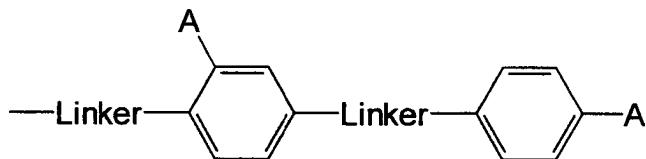
4. Verfahren gemäss Anspruch 1, worin m 0 oder 1 ist, n ist 4 bis 6 und jeder Linker ist unabhängig -CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- oder -NHCO- oder ein Isoster davon.

5. Verfahren gemäss Anspruch 1, wobei die Verbindung die folgende Formel aufweist:

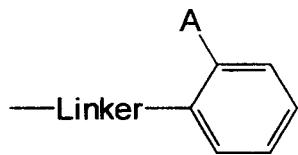


worin n 4 bis 6 und A wie in Anspruch 1 definiert ist.

6. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3, worin jedes R unabhängig OH oder



oder



ist, worin A und Linker wie in Anspruch 1 definiert sind.

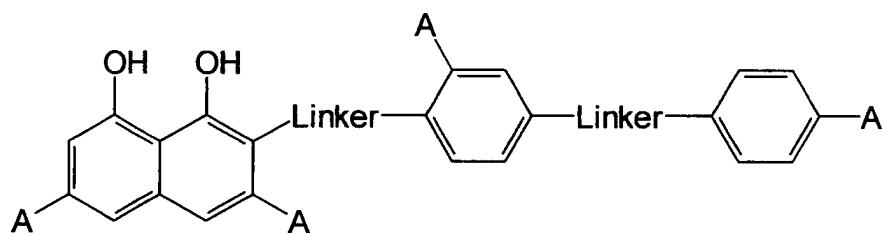
7. Verfahren gemäss Anspruch 2 oder 3, worin m 0 oder 1 und jedes R unabhängig OH ist.

8. Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 4, worin jedes R unabhängig Alkyl (1-6C) ist.

9. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 8, worin jedes A unabhängig -SO<sub>3</sub>X oder -COOX ist, worin X H oder ein Kation ist.

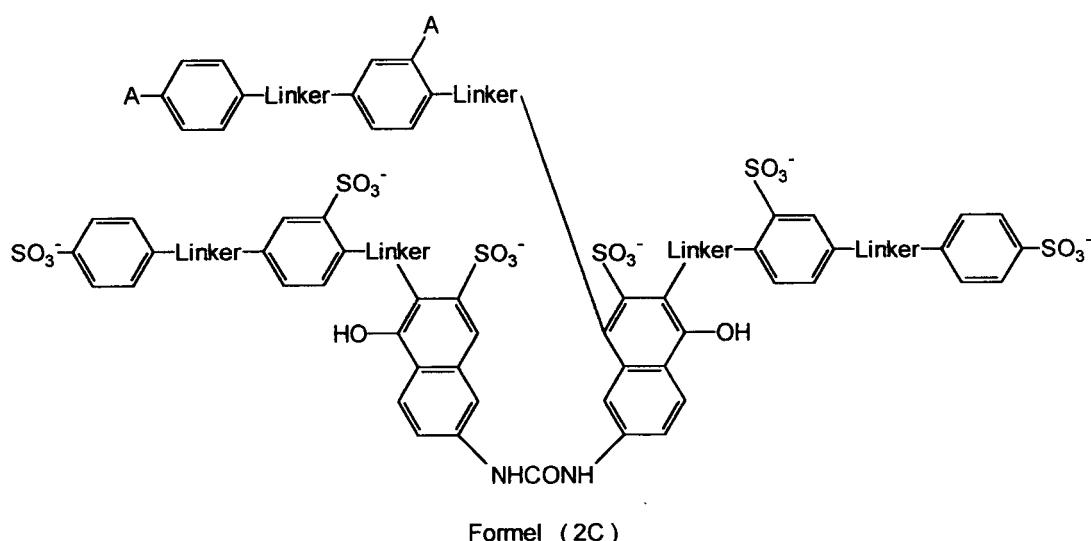
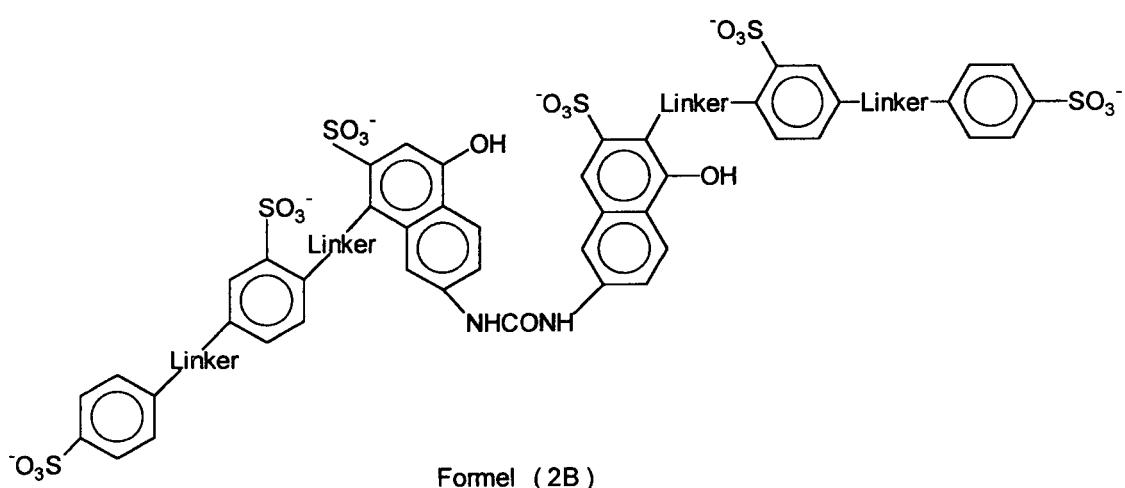
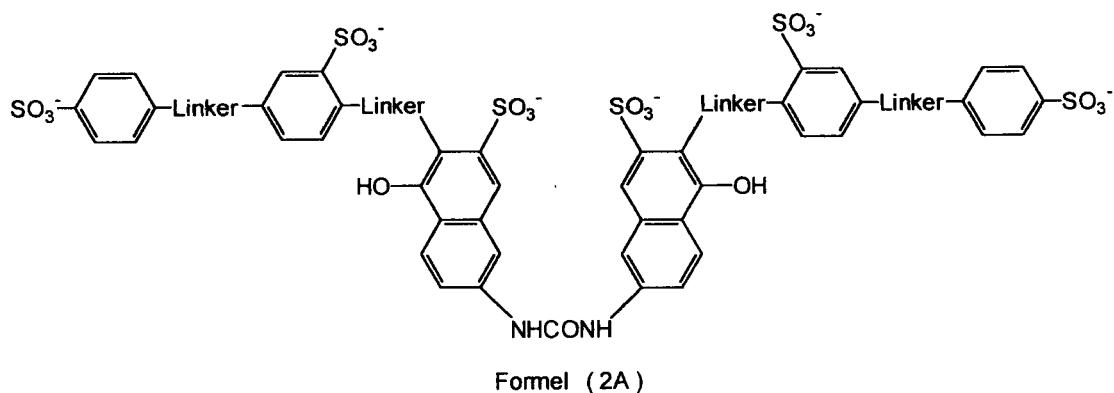
10. Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9, worin alle m 0 sind.

11. Verfahren gemäss Anspruch 3, wobei die Verbindung die folgende Formel aufweist:



worin jeder Linker unabhängig entweder -NHCO- oder -CH=CH- ist, und jedes A ist unabhängig -SO<sub>3</sub>X oder -COOX, worin X H oder ein Kation ist.

12. Verfahren gemäss Anspruch 2, wobei die Verbindung gewählt ist aus der Gruppe bestehend aus



worin jeder Linker unabhängig entweder  $-\text{N}=\text{N}-$  oder  $-\text{NHCO}-$  ist.

13. Design- und Syntheseverfahren eines Moleküls, das den Insulinrezeptor aktiviert, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

Beurteilung eines Aktivators, bei dem es sich um eine Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12 handelt, im Hinblick auf strukturelle Merkmale, die mit den Aktivitäten korrelieren; Synthese einer Verbindung, die

diese strukturellen Merkmale enthält, und Überprüfung der Verbindung im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung des Insulinrezeptors zur Sicherstellung, dass es sich um einen Aktivator handelt.

14. Screeningverfahren für Kandidatenverbindungen im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung des Insulinrezeptors, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

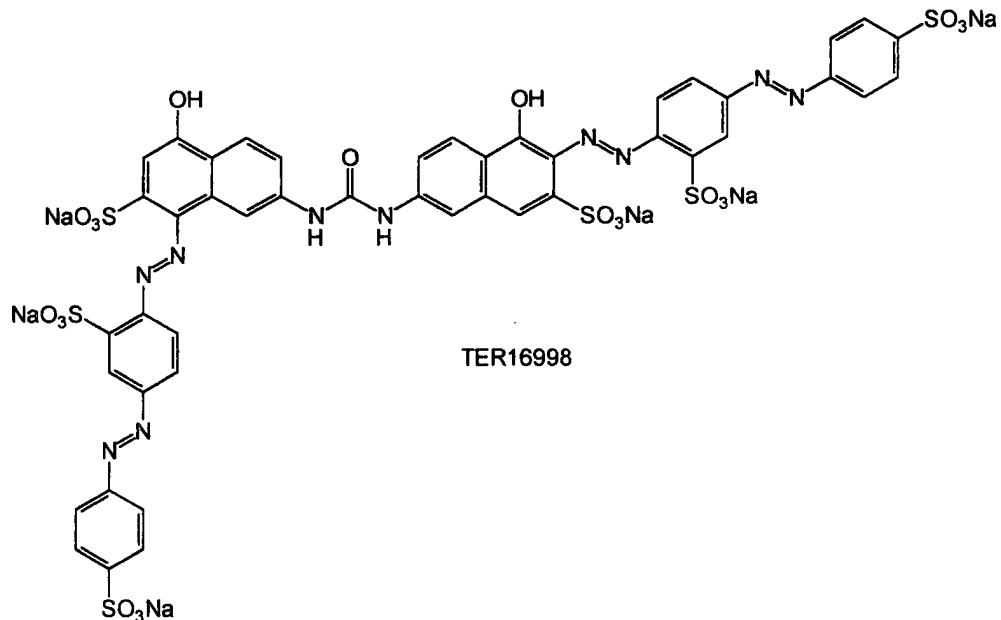
Erhalt eines Fingerabdrucks von jedem Kandidaten im Hinblick auf ein Referenzpanel;

Erhalt eines Fingerabdrucks eines Aktivators, bei dem es sich um eine Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12 handelt, im Hinblick auf dasselbe Referenzpanel;

Vergleich des Fingerabdrucks jedes Kandidaten mit demjenigen des Aktivators; und

Identifizieren einer Verbindung, deren Fingerabdruck demjenigen des Aktivators ähnelt, als erfolgreichen Kandidaten.

