

Приоритетные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет по предварительным заявкам 60/321361, поданной 15 августа 2001г., и 60/268683, поданной 15 февраля 2001г., причем полное содержание обеих заявок включено сюда путем ссылки.

Предшествующий уровень техники

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к некоторым производным 3-(4-амидопиррол-2-илметилен)-2-индолинона, которые модулируют активность протеинкиназ ("РК"). Соединения по данному изобретению, следовательно, полезны при лечении расстройств, связанных с аномальной активностью РК. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие эти соединения, способы лечения заболеваний с использованием фармацевтических композиций, содержащих эти соединения, и способы их получения.

Уровень техники

РК представляют собой ферменты, которые катализируют фосфорилирование гидроксигрупп на тирозиновых, сериновых и треониновых остатках в белках. Последствия этой кажущейся простой активности являются поразительными; клеточный рост, дифференцировка и пролиферация, то есть фактически все аспекты жизни клетки, тем или другим образом зависят от активности РК. Более того, аномальная активность РК связана со множеством расстройств, варьирующих от относительно не угрожающих жизни заболеваний, таких как псориаз, до чрезвычайно вирулентных заболеваний, таких как глиобластома (рак головного мозга).

РК могут быть удобно разбиты на два класса, протеинтирозинкиназы (РТК) и серинтреонинкиназы (СТК).

Одним из первичных аспектов активности РТК является их взаимодействие с рецепторами факторов роста. Рецепторы факторов роста представляют собой белки клеточной поверхности. При связывании лиганда фактора роста рецепторы факторов роста переходят в активную форму, которая взаимодействует с белками на внутренней поверхности клеточной мембраны. Это приводит к фосфорилированию на тирозиновых остатках рецептора и других белков и к образованию внутри клетки комплексов с рядом цитоплазматических сигнальных молекул, которые, в свою очередь, осуществляют многочисленные клеточные ответы, такие как деление клеток (пролиферация), клеточная дифференцировка, клеточный рост, экспрессия метаболических эффектов во внеклеточное микроокружение и т.д. Для более полного рассмотрения см. Schlessinger and Ullrich, Neuron, 9: 303-391 (1992), который включен путем ссылки, включая любые графические материалы, как если бы был полностью приведен здесь.

Рецепторы факторов роста с активностью РТК известны как рецепторные тирозинкиназы ("РТК"). Они включают в себя большое семейство трансмембранных рецепторов с разнообразной биологической активностью. В настоящее время идентифицировано по меньшей мере девятнадцать (19) разных подсемейств РТК. Примером их является подсемейство, обозначенное как "HER" РТК, которое включает в себя EGFR (epithelial growth factor receptor, рецептор эпителиального фактора роста), HER2, HER3 и HER4. Эти РТК состоят из внеклеточного гликозилированного лигандсвязывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного цитоплазматического каталитического домена, который может фосфорилировать тирозиновые остатки на белках.

Еще одно подсемейство РТК состоит из инсулинового рецептора (IR), рецептора инсулиноподобного фактора роста I (IGF-IR) и рецептора, родственного инсулиновому рецептору (IRR). IR и IGF-IR взаимодействуют с инсулином, IGF-I и IGF-II с образованием гетеротетрамера из двух полностью внеклеточных гликозилированных α -субъединиц и двух β -субъединиц, которые пересекают клеточную мембрану и которые содержат тирозинкиназный домен.

Третье подсемейство РТК называют группой рецептора тромбоцитарного фактора роста ("PDGFR"), которая включает PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, c-kit и c-fms. Эти рецепторы состоят из гликозилированных внеклеточных доменов, состоящих из разного количества иммуноглобулинподобных петель, и внутриклеточного домена, где тирозинкиназный домен прерывается неродственными аминокислотными последовательностями.

Еще одна группа, которую из-за ее сходства с подсемейством PDGFR иногда относят к последнему, представляет собой рецепторное подсемейство киназы печени эмбриона ("flk"). Считают, что эта группа состоит из рецепторной киназы печени эмбриона-1 с киназным встроенным доменом (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 и fms-подобной тирозинкиназы 1 (flt-1).

Еще одним членом семейства тирозинкиназного рецептора фактора роста является подгруппа рецептора фактора роста фибробластов ("FGF"). Эта группа состоит из четырех рецепторов FGFR 1-4 и семи лигандов FGF 1-7. Хотя это еще точно не определено, рецепторы, по-видимому, состоят из гликозилированного внеклеточного домена, содержащего переменное количество иммуноглобулинподобных петель, и внутриклеточного домена, в котором тирозинкиназная последовательность прерывается областями неродственных аминокислотных последовательностей.

Еще одним членом семейства тирозинкиназного рецептора фактора роста является подгруппа рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста ("VEGF"). VEGF представляет собой димерный

гликопротеин, похожий на PDGF, но имеющий отличающиеся биологические функции и специфичность в отношении клеток-мишеней *in vivo*. Более конкретно, в настоящее время считают, что VEGF играет существенную роль в васкулогенезе и ангиогенезе.

Более полный список известных подсемейств RTK описан в Plowman et al., DN&P, 7(6): 334-339 (1994), который включен сюда путем ссылки, включая любые графические материалы, как если бы был полностью приведен здесь.

В дополнение к этим RTK также существует семейство полностью внутриклеточных РТК, называемых "нерецепторные тирозинкиназы" или "клеточные тирозинкиназы". Это последнее обозначение, сокращаемое как "СТК" (cellular tyrosine kinases), будет использоваться здесь. СТК не содержат внеклеточных и трансмембранных доменов. В настоящее время идентифицировано более 24 СТК в 11 подсемействах (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak и Ack). До сих пор подсемейство Src, по-видимому, представляет собой самую большую группу СТК и включает в себя Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr и Yrk. Для более детального рассмотрения СТК см. Bolen, Oncogene, 8: 2025-2031 (1993), которая включена сюда путем ссылки, включая любые графические материалы, как если бы была полностью приведена здесь.

Серин/треонинкиназы, СТК, подобно СТК являются преимущественно внутриклеточными, хотя существует несколько рецепторных киназ STK-типа. STK являются наиболее распространенными из цитозольных киназ, то есть киназ, которые осуществляют свою функцию в части цитоплазмы, отличной от цитоплазматических органелл и цитоскелета. Цитозоль представляет собой область внутри клетки, где происходит большая часть посреднической метаболической и биосинтетической клеточной активности, например именно в цитозоле белки синтезируются на рибосомах.

РТК, СТК и STK - все вовлечены во множество патогенных состояний, включая, в значительной степени, рак. Другие патогенные состояния, которые связаны с РТК, включают, без ограничения, псориаз, цирроз печени, диабет, ангиогенез, рестеноз, глазные болезни, ревматоидный артрит и другие воспалительные расстройства, иммунологические расстройства, как, например, аутоиммунное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, как, например, атеросклероз, и ряд почечных расстройств.

В отношении рака, двум основным гипотезам удалось объяснить, что избыточная клеточная пролиферация, ведущая в развитии опухоли, относится к функциям, про которые известно, что они регулируются РК. То есть предположили, что злокачественный клеточный рост является результатом нарушения в механизмах, которые контролируют клеточное деление и/или дифференцировку. Было показано, что белковые продукты ряда протоонкогенов вовлечены в пути сигнальной трансдукции, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку. Эти белковые продукты протоонкогенов включают внеклеточные факторы роста, трансмембранные РТК-рецепторы факторов роста (РТК), цитоплазматические РТК (СТК) и цитозольные STK, обсуждавшиеся выше.

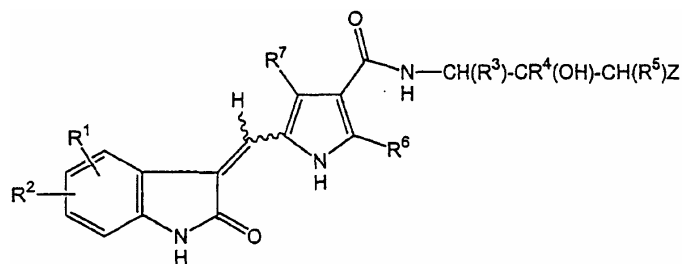
Ввиду очевидной связи между связанными с РК клеточными активностями и широким разнообразием человеческих расстройств, не удивительно, что огромное количество усилий тратится в попытке идентифицировать пути модуляции активности РК. В некоторые из этих усилий вовлечены биомиметические подходы, использующие большие молекулы, похожие на те, что вовлечены в действительные клеточные процессы (например, мутантные лиганды (заявка на патент США № 4966849); растворимые рецепторы и антитела (заявка № WO 94/10202, Kendall and Thomas, Proc. Nat'l Acad. Sci., 90:10705-09 (1994), Kim, et al. Nature, 362:841-844 (1993)); ПНК-лиганды (Jelinek, et al., Biochemistry, 33:10450-56; Takano, et al., Mol. Bio. Cell 4:358A (1993); Kinsella, et al., Exp. Cell Res. 199:56-62 (1992); Wright, et al., J. Cellular Phys., 152:448-57) и ингибиторы тирозинкиназы (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808; патент США № 5330992; Mariani, et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 35:2268 (1994)).

В дополнение к вышесказанному, были сделаны попытки идентифицировать небольшие молекулы, которые действуют как ингибиторы РК. Например, бис-моноциклические, бициклические и гетероциклические арильные соединения (PCT WO 92/20642), виниленазаиндолные производные (PCT WO 94/14808) и 1-циклопропил-4-пиридилхинолоны (патент США № 5330992) были описаны как ингибиторы тирозинкиназ. Соединения стирала (патент США № 5217999), стирилазамещенные пиридинные соединения (патент США № 5302606), хинолиновые производные (заявка EP № 0566266 A1), селенаиндолы и селениды (PCT WO 94/03427), трициклические полигидроксильные соединения (PCT WO 92/21660) и соединения бензилфосфоновой кислоты (PCT WO 91/15495) - все описаны в качестве ингибиторов РТК, полезных при лечении рака.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к некоторым производным 3-(4-амидопиррол-2-илметилиден)-2-индолинона, которые проявляют РК-модулирующую способность и, следовательно, полезны при лечении расстройств, связанных с аномальной активностью РК.

Одно воплощение данного изобретения представляет собой соединение формулы (I)



(I)

где R^1 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, галогеноалкокси, циклоалкила, гидрокси, алкокси, $-C(O)R^8$ и $-C(O)NR^{12}R^{13}$;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, тригалогенометила, гидрокси, алкокси и $-C(O)R^8$;

R^3 , R^4 и R^5 представляют собой независимо водород или алкил;

Z представляет собой арил, гетероарил, гетероцикл или $-NR^{15}R^{16}$, где R^{15} и R^{16} независимо представляют собой водород или алкил; либо R^{15} и R^{16} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоаминогруппу;

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода или алкила;

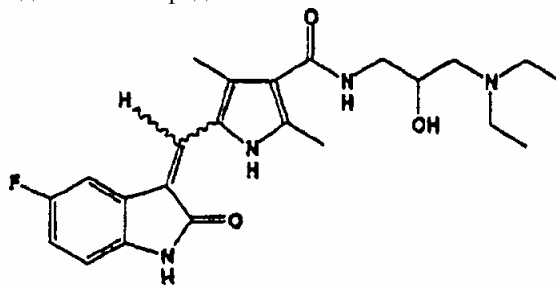
R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила;

R^8 выбран из группы, состоящей из гидрокси и алкокси;

R^{12} и R^{13} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила и арила; либо R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоамино;

или его фармацевтически приемлемую соль;

при условии, что это соединение не представляет собой



и где алкил означает C_1 - C_{10} алкил, возможно замещенный галогеном или гидрокси;

циклоалкил означает C_{3-8} моноциклическое кольцо или C_{11-12} конденсированное или полициклическое кольцо, где одно или более чем одно из колец может содержать одну и более чем одну двойную связь, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной пи-электронной системы;

арил означает моноциклическую или конденсированную полициклическую C_{6-12} кольцевую группу, имеющую полностью сопряженную пи-электронную систему и возможно замещенную одним или более чем одним галогеном или циано;

гетероарил означает моноциклическую или конденсированную кольцевую группу из 5-12 атомов, содержащую 1-4 кольцевых гетероатомов, выбранных из N, O или S, имеющих полностью сопряженную пи-электронную систему, и возможно замещенную гидрокси;

гетероцикл означает насыщенное циклическое кольцо из 3-8 атомов, в котором один или два кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), где один или два С атома гетероцикла возможно могут быть замещены карбонильной группой и где гетероциклическое кольцо возможно замещено одним незамещенным C_1 - C_4 алкилом или двумя незамещенными C_1 - C_4 алкилами;

гетероциклоамино означает насыщенное циклическое кольцо из 3-8 атомов, в котором по меньшей мере один из кольцевых атомов представляет собой азот и возможно один или два дополнительных кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), где один или два атома С могут быть возможно замещены карбонильной группой и где гетероциклоаминокольцо возможно замещено одним незамещенным C_1 - C_4 алкилом или двумя незамещенными C_1 - C_4 алкилами; и

арилокси означает $-O-C_{6-12}$ арил или О-гетероарил.

Другое воплощение представляет собой соединение формулы I, где:

R^1 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, циклоалкила, гидрокси, алкокси, $-C(O)R^8$ и $-C(O)NR^{12}R^{13}$;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, тригалогенометила, гидрокси, алкокси;

R^3 , R^4 и R^5 представляют собой независимо водород или алкил;

Z представляет собой арил, гетероарил, гетероцикл или $-NR^{15}R^{16}$, где R^{15} и R^{16} независимо представляют собой водород или алкил; либо R^{15} и R^{16} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоаминогруппу;

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода или алкила;

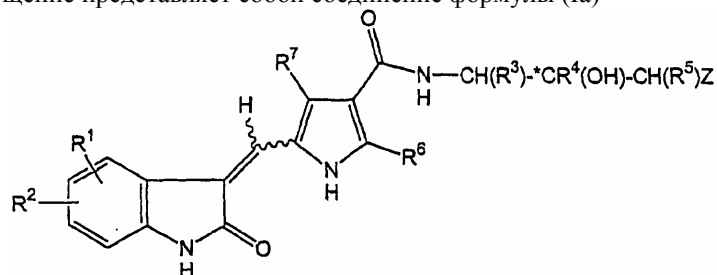
R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила, и гетероарила;

R^8 выбран из группы, состоящей из гидроксид и алкоксид;

R^{12} и R^{13} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила и арила, либо R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероцикл;

или его фармацевтически приемлемую соль.

Еще одно воплощение представляет собой соединение формулы (Ia)



где:

R^1 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород;

R^2 представляет собой фтор и находится в положении 5 индолинового кольца; и

Z представляет собой морфолин-4-ил;

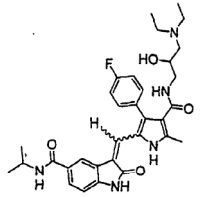
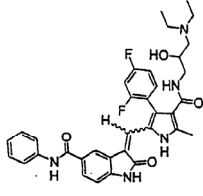
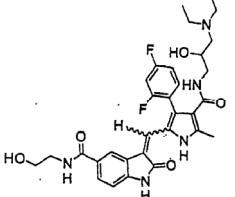
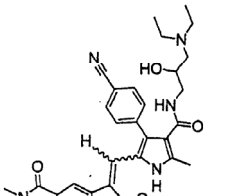
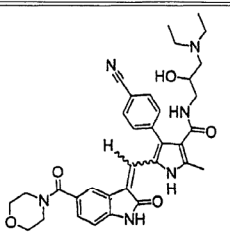
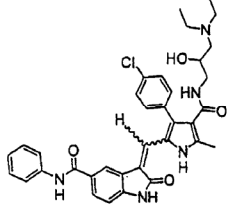
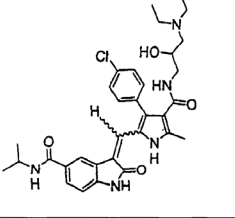
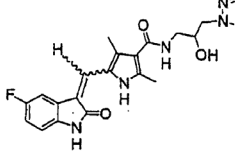
R^6 и R^7 представляют собой метил; и

стереохимия по *C представляет собой (S).