15. Verbindung der Formel:



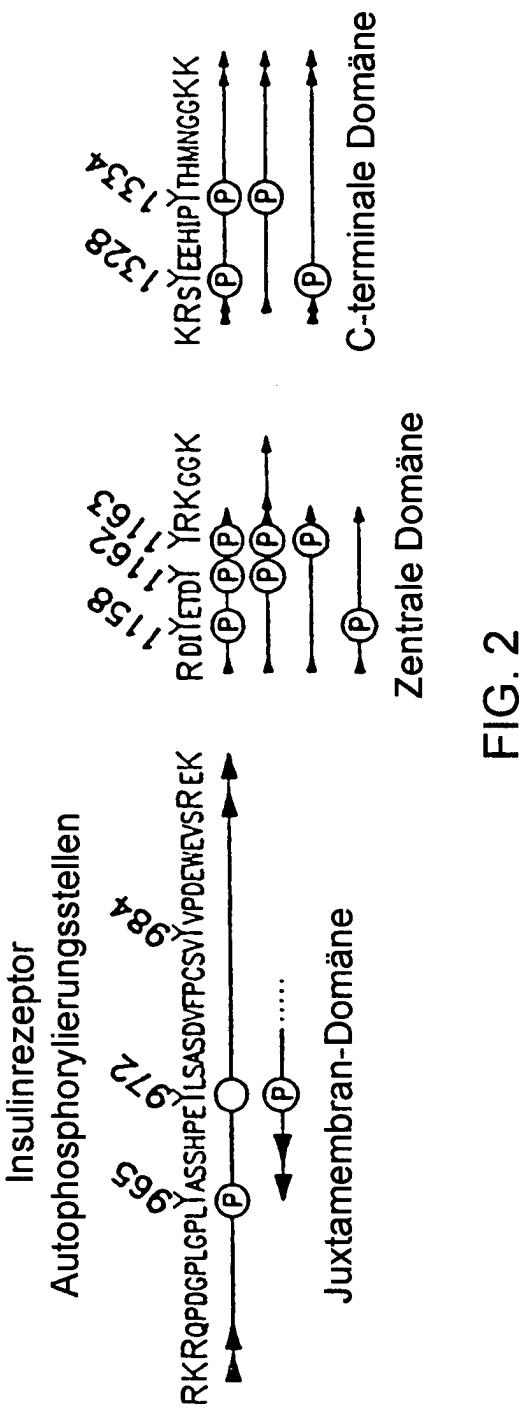
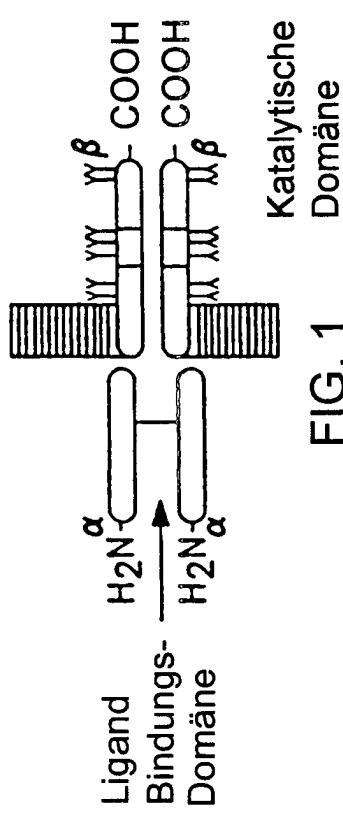
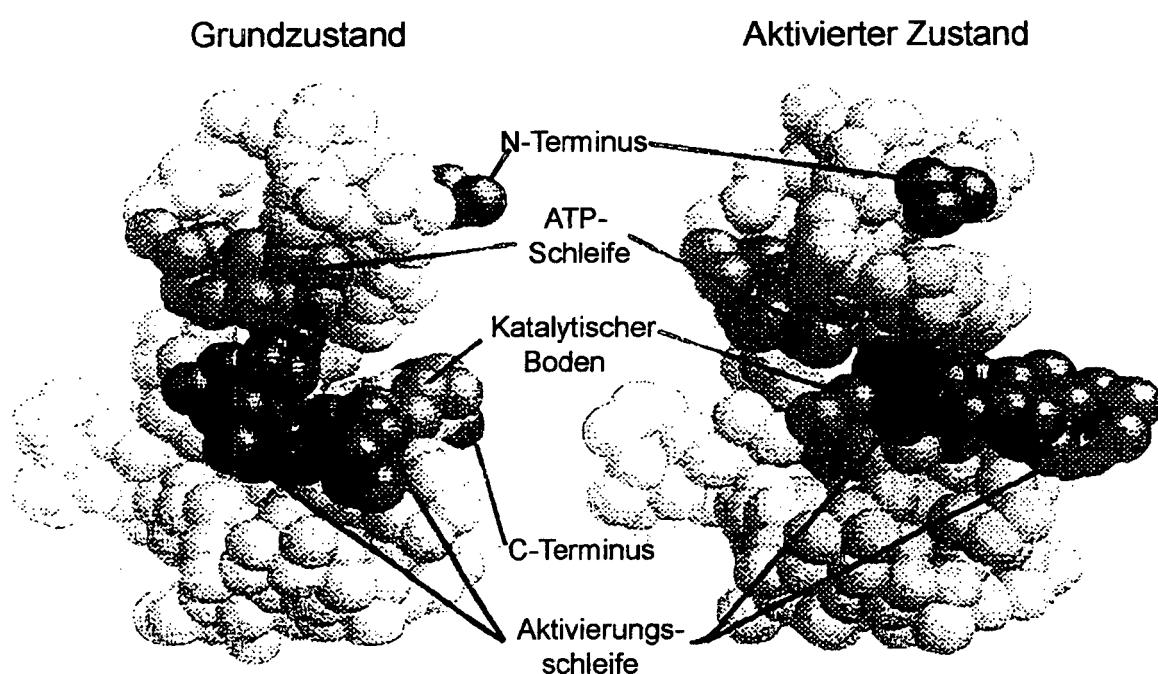


FIG. 3A



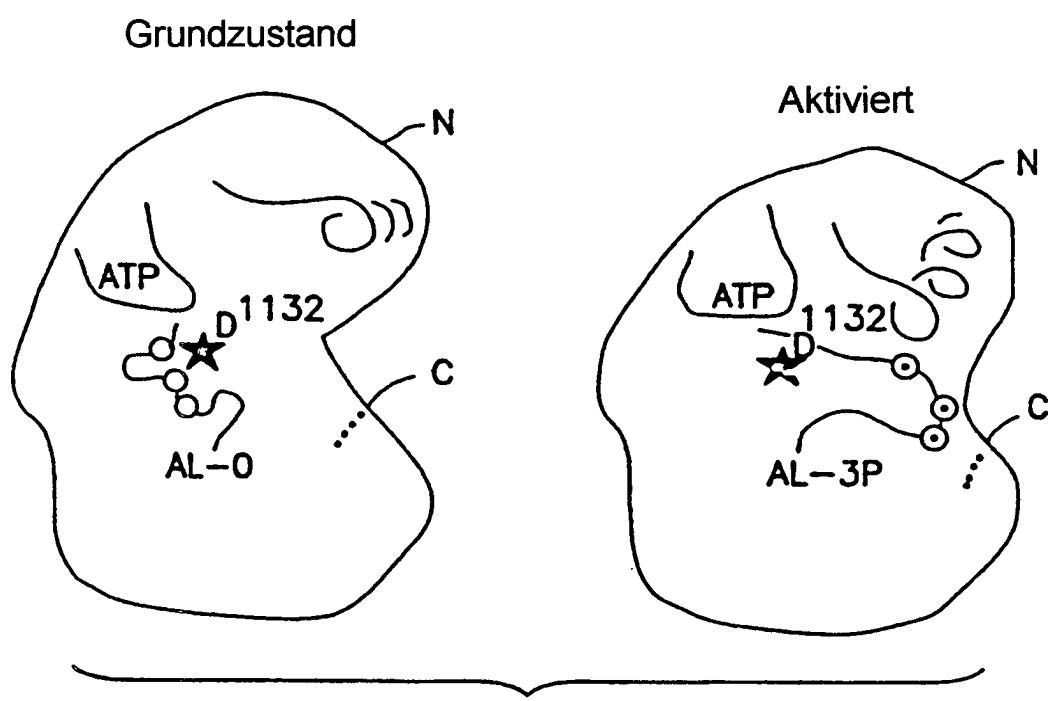


FIG. 3B

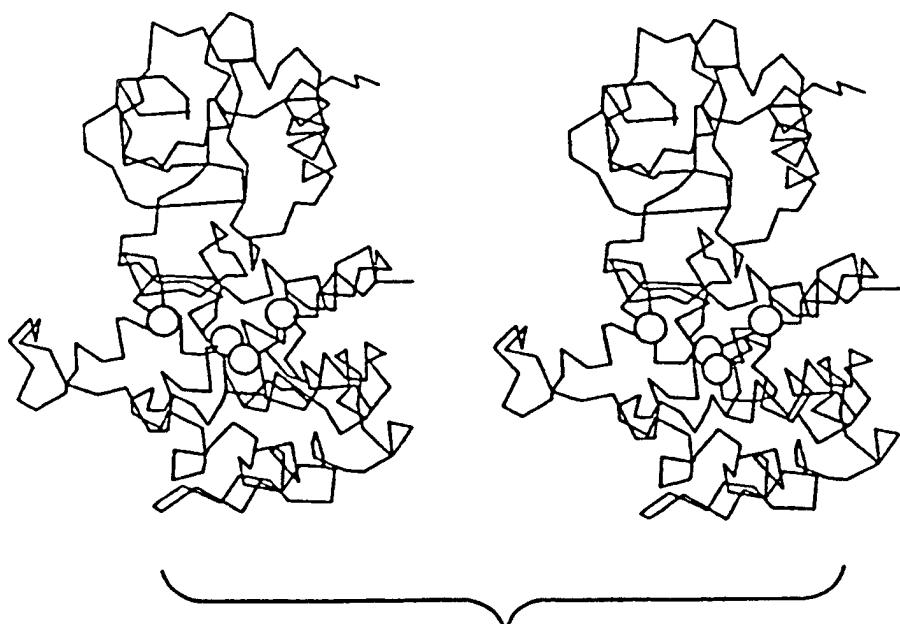


FIG. 3C

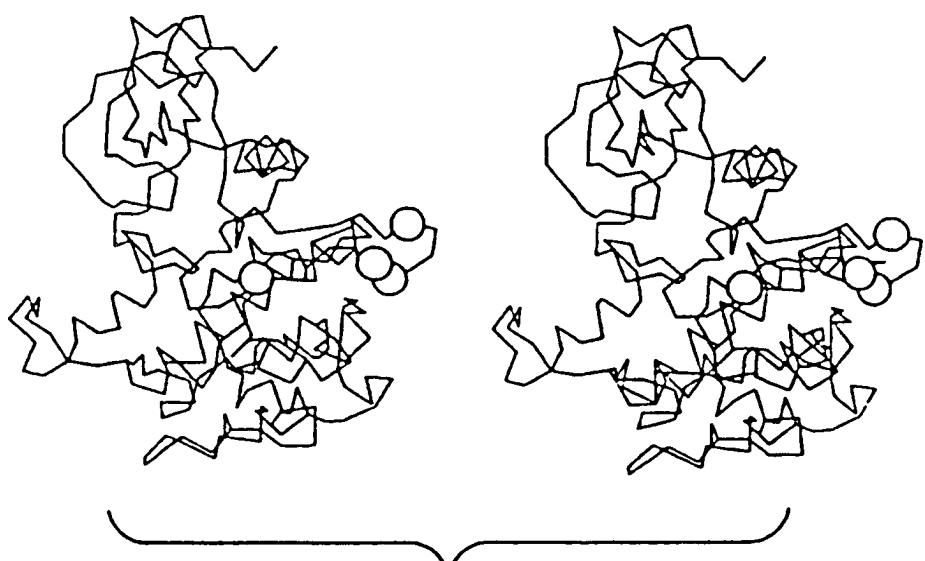
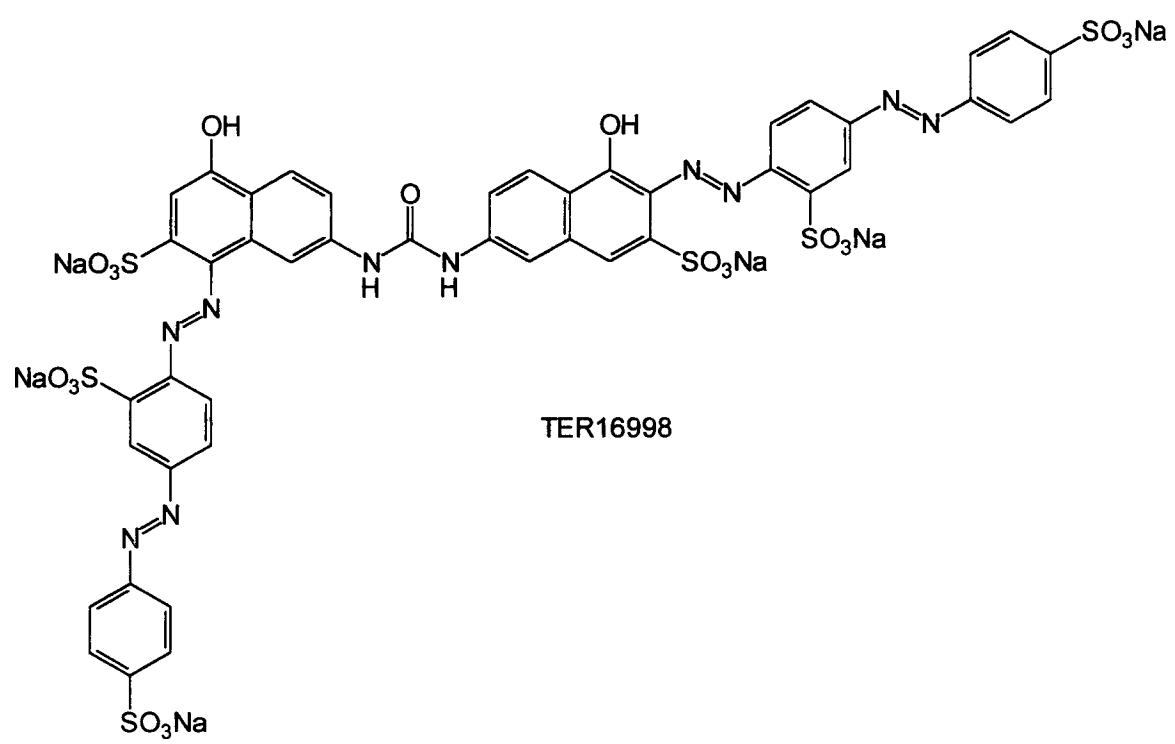
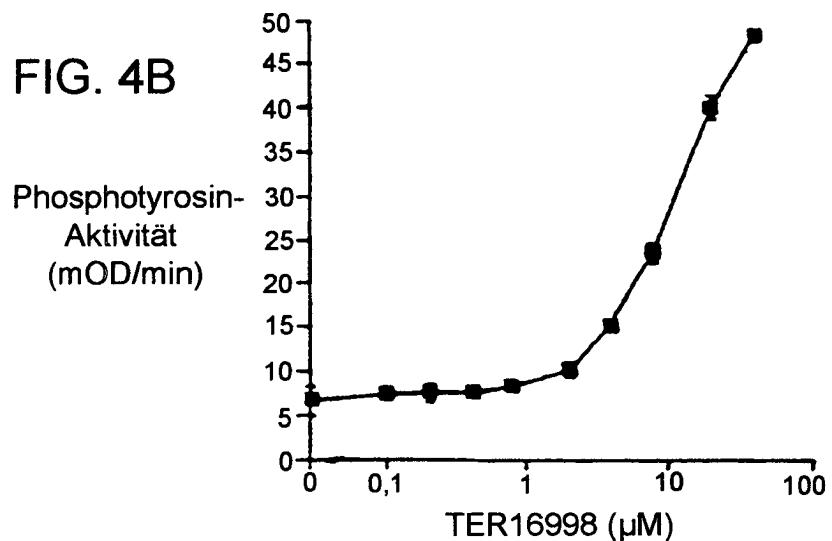