Еще одним воплощением данного изобретения является соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

№ соединения	Структура	Название
2N		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
3N		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
4N		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид

5N		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
6N		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
7N		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
8N		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
9N		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
11N		3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле}-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
12N		(3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле)-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
13N		(3Z)-3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
14N		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-[[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамида

15N		3-([4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(4-фторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
16N		3-([4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
17N		3-([4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
18N		3-([4-([3-(4-цианофенил)-4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
19N		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-[[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
20N		3-([3-(4-хлорфенил)-4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
21N		3-([3-(4-хлорфенил)-4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метил)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
22N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид

23N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
24N		N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
25N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
26N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
27N		N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
28N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
29N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
30N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
34N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
35N		N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид

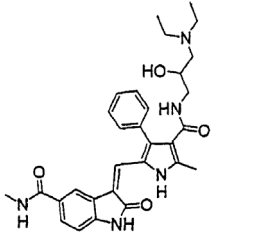
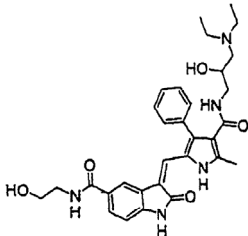
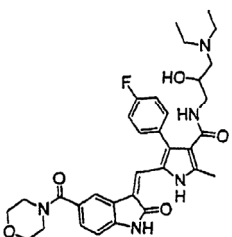
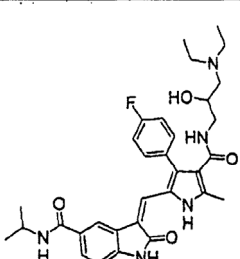
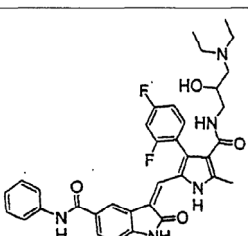
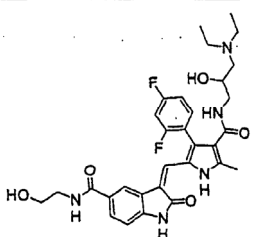
36N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
37N		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)-метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
38N		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
39N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
40N		5-[(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
47N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
48N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиден)метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

Еще одним воплощением данного изобретения является соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

№ соединения	Структура	Название
2S		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
3S		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
4S		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
5S		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
6S		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
7S		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
8S		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
9S		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид

Еще одним воплощением данного изобретения является соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

11S		(3Z)-3-([4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-3-фенил-1H-пиррол-2-ил]метил)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксамида
-----	--	--

12S		(3Z)-3-({[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
13S		(3Z)-3-({[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
14S		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-({(Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-1Н-пиррол-3-карбоксамид
15S		(3Z)-3-({[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-3-(4-фторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
16S		(3Z)-3-({[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
17S		(3Z)-3-({[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид

18S		(3Z)-3-{{3-(4-цианофенил)-4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил}метилен)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
19S		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-{{(Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-1Н-пиррол-3-карбоксамид
20S		(3Z)-3-{{3-(4-хлорфенил)-4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил}метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
21S		(3Z)-3-{{3-(4-хлорфенил)-4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил}метилен)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
22S		5-{{(Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
23S		5-{{(Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
24S		N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-{{(Z)-[2-оксо-5-трифторметокси]-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-1Н-пиррол-3-карбоксамид

25S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
26S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
27S		N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
28S		N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
29S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
30S		N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
31S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
32S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
33S		N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
34S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид

35S		N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-((Z)-{2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден}метил)-1H-пиррол-3-карбоксамид
36S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
37S		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
38S		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
39S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
40S		5-[(Z)-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
41S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
42S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
43S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
44S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид

Еще одним воплощением является соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

47S		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
-----	--	--

48S		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49S		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50S		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51S		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52S		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

Еще одним воплощением данного изобретения является соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

№ соединения	Структура	Название
45N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
45S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
46S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид

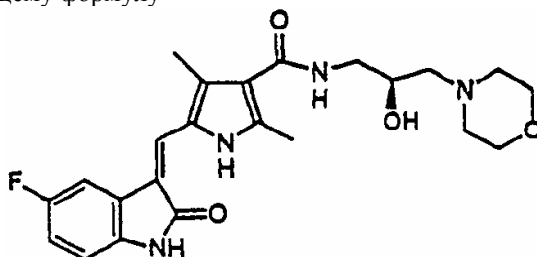
Еще одним воплощением является фармацевтическая композиция, содержащая соединение или соль формул I или Ia и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Еще одним воплощением является способ модуляции каталитической активности протеинкиназы, при котором указанную протеинкиназу приводят в контакт с соединением или солью формул I или Ia.

Протеинкиназа для этого способа может представлять собой рецепторную тирозинкиназу, нерецепторную тирозинкиназу и серинтреонинкиназу.

Еще одним воплощением является способ лечения или предупреждения расстройства, связанного с протеинкиназой, у организма, при котором вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей соединение или соль формул I или Ia и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Протеинкиназа для этого способа может представлять собой рецепторную тирозинкиназу, нерецепторную тирозинкиназу и серинтреонинкиназу. Расстройство, связанное с протеинкиназой, может представлять собой расстройство, связанное с EGFR, расстройство, связанное с PDGFR, расстройство, связанное с IGFR, и расстройство, связанное с flk. Протеинкиназное расстройство может также представлять собой плоскоклеточный рак, астроцитому, саркому Калози, глиобластому, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, меланому, рак яичников, рак простаты, рак молочной железы, мелкоклеточный рак легкого, глиому, рак ободочной и прямой кишки, рак мочеполовых путей и рак желудочно-кишечного тракта. Более того, протеинкиназное расстройство может также представлять собой диабет, аутоиммунное расстройство, гиперпролиферативное расстройство, рестеноз, фиброз, псориаз, болезнь Гиппеля-Линдау, остеоартрит, ревматоидный артрит, ангиогенез, воспалительное расстройство, иммунологическое расстройство и сердечно-сосудистое расстройство. Эти способы могут быть использованы для лечения людей.

Еще в одном воплощении данное изобретение относится к соединению 41S или его фармацевтически приемлемой соли, имеющему формулу



Кроме того, данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения 41S или фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

В другом воплощении данное изобретение относится к способам получения соединений формулы I.

Наконец, данное изобретение также относится к идентификации химического соединения, которое модулирует каталитическую активность протеинкиназы, путем приведения клеток, экспрессирующих протеинкиназу, в контакт с соединением или солью по настоящему изобретению, и последующего мониторинга клеток в отношении эффекта.

Подробное описание изобретения

Определения

Если не указано иначе, следующие термины, используемые в описании и формуле, имеют значения, как трактуется ниже.

"Алкил" относится к насыщенному алифатическому углеводородному радикалу, включая группы с прямой цепью и разветвленной цепью из 1-20 атомов углерода (всякий раз, когда здесь установлен числовой диапазон, например "1-20", это означает, что группа, в данном случае алкильная группа, может содержать 1 атом углерода, 2 атома углерода, 3 атома углерода и т.д. вплоть до 20 атомов углерода включительно). Более предпочтительно, он представляет собой алкил среднего размера, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, например метил, этил, пропил, 2-пропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, пентил и т.п. Наиболее предпочтительно, это низший алкил, имеющий от 1 до 4 атомов углерода, например метил, этил, пропил, 2-пропил, н-бутил, изобутил или трет-бутил и т.п. Алкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он является замещенным, группа(ы)-заместитель(и) представляет(ют) собой предпочтительно галогено, гидроксигруппу, низший алкокси, арил, арилокси, гетероарил, гетероалициклическую группу, $C(O)R^8$, NR^9R^{10} и $C(O)NR^9R^{10}$.

"Циклоалкил" относится к 3-8-членной полностью углеродной моноциклической кольцевой группе, полностью углеродной 5-членной/6-членной или 6-членной/6-членной конденсированной бициклической кольцевой группе или мультициклической конденсированной кольцевой группе ("конденсированная" кольцевая система означает, что каждое кольцо в этой системе имеет общую пару соседних атомов углерода с каждым другим кольцом в этой системе), где одно или более чем одно из колец может содержать одну или более чем одну двойную связь, но ни одно из этих колец не имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Неограничивающими примерами циклоалкильных групп являются циклопропан, циклобутан, циклопентан, циклопентен, циклогексан, циклогексадиен, адамантан, циклогептан, циклогептатриен и т.п. Циклоалкильная группа может быть замещенной или незамещенной. Когда она замещена, группа(ы)-заместитель(и) представляет(ют) собой предпочтительно один или более чем один, более предпочтительно один или два заместителя, независимо выбранных из группы, состоящей из низше-

го алкила, тригалогеноалкила, галогено, гидрокси, низшего алкокси, арила, возможно замещенного одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга представляющими собой галогено, гидрокси, низший алкил или низшую алкоксигруппу, арилокси, возможно замещенного одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга представляющими собой галогено, гидрокси, низший алкил или низшую алкоксигруппу, 6-членного гетероарила, имеющего от 1 до 3 атомов азота в кольце, причем углероды в этом кольце возможно замещены одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга представляющими собой галогено, гидрокси, низший алкил или низшую алкоксигруппу, 5-членного гетероарила, имеющего от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы, причем атомы углерода и азота этой группы возможно замещены одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга представляющими собой галогено, гидрокси, низший алкил или низшую алкоксигруппу, 5- или 6-членной гетероалициклической группы, имеющей от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы, причем атомы углерода и азота (если присутствует) в этой группе возможно замещены одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга представляющими собой галогено, гидрокси, низший алкил или низшую алкоксигруппу, меркапто, (низший алкил)тио, арилтио, возможно замещенный одной или более чем одной, предпочтительно одной или двумя группами, независимо друг от друга выбранными из галогено, гидрокси, низшей алкильной или низшей алкоксигрупп, циано, ацила, тиаоцила, О-карбамила, N-карбамила, О-тиокарбамила, N-тиокарбамила, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^9S(O)-$, $R^9S(O)_2-$, $-C(O)OR^9$, $R^9C(O)O-$ и $-NR^9R^{10}$, такие как определено выше.

"Алкенил" относится к алкильной группе, как она определена здесь, состоящей из по меньшей мере 2 атомов углерода и по меньшей мере одной углерод-углеродной двойной связи. Репрезентативные примеры включают, но не ограничены ими, этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-, 2- или 3-бутенил и т.п.

"Алкинил" относится к алкильной группе, как она определена здесь, состоящей из по меньшей мере 2 атомов углерода и по меньшей мере одной углерод-углеродной тройной связи. Репрезентативные примеры включают, но не ограничены ими, этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-, 2- или 3-бутинил и т.п.

"Арил" относится к полностью углеродной моноциклической или полициклической с конденсированными кольцами (то есть кольцами, которые имеют общие пары соседних атомов углерода) группам из 6-12 атомов углерода, имеющим полностью сопряженную пи-электронную систему. Примерами, без ограничения, арильных групп являются фенил, нафталенил и антраценил. Арильная группа может быть замещенной или незамещенной. Когда она замещена, группа(ы)-заместитель(и) представляет(ют) собой предпочтительно одну или более чем одну, более предпочтительно одну, две или три, еще более предпочтительно одну или две группы, независимо выбранные из группы, состоящей из низшего алкила, тригалогеноалкила, галогено, гидрокси, низшего алкокси, меркапто, (низший алкил)тио, циано, ацила, тиаоцила, О-карбамила, N-карбамила, О-тиокарбамила, N-тиокарбамила, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^9S(O)-$, $R^9S(O)_2-$, $-C(O)OR^9$, $R^9C(O)O-$ и $-NR^9R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено выше. Предпочтительно, арильная группа возможно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из галогено, низшего алкила, тригалогеноалкила, гидрокси, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфонамидо.

"Гетероарил" относится к моноциклической или конденсированной кольцевой (то есть кольца имеют общую пару соседних атомов) группе из 5-12 атомов в кольце, содержащей один, два, три или четыре кольцевых гетероатома, выбранных из N, O или S, при этом оставшиеся кольцевые атомы представляют собой C, и, кроме того, имеющей полностью сопряженную пи-электронную систему. Примерами, без ограничения, незамещенных гетероарильных групп являются пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, пиазол, пиридин, пиримидин, хинолин, изохинолин, пурин, тетразол, триазин и карбазол. Гетероарильная группа может быть замещенной или незамещенной. Когда она замещена, группа(ы)-заместитель(и) представляет(ют) собой предпочтительно один или более чем один, более предпочтительно один, два или три, даже более предпочтительно один или два заместителя, независимо выбранных из группы, состоящей из низшего алкила, тригалогеноалкила, галогено, гидрокси, низшего алкокси, меркапто, (низший алкил)тио, циано, ацила, тиаоцила, О-карбамила, N-карбамила, О-тиокарбамила, N-тиокарбамила, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^9S(O)-$, $R^9S(O)_2-$, $-C(O)OR^9$, $R^9C(O)O-$ и $-NR^9R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено выше. Предпочтительно, гетероарильная группа возможно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из галогено, низшего алкила, тригалогеноалкила, гидрокси, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфонамидо.

"Гетероалициклическая группа" относится к моноциклической или конденсированной кольцевой группе, имеющей в кольце(ах) от 5 до 9 кольцевых атомов, среди которых один или два кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), а оставшиеся кольцевые атомы представляют собой C. Кольца могут также иметь одну или более чем одну двойную связь. Однако кольца не имеют полностью сопряженной пи-электронной системы. Примерами, без ограничения, незамещенных гетероалициклических групп являются пирролидино, пипе-

ридино, пиперазино, морфолино, тиоморфолино, гомопиперазино и т.п. Гетероалициклическое кольцо может быть замещенным или незамещенным. Когда оно замещено, группа(ы)-заместитель(и) представляет(ют) собой предпочтительно один или более чем один, более предпочтительно один, два или три, даже более предпочтительно один или два заместителя, независимо выбранных из группы, состоящей из низшего алкила, тригалогеноалкила, галогено, гидроксид, низшего алкокси, меркапто, (низший алкил)тио, циано, ацила, тиоацила, О-карбамила, N-карбамила, О-тиокарбамила, N-тиокарбамила, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамида, S-сульфонамида, $R^9S(O)-$, $R^9S(O)_2-$, $-C(O)OR^9$, $R^9C(O)O-$ и $-NR^9R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено выше. Предпочтительно, гетероалициклическая группа возможно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из галогено, низшего алкила, тригалогеноалкила, гидроксид, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфонамида.

"Гетероциклил" обозначает насыщенный циклический радикал из 3-8 кольцевых атомов, в котором один или два кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), а оставшиеся кольцевые атомы представляют собой C, при этом один или два атома C могут возможно быть заменены карбонильной группой. Гетероциклическое кольцо может быть возможно замещено независимо одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из низшего алкила, возможно замещенного одним или двумя заместителями, независимо выбранными из карбокси- или сложноэфирной группы, галогеноалкила, цианоалкила, галогено, нитро, циано, гидроксид, алкокси, амина, моноалкиламино, диалкиламино, аралкила, гетероаралкила и $-COR$ (где R представляет собой алкил). Более конкретно, термин "гетероциклил" включает в себя, но не ограничен ими, тетрагидропиранил, 2,2-диметил-1,3-диоксолан, пиперидино, N-метилпиперидин-3-ил, пиперазино, N-метилпирролидин-3-ил, пирролидино, морфолино, тиоморфолино, тиоморфолино-1-оксид, тиоморфолино-1,1-диоксид, 4-этилоксикарбонилпиперазино, 3-оксопиперазино, 2-имидазолидинон, 2-пирролидинон, 2-оксогомопиперазино, тетрагидропиримидин-2-он и их производные. Предпочтительно, гетероциклическая группа возможно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из галогено, низшего алкила, низшего алкила, замещенного карбокси, сложным эфиром, гидроксид либо моно- или диалкиламино.

"Гетероциклоамино" обозначает насыщенный циклический радикал из 3-8 кольцевых атомов, в котором по меньшей мере один из кольцевых атомов представляет собой азот и возможно где один или два дополнительных кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), при этом оставшиеся кольцевые атомы представляют собой C, при этом один или два атома C могут возможно быть заменены карбонильной группой. Гетероциклоаминокольцо может быть возможно замещено независимо одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из низшего алкила, возможно замещенного одним или двумя заместителями, независимо выбранными из карбокси или сложноэфирной группы, галогеноалкила, цианоалкила, галогено, нитро, циано, гидроксид, алкокси, амина, моноалкиламино, диалкиламино, аралкила, гетероаралкила и $-COR$ (где R представляет собой алкил). Более конкретно, термин «гетероциклоамино» включает, но не ограничен ими, пиперидин-1-ил, пиперазин-1-ил, пирролидин-1-ил, морфолин-4-ил, тиоморфолин-4-ил, тиоморфолино-1-оксид, тиоморфолино-1,1-диоксид, 4-этилоксикарбонилпиперазин-1-ил, 3-оксопиперазин-1-ил, 2-имидазолидинон-1-ил, 2-пирролидинон-1-ил, 2-оксогомопиперазино, тетрагидропиримидин-2-он и их производные. Предпочтительно, эта гетероциклическая группа возможно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из галогено, низшего алкила, низшего алкила, замещенного карбокси или сложным эфиром, гидроксид либо моно- или диалкиламино. Гетероциклоаминогруппа представляет собой подвид гетероциклической группы, определенной выше.

"Гидроксид" относится к группе $-OH$.

"Алкокси" относится как к группе $-O$ -(алкил), так и к $-O$ -(незамещенный циклоалкил). Репрезентативные примеры включают, но не ограничены ими, например, метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси и т.п.

"Галогеноалкокси" относится к $-O$ -(галогеноалкил)группе. Репрезентативные примеры включают, но не ограничены ими, например, трифторметокси, трибромметокси и т.п.

"Арилокси" относится к обеим, $-O$ -арильной и $-O$ -гетероарильной группам, как они определены здесь. Репрезентативные примеры включают в себя, но не ограничены ими, например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси, тиенилокси, пиримидинилокси, пиазинилокси и т.п. и их производные.

"Меркапто" относится к группе $-SH$.

"Алкилтио" относится к обеим группам, $-S$ -(алкил) и $-S$ -(незамещенный циклоалкил). Репрезентативные примеры включают в себя, но не ограничены ими, например, метилтио, этилтио, пропилтио, бутилтио, циклопропилтио, циклобутилтио, циклопентилтио, циклогексилтио и т.п.

"Арилтио" относится к обеим, $-S$ -арильной и $-S$ -гетероарильной группам, как они определены здесь. Репрезентативные примеры включают в себя, но не ограничены ими, фенолтио, пиридинилтио, фуранилтио, тиенилтио, пиримидинилтио и т.п. и их производные.

"Ацил" относится к группе $-C(O)-R$ ", где R" выбран из группы, состоящей из водорода, низшего алкила, тригалогенометила, незамещенного циклоалкила, арила, возможно замещенного одним или более чем одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей

из низшего алкила, тригалогенометила, низшего алкокси, галогено и $-NR^9R^{10}$ групп, гетероарила (присоединенного через кольцевой углерод), возможно замещенного одним или более чем одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из низшего алкила, тригалогеноалкила, низшего алкокси, галогено и $-NR^9R^{10}$ групп, и гетероалициклической группы (присоединенной через кольцевой углерод), возможно замещенной одним или более чем одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, состоящей из низшего алкила, тригалогеноалкила, низшего алкокси, галогено и $-NR^9R^{10}$ групп. Репрезентативные ацильные группы включают в себя, но не ограничены ими, ацетил, трифторацетил, бензоил и т.п.

"Альдегид" относится к ацильной группе, где R" представляет собой водород.

"Тиоацил" относится к группе $-C(S)-R$ ", при этом R" такой, как определено здесь.

"Сложный эфир" относится к группе $-C(O)O-R$ ", при этом R" такой, как определено здесь, за исключением того, что R" не может быть водородом.

"Ацетильная" группа относится к группе $-C(O)CH_3$.

"Галогено"-группа относится к фтору, хлору, бром или иоду, предпочтительно фтору или хлору.

"Тригалогенометильная" группа относится к группе $-CX_3$, где X представляет собой галогено, как определено выше.

"Тригалогенометансульфонильная" группа относится к группе $X_3CS(=O)_2-$, где X такой, как определено выше.

"Циано" относится к группе $-C\equiv N$.

"S-Сульфонамидо" относится к группе $-S(O)_2NR^9R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"N-Сульфонамидо" относится к группе $-NR^9S(O)_2R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"О-Карбамильная" группа относится к группе $-OC(O)NR^{12}R^{13}$, причем R^{12} и R^{13} такие, как определено здесь.

"N-Карбамил" относится к группе $R^9OC(O)NR^{10}-$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"О-Тиокарбамил" относится к группе $-OC(S)NR^{12}R^{13}$, причем R^{12} и R^{13} такие, как определено здесь.

"N-Тиокарбамил" относится к группе $R^9OC(S)NR^{10}-$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"Амино" относится к группе $-NR^9R^{10}$, где R^9 и R^{10} оба представляют собой водород.

"С-Амидо" относится к группе $-C(O)NR^9R^{10}$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"N-Амидо" относится к группе $R^9C(O)NR^{10}-$, причем R^9 и R^{10} такие, как определено здесь.

"Нитро" относится к группе $-NO_2$.

"Галогеноалкил" обозначает алкил, предпочтительно низший алкил, как он определен выше, который замещен одним или более одинаковыми или различными галогеноатомами, например $-CH_2Cl$, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CH_2CCl_3$ и т.п.

"Гидроксиалкил" обозначает алкил, предпочтительно низший алкил, как он определен выше, который замещен одной, двумя или тремя гидроксигруппами, например гидроксиметил, 1- или 2-гидрокси-этил, 1,2-, 1,3- или 2,3-дигидроксипропил и т.п.

"Аралкил" обозначает алкил, предпочтительно низший алкил, как он определен выше, который замещен арильной группой, как она определена выше, например $-CH_2$ фенил, $-(CH_2)_2$ фенил, $-(CH_2)_3$ фенил, $CH_3CH(CH_3)CH_2$ фенил и т.п. и их производные.

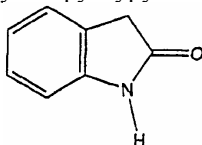
"Гетероаралкильная" группа обозначает алкил, предпочтительно низший алкил, как он определен выше, который замещен гетероарильной группой, например $-CH_2$ пиридинил, $-(CH_2)_2$ пиримидинил, $-(CH_2)_3$ имидазолил и т.п. и их производные.

"Моноалкиламино" обозначает радикал $-NHR$, где R представляет собой алкильную или незамещенную циклоалкильную группу, как они определены выше, например метиламино, (1-метилэтил)амино, циклогексиламино и т.п.

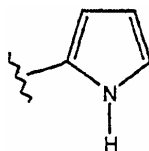
"Диалкиламино" обозначает радикал $-NRR$, где каждый R представляет собой независимо алкильную или незамещенную циклоалкильную группу, как они определены выше, например диметиламино, диэтиламино, (1-метилэтил)этиламино, циклогексилметиламино, циклопентилметиламино и т.п.

"Возможный" или "возможно" обозначают, что событие или обстоятельство, за ними описанное, может, но не обязательно, иметь место и что описание изобретения включает в себя случаи, когда событие или обстоятельство имеет место, и случаи, в которых оно не имеет место. Например, "гетероциклическая группа, возможно замещенная алкильной группой" обозначает, что алкил может присутствовать, но не обязательно присутствует, и описание изобретения включает в себя ситуации, где гетероциклическая группа замещена алкильной группой, и ситуации, где гетероциклическая группа не замещена алкильной группой.

Термины "2-индолинон", "индолин-2-он" и "2-оксиндол" используются взаимозаменяемо здесь для обозначения молекулы, имеющей химическую структуру



Термин "пиррол" относится к молекуле, имеющей химическую структуру



Соединения, которые имеют одинаковую молекулярную формулу, но различаются по своей природе, или порядку связи своих атомов, или расположению своих атомов в пространстве, называют "изомеры".

Изомеры, которые различаются по расположению своих атомов в пространстве, называют "стерео-изомеры". Стереизомеры, которые не являются зеркальными отображениями один другого, называют "диастереомеры", а те, которые являются не накладываемыми друг на друга зеркальными отображениями друг друга, называют "энантиомеры". Когда соединение обладает асимметрическим центром, например оно связано с четырьмя различными группами, возможна пара энантиомеров. Энантиомер может характеризоваться абсолютной конфигурацией его асимметрического центра и описываться правилами R- и S-последовательности Кана и Прелога или тем, каким образом молекула вращает плоскость поляризованного света и тогда обозначается как правовращающая или левовращающая (то есть как (+) или (-)-изомеры, соответственно). Хиральное соединение может существовать либо в виде индивидуального энантиомера, либо в виде смеси энантиомеров. Смесь, содержащая равные доли энантиомеров, называется "рацемической смесью".

Соединения по настоящему изобретению могут обладать одним или более чем одним асимметрическим центром; такие соединения могут, следовательно, быть получены в виде индивидуальных (R)- или (S)-стереоизомеров или в виде их смесей. Например, атом углерода, несущий гидроксигруппу в $\text{-CONHCHR}^3\text{-CR}^4(\text{OH})\text{CR}^5\text{Z}$ в соединении формулы (I), представляет собой асимметрический центр, и, следовательно, соединение формулы (I) может существовать в виде (R)- или (S)-стереоизомера. Если не указано иначе, понимается, что описание или название конкретного соединения в описании и формуле изобретения включает в себя как индивидуальные энантиомеры, так и их смеси - рацемические или другие. Способы определения стереохимии и разделения стереоизомеров хорошо известны в данной области (смотри обсуждение в главе 4 "Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992).

Соединения формулы (I) могут проявлять таутомерию и структурную изомерию. Например, соединения, описанные здесь, могут иметь E или Z конфигурацию вокруг двойной связи, соединяющей 2-индолиноновую группировку с пиррольной группировкой, либо они могут представлять собой смесь E и Z. Данное изобретение охватывает любую таутомерную или структурно изомерную форму и их смеси, которые обладают способностью модулировать активность RTK, CTK и/или STK, и не ограничивается какой-либо одной таутомерной или структурно изомерной формой.

"Фармацевтическая композиция" относится к смеси одного или более чем одного из соединений, описанных здесь, или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей или пролекарств, с другими химическими компонентами, такими как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Целью фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

Соединение формулы (I) может также действовать в качестве пролекарства. "Пролекарство" относится к агенту, который превращается в родоначальное лекарство *in vivo*. Пролекарства часто полезны, поскольку в некоторых ситуациях их можно вводить легче, чем родоначальное лекарство. Они могут быть, например, биодоступны при пероральном введении, в то время как родоначальное лекарство - нет. Пролекарство может также иметь улучшенную растворимость в фармацевтических композициях по сравнению с родоначальным лекарством. Примером, без ограничения, пролекарства будет соединение по настоящему изобретению, которое вводится в виде сложного эфира ("пролекарства") для облегчения прохождения через клеточную мембрану, где растворимость в воде вредит подвижности, а затем в ходе обмена веществ гидролизует до карбоновой кислоты - активного начала - сразу же внутри клетки, где растворимость в воде благоприятна.

Дополнительным примером пролекарства может быть короткий полипептид, например, без ограничения, 2-10-аминокислотный полипептид, связанный через концевую аминогруппу с карбоксигруппой соединения по настоящему изобретению, при этом полипептид гидролизует или метаболизируется *in vivo* с высвобождением активной молекулы. Пролекарства соединения формулы (I) входят в объем данного изобретения.

Дополнительно, предполагается, что соединение формулы (I) будет метаболизироваться с помощью ферментов в теле организма, такого как человек, с образованием метаболита, который может модулировать активность протеинкиназ. Такие метаболиты входят в объем настоящего изобретения.

Как используется здесь, термин "физиологически/фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения в организме и не снимает биологическую активность и свойства вводимого соединения.

"Фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения соединения. Примеры, без ограничения, эксципиентов включают в себя карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Как используется здесь, "фармацевтически приемлемая соль" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства родоначального соединения. Такие соли включают:

(1) соль присоединения кислоты, которую получают путем реакции свободного основания родоначального соединения с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота и т.п., либо с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, (D)- или (L)-яблочная кислота, малеиновая кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, паратолуолсульфоновая кислота, салициловая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота и т.п., предпочтительно соляная кислота или (L)-яблочная кислота; либо

(2) соли, образованные, когда кислотный протон, присутствующий в родоначальном соединении, либо заменен ионом металла, например ионом щелочного металла, ионом щелочно-земельного металла или ионом алюминия; либо образует координационные связи с органическим основанием, таким как этаноламин, диэтанолламин, триэтанолламин, трометамин, N-метилглуксамин и т.п.

"РК" относится к рецепторной протеинтирозинкиназе (RTK), нерецепторной или "клеточной" тирозинкиназе (СТК) и серинтреонинкиназам (СТК).

"Способ" относится к образу действий, средствам, методикам и процедурам для осуществления поставленной задачи, включая, но не ограничиваясь ими, образ действий, средства, методики и процедуры, либо известные, либо легко разрабатываемые из известных образов действий, средств, методик и процедур специалистами в химических, фармацевтических, биологических, биохимических и медицинских областях.

"Модуляция" или "модулирование" относится к изменению каталитической активности RTK, СТК и STK. Более конкретно, модулирование относится к активации каталитической активности RTK, СТК и STK, предпочтительно к активации или ингибированию каталитической активности RTK, СТК и STK, в зависимости от концентрации соединения или соли, воздействию которых подвергается RTK, СТК и STK, либо, более предпочтительно, к ингибированию каталитической активности RTK, СТК и STK.

"Каталитическая активность" относится к скорости фосфорилирования тирозина под влиянием, прямым или косвенным, RTK и/или СТК либо фосфорилирования серина и треонина под влиянием, прямым или косвенным, СТК.

"Приведение в контакт" относится к сведению вместе соединения по данному изобретению и РК-мишени таким образом, что соединение может влиять на каталитическую активность РК либо прямо, то есть путем взаимодействия с самой киназой, либо косвенно, то есть путем взаимодействия с другой молекулой, от которой зависит каталитическая активность киназы. Такое "приведение в контакт" можно осуществлять *"in vitro"*, то есть в пробирке, на чашке Петри или т.п. В пробирке приведение в контакт может включать в себя только соединение и интересующую РК либо может включать в себя целые клетки. Клетки могут также поддерживаться или выращиваться в чашках для культивирования клеток и приводиться в контакт с соединением в этой среде. В этом контексте, способность конкретного соединения влиять на связанное с РК расстройство, то есть ИК₅₀ соединения, определенная ниже, может быть установлена до попыток использования соединений *in vivo* на более сложных живых организмах. Для клеток за пределами организма существует, и они хорошо известны специалистам в данной области, множество способов приведения РК в контакт с соединениями, включая, но не ограничиваясь ими, прямую микроинъекцию в клетки и множество методов трансмембранного переноса.

"*In vitro*" относится к процедурам, осуществляемым в искусственной окружающей среде, как, например, без ограничения, в пробирке или культуральной среде.

"*In vivo*" относится к процедурам, осуществляемым внутри живого организма, такого как, без ограничения, мышь, крыса или кролик.

"Расстройство, связанное с РК", "расстройство, стимулируемое РК" и "аномальная активность РК" - все это относится к состоянию, характеризующемуся неподходящей, то есть пониженной или, более часто, повышенной каталитической активностью РК, где конкретная РК может представлять собой RTK, СТК или STK. Неподходящая каталитическая активность может возникать как результат либо: (1) экспрессии РК в клетках, которые в норме не экспрессируют РК; либо (2) повышенной экспрессии РК, приводящей к нежелательной пролиферации, дифференцировке и/или росту клеток, либо (3) пониженной экспрессии РК, приводящей к нежелательным уменьшениям пролиферации, дифференцировке и/или росту клеток. Повышенная активность РК относится либо к амплификации гена, кодирующего конкретную РК, либо к продуцированию уровня активности РК, который может коррелировать с расстройством клеточной пролиферации, дифференцировки и/или роста (таким образом, когда уровень РК повышается, тяжесть одного или более из симптомов клеточного расстройства увеличивается). Уменьшенная активность имеет место, естественно, наоборот, когда тяжесть одного или более чем одного из симптомов клеточного расстройства увеличивается при снижении уровня активности РК.

"Лечить", "лечение" относятся к способу облегчения или нейтрализации РК-опосредованного клеточного расстройства и/или его сопутствующих симптомов. По отношению конкретно к раку, эти термины просто означают, что предполагаемая продолжительность жизни индивидуума, пораженного раком, будет увеличена или что один или более из симптомов заболевания будут уменьшены.

"Организм" относится к любому живому существу, состоящему из по меньшей мере одной клетки. Живой организм может быть таким простым, как, например, одноклеточная эукариотическая клетка, или таким сложным, как млекопитающее, включая человека.

"Терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству вводимого соединения, которое будет ослаблять до некоторой степени один или более из симптомов расстройства, которое лечат. При ссылке на лечение рака, терапевтически эффективное количество относится к такому количеству, которое обладает эффектом:

- (1) уменьшения размера опухоли;
- (2) ингибирования (то есть замедления до некоторой степени, предпочтительно остановки) опухолевого метастаза;
- (3) ингибирования до некоторой степени (то есть замедления до некоторой степени, предпочтительно остановки) роста опухоли; и/или
- (4) облегчения до некоторой степени (либо, предпочтительно, устранения) одного или более чем одного симптома, связанного с раком.

"Мониторинг" обозначает наблюдение или детекцию эффекта приведения в контакт соединения с клеткой, экспрессирующей конкретную РК. Наблюдаемый или детектируемый эффект может представлять собой изменение в фенотипе клетки, в каталитической активности РК либо изменение во взаимодействии РК с естественным партнером связывания. Методики наблюдения и детектирования таких эффектов хорошо известны в данной области.

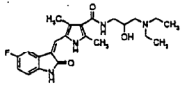
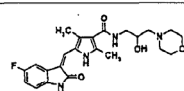
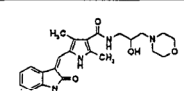
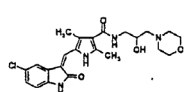
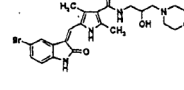
Вышеназванный эффект выбирают из изменения или отсутствия изменения в фенотипе клетки, изменения или отсутствия изменения каталитической активности указанной протеинкиназы либо изменения или отсутствия изменения во взаимодействии указанной протеинкиназы с естественным партнером связывания в конечном аспекте данного изобретения.

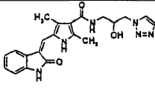
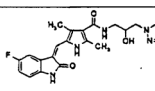
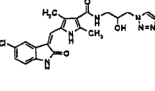
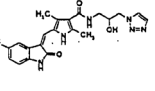
"Фенотип клетки" относится к внешнему виду клетки или ткани либо к биологической функции клетки или ткани. Примерами, без ограничения, клеточного фенотипа являются размер клетки, рост клетки, пролиферация клетки, клеточная дифференцировка, продолжительность жизни клетки, апоптоз, а также захват и использование питательных веществ. Такие фенотипические характеристики можно определить с помощью методик, хорошо известных в данной области техники.