FIG. 3D

FIG. 4A



**FIG. 4B**



**FIG. 4C**

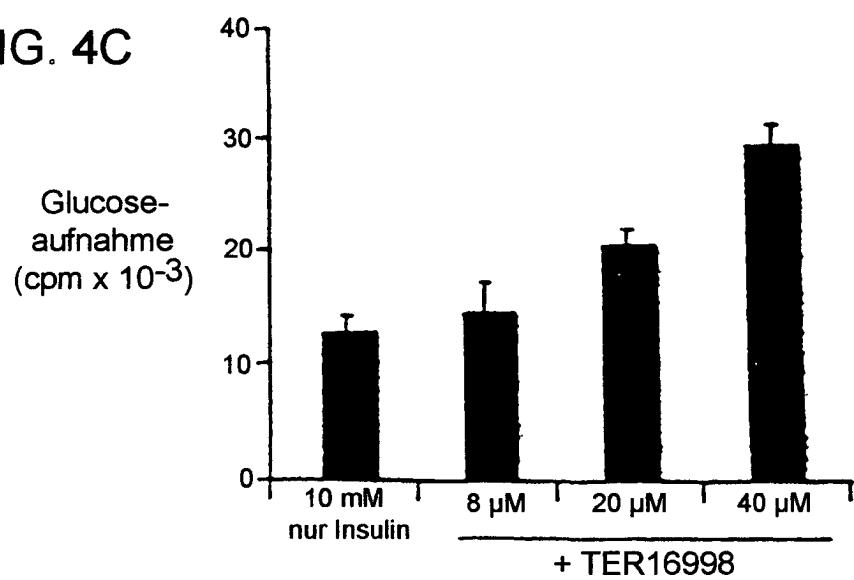


FIG. 5

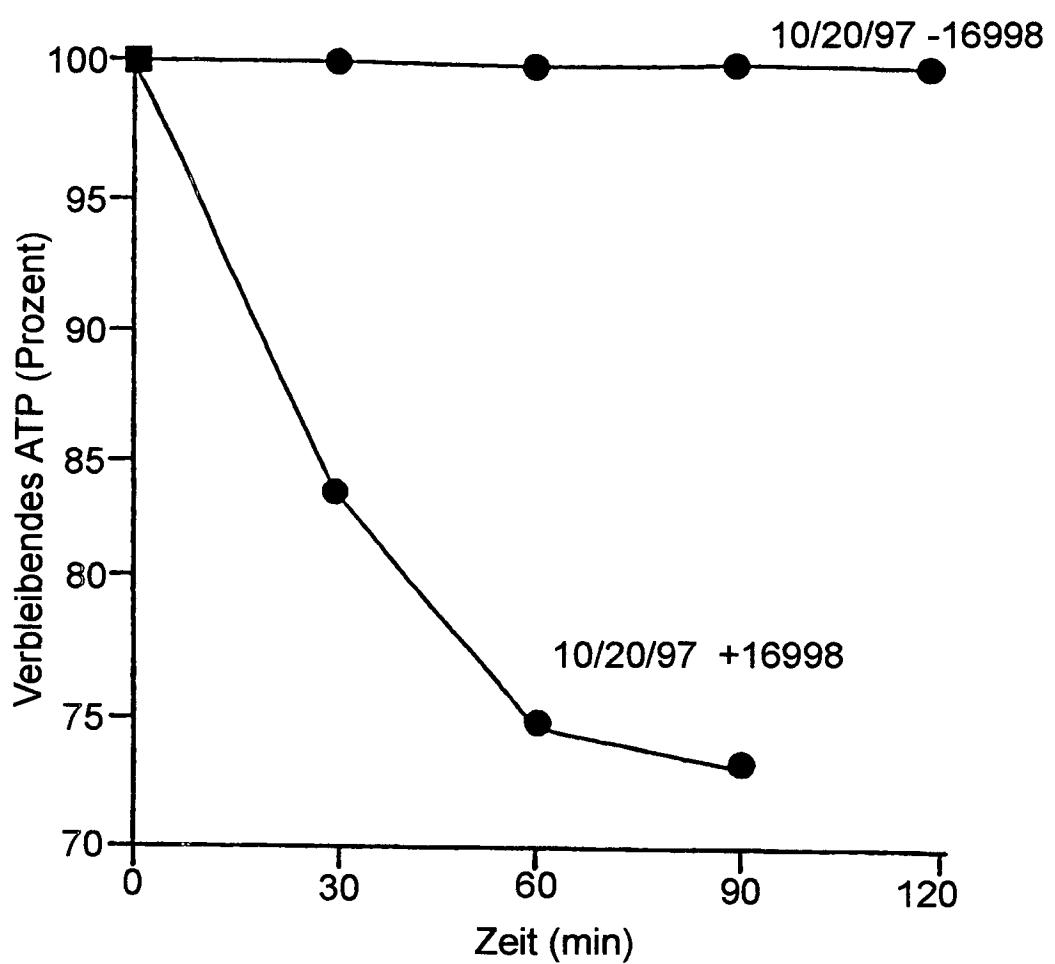


FIG. 6

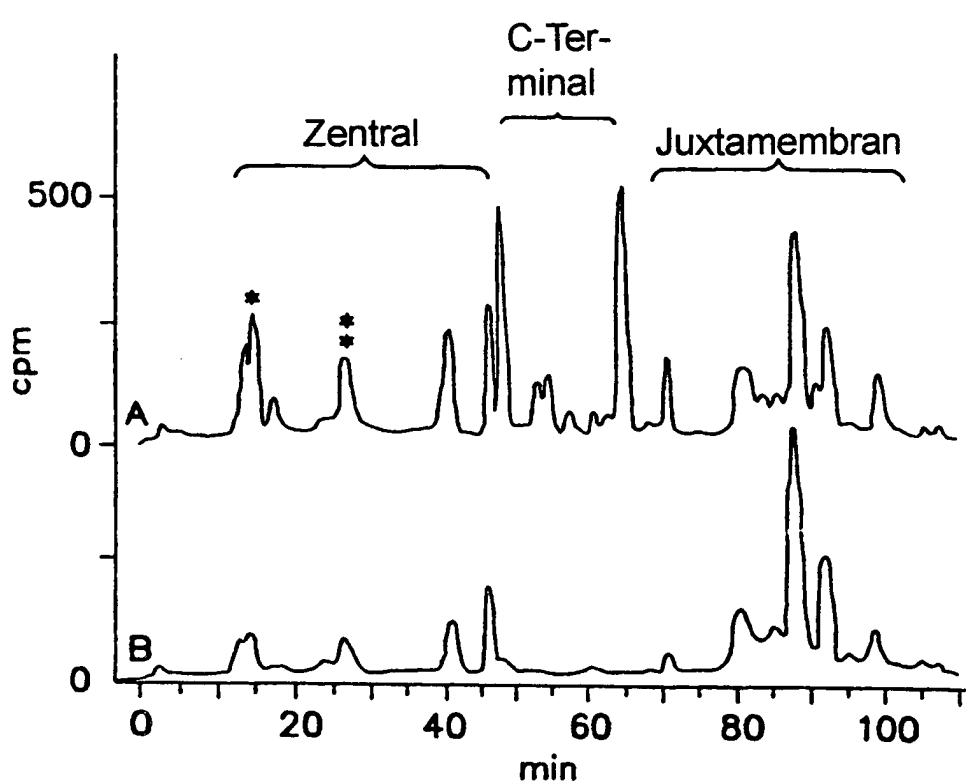


FIG. 7

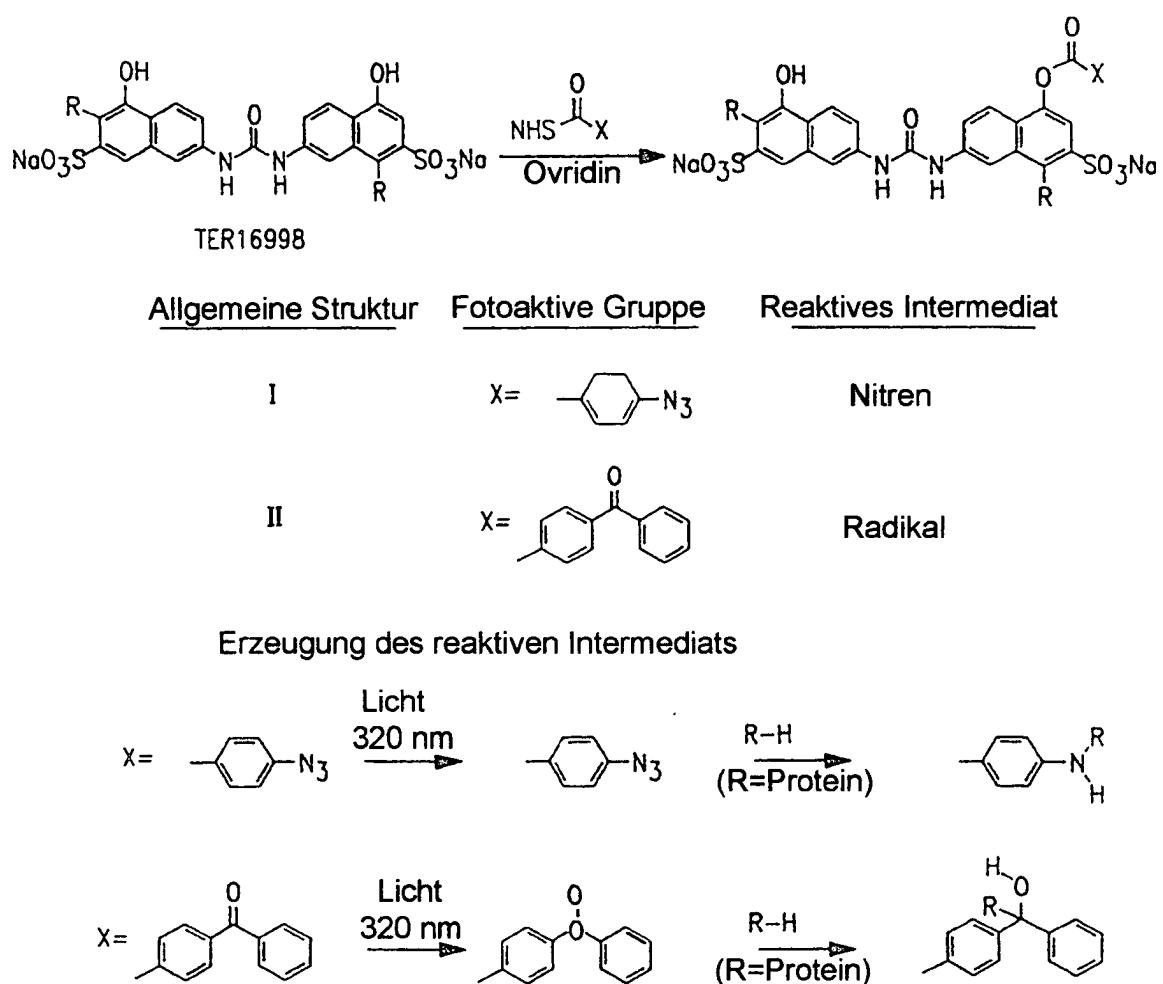


FIG. 8A

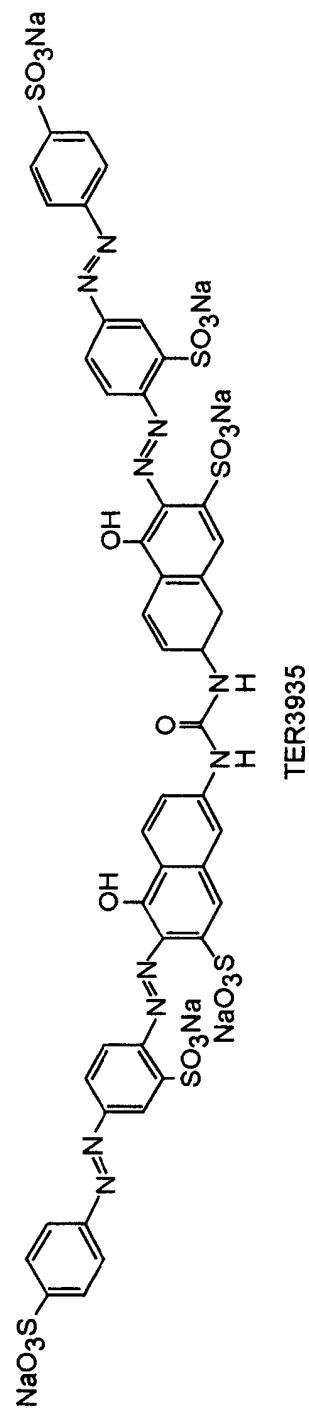


FIG. 8B

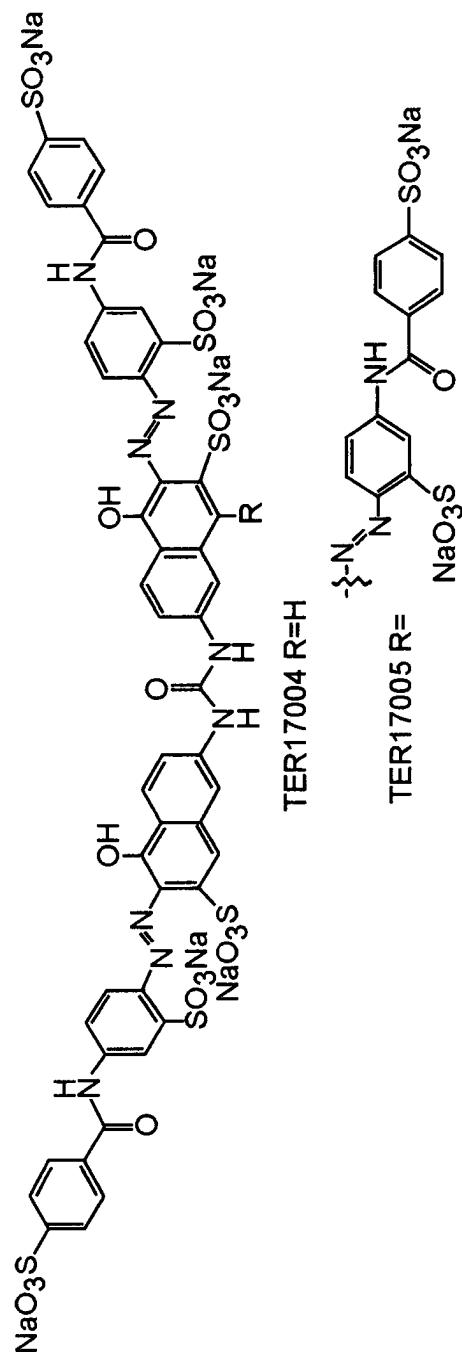


FIG. 8C

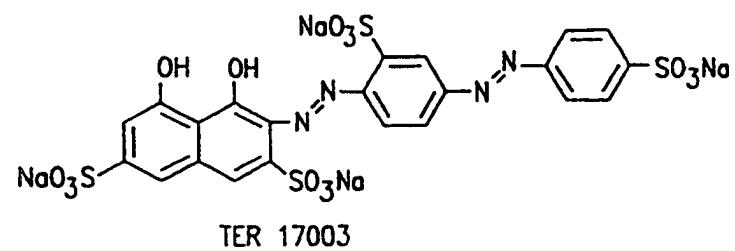
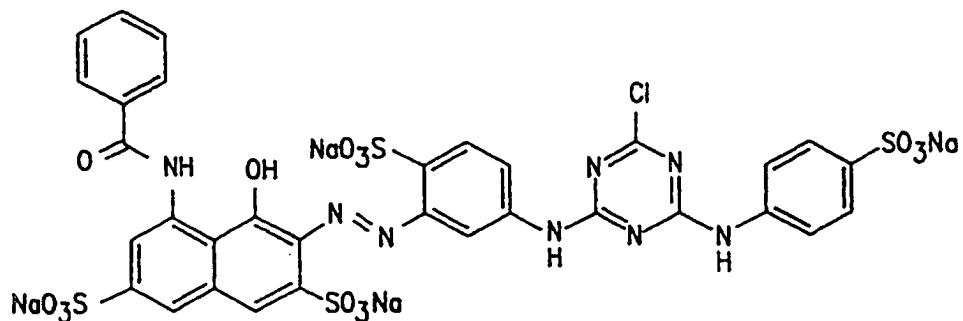
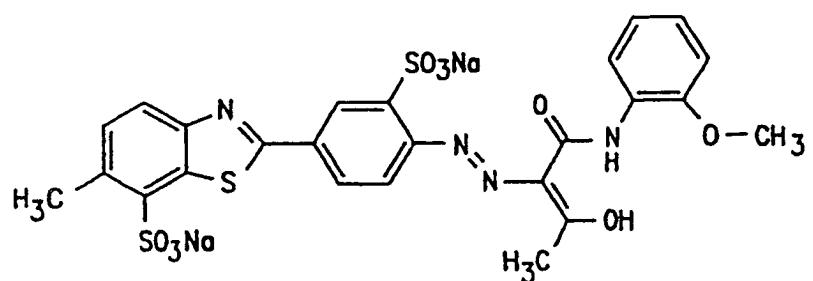


FIG. 8D



TER 12

FIG. 8E



TER 3938

FIG. 9

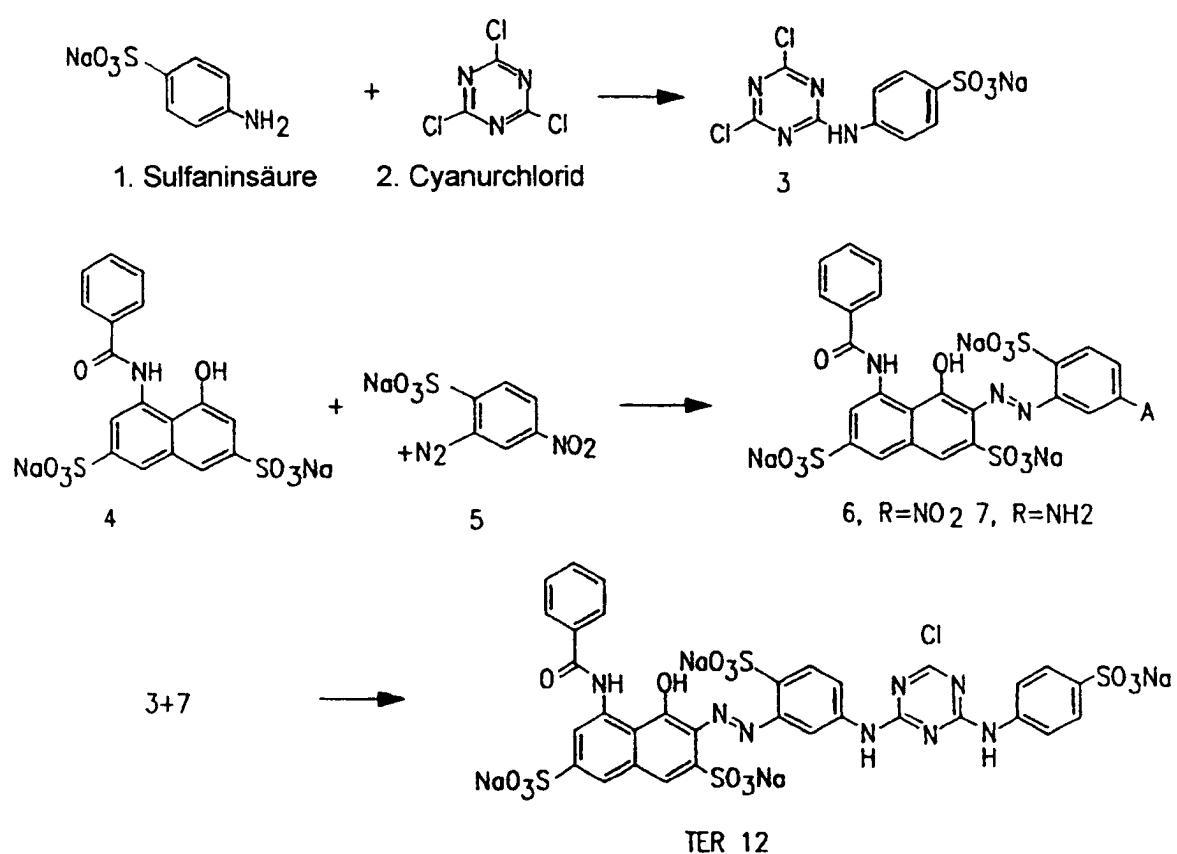


FIG. 10

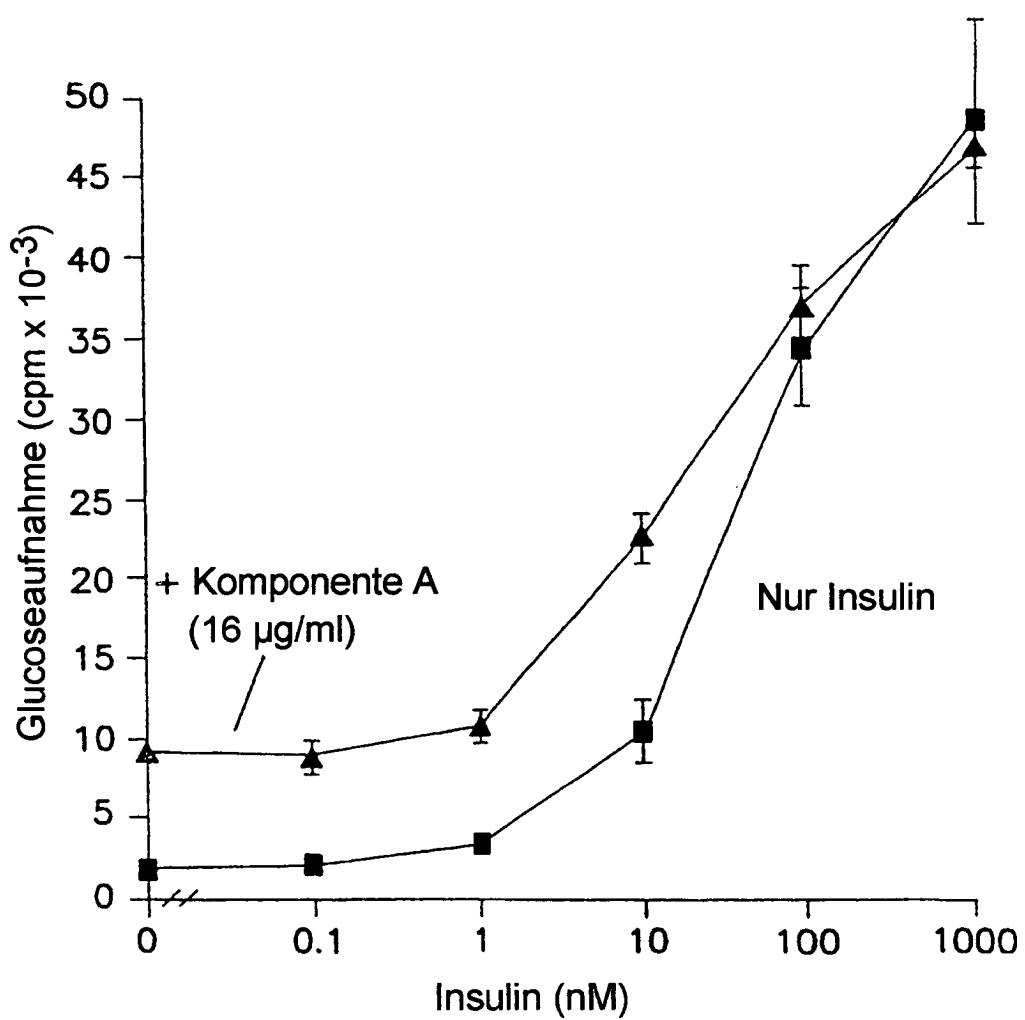


FIG. 11

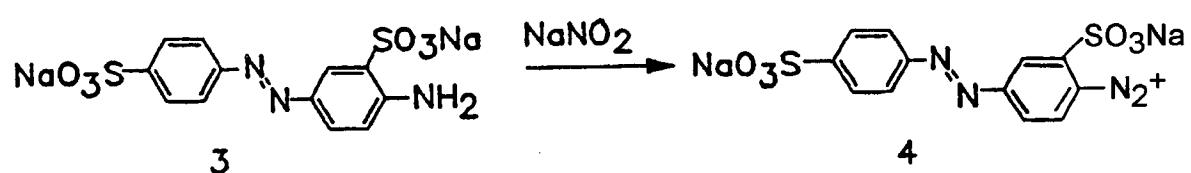
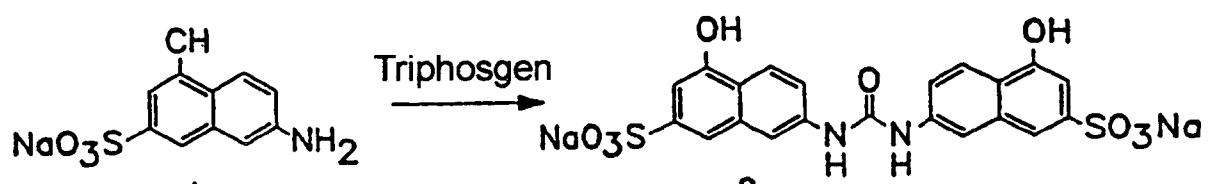