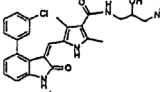
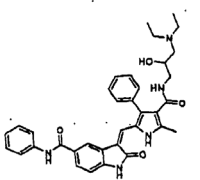
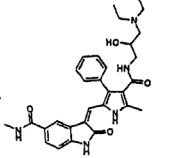
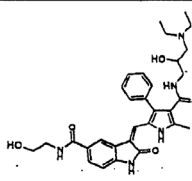
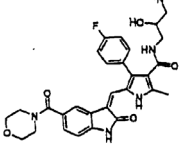
"Естественный партнер связывания" относится к полипептиду, который связывается с конкретной РК в клетке. Естественные партнеры связывания могут играть роль в распространении сигнала в процессе РК-опосредованной сигнальной трансдукции. Изменение во взаимодействии естественного партнера связывания с РК может проявляться как повышенная или пониженная концентрация комплекса "РК/естественный партнер связывания" и, в результате, в наблюдаемом изменении способности РК опосредовать сигнальную трансдукцию.

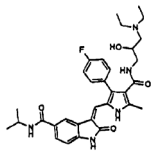
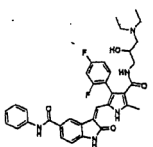
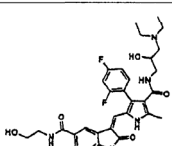
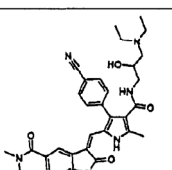
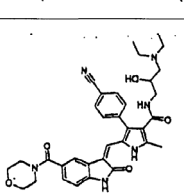
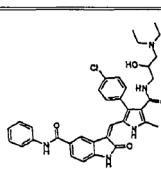
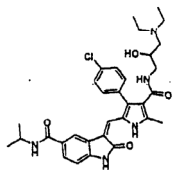
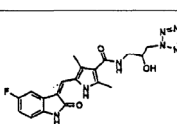
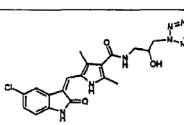
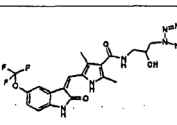
Репрезентативные соединения по настоящему изобретению приведены в табл. 1а ниже.

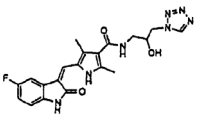
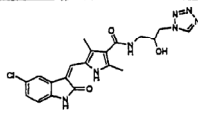
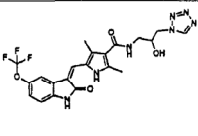
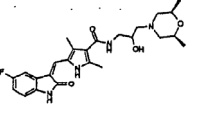
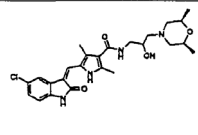
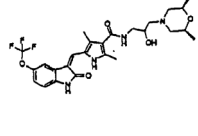
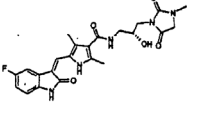
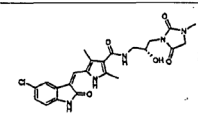
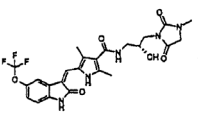
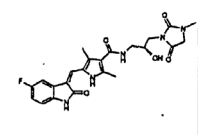
Таблица 1а

№ соединения	Структура	Название	МС m/z
1		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидрокси-пропил)-амид	427 [M+1]
2		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид	441 [M-1]
3		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид	423 [M-1]
4		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид	457 [M-1]
5		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид	501 [M-1] 503 [M-1]
			1

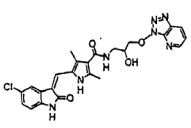
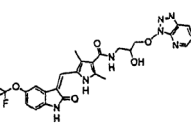
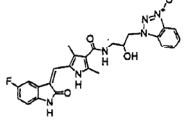
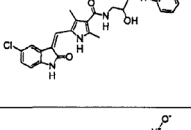
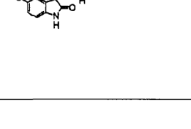
6		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид	405 [M-1]
7		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид	423 [M-1]
8		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид	439 [M-1]
9		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид	483 [M-1] 485 [M-1]

10		5-((Z)-[4-(3-хлорфенил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил)-N-(2-гидрокси-3-пирролидин-1-илпропил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамида	
11		(3Z)-3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида	
12		(3Z)-3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида	
13		(3Z)-3-[[4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида	
14		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил)-1Н-пиррол-3-карбоксамида	

15		(3Z)-3-([4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(4-фторфенил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
16		(3Z)-3-([4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
17		(3Z)-3-([4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
18		(3Z)-3-([3-(4-цианофенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
19		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил)-1H-пиррол-3-карбоксаид
20		(3Z)-3-([3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
21		(3Z)-3-([3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1H-пиррол-2-ил]метилен)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксаид
22		5-((Z)-[5-(фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксаид
23		5-((Z)-[5-(хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксаид
24		N-[2-гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил)-1H-пиррол-3-карбоксаид

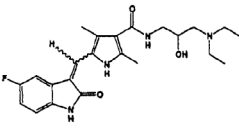
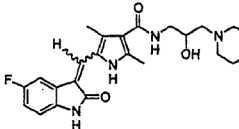
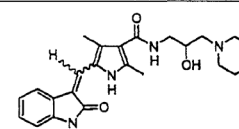
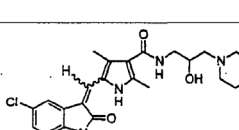
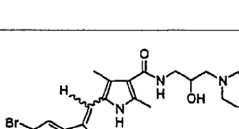
25		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
26		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
27		N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
28		N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
29		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
30		N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
31		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
32		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
33		N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
34		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид

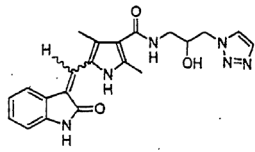
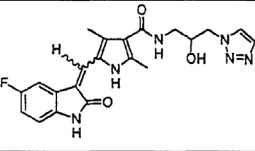
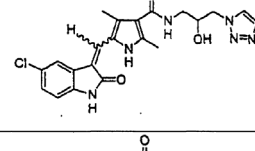
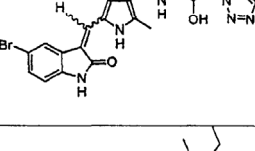
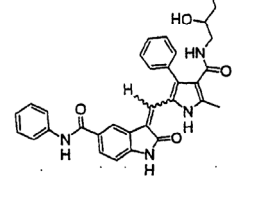
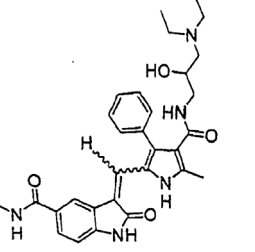
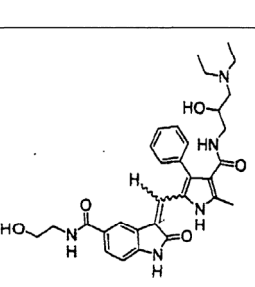
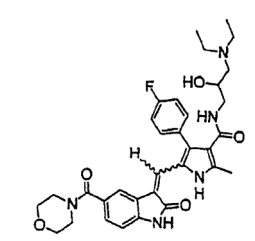
35		N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
36		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
37		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
38		N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
39		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
40		5-[(Z)-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидотиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
41		442,49 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
42		442,49 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
43		458,95 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
44		458,95 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
47		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид

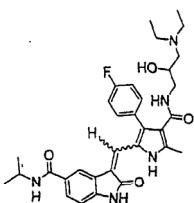
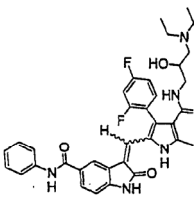
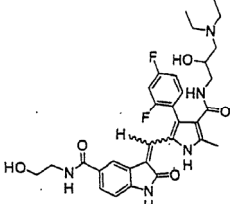
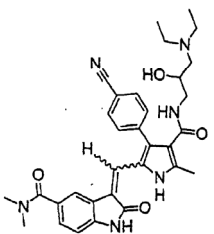
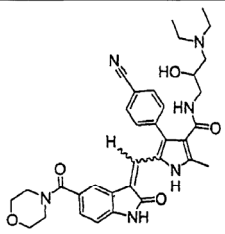
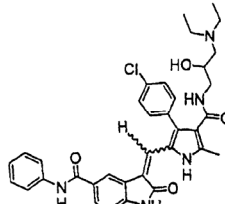
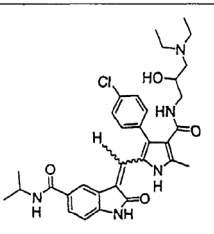
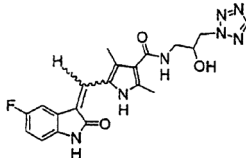
48		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-((1,2,3]триазоло[4,5-в]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-((1,2,3]триазоло[4,5-в]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

Другие репрезентативные соединения по настоящему изобретению показаны в табл. 16 ниже.

Таблица 16

№ соедин ения	Структура	Название
1N		5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидрокси-пропил)-амид
2N		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
3N		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
4N		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
5N		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид

6N		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
7N		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
8N		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
9N		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
11N		3-[[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
12N		(3-[[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
13N		(3Z)-3-[[4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метилен]-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
14N		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-[[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамида

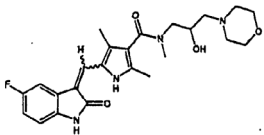
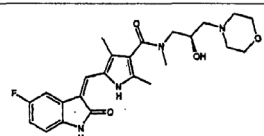
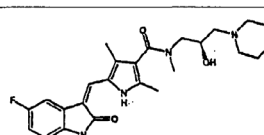
15N		3-((4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(4-фторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
16N		3-((4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
17N		3-((4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
18N		3-((3-(4-цианофенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
19N		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-[[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
20N		3-((3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
21N		3-((3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
22N		5-((5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид

23N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
24N		N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
25N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
26N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
27N		N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
28N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
29N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
30N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
34N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
35N		N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид

36N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
37N		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
38N		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
39N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
40N		5-[(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
47N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
48N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-б]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

Другие репрезентативные соединения по настоящему изобретению показаны в табл. 1в ниже.

Таблица 1в

№ соединения	Структура	Название
45N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
45S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
46S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид

Соединения, представленные в табл. 1а-1в, являются только примерами и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем данного изобретения.

Предпочтительные воплощения

Хотя самое широкое определение приведено в разделе "Краткое изложение сущности изобретения", некоторые соединения формулы (I), приведенные ниже, предпочтительны.

Предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где

R⁶ выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила; а

R⁷ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, и более предпочтительно R⁷ представляет собой водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил.

Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где

R⁶ выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила, наиболее предпочтительно метила;

R⁷ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, и R⁷ представляет собой, более предпочтительно, водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил; и

R³, R⁴ и R⁵ представляют собой водород; а

Z представляет собой арил.

Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где:

R⁶ выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила, наиболее предпочтительно метила;

R⁷ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, и R⁷ представляет собой, более предпочтительно, водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил, наиболее предпочтительно метил; и

R³, R⁴ и R⁵ представляют собой водород; а

Z представляет собой гетероарил, предпочтительно триазилил, тетразолил, имидазолил, пиридилил, пиримидинил или пиазинил.

Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где:

R⁶ выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила, наиболее предпочтительно метила;

R⁷ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, и R⁷ представляет собой, более предпочтительно, водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил; и

R³, R⁴ и R⁵ представляют собой водород; а

Z представляет собой гетероцикл.

Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где:

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила, наиболее предпочтительно метила;

R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, и R^7 представляет собой, более предпочтительно, водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил, наиболее предпочтительно метил; и

R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород; а

Z представляет собой $-NR^{15}R^{16}$, где R^{15} и R^{16} объединены с образованием гетероциклоамино, предпочтительно пиперидин-1-ила, N-метилпиперидин-1-ила, пиперазин-1-ила, N-метилпирролидин-1-ила, пирролидин-1-ила, морфолин-4-ила, тиоморфолин-4-ила, тиоморфолино-1-оксида, тиоморфолино-1,1-диоксида, 4-этилоксикарбонилметилпиперазин-1-ила, 3-оксопиперазин-1-ила, имидазолидин-1-ил-2-она, пирролидин-1-ил-2-она, 2-оксогомопиперазин-1-ила или тетрагидропиримидин-1-ил-2-она, более предпочтительно морфолин-4-ила.

Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая, где:

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода и алкила, предпочтительно водорода, метила, этила, изопропила, трет-бутила, изобутила или н-бутила, более предпочтительно водорода или метила;

R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила, где R^{17} представляет собой гидроксильный, алкил или арил, и R^7 представляет собой, более предпочтительно, водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, даже более предпочтительно метил, водород или фенил; и

R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород; а

Z представляет собой $-NR^{15}R^{16}$, где R^{15} и R^{16} представляют собой алкил, предпочтительно диэтиламино, диметиламино или этиламино.

В пределах вышеуказанных предпочтительных и более предпочтительных групп даже более предпочтительной группой соединений является такая, где:

R^1 представляет собой водород, алкил, $-C(O)NR^{12}R^{13}$, незамещенный циклоалкил, предпочтительно водород, 3,4-диметоксифениламинокарбонил, 4-метокси-3-хлорфениламинокарбонил, даже более предпочтительно водород или метил, наиболее предпочтительно водород; и

R^2 представляет собой водород, галогено, низший алкокси, предпочтительно R^2 представляет собой водород, хлоро, бром, фтор, метокси, этокси, фенил, диметиламиносульфонил, 3-хлорфениламиносульфонил, карбокси, метокси, более предпочтительно водород, фтор или бром. Наиболее предпочтительно R^2 представляет собой фтор и локализован в 5-положении индолинонового кольца.

В вышеуказанных предпочтительных, более предпочтительных и еще более предпочтительных соединениях стереохимия по атому углерода, несущему гидроксигруппу в цепи $-CONHCH(R^3)CR^4(OH)CR^5Z$ и обозначенному символом "*", представляет собой что-либо из RS, R или S, более предпочтительно S.

Полезность

РК, чья каталитическая активность модулируется соединениями по настоящему изобретению, включают протеинтирозинкиназы, которых существует два типа: рецепторные тирозинкиназы (RTK) и клеточные тирозинкиназы (CTK), а также серинтреонинкиназы (STK). RTK-опосредованная сигнальная трансдукция инициируется внеклеточным взаимодействием со специфичным фактором роста (лигандом), за чем следуют димеризация рецептора, временная стимуляция свойственной протеинтирозинкиназной активности и фосфорилирование. Сайты связывания, таким образом, создаются для молекул внутриклеточной сигнальной трансдукции и приводят к образованию комплексов с рядом цитоплазматических сигнальных молекул, которые облегчают соответствующий клеточный ответ (например, деление клетки, метаболические эффекты на внеклеточное микроокружение и т.д.). См. Schlessinger and Ullrich, 1992, Neuron 9: 303-391.

Было показано, что сайты фосфорилирования тирозина на рецепторах факторов роста функционируют как высокоаффинные сайты связывания для доменов SH2 (src гомология, src homology) сигнальных молекул. Fantl et al., 1992, Cell 69:413-423, Songyang et al., 1994, Mol. Cell. Biol. 14:2777-2785, Songyang et al., 1993, Cell 72:767-778, и Koch et al., 1991, Science 252:668-678. Несколько внутриклеточных субстратных белков, которые связываются с RTK, были идентифицированы. Они могут быть разделены на две основные группы: (1) субстраты, которые имеют каталитический домен, и (2) субстраты, у которых отсутствует такой домен, но которые служат в качестве адаптеров и связываются с каталитически активными молекулами. Songyang et al., 1993, Cell 72: 767-778. Специфичность взаимодействий между рецепторами и SH2-доменами их субстратов определяется аминокислотными остатками, непосредственно окружающими фосфорилированный тирозиновый остаток.

Различия в аффинностях связывания между SH2-доменами и аминокислотными последовательностями, окружающими фосфотирозиновые остатки на конкретных рецепторах, находятся в соответствии с наблюдаемыми различиями в профилях их субстратного фосфорилирования. Songyang et al., 1993, Cell 72: 767-778. Эти наблюдения предполагают, что функция каждой RTK определяется не только характе-

ром ее экспрессии и доступностью лигандов, но также рядом путей по ходу сигнальной трансдукции, которые активируются конкретным рецептором. Таким образом, фосфорилирование обеспечивает важную регуляторную стадию, которая определяет селективность сигнальных путей, задействованных рецепторами специфических факторов роста, а также рецепторами факторов дифференцировки.

STK, являясь преимущественно цитозольными, влияют на внутреннюю биохимию клетки, часто в виде ответа в сторону нижнего уровня на РТК-событие. STK вовлечены в сигнальный процесс, который инициирует синтез ДНК и последующий митоз, приводящий к клеточной пролиферации.

Таким образом, РК-сигнальная трансдукция приводит, среди других ответов, к клеточной пролиферации, дифференцировке, росту и метаболизму. Аномальная клеточная пролиферация может приводить к широкому спектру расстройств и заболеваний, включая развитие неоплазии, такой как карцинома, саркома, глиобластома и гемангиома, расстройств, таких как лейкемия, псориаз, артериосклероз, артрит и диабетическая ретинопатия, и других расстройств, связанных с неконтролируемым ангиогенезом и/или васкулогенезом.

Точное понимание механизма, по которому соединения по настоящему изобретению ингибируют РК, не требуется для того, чтобы применять настоящее изобретение на практике. Однако, не привязываясь к какому-либо конкретному механизму или теории, считается, что данные соединения взаимодействуют с аминокислотами в каталитической области РК. РК обычно обладают двудольной структурой, причем АТФ, по-видимому, связывается в щели между двумя долями в области, где аминокислоты консервативны среди РК. Полагается, что ингибиторы РК связываются с помощью нековалентных взаимодействий, таких как водородная связь, силы Ван дер Ваальса и ионные взаимодействия, в той же самой основной области, где вышеуказанная АТФ связывается с РК. Более конкретно, считают, что 2-индолиноновый компонент соединений по настоящему изобретению связывается в основном пространстве, обычно занятом адениновым кольцом АТФ. Специфичность конкретной молекулы в отношении конкретной РК может затем возрастать как результат дополнительных взаимодействий между различными заместителями на 2-индолиноновом ядре и аминокислотными доменами, специфичными для конкретных РК. Таким образом, различные индолиноновые заместители могут вносить вклад в преимущественное связывание с конкретными РК. Возможность отобрать соединения, активные в отношении различных сайтов связывания АТФ (или другого нуклеотида), делает соединения по настоящему изобретению полезными для нацеливания на любой белок с таким сайтом. Соединения, описанные здесь, таким образом, полезны в *in vitro* анализах для таких белков, а также проявляют *in vivo* терапевтические эффекты посредством взаимодействия с такими белками.

Дополнительно, соединения по настоящему изобретению обеспечивают терапевтический подход к лечению многих видов твердых опухолей, включая, но не ограничиваясь ими, карциномы, саркомы, включая саркому Калози, эритробластому, глиобластому, менингиому, астроцитому, меланому и миобластому. Лечение или предупреждение рака не в виде твердых опухолей, такого как лейкемия, также предполагается настоящим изобретением. Показания могут включать в себя, но не ограничены ими, рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак ободочной кишки, рак крови, рак легкого и рак кости.

Дополнительные примеры, без ограничения, типов расстройств, связанных с несоответствующей активностью РК, в предупреждении, лечении и изучении которых могут быть полезны соединения, описанные здесь, представляют собой клеточные пролиферативные расстройства, фиброзные расстройства и расстройства обмена веществ.

Клеточные пролиферативные расстройства, которые можно предупреждать, лечить или дополнительно изучать с помощью настоящего изобретения, включают в себя рак, пролиферативные расстройства кровеносных сосудов и пролиферативные расстройства мезангиальных клеток.

Пролиферативные расстройства кровеносных сосудов относятся к расстройствам, связанным с аномальным васкулогенезом (образование кровеносных сосудов) и ангиогенезом (распространение кровеносных сосудов). Хотя васкулогенез и ангиогенез играют важную роль в разнообразных нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, образование желтого тела, заживление ран и регенерация органов, они также играют кардинальную роль в развитии рака, где они приводят к образованию новых капилляров, необходимых для поддержания опухоли живой. Другие примеры пролиферативных расстройств кровеносных сосудов включают в себя артрит, где новые капиллярные кровеносные сосуды проникают в сустав и разрушают хрящ, и глазные болезни, подобные диабетической ретинопатии, где новые капилляры в сетчатке проникают в стекловидное тело, кровоточат и вызывают слепоту.

Были идентифицированы две структурно родственные РТК, которые связывают VEGF с высокой афинностью: fms-подобный тирозиновый рецептор 1 (flt-1) (Shibuya et al., 1990, *Oncogene*, 5:519-524; De Vries et al., 1992, *Science*, 255:989-991) и KDR/FLK-1 рецептор, также известный как VEGF-R2. Сообщалось, что сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) представляет собой специфический митоген эндотелиальных клеток с *in vitro* активностью, стимулирующей рост эндотелиальных клеток. Ferrara & Henzel, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161:851-858; Vaisman et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:19461-19566. Информация, приведенная в заявках на патент США №№ 08/193829, 08/038596 и 07/975750, прочно позволяет считать, что VEGF не только ответственен за пролиферацию эндотелиальных клеток,

но также является первичным регулятором нормального и патологического ангиогенеза. См., в общем, Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3 (10) 699-702; Houck, et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:26031-26037.

Нормальный васкулогенез и ангиогенез играют важные роли в разнообразных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, заживление ран, регенерация органов и женские репродуктивные процессы, такие как развитие фолликула в желтом теле во время овуляции и плацентарный рост после беременности. Folkman & Shing, 1992, *J. Biological Chem.*, 267 (16): 10931-34. Неконтролируемый васкулогенез и/или ангиогенез связан с заболеваниями, такими как диабет, а также со злокачественными твердыми опухолями, которым для роста нужна васкуляризация. Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3 (10): 699-702; Folkman, 1991, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 4-6; Weidner, et al., 1991, *New Engl. J. Med.*, 324: 1-5.

Предполагаемая роль VEGF в пролиферации и миграции эндотелиальных клеток во время ангиогенеза и васкулогенеза указывает на важную роль KDR/FLK-1-рецептора в этих процессах. Заболевания, такие как сахарный диабет (Folkman, 198, в XIth Congress of Thrombosis and Haemostasis (Verstraeta, et al., eds.), pp. 583-596, Leuven University Press, Leuven) и артрит, а также злокачественный рост опухоли, могут являться результатом неконтролируемого ангиогенеза. Смотри, например, Folkman, 1971, *N. Engl. J. Med.*, 285: 1182-1186. Рецепторы, с которыми VEGF специфически связывается, представляют собой важную и мощную терапевтическую мишень для регуляции и модуляции васкулогенеза и/или ангиогенеза также разнообразных тяжелых заболеваний, в которые вовлечен аномальный клеточный рост, вызванный такими процессами. Plowman, et al., 1994, *DN&P*, 7(6): 334-339. Более конкретно, высокоспецифичная роль KDR/FLK-1 рецептора в неоваскуляризации делает его мишенью выбора для терапевтических подходов к лечению рака и других заболеваний, в которые вовлечено неконтролируемое образование кровеносных сосудов.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены соединения, способные к регуляции и/или модуляции тирозинкиназной сигнальной трансдукции, включая KDR/FLK-1-рецепторную сигнальную трансдукцию, для ингибирования или стимуляции ангиогенеза и/или васкулогенеза, т.е. соединения, которые ингибируют, предупреждают или оказывают влияние на сигнал, передаваемый KDR/FLK-1 при активации лигандами, такими как VEGF. Хотя считается, что соединения по настоящему изобретению действуют на рецептор или другой компонент в пути тирозинкиназной сигнальной трансдукции, они могут также действовать непосредственно на опухолевые клетки, которые являются результатом неконтролируемого ангиогенеза.

Хотя номенклатура человеческого и мышинного эквивалентов рецептора "flk-1" отличается, они являются во многих отношениях взаимозаменяемыми. Мышинный рецептор, Flk-1, и его человеческий эквивалент, KDR, имеют гомологию последовательности на 93,4% в пределах внутриклеточного домена. Подобным образом, мышинный FLK-1 связывает человеческий VEGF с такой же афинностью, что и мышинный VEGF, и, соответственно, активируется лигандом, полученным от любого из этих видов. Millauer et al., 1993, *Cell*, 72: 835-846; Quinn et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7533-7537. FLK-1 также связывается с субстратами человеческой RTK (например, PLC-γ или p85) и затем фосфорилирует их по тирозину при совместной экспрессии в 293 клетках (фибробласты почек человеческого эмбриона).

Модели, которые опираются на FLK-1 рецептор, следовательно, прямо применимы для понимания KDR рецептора. Например, использование мышинного FLK-1 рецептора в способах, которыми идентифицируют соединения, регулирующие путь сигнальной трансдукции у мышей, прямо применимо к идентификации соединений, которые могут быть использованы для регуляции пути сигнальной трансдукции у человека, т.е. которые регулируют активность, связанную с KDR рецептором. Таким образом, химические соединения, идентифицированные в качестве ингибиторов KDR/FLK-1 *in vitro*, могут быть подтверждены в подходящих *in vivo* моделях. Было продемонстрировано, что обе *in vivo*, мышинная и крысиная, животные модели обладают исключительной ценностью для оценки клинического потенциала агентов, действующих на индуцируемый KDR/FLK-1 путь сигнальной трансдукции.

Таким образом, в настоящем изобретении предложены соединения, которые регулируют, модулируют и/или ингибируют васкулогенез и/или ангиогенез, воздействуя на ферментативную активность рецептора KDR/FLK-1 и оказывая влияние на сигнал, передаваемый KDR/FLK-1. Таким образом, в настоящем изобретении предложен терапевтический подход к лечению многих видов твердых опухолей, включая, но не ограничиваясь ими, глиобластоме, меланоме и саркоме Калози, а также карциноме яичника, легкого, молочной железы, простаты, поджелудочной железы, ободочной кишки и эпидермиса. Кроме того, данные предполагают, что введение соединений, которые ингибируют KDR/FLK-1-опосредованный путь сигнальной трансдукции, может также быть использовано при лечении гемангиомы, ретиноза и диабетической ретинопатии.

Более того, данное изобретение относится к ингибированию васкулогенеза и ангиогенеза через другие рецептор-опосредованные пути, включая путь, в который вовлечен flt-1 рецептор.

Сигнальная трансдукция, опосредованная рецепторной тирозинкиназой, инициируется внеклеточным взаимодействием со специфичным фактором роста (лигандом), за чем следует димеризация рецептора, временная стимуляция собственной протеинтирозинкиназной активности и аутофосфорилирование. Создаются, таким образом, сайты связывания для молекул внутриклеточной сигнальной трансдукции, что приводит к образованию комплексов с рядом цитоплазматических сигнальных молекул, кото-

рые способствуют соответствующему клеточному ответу, например клеточному делению и метаболическим эффектам на внеклеточное микроокружение. Смотри Schlessinger and Ullrich, 1992, *Neuron* 9: 1-20.

Близкая гомология внутриклеточных областей KDR/FLK-1 с таковыми у рецептора PDGF- β (50,3% гомологии) и/или родственного flt-1 рецептора указывает на индукцию перекрытия путей сигнальной трансдукции. Например, для рецептора PDGF- β было показано, что члены src-семейства (Twamley et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7696-7700), фосфатидилинозитол-3'-киназа (Hu et al., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12:981-990), фосфолипаза γ (Kashishian & Cooper, 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 4:49-51), gas-GTPаза-активирующий белок (Kashishian et al., 1992, *EMBO J.*, 11: 1373-1382), PTP-ID/syp (Kazlauskas et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10 90:6939-6943), Grb2 (Arvidsson et al., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:6715-6726) и адаптерные молекулы Shc и Nck (Nishimura et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13:6889-6896) связываются с областями, включающими в себя различные сайты аутофосфорилирования. Смотри, в общем, Claesson-Welsh, 1994, *Prog. Growth Factor Res.*, 5: 37-54. Таким образом, вероятно, что пути сигнальной трансдукции, активируемые KDR/FLK-1, включают в себя gas-путь (Rozakis et al., 1992, *Nature*, 360: 689-692), PI-3'-киназный, src-опосредованный и plc-опосредованный пути. Каждый из этих путей может играть критическую роль в ангиогенном и/или васкулогенном эффекте KDR/FLK-1 в эндотелиальных клетках. Следовательно, еще один аспект настоящего изобретения относится к применению органических соединений, описанных здесь, для модуляции ангиогенеза и васкулогенеза, поскольку эти процессы контролируются указанными путями.

Напротив, расстройства, связанные со сжатием, сокращением или закрытием кровеносных сосудов, такие как рестеноз, также подразумеваются, и их можно лечить или предупреждать с помощью способов по настоящему изобретению.

Фиброзные расстройства относятся к аномальному формированию внеклеточного матрикса. Примеры фиброзных расстройств включают цирроз печени и пролиферативные расстройства мезангиальных клеток. Цирроз печени характеризуется увеличением составляющих внеклеточного матрикса, приводя к образованию печеночных рубцов. Увеличенный внеклеточный матрикс, приводящий к печеночным рубцам, также может быть вызван вирусной инфекцией, такой как гепатит. Липоциты, по-видимому, играют главную роль в циррозе печени. Другие подразумеваемые фиброзные расстройства включают атеросклероз.

Пролиферативные расстройства мезангиальных клеток относятся к расстройствам, вызываемым аномальной пролиферацией мезангиальных клеток. Мезангиальные пролиферативные расстройства включают различные человеческие болезни почек, такие как гломерулонефрит, диабетическая нефропатия и злокачественный нефросклероз, а также такие расстройства, как синдромы тромботической микроангиопатии, отторжение трансплантата и гломерулопатии. RTK PDGFR вовлечена в поддержание пролиферации мезангиальных клеток. Floege et al., 1993, *Kidney International* 43: 47S-54S.

Многие виды рака представляют собой клеточные пролиферативные расстройства и, как отмечалось выше, РК связаны с клеточными пролиферативными расстройствами. Таким образом, не удивительно, что РК, такие как, например, члены семейства RTK, связаны с развитием рака. Некоторые из этих рецепторов, подобно EGFR (Tuzi et al., 1991, *Br. J. Cancer* 63:227-233, Torp et al., 1992, *APMIS* 100: 713-719), HER2/neu (Slamon et al., 1989, *Science* 244: 707-712) и PDGF-R (Kumabe et al., 1992, *Oncogene*, 7:627-633), сверхэкспрессируются во многих опухолях и/или постоянно активируются аутокринными петлями. Действительно, при большинстве наиболее распространенных и тяжелых видах рака были продемонстрированы сверхэкспрессия этих рецепторов (Akbasak and Suner-Akbasak et al., 1992, *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133, Dickson et al., 1992, *Cancel-Treatment Res.* 61:249-273, Korc et al., 1992, *J. Clin. Invest.*, 90:1352-1360) и аутокринные петли (Lee and Donoghue, 1992, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070, Korc et al., *supra*, Akbasak and Suner-Akbasak et al., *supra*). Например, EGFR связан с плоскоклеточной карциномой, астроцитомой, глиобластомой, раком головы и шеи, раком легкого и раком мочевого пузыря. HER2 связан с раком молочной железы, яичника, желудка, легкого, поджелудочной железы и мочевого пузыря. PDGFR связан с глиобластомой и меланомой, а также с раком легкого, яичника и простаты. RTK c-met также связана с образованием злокачественной опухоли. Например, c-met также связан, среди других видов рака, с карциномами ободочной и прямой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, желудка и гепатоцеллюлярной карциномой и лимфомами. Дополнительно, c-met связан с лейкемией. Сверхэкспрессия гена c-met также была обнаружена у пациентов с болезнью Ходжкина и болезнью Беркитта.

IGF-IR помимо того, что он вовлечен в парентеральное питание и в диабет типа II, также связан с несколькими типами рака. Например, IGF-I вовлечен в качестве аутокринного стимулятора роста для нескольких типов опухолей, например клетки карциномы рака молочной железы человека (Arteaga et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84: 1418-1423) и клетки мелкоклеточной опухоли легкого (Macauley et al., 1990, *Cancer Res.*, 50: 2511-2517). В дополнение, IGF-I, хотя и неотъемлемо вовлечен в нормальный рост и дифференцировку нервной системы, также, по-видимому, является аутокринным стимулятором человеческих глиом. Sandberg-Nordqvist et al., 1993, *Cancer Res.* 53: 2475-2478. Важность IGF-IR и его лигандов в клеточной пролиферации дополнительно поддерживается тем фактом, что многие типы клеток в культуре (фибробласты, эпителиальные клетки, гладкомышечные клетки, Т-лимфоциты, миелоидные клетки, хондроциты и остеобласты (стволовые клетки костного мозга)) стимулируются к росту с помощью IGF-I.

Goldring and Goldring, 1991, *Eukaryotic Gene Expression*, 1: 301-326. Baserga и Coppola предполагают, что IGF-IR играет центральную роль в механизме трансформации и как таковой может быть предпочтительной мишенью для терапевтических вмешательств для широкого спектра человеческих злокачественных опухолей. Baserga, 1995, *Cancer Res.*, 55: 249-252, Baserga, 1994, *Cell* 79: 927-930, Coppola et al., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14: 4588-4595.

STK вовлечены во многие типы рака, включая, в значительной степени, рак молочной железы (Cance, et al., *Int. J. Cancer*, 54: 571-77 (1993)).

Связь между аномальной активностью РК и заболеванием не ограничивается раком. Например, RTK связаны с такими заболеваниями, как псориаз, сахарный диабет, эндометриоз, ангиогенез, развитие атеросклеротических бляшек, болезнь Альцгеймера, рестеноз, болезнь Гиппеля-Линдау, эпидермальная гиперпролиферация, нейродегенеративные заболевания, старческая дегенерация желтого пятна и гемангиомы. Например, EGFR показан при заживлении ран роговицы и кожи. Дефекты инсулин-R и IGF-IR показаны при сахарном диабете типа II. Более полная корреляция между конкретными RTK и их терапевтическими показаниями приведена в Plowman et al., 1994, *DN&P* 7: 334-339.

Как отмечалось ранее, не только RTK, но и CTK, включая, но не ограничиваясь ими, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr и yrk (обзор в Bolen et al., 1992, *FASEB J.*, 6: 3403-3409), вовлечены в пролиферативные и метаболические пути сигнальной трансдукции, и, таким образом, можно ожидать, и это было показано, что они вовлечены во многие РТК-опосредованные расстройства, на которые направлено настоящее изобретение. Например, было показано, что мутантная src (v-src) представляет собой онкобелок (pp60^{v-src}) у куриц. Более того, ее клеточный гомолог, протоонкоген pp60^{c-src}, передает онкогенные сигналы многих рецепторов. Сверхэкспрессия EGFR или HER2/neu в опухолях приводит к конститутивной активации pp60^{c-src}, которая присуща злокачественным клеткам, но отсутствует в нормальных клетках. С другой стороны, мыши, дефицитные по экспрессии c-src, проявляют остеопетрозный фенотип, указывая на ключевое участие c-src в функции остеобластов и возможную вовлеченность в родственные расстройства.