FIG. 12

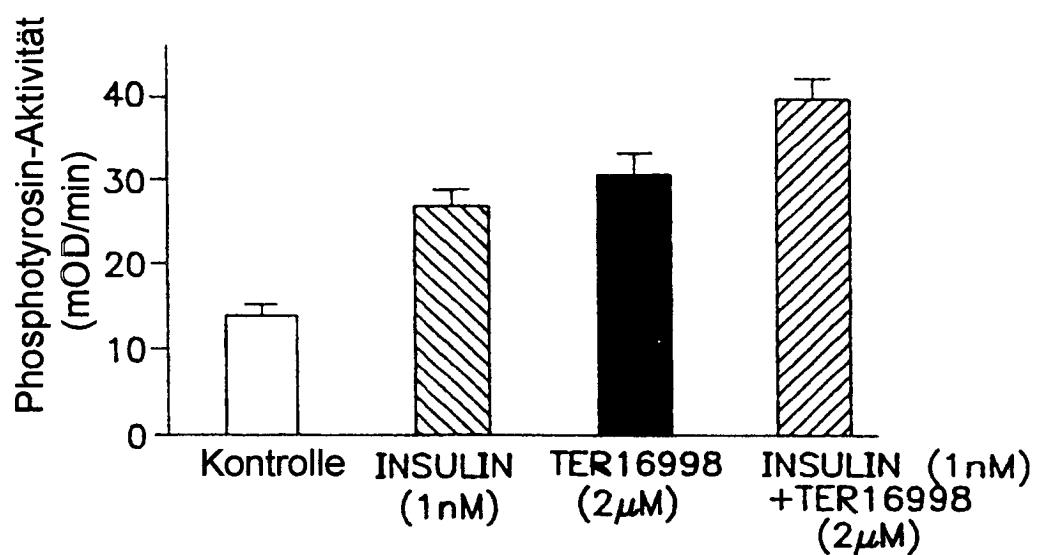
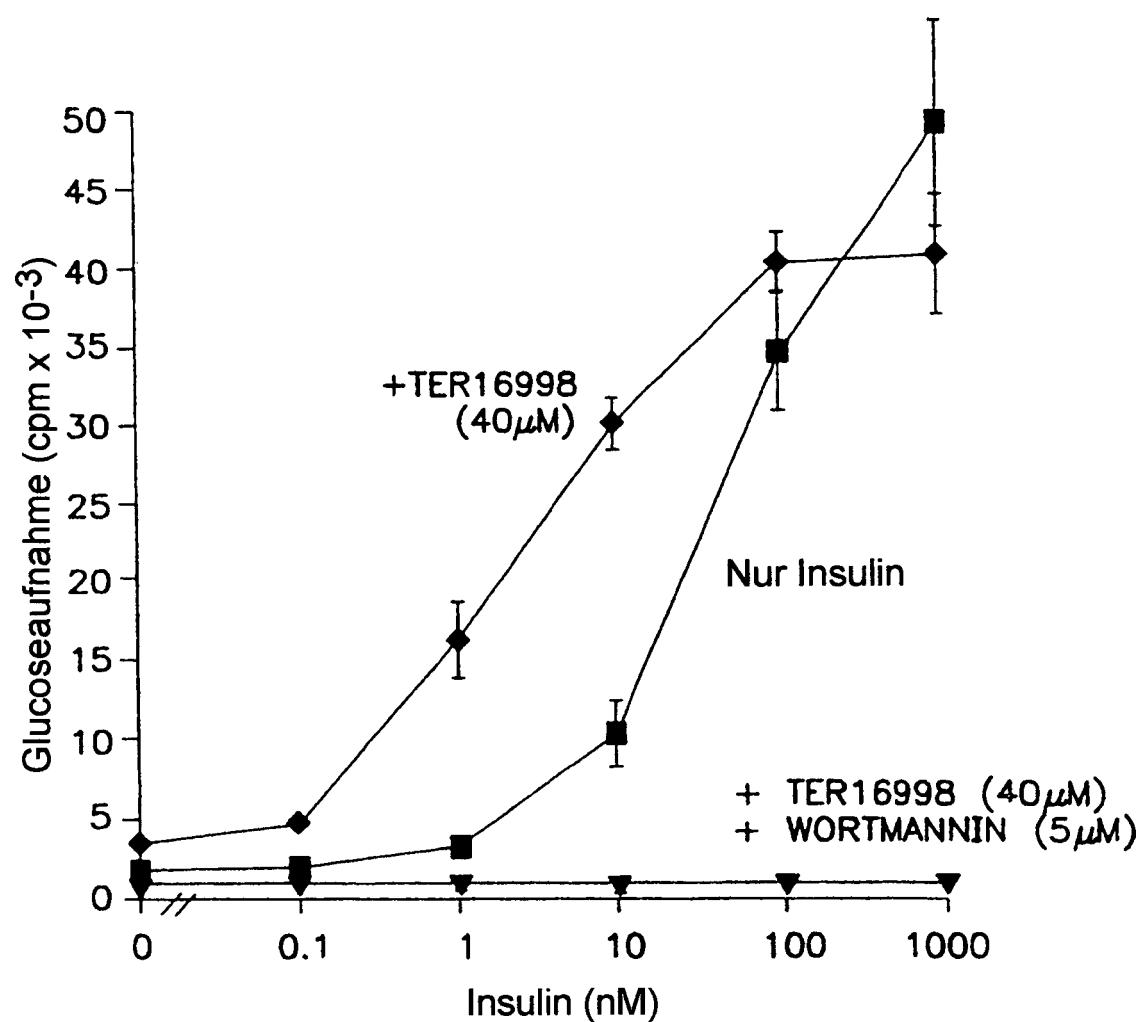