Подобным образом, Zap70 вовлечен в Т-клеточную передачу сигнала, которая может быть связана с аутоиммунными расстройствами.

STK связаны с воспалением, аутоиммунным заболеванием, иммунологическими ответами и гиперпролиферативными расстройствами, такими как рестеноз, фиброз, псориаз, остеоартрит и ревматоидный артрит.

РК также вовлечены в имплантацию эмбриона. Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут обеспечить эффективный способ предупреждения такой имплантации эмбриона и, таким образом, могут быть полезны в качестве агентов контроля рождаемости. Дополнительные расстройства, которые можно лечить или предупреждать с использованием соединений по настоящему изобретению, представляют собой иммунологические расстройства, такие как аутоиммунное заболевание, СПИД, и сердечно-сосудистые расстройства, такие как атеросклероз.

Наконец, в настоящее время предполагается, что как RTK, так и STK вовлечены в гипериммунные расстройства.

Представленные соединения и данные не следует интерпретировать как каким-либо образом ограничивающие объем данного изобретения.

Введение и фармацевтическая композиция

Соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить пациенту-человеку как таковые либо их можно вводить в фармацевтических композициях, в которых вышеупомянутые материалы смешаны с подходящими носителями или эксципиентом(ами). Методики для приготовления и введения лекарств могут быть найдены в "Remington's Pharmacological Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA., последнее издание.

Как используется здесь, "вводить" или "введение" относится к доставке соединения формулы (I), или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы или его фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению, организму с целью предупреждения или лечения расстройства, связанного с РК.

Подходящие пути введения могут включать в себя, без ограничения, пероральное, ректальное введение, введение через слизистую или интерстициальное введение либо внутримышечную, подкожную, интрамедуллярную, интратекальную, прямую внутрижелудочковую, внутривенную, интравитреальную, интраперитонеальную, интраназальную или внутриглазную инъекции. Предпочтительными путями введения являются пероральный и парентеральный.

Альтернативно, можно вводить соединение местным, а не системным способом, например путем инъекции соединения прямо в твердую опухоль, часто в депо-препарате или в препарате с замедленным высвобождением.

Более того, можно вводить лекарство в системе направленной доставки лекарства, например в липосоме, покрытой опухольспецифичным антителом. Липосомы будут мишенью и будут селективно захватываться ей.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть произведены с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например общепринятыми способами смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, захватывания или лиофилизации.

Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть приготовлены в виде препаратов традиционным способом, с использованием одного или более чем одного физиологически приемлемого носителя, включая эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают процесс включения активных соединений в препараты, которые могут быть использованы фармацевтически. Подходящий препарат зависит от выбранного пути введения.

Для инъекции соединения по изобретению могут быть приготовлены в виде препаратов в форме водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенка, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Для введения через слизистую в препарате используют смачивающие реагенты, подходящие для проникновения через нужный барьер. Такие смачивающие реагенты обычно известны в данной области техники.

Для перорального введения соединения могут быть включены в препарат путем объединения активных соединений с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители позволяют готовить препараты соединений по изобретению в виде таблеток, пилюлей, лепешек, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и т.п. для перорального проглатывания пациентом. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть приготовлены с использованием твердого эксципиента, возможно с измельчением полученной смеси и обработкой смеси гранул после добавления других подходящих вспомогательных веществ, если желательно, с получением ядер таблеток или драже. Полезными эксципиентами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит, препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал, и другие материалы, как, например, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (ПВП). При желании могут быть добавлены разрыхляющие агенты, такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгинатная кислота. Может быть также использована соль, такая как альгинат натрия.

Ядра драже обеспечивают подходящим покрытием. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахаров, которые могут, возможно, содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, гель на основе карбопола, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, растворы лака и подходящие органические растворители или смеси растворителей. Красители или пигменты могут быть добавлены в покрытия таблеток или драже для идентификации или характеристики различных комбинаций доз активного соединения.

Фармацевтические композиции, которые могут применяться перорально, включают в себя капсулы с крышечками, сделанные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Капсулы с крышечками могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующим веществом, таким как крахмал, и/или смазывающим веществом, таким как тальк или стеарат магния, и, возможно, со стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин либо жидкие полиэтиленгликоли. Стабилизаторы также могут быть добавлены в эти препараты.

Фармацевтические композиции, которые также могут быть использованы, включают в себя твердые желатиновые капсулы. Как неограничивающий пример: готовый пероральный лекарственный продукт активного соединения, представляющий собой капсулу, может иметь дозы 50 и 200 мг. Эти две дозы получают из тех же самых гранул путем заполнения ими твердых желатиновых капсул разного размера: размера 3 для капсулы на 50 мг и размера 0 для капсулы на 200 мг. Состав препарата может быть, например, таким, как указано в табл. 2.

Таблица 2

Ингредиент наименование/ сорт	Концентрация при грануляции (% масс./масс.)	Количество в капсуле на 50 мг (мг)	Количество в капсуле на 200 мг (мг)
Активное соединение NF	65,0	50,0	200,0
Маннит NF	23,5	18,1	72,4
Кроскармеллоза натрия NF	6,0	4,6	18,4
Повидон К 30 NF	5,0	3,8	15,2
Стеарат магния NF	0,5	0,38	1,52
Капсула, шведская желтая NF		Размер 3	Размер 0

Капсулы могут быть упакованы в склянки из коричневого стекла или пластиковые бутылочки для защиты активного соединения от света. Контейнеры, содержащие препарат активного соединения в форме капсул, должны храниться при регулируемой комнатной температуре (15-30°C).

Для введения путем ингаляции соединения для применения по настоящему изобретению удобно доставлять в форме распыляемого аэрозоля, с использованием контейнера под давлением или распылителя и подходящего пропеллента, например, без ограничения, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана или диоксида углерода. В случае аэрозоля под давлением единицу дозировки можно регулировать путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи для использования в ингаляторе или инсуффляторе, изготовленные, например, из желатина, могут быть приготовлены как препарат, содержащий порошкообразную смесь соединения и подходящую порошкообразную основу, такую как лактоза или крахмал.

Соединения могут также быть включены в состав препаратов для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Препараты для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавленным консервантом. Композиции могут находиться в таких формах, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать такие материалы, используемые в технологии приготовления лекарственных средств, как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы водорастворимой формы активного соединения, такой как, без ограничения, соль. Дополнительно, суспензии активных соединений могут быть приготовлены в липофильном растворителе. Подходящие липофильные растворители включают в себя жирные масла, такие как масло кунжута, синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, и триглицериды, или материалы, такие как липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Возможно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы и/или агенты, которые увеличивают растворимость соединений, позволяя получать высококонцентрированные растворы.

Альтернативно, активный ингредиент может быть в порошкообразной форме для разведения подходящим растворителем, например стерильной апиrogenной водой, перед применением.

Соединения по изобретению могут быть включены в препараты в виде ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, традиционных основ для суппозиториев, таких как масло-какао или другие глицериды.

В дополнение к препаратам, описанным ранее, соединения могут быть включены в депо-препараты. Такие препараты длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Соединение по настоящему изобретению для этого пути введения может быть включено в препарат с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в эмульсии с фармакологически приемлемым маслом), с ионообменными смолами либо в виде слаборастворимого производного, такого как, без ограничения, слаборастворимая соль.

Неограничивающим примером фармацевтического носителя для гидрофобных соединений по настоящему изобретению является система соразтворителей, содержащая бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество (ПАВ), смешивающийся с водой органический полимер и водную фазу, как, например, система соразтворителей VPD. VPD представляет собой раствор 3% мас./об. бензинового спирта, 8% мас./об. неполярного поверхностно-активного вещества полисорбата 80 и 65% мас./об. полиэтиленгликоля 300, доведенный до объема абсолютным этанолом. Система соразтворителей VPD (VPD:D5W) состоит из VPD, разбавленного 1:1 5% декстрозой в водном растворе. Эта система соразтворителей хорошо растворяет гидрофобные соединения и сама по себе дает низкую токсичность при системном введении. Естественно, соотношения в такой системе соразтворителей могут значительно варьировать без нарушения характеристик ее растворимости и токсичности. Более того, идентичность компонентов-соразтворителей может варьировать: например, вместо полисорбата 80 могут быть использованы другие низкотоксичные неполярные поверхностно-активные вещества, размер фракции полиэтиленгликоля может варьировать, другие биосовместимые полимеры могут заменить полиэтиленгликоль, например поливинилпирролидон, а другие сахара или полисахариды могут заменить декстрозу.

Альтернативно, могут быть использованы другие системы доставки для гидрофобных фармацевтических соединений. Липосомы и эмульсии представляют собой хорошо известные примеры средств доставки или носителей для гидрофобных лекарств. В дополнение, некоторые органические растворители, такие как диметилсульфоксид, также могут быть использованы, хотя часто ценой большей токсичности.

Дополнительно, соединения могут быть доставлены с использованием системы пролонгированного высвобождения, такой как полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие терапевтический агент. Изучены различные материалы пролонгированного высвобождения, и они хорошо известны специалистам в данной области. Капсулы пролонгированного высвобождения могут, в зависимости от их химической природы, высвобождать соединения в течение нескольких недель, вплоть

до периода более 100 дней. В зависимости от химической природы и биологической стабильности терапевтического реагента, могут быть использованы дополнительные стратегии для стабилизации белка.

Фармацевтические композиции здесь также могут содержать подходящие носители или эксципиенты в твердой фазе или в фазе геля. Примеры таких носителей или эксципиентов включают в себя, но не ограничены ими, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли.

Многие из модулирующих РК соединений по изобретению могут быть предложены в виде физиологически приемлемых солей, причем заявленное соединение может образовывать отрицательно или положительно заряженные структуры. Примеры солей, когда соединение образует положительно заряженную группировку, включают в себя, без ограничения, соли четвертичного аммония (определенные в другом месте здесь), такие как гидрохлорид, сульфат, карбонат, лактат, тартрат, малат, малеат, сукцинат, где атом азота четвертичной аммониевой группы представляет собой азот выбранного соединения по изобретению, который провзаимодействовал с подходящей кислотой. Соли, в которых соединение по настоящему изобретению образует отрицательно заряженные структуры, включают в себя, без ограничения, соли натрия, калия, кальция и магния, образованные путем взаимодействия карбоксильной группы в соединении с подходящим основанием (например, гидроксидом натрия (NaOH), гидроксидом калия (KOH), гидроксидом кальция (Ca(OH)₂) и т.д.).

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают композиции, где активные ингредиенты содержатся в количестве, достаточном для достижения заданной цели, например модуляции активности РК или лечения либо предупреждения расстройства, связанного с РК.

Более конкретно, терапевтически эффективное количество означает количество соединения, эффективное для предупреждения, облегчения или уменьшения интенсивности симптомов заболевания или продления жизни субъекта, которого лечат.

Определение терапевтически эффективного количества также находится в пределах знаний специалистов в данной области, особенно в свете подробного описания, предложенного здесь.

Для любого соединения, используемого в способах по изобретению, терапевтически эффективное количество или доза могут оцениваться на ранней стадии с помощью анализов в клеточных культурах. Затем, может быть отработана дозировка для применения в животных моделях, такая, чтобы достичь диапазона концентрации в системе кровообращения, включающего ИК₅₀, которая определена в клеточной культуре (то есть концентрацию тестируемого соединения, которая дает половинное от максимального ингибирования активности РК). Такая информация затем может быть использована для более точного определения доз, используемых у людей.

Токсичность и терапевтическую эффективность соединений, описанных здесь, можно определить с помощью стандартных фармацевтических методик на клеточных культурах или экспериментальных животных, например путем определения ИК₅₀ и ЛД₅₀ (обе из которых обсуждаются здесь в другом месте) для рассматриваемого соединения. Данные, полученные в этих анализах клеточных культур и исследованиях на животных, могут быть использованы при разработке диапазона дозировок для применения у людей. Дозировка может варьировать в зависимости от используемой лекарственной формы и применяемого пути введения. Конкретный препарат, путь введения и дозировка могут быть выбраны конкретным лечащим врачом с учетом состояния пациента (см., например, Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

Количество доз и интервал между ними могут быть отрегулированы индивидуально так, чтобы обеспечить уровни в плазме активных молекул, достаточные для поддержания эффектов модулирования киназ. Эти уровни в плазме называют минимальными эффективными концентрациями (MEC). MEC будет варьировать для каждого соединения, но может быть оценена по *in vitro* данным, например концентрация, необходимая для достижения 50-90% ингибирования киназы, может быть установлена с использованием анализов, описанных здесь. Дозировки, необходимые для достижения MEC, будут зависеть от конкретных характеристик и пути введения. Анализы с помощью ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) или биоанализы могут быть использованы для определения концентраций в плазме.

Интервалы дозировок также могут быть определены с использованием величины MEC. Соединения следует вводить, используя режим, который поддерживает уровни в плазме, превышающие MEC, в течение 10-90% времени, предпочтительно 30-90% и наиболее предпочтительно 50-90%.

В настоящее время терапевтически эффективные количества соединений формул I, Ia или II могут варьировать от приблизительно 25 до 1500 мг/м² в сутки; предпочтительно примерно 3 мг/м²/сутки. Даже более предпочтительно - от 50 мг/каждое утро каждый день до 400 мг/каждый день.

В случаях местного введения или селективного захвата, эффективная местная концентрация лекарства может не быть связана с концентрацией в плазме, а могут быть использованы другие методики, известные в данной области, для определения правильного количества дозировки и интервала.

Количество вводимой композиции, конечно, будет зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести болезни, способа введения, заключения лечащего врача и т.д.

Композиции, при желании, могут быть представлены в упаковке или дозирующем устройстве, таком как набор, одобренный Управлением по контролю за качеством продуктов и лекарств США (FDA),

который может содержать одну или более чем одну стандартную лекарственную форму, содержащую активный ингредиент. Упаковка может, например, представлять собой металлическую или пластиковую фольгу, как, например, блистерная упаковка. Упаковка или дозирующее устройство могут сопровождаться инструкциями по введению. Упаковка или дозирующее устройство могут также сопровождаться уведомлением при контейнере в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств, которое отражает одобрение этим органом такой формы композиций либо введения людям или животным. Такое уведомление может быть, например, ярлыком, одобренным FDA US для лекарств, отпускаемых по рецептам, либо одобренным вкладышем на продукт. Композиции, содержащие соединение по изобретению, включенное в препарат в совместимом фармацевтическом носителе, также могут быть приготовлены, помещены в соответствующий контейнер и снабжены ярлыком, относящимся к лечению указанного состояния. Подходящие состояния, указанные на ярлыке, могут включать в себя лечение опухоли, ингибирование ангиогенеза, лечение фиброза, диабета и т.п.

Настоящее изобретение можно вводить с помощью суспензионного носителя на основе карбоксиметилцеллюлоз (СМС). Примерная СМС-суспензия представлена ниже в табл. 3.

Таблица 3

Компонент	Концентрация, % (мас./об.)
API	*
Натрийкарбоксиметилцеллюлоза, Фармакопея США (USP) (среднее качество)	0,5
Хлорид натрия, USP/NF	0,9
Полисорбат-80, NF	0,4
Бензиловый спирт, NF	0,9
Вода, деионизированная	Достаточное количество ("qs") до 100 мл

* зависит от требуемой концентрации (времени)

Протокол для 1,0 л суспензионного СМС-носителя является следующим. Вычисляют подходящее количество эксципиентов, необходимых для приготовления препарата носителя, с использованием таблицы, показывающей состав препарата носителя и размер партии. Взвешивают подходящий пустой контейнер, такой как чистая широкогорлая стеклянная бутылка или полиэтиленовая бутылка. В контейнер добавляют примерно 600 мл воды. Взвешивают натрийкарбоксиметилцеллюлозу (5 г) и переносят в контейнер. Перемешивают, используя магнитный стержень-мешалку или лабораторную пропеллерную мешалку до гомогенности (примерно 2-3 ч). Взвешивают NaCl и добавляют в контейнер. Продолжают перемешивание до растворения (примерно 10 мин). Добавляют полисорбат-80. Перемешивают до тех пор, пока раствор не станет гомогенным (примерно 20 мин). Добавляют бензиловый спирт. Перемешивают до тех пор, пока раствор не станет гомогенным (примерно 10 мин). Добавляют оставшуюся воду, чтобы довести массу раствора до требуемого размера партии, либо по массе, либо по объему (1010 г или 1000 мл, плотность при 22°C равна 1,01). Хранят при 2-8°C (в холодильнике).

Препарат-суспензию можно производить следующим образом. Растирают API, используя ступку и пестик для получения порошка гомогенного вида с маленьким размером частиц (никаких больших кусков или больших частиц - в идеале должны проходить через стандартное сито по US >80, то есть размер <180 мкм). Отвешивают рассчитанное количество API в контейнер. Добавляют примерно 90% общего требуемого количества (суспензионного СМС-носителя) в контейнер. Суспендируют соединения в носителе, используя лабораторную пропеллерную мешалку или ее эквивалент. Диаметр лопастей пропеллера должен соответствовать диаметру дна контейнера, чтобы обеспечить достаточное перемешивание. Перемешивают при 50 об./мин в течение 30 мин либо до тех пор, пока лекарство не будет хорошо суспендированным. Добавляют препарат носителя до "qs" (достаточное количество) (доводят водой) до подходящей массы, соответствующей размеру партии. Перемешивают при 50 об./мин в течение дополнительных 30 мин. Аликвоты суспензии немедленно помещают в контейнеры из янтарного стекла или полипропиленовые контейнеры. Контейнеры должны быть защищены от света. Перемешивают при 2-8°C (в холодильнике, не замораживая).

Также аспектом настоящего изобретения является то, что соединение, описанное здесь, или его соль, или пролекарство может быть объединено с другими химиотерапевтическими агентами для лечения заболеваний или расстройств, обсуждавшихся выше. Например, соединение, соль или пролекарство по настоящему изобретению может быть объединено с алкилирующими агентами, такими как фторурацил (5-FU) сам по себе или в дополнительной комбинации с лейковорином; или с другими алкилирующими агентами, такими как, без ограничения, другие пиримидиновые аналоги, такие как UFT, капецитабин, гемцитабин и цитарабин, алкилсульфонаты, например бусульфан (используемый при лечении хронической гранулоцитарной лейкемии), импросульфан и пипосульфан; азиридины, например бензодепа, карбохон (carboquone), метуредеп и уредеп; этиленимины и метилмеламины, например алтреамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; и азоти-

стые аналоги иприта (nitrogen mustard), например хлорамбуцил (используемый при лечении хронического лимфолейкоза, первичной макроглобулинемии и неходжкинской лимфомы), циклофосфамид (используемый при лечении болезни Ходжкина, множественной миеломы, нейробластомы, рака молочной железы, рака яичников, рака легкого, опухоли Вильмса и рабдомиосаркомы), эстрамустин, ифосфамид, новембрихин, преднемустин и урациловый аналог иприта (uracil mustard) (используемый при лечении первичного тромбоцитоза, неходжкинской лимфомы, болезни коджкина и рака яичников); и триазины, например дакарбазин (используемый при лечении саркомы мягких тканей).

Соединение, соль или пролекарство по настоящему изобретению также может быть использовано в комбинации с другими антиметаболическими химиотерапевтическими агентами, такими как, без ограничения, аналоги фолиевой кислоты, например метотрексат (используемый при лечении острого лимфолейкоза, хориокарциномы, грибкового микоза, рака молочной железы, рака головы и шеи и остеогенной саркомы) и птероптерин; и пуриновые аналоги, такие как меркаптопурин и тиогуанин, которые находят применение при лечении острой гранулоцитарной лейкемии, острого лимфолейкоза и хронической гранулоцитарной лейкемии.

Предусматривается, что соединение, соль или пролекарство по настоящему изобретению может также быть использовано в комбинации с химиотерапевтическими агентами на основе природных продуктов, такими как, без ограничения, алкалоиды барвинка, например винбластин (используемый при лечении рака молочной железы и рака яичек), винкристин и виндезин; эпиподофилотоксины, например этопозид и тенипозид, оба из которых полезны при лечении рака яичек и саркомы Капоши; антибиотические химиотерапевтические агенты, например даунорубин, доксорубин, эпирубин, митомицин (используемый при лечении рака желудка, шейки матки, ободочной кишки, молочной железы, мочевого пузыря и поджелудочной железы), дактиномицин, темозоломид, пликамицин, блеомицин (используемый при лечении рака кожи, пищевода и мочеполовых путей); и химиотерапевтические агенты-ферменты, такие как L-аспарагиназа.

В дополнение к вышесказанному, соединение, соль или пролекарство по настоящему изобретению также может быть использовано в комбинации с координационными комплексами платины (цисплатин и т.д.); замещенными мочевидами, такими как гидроксимочевина; производными метилгидразина, например прокарбазином; адренкортикальными супрессантами, например митотаном, аминоглутетимидом; и гормоном и антагонистами гормона, такими как адренкортикостероиды (например, преднизон), прогестины (например, гидроксипрогестерона капроат), эстрогены (например, диэтилстилбестерол), антиэстрогены, такие как тамоксифен, андрогены, например пропионат тестостерона; и ингибиторами ароматазы, такими как анастрозол.

Наконец, также предполагается, что комбинация соединения по настоящему изобретению будет эффективна в комбинации с митоксантроном, паклитакселом, ингибиторами циклооксигеназы-2, известными в данной области, в частности с Celebrex[®], Paracoxib[®], Vioxx[®], Abbott's Cox-189, описанным в публикации РСТ № WO 99/11605, ингибиторами топоизомеразы, такими как Camptosar[®], антагонистами рецептора Her-2, такими как Herceptin[®], эндостатин, Gleevac[®], антагонистом рецептора ImClone VEGF IMC C225[®] для лечения твердых опухолевых раков или лейкозиев, таких как, без ограничения, острая миелогенная (нелимфоцитарная) лейкемия.

Общая методика синтеза

Следующая общая методика может быть использована для получения соединений по настоящему изобретению.

Подходящим образом замещенный 2-оксиндол (1 экв.), подходящим образом замещенный 3-карбок-си-5-формилпиррол (1,2 экв.) и основание (0,1 экв.) смешивают в растворителе (1-2 мл/ммоль 2-оксиндола) и данную смесь затем нагревают в течение промежутка времени от примерно 2 до примерно 12 ч. После охлаждения осадок, который образовался, фильтруют, промывают холодным этанолом или диэтиловым эфиром и сушат под вакуумом с получением соответствующей 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиден-метил)-1-Н-пиррол-3-карбоновой кислоты. Если никакого осадка не образуется, реакционную смесь концентрируют и остаток растирают с дихлорметаном/диэтиловым эфиром, полученное твердое вещество собирают путем фильтрования и затем сушат. Продукт возможно может быть дополнительно очищен с помощью хроматографии.

Основание может представлять собой органическое или неорганическое основание. Если используют органическое основание, предпочтительно это азотное основание. Примеры органических азотных оснований включают в себя, но не ограничены ими, диизопропиламин, триметиламин, триэтиламин, анилин, пиридин, 1,8-диазабицикло[5,4,1]ундец-7-ен, пирролидин и пиперидин.

Примерами неорганических оснований являются, без ограничения, аммиак, гидроксиды щелочных металлов или щелочно-земельных металлов, фосфаты, карбонаты, бикарбонаты, бисульфаты и амиды. Щелочные металлы включают литий, натрий и калий, в то время как щелочно-земельные металлы включают кальций, магний и барий.

В предпочтительном в настоящее время воплощении данного изобретения, когда растворитель представляет собой протонный растворитель, такой как вода или спирт, основание представляет собой

неорганическое основание щелочного металла или щелочно-земельного металла, предпочтительно гидроксид щелочного металла или щелочно-земельного металла.

Специалистам в данной области будет понятно, на основе известных общих принципов органического синтеза и данного описания изобретения, какое основание будет наиболее подходящим для рассматриваемой реакции.

Растворитель, в котором осуществляют реакцию, может представлять собой протонный или апротонный растворитель, предпочтительно он представляет собой протонный растворитель. "Протонный растворитель" представляет собой растворитель, который имеет атом(ы) водорода, ковалентно связанный(ые) с атомами кислорода или азота, которые делают атомы водорода существенно кислотными и, таким образом, способными быть "разделенными" с растворенным веществом с помощью водородной связи. Примеры протонных растворителей включают, без ограничения, воду и спирты.

"Апротонный растворитель" может быть полярным или неполярным, но в любом случае не содержит кислотных атомов водорода и, следовательно, не способен к образованию однородной связи с растворенными веществами. Примерами, без ограничения, неполярных апротонных растворителей являются пентан, гексан, бензол, толуол, метилхлорид и четыреххлористый углерод. Примерами полярных апротонных растворителей являются хлороформ, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и диметилформамид.

В предпочтительном в настоящее время воплощении данного изобретения растворитель представляет собой протонный растворитель, предпочтительно воду или спирт, такой как этанол.

Реакцию осуществляют при температурах, больших чем комнатная температура. Температура представляет собой обычно температуру от примерно 30 до примерно 150°C, предпочтительно от примерно 80 до примерно 100°C, наиболее предпочтительно от примерно 60 до примерно 85°C, что представляет собой примерно температуру кипения этанола. Под "примерно" подразумевается, что температурный диапазон находится предпочтительно в пределах 10°C от указанной температуры, более предпочтительно в пределах 5°C от указанной температуры и наиболее предпочтительно в пределах 2°C от указанной температуры. Таким образом, например, под "примерно 75°C" понимают 75°C±10°C, предпочтительно 75°C±5°C и наиболее предпочтительно 75°C±2°C.

2-Оксиндолы и 3-карбокси-5-формилпиррол могут быть легко синтезированы с использованием методик, хорошо известных в области химии, с использованием легкодоступных исходных материалов.

Сочетание 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты с амином формулы $ZCH(R^5)-CR^4(OH)-CHR^3NH_2$ в органическом растворителе, таком как диметилформамид, тетрагидрофуран и т.п., и в присутствии подходящего агента сочетания, такого как дициклогексилкарбодиимид, DEAD (диэтилазодикарбоксилат), EDC и HOBt (1-гидроксибензотриазола гидрат), затем дает соединение формулы (I). Амины формулы $ZCH(R^5)-CR^4(OH)-CHR^3NH_2$ имеются в продаже, либо они могут быть приготовлены способом, хорошо известным в данной области техники. Некоторые такие методики описаны ниже.

Специалистам в данной области следует понимать, что доступны и другие пути синтеза соединений по изобретению и что следующее предлагается в качестве примера, а не ограничения.

Примеры

Следующие приготовления и примеры даны, чтобы позволить специалистам в данной области более ясно понимать и внедрять в практику настоящее изобретение. Они не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения, а просто в качестве его иллюстрации и примера.

Примеры синтеза

Пример 1. Синтез 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Стадия 1.

Диметилформамид (25 мл, 3 экв.) охлаждали при перемешивании в ледяной бане. К этому добавляли $POCl_3$ (1,1 экв., 10,8 мл). Через 30 мин раствор 3,5-диметил-4-этилового эфира пиррола (17,7 г, 105,8 ммоль) в диметилформамиде (ДМФ) (2М, 40 мл) добавляли к реакционной смеси и перемешивание продолжали. Через 2 ч реакционную смесь разбавляли водой (250 мл) и подщелачивали до pH=11 с помощью 1н. водного раствора NaOH. Белое твердое вещество удаляли путем фильтрования, промывали водой, а затем гексанами и сушили с получением этилового эфира 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (19,75 г, 95%) в виде рыжевато-коричневого твердого вещества. 1H ЯМР (360 МГц, DMSO- d_6) δ 12,11 (br s, 1H, NH), 9,59 (s, 1H, CHO), 4,17 (q, J=6,7 Гц, 2H, OCH_2CH_3), 2,44 (s, 3H, CH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3), 1,26 (d, J=6,7 Гц, 3H, OCH_2CH_3).

Стадия 2.

Этиловый эфир 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2 г, 10 ммоль) добавляли к раствору гидроксида калия (3 г, 53 ммоль), растворенного в метаноле (3 мл) и воде (10 мл). Данную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч, охлаждали до комнатной температуры и подкисляли 6н. соляной кислотой до pH 3. Твердое вещество собирали путем фильтрования, промывали водой и сушили в вакуумном сушильном шкафу в течение ночи с получением 5-формил-2,4-диметил-1Н-

пиррол-3-карбоновой кислоты (1,6 г, 93%). ^1H ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6) δ 12,09 (s, br, 2H, NH и COOH), 9,59 (s, 1H, CHO), 2,44 (s, 3H, CH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3).

Стадия 3.

5-Фторизатин (8,2 г, 49,7 ммоль) растворяли в 50 мл гидрата гидразина и кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч. Реакционные смеси затем выливали в воду со льдом. Осадок затем фильтровали, промывали водой и сушили в вакуумном сушильном шкафу с получением 5-фтор-2-оксиндола (7,5 г).

Стадия 4.

Реакционную смесь 5-фтороксиндола (100 мг, 0,66 ммоль), 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (133 мг, 0,79 ммоль) и 10 капель пиперидина в этаноле (3 мл) перемешивали при 60°C в течение ночи и фильтровали. Твердое вещество промывали 1М водным раствором хлороводорода, водой и сушили с получением 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (201 мг, количественно) в виде желтого твердого вещества. Масс-спектрометрия (МС) m/z (относительная интенсивность, %) 299 ($[\text{M}-1]^+$, 100).

Пример 2. Синтез 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидроксипропил)амида.

Стадия 1.

К 2-хлорметилоксирану (95 г, 1,03 моль) добавляли смесь воды (3,08 г, 0,17 моль) и диэтиламина (106,2 мл, 1,03 моль) при 30°C. Реакционную смесь затем перемешивали при 28-35°C в течение 6 ч и охлаждали до 20-25°C с получением 1-хлор-3-диэтиламинопропан-2-ола.

Стадия 2.

Раствор гидроксида натрия (47,9 г, 1,2 моль) в 78 мл воды добавляли к 1-хлор-3-диэтиламинопропан-2-олу. Полученную смесь перемешивали при 20-25°C в течение 1 ч, разбавляли 178 мл воды и дважды экстрагировали диэтиловым эфиром. Объединенный эфирный раствор сушили с помощью твердого гидроксида калия и выпаривали с получением 135 г неочищенного продукта, который очищали путем фракционной перегонки с получением чистого глицидилдиэтиламина (98 г, 76%) в виде масла.

Стадия 3.

К ледяному раствору гидроксида аммония (25 мл, 159 ммоль), 25% (мас./мас.), по каплям добавляли глицидилдиэтиламин (3,2 г, 24,8 ммоль) в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали при 0-5°C в течение 1 ч, а затем при комнатной температуре в течение 14 ч. Полученную реакцию смесь упаривали и перегоняли (84-90°C при 500-600 мТ (65,5-78,6 Па)) с получением 1-амино-3-диэтиламинопропан-2-ола (3,3 г, 92%). МС m/z 147 ($[\text{M}+1]^+$).

Стадия 4.

К раствору 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг, 0,43 ммоль), EDC (122,7 мг, 0,64 ммоль) и HOBT (86,5 мг, 0,64 ммоль) в 1,0 мл ДМФ добавляли 1-амино-3-диэтиламинопропан-2-ол (93,2 мг, 0,64 ммоль). Полученный реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и упаривали. Остаток суспендировали в 10 мл воды и фильтровали. Твердое вещество промывали насыщенным бикарбонатом натрия и водой и сушили в сушильном шкафу при большом вакууме в течение ночи с получением неочищенного продукта, который очищали колоночной хроматографией, элюируя в 6% растворе метанола в дихлорметане, содержащем триэтиламин (2 капли/100 мл 6% метанола в дихлорметане) с получением 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидроксипропил)амида (62 мг, 34%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 13,70 (s, 1H, NH-1'), 10,90 (s, 1H, NH-1), 7,76 (dd, $J=2,38$; 9,33 Гц, 1H, H-4), 7,72 (s, 1H, винил-H), 7,60 (m, br, 1H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ -4'), 6,93 (dt, $J=2,38$; 8,99 Гц, 1H, H-5), 6,85 (dd, $J=4,55$; 8,99 Гц, 1H, H-6), 3,83 (m, br, 1H, OH), 3,33 (m, 4H), 2,67 (m, br, 5H), 2,46 (s, 3H, CH_3), 2,44 (s, 3H, CH_3), 1,04 (m, br, 6H, $\text{CH}_3 \times 2$). МС m/z (относительная интенсивность, %) 427 ($[\text{M}+1]^+$, 100).

Пример 3. Синтез 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида.

Стадия 1.

Смесь морфолина (2,6 мл, 30 ммоль) и эпихлоргидрина (2,35 мл, 30 ммоль) в этаноле (50 мл) перемешивали при 70°C в течение ночи. После удаления растворителя остаток разбавляли метиленхлоридом (50 мл). Чистое выпавшее в осадок твердое вещество собирали путем вакуумного фильтрования с получением 1-хлор-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ола (2,0 г, 37%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 3,49 (t, $J=4,8$ Гц, 2H), 3,60 (t, $J=4,6$ Гц, 2H), 3,75 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 4,20 (dd, $J=5,2$; 12 Гц, 2H), 4,54 (m, 2H), 4,62 (m, 1H, CH), 6,64 (d, $J=6,4$ Гц, 1H, OH). МС (m/z) 180,2 ($\text{M}+1$).

Стадия 2.

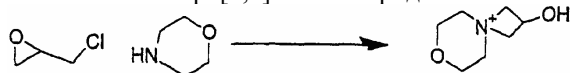
1-Хлор-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол (2,0 г, 11 ммоль) обрабатывали раствором NH_3 в метаноле (25% по массе, 20 мл) при комнатной температуре. Азот барботировали через реакционную смесь для удаления аммиака. Выпаривание растворителя дало соль гидрохлорид 1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ола (2,0 г, 91%). ^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 2,30 (d, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,36 (m, 4H, NCH_2), 2,65 (dd, $J=8,4$; 12,8 Гц,

1H), 2,91 (dd, J=3,6; 12,8 Гц, 1H), 3,52 (m, 4H, OCH₂), 3,87 (m, 1H, CH), 5,32 (s, 1H, OH), 8,02 (brs., 3H, NH₃⁺). МС (m/z) 161,1 (M+1).