FIG. 13



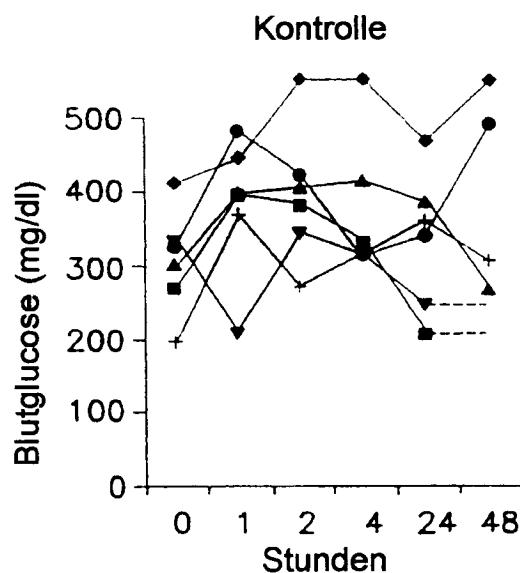


FIG. 14A

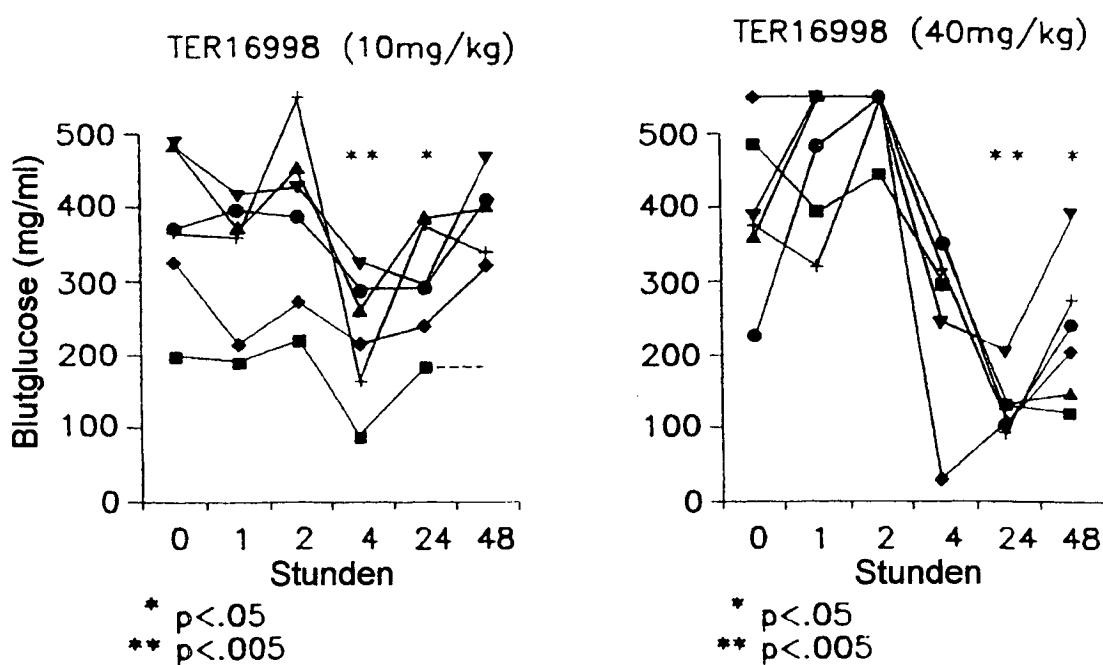


FIG. 14B

FIG. 14C

FIG. 15

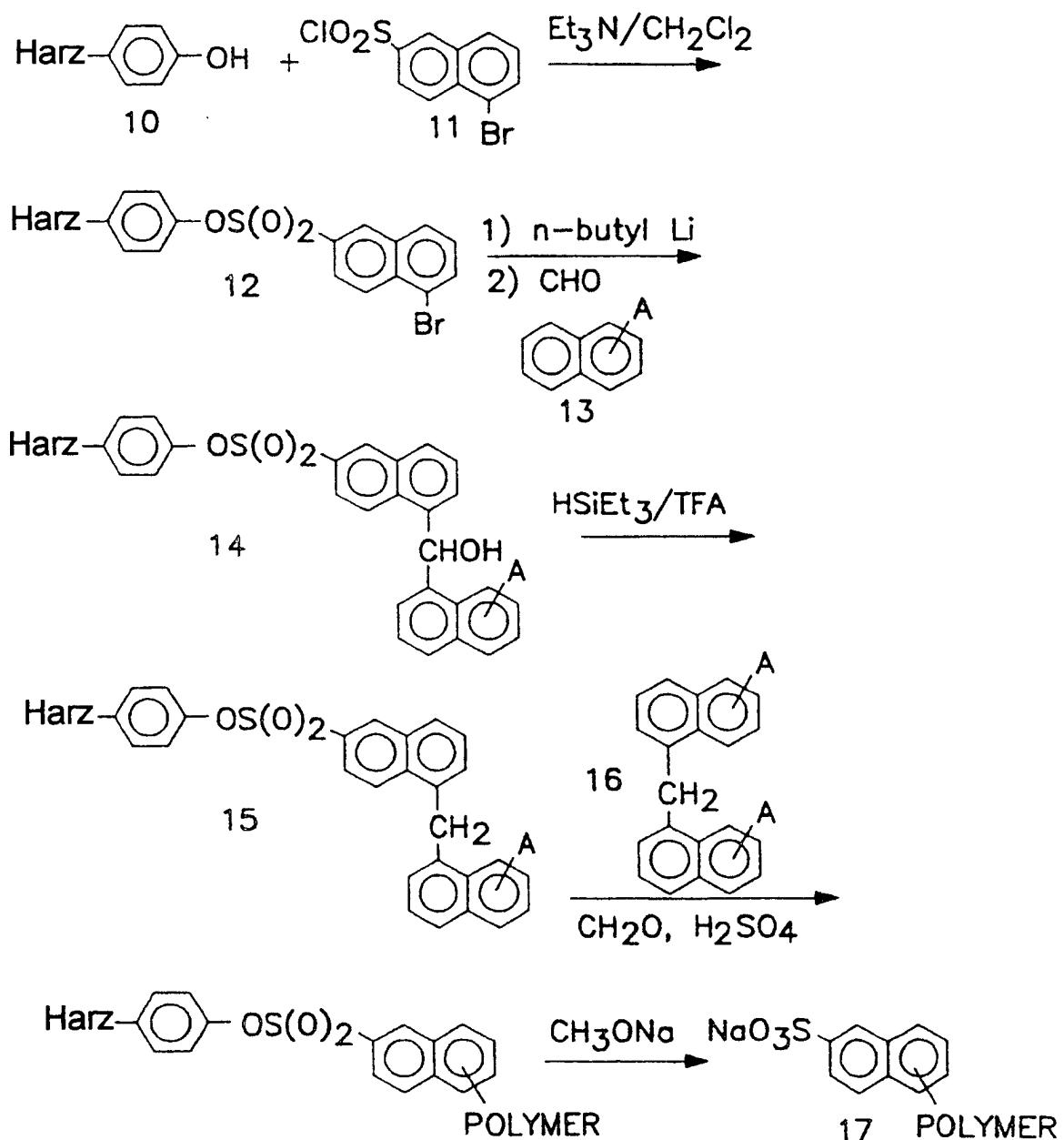


FIG. 16

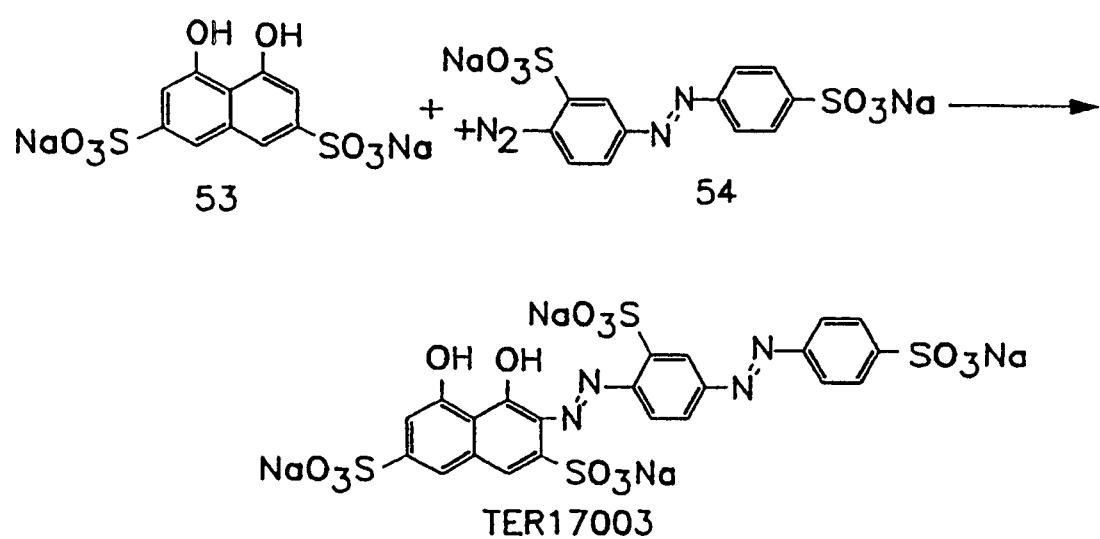


FIG. 17

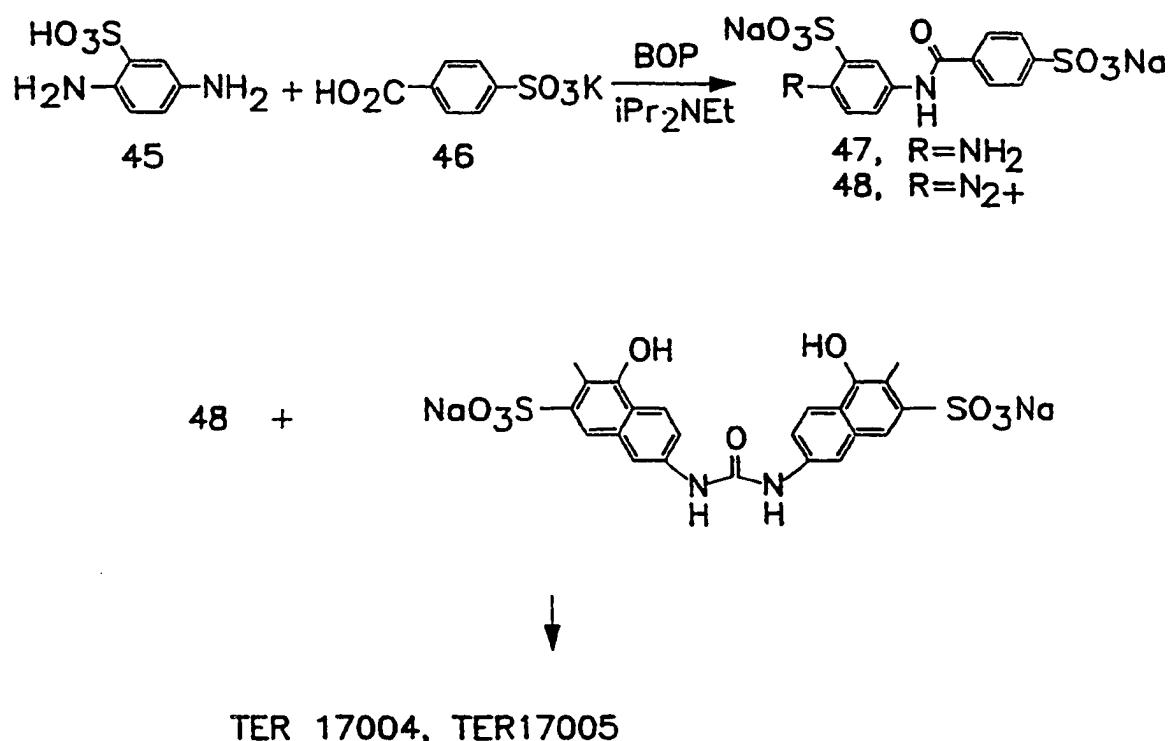


FIG. 18A

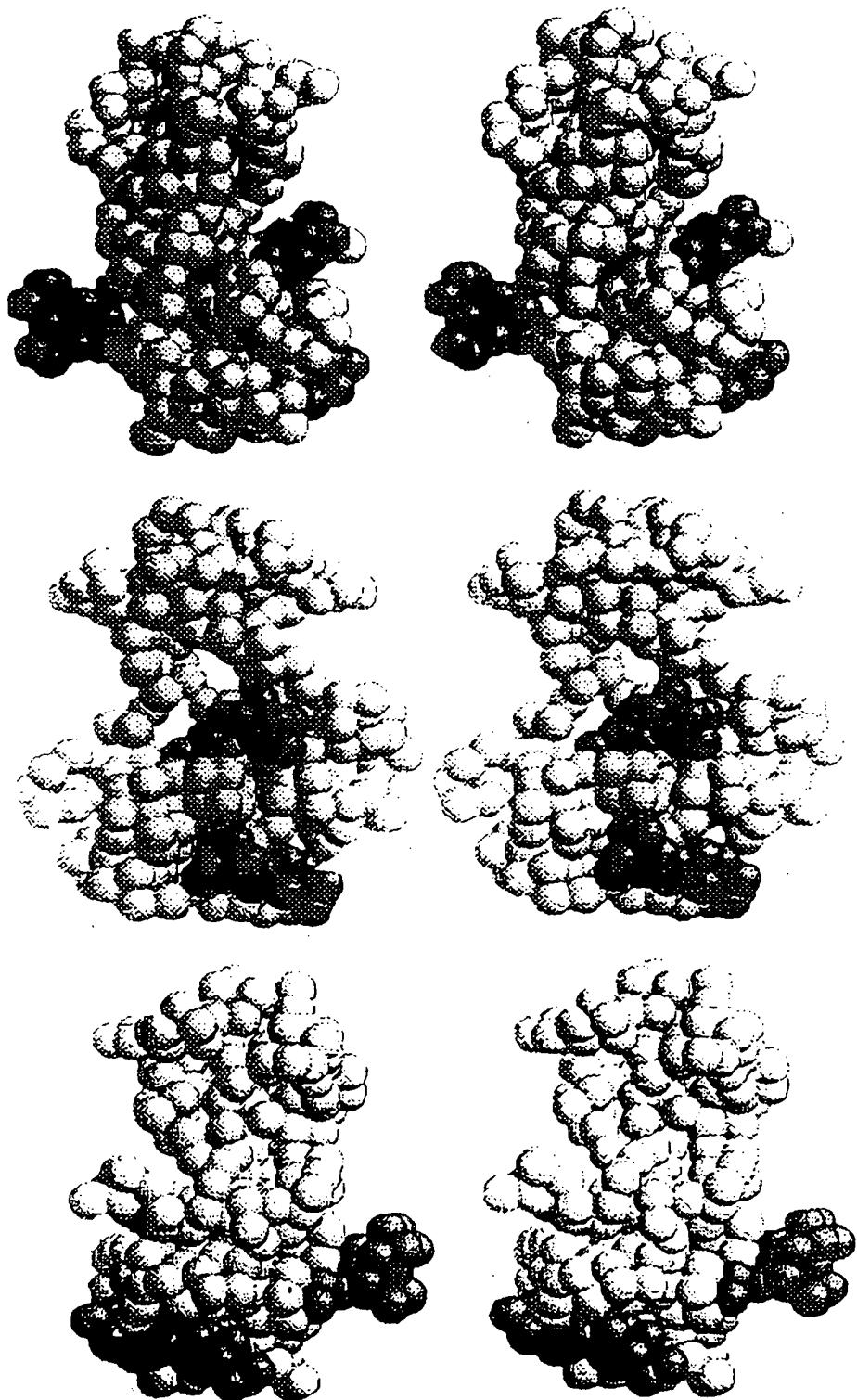


FIG. 18B

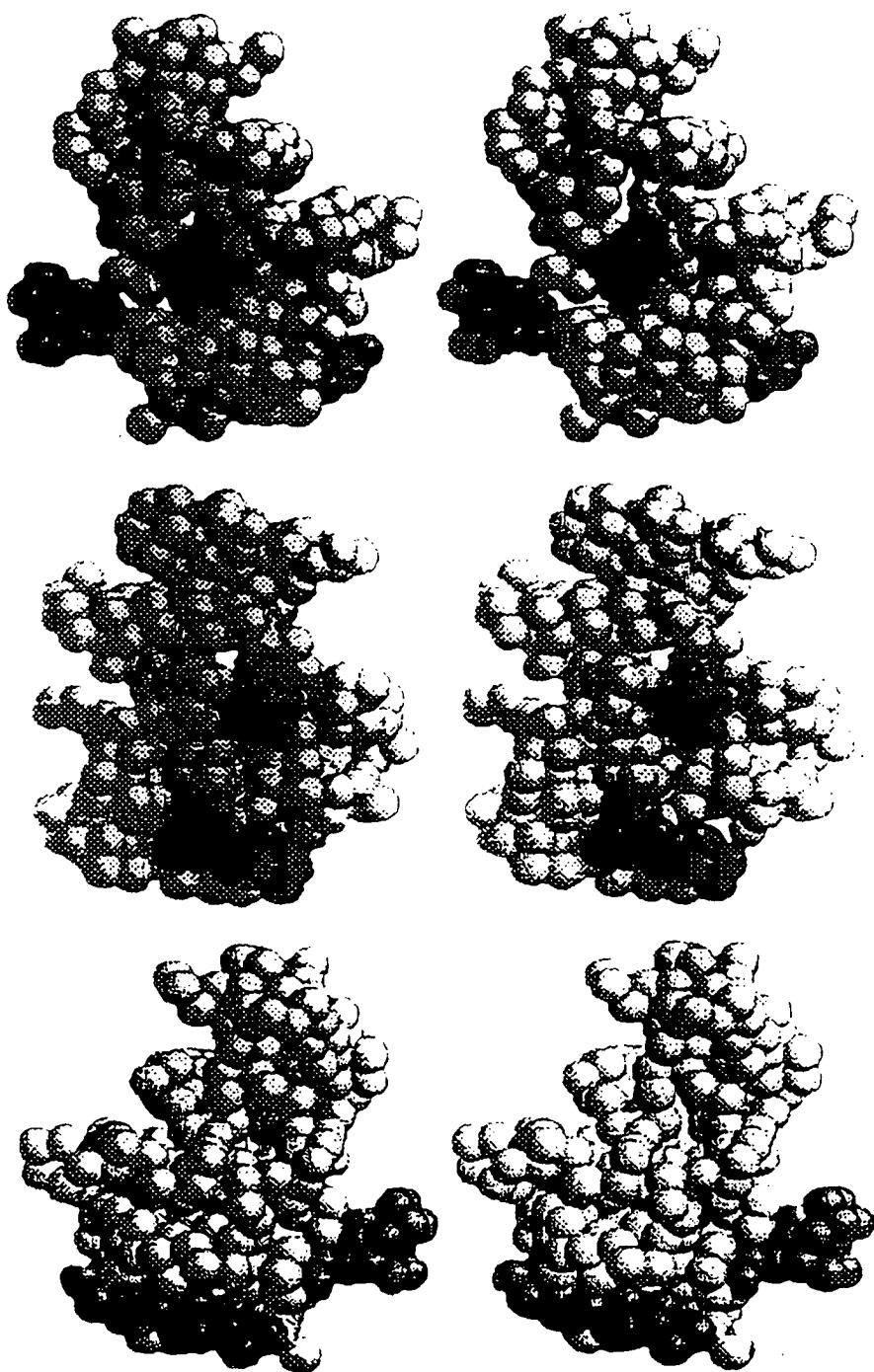


FIG. 19

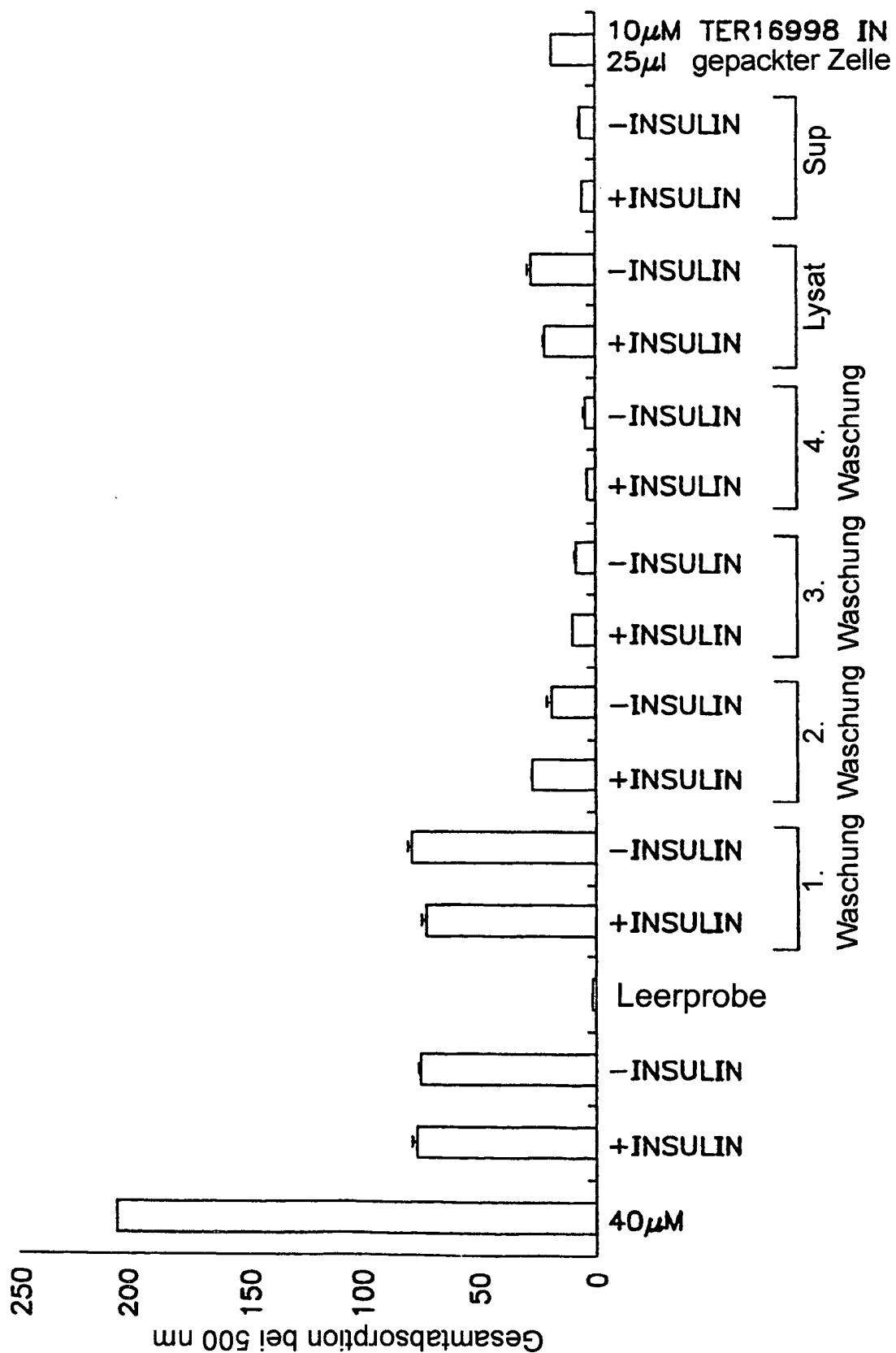


FIG. 20