Стадия 3.

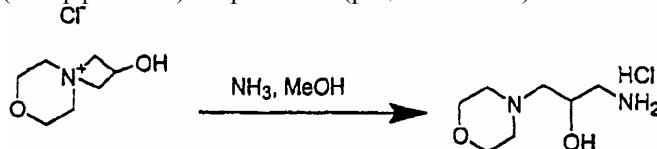
5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновую кислоту (120 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-олом (74 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида (65 мг, 36%). Маточный раствор упаривали до сухости и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с получением дополнительных 2N (70 мг, 39%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,28 (m, 1H), 2,32 (m, 1H), 2,40 (m, 4H), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,15 (s, 1H), 3,31 (m, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,78 (m, 1H), 4,73 (brs, 1H, OH), 6,82 (dd, J=4,5; 8,4 Гц, 1H), 6,90 (td, ²J=2,8; ³J=10,0 Гц, 1H), 7,53 (m, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,74 (dd, J=2,0; 9,6 Гц, 1H) (ароматический и винильный), 10,87 (s, 1H, CONH), 13,66 (s, 1H, NH). ЖХ (жидкостная хроматография)-МС (m/z) 441,4 (M-1).

Синтез 2-гидрокси-7-окса-4-азониаспиро[3,5]нонанхлорида.



В 1 л 3-горлую круглодонную колбу, снабженную термопарой, впускным отверстием для азота и воронкой для добавления на 250 мл, загружали морфолин (91,5 г, 91,5 мл, 1,05 моль, 1,0 экв.) и 100 мл этанола. Раствор быстро перемешивали с добавлением эпихлоргидрина (100 г, 84,5 мл, 1,08 моль, 1,03 экв.) из колонки для добавления в течение примерно 30 мин. За температурой наблюдали, и когда температура куба достигла 27°C, реакционную смесь охлаждали с помощью ледяной водяной бани. Прозрачный раствор перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь анализировали с помощью ГХ (газовой хроматографии) (разводили 5 капель реакционной смеси в 1 мл этанола и впрыскивали на 15m DB-5 капиллярную колонку для ГХ со следующими рабочими параметрами: инжектор 250°C, детектор 250°C, начальная температура термостата 28°C, нагрев до 250°C со скоростью 10°C/мин). Реакцию завершали с менее чем 3% оставшегося морфолина. Реакционную смесь концентрировали на роторном испарителе при 50°C с полным вакуумом до тех пор, пока больше дистиллята нельзя было сконденсировать. Полученное масло хранили при комнатной температуре в течение 24-48 ч или до тех пор, пока не наблюдалась значительная масса кристаллов (затравка увеличит скорость процесса). Суспензию разбавляли 250 мл ацетона и фильтровали. Твердые вещества сушили в вакуумном сушильном шкафу при 60°C в течение 18-24 ч. Это обеспечило 84 г кристаллического продукта. Маточные жидкости можно было концентрировать и процесс кристаллизации повторяли с увеличением извлечения. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 6,55 (d, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,53 (m, 2H), 4,18 (m, 2H), 3,74 (m, 4H), 3,60 (m, 2H), 3,48 (m, 2H). ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆) δ 70,9, 61,39, 61,04, 60,25, 58,54, 57,80.

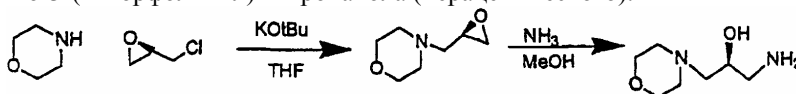
Синтез 1-амино-3-(4-морфолинил)-2-пропанола (рацемического).



В 3 л 1-горлую круглодонную колбу с магнитным перемешивающим стержнем загружали 2-гидрокси-7-окса-4-азониаспиро[3,5]нонанхлорид (150 г, 835 ммоль), а затем 23 мас.% безводный аммиак в метаноле (2120 мл). Колбу закупоривали и полученный прозрачный раствор перемешивали при 20-23°C в течение 18 ч. ГХ в условиях, указанных выше, показала, что никакого исходного материала не осталось. Пробку удаляли и аммиаку давали возможность барботировать из раствора в течение 30 мин. Колбу затем переносили в роторный испаритель и осуществляли концентрирование до белого твердого вещества с помощью 45°C бани и полного вакуума. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 3,57 (dd, 2H), 3,3-3,5 (m, 6H), 2,59 (m, 2H), 2,2-2,4 (m, 6H); ¹³C ЯМР (100 МГц, DMSO-d₆) δ 70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.

Следуя процедуре, описанной в примере 3 выше, но замещая 2-(RS)-1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол на 2-(S)-1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол, приготовленный, как описано ниже, получали желаемое соединение 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-(S)-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амид.

Синтез 1-амино-3-(4-морфолинил)-2-пропанола (нерацемического).



В 1 л 3-горлую круглодонную колбу, снабженную механической мешалкой, термопарой и воронкой для добавления, загружали морфолин (91,5 г, 91,5 мл, 1,05 моль, 1,0 экв.) и 45 мл трет-бутанола. Раствор быстро перемешивали, добавляя R-эпихлоргидрин (100 г, 84,5 мл, 1,08 моль, 1,03 экв.) из воронки для добавления в течение примерно 30 мин. За температурой наблюдали, и когда температура куба достигла 27°C, реакционную смесь охлаждали с помощью ледяной водяной бани. Прозрачный раствор перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь анализировали с помощью ГХ (газовой хроматографии) (разво-

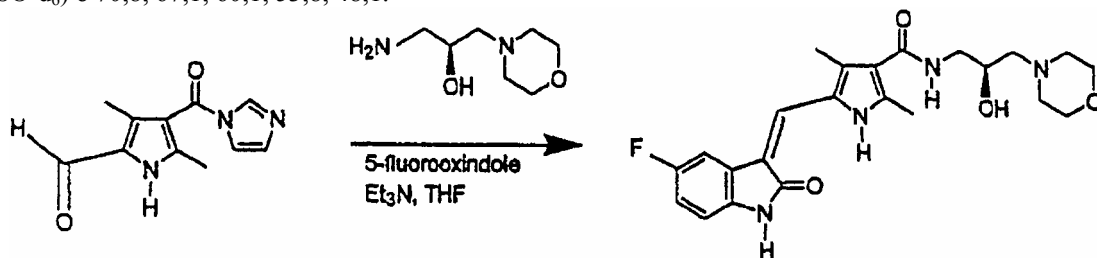
дили 5 капель реакционной смеси в 1 мл этанола и впрыскивали в 15m DB-5 капиллярную колонку для ГХ со следующими рабочими параметрами: инжектор 250°C, детектор 250°C, начальная температура термостата 28°C, нагрев до 250°C при 10°C/мин). Реакцию завершали с менее чем 3% оставшегося морфолина. Раствор охлаждали до 10°C и 20 мас.% раствор трет-бутилата калия в ТГФ (тетрагидрофуран) (576 г) добавляли по каплям, поддерживая температуру менее 15°C. Полученную белую суспензию перемешивали при 10-15°C в течение 2 ч и проверяли с помощью ГХ, используя вышеуказанные условия. Никакого хлоргидрина не наблюдалось. Смесь концентрировали на роторном испарителе, используя 50°C баню и полный вакуум. Полученную смесь разбавляли водой (500 мл) и метиленхлоридом. Фазы разделяли и водную фазу промывали метиленхлоридом (500 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали до прозрачного бесцветного масла. Это обеспечило 145 г, 97% выход, эпоксида. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 3,3 (dd, 4H), 3,1 (m, 1H), 2,6 (dd, 1H), 2,5 (dd, 1H), 2,4 (m, 4H), 2,2 (dd, 2H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ 65,4, 60,1, 53,1, 48,9, 43,4.

Вышеуказанный неочищенный эпоксид загружали в 3 л 1-горлую круглодонную колбу с магнитным перемешивающим стержнем. Добавляли безводный аммиак в метаноле (24% мас./мас., 2,5 л.), колбу закупоривали и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. ГХ в условиях, указанных выше, показала, что никакого исходного материала не осталось. Пробку удаляли и аммиаку давали возможность барботировать из раствора в течение 30 мин. Колбу затем переносили в роторный испаритель и осуществляли концентрирование до прозрачного бесцветного масла с помощью 45°C бани и полного вакуума. Это дало 124 г продукта. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 3,57 (dd, 2H), 3,3-3,5 (m, 6H), 2,59 (m, 2H), 2,2-2,4 (m, 6H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ 70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.

Синтез 1-амино-3-(4-морфолинил)-2-(S)-пропанола.

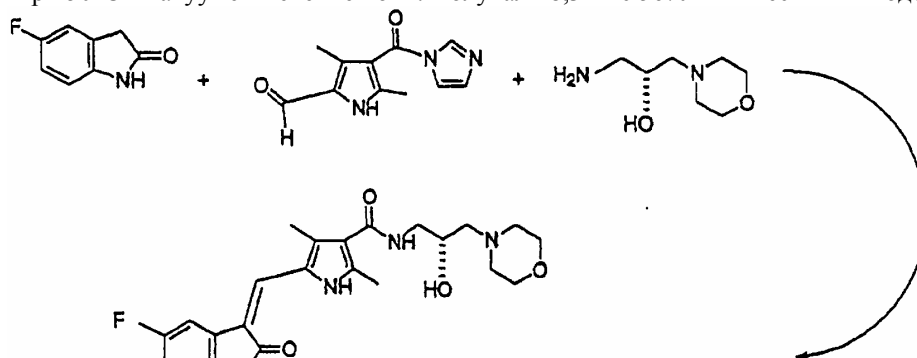
В 1 л 3-горлую круглодонную колбу, снабженную механической мешалкой, термopарой и воронкой для добавления, загружали морфолин (91,5 г, 91,5 мл, 1,05 моль, 1,0 экв.) и 200 мл метанола. Раствор быстро перемешивали, добавляя R-эпихлоргидрин (100 г, 84,5 мл, 1,08 моль, 1,03 экв.) из воронки для добавления в течение примерно 30 мин. За температурой наблюдали и, когда температура куба достигла 27°C, реакционную смесь охлаждали с помощью водяной бани со льдом. Прозрачный раствор перемешивали в течение 18 ч. Реакционную смесь анализировали с помощью ГХ (газовой хроматографии) (разводили 5 капель реакционной смеси в 1 мл этанола и впрыскивали в 15m DB-5 капиллярную колонку для ГХ со следующими рабочими параметрами: инжектор 250°C, детектор 250°C, начальная температура в термостате 28°C, нагрев до 250°C при 10°C/мин). Реакцию завершали с менее чем 3% оставшегося морфолина. Раствор охлаждали до 10°C и 25 мас.% раствор метилата натрия в метаноле (233 г, 1,08 моль, 247 мл) добавляли по каплям, поддерживая температуру менее 15°C. Полученную белую суспензию перемешивали при 10-15°C в течение 2 ч и проверяли с помощью ГХ, используя вышеуказанные условия. Никакого хлоргидрина не наблюдалось. Смесь концентрировали на роторном испарителе, используя 50°C баню и полный вакуум. Полученную смесь разбавляли водой (500 мл) и метиленхлоридом. Фазы разделяли и водную фазу промывали метиленхлоридом (500 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия и концентрировали до прозрачного бесцветного масла. Это обеспечило 145 г, 97% выход, 1,2-эпокси-3-морфолин-4-илпропана. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 3,3 (dd, 4H), 3,1 (m, 1H), 2,6 (dd, 1H), 2,5 (dd, 1H), 2,4 (m, 4H), 2,2 (dd, 2H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ 65,4, 60,1, 53,1, 48,9, 43,4.

Вышеуказанный неочищенный 1,2-эпокси-3-морфолин-4-илпропан загружали в 3 л 1-горлую круглодонную колбу с магнитным перемешивающим стержнем. Добавляли безводный аммиак в метаноле (24% мас./мас., 2,5 л.), колбу закупоривали и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. ГХ в условиях, указанных выше, показала, что никакого исходного материала не осталось. Пробку удаляли и аммиаку давали возможность барботировать из раствора в течение 30 мин. Колбу затем переносили в роторный испаритель и осуществляли концентрирование до прозрачного бесцветного масла с помощью 45°C бани и полного вакуума. Это дало 124 г 1-амино-3-(4-морфолинил)-2-(S)-пропанола. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 3,57 (dd, 2H), 3,3-3,5 (m, 6H), 2,59 (m, 2H), 2,2-2,4 (m, 6H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ 70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.



Имидазоламид (7,0 г, 32,3 ммоль), амин (15,0 г, 64,6 ммоль), 5-фтороксиндол (4,93 г, 32,6 ммоль), триэтиламин (9,79 г, 96,9 ммоль) и ТГФ (88 мл) смешивали и нагревали до 60°C. Образовывался коричневый раствор. После перемешивания в течение 24 ч при 60°C желтую суспензию охлаждали до к.т. (комнатная температура) и фильтровали. Лепешку осадка промывали 80 мл ТГФ и сушили в течение но-

чи при 50°C в вакууме. Получали коричневое твердое вещество (23.2 г). Данное твердое вещество суспендировали в 350 мл воды в течение 5 ч при к.т. и фильтровали. Лепешку осадка промывали 100 мл воды и сушили при 50°C в вакууме в течение ночи. Получали 8,31 г с 56% химическим выходом.



0,25 л колбу, снабженную термометром, конденсатором, магнитной мешалкой и впускным отверстием для азота, загружали 4,92 г 5-фтороксиндола, 7,0 г имидазоламида, 15,5 г (R)-1-амино-3-(4-морфолинил)-2-пропанола, 9,78 г триэтиламина и 88 мл тетрагидрофурана. Смесь нагревали до 60°C в течение 16,5 ч. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и фильтровали. Полученные твердые вещества суспендировали (3) последовательно 3 раза в ацетонитриле в концентрации 11 мл/г, сушили в вакууме в течение 3,6 г (25,25%). [ВЭЖХ, Hypersil BDS, C-18, 5 μ , (6:4), ацетонитрил:0,1М аммония хлорид, РНА-571437=4,05 мин]. ^1H ЯМР (DMSO): δ 10,86 (1H, bs); 7,75 (1H, d); 7,70 (1H, s); 7,50 (1H, m); 6,88 (2H, m); 4,72 (1H, bs); 3,78 (1H, bs); 3,56 (4H, m); 3,32 (6H, m); 3,15 (1H, m); 2,43 (8H, bm).

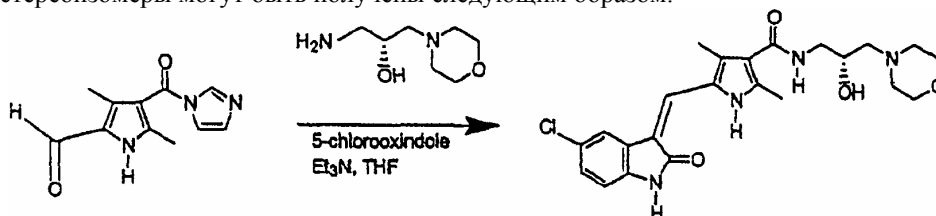
Пример 4. Синтез 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида.

5-(2-Оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновую кислоту (113 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-олом (74 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида (77 мг, 45,3%). ^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 2,27 (m, 1H), 2,32 (m, 1H), 2,40 (m, 4H), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,15 (s, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,77 (m, 1H), 4,74 (d, J=4,8 Гц, 1H, OH), 6,86 (d, J=7,6 Гц, 1H), 6,96 (t, J=7,2 Гц, 1H), 7,10 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,49 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,77 (d, J=8,0 Гц, 1H) (ароматический и винильный), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 425,4 (M+1).

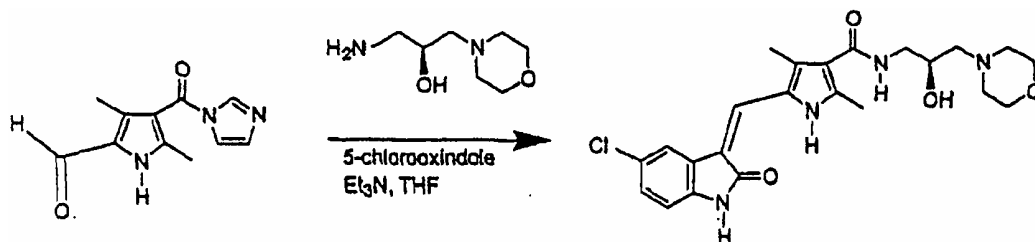
Пример 5. Синтез 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида.

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновую кислоту (126,6 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-олом (74 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида (107 мг, 58%). ^1H ЯМР (DMSO- d_6) δ 2,29 (m, 1H), 2,33 (m, 1H), 2,39 (m, 4H), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,15 (s, 1H), 3,37 (m, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,77 (m, 1H), 4,74 (d, J=4,8 Гц, 1H, OH), 6,85 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,11 (dd, J=2,0; 8,0 Гц, 1H), 7,53 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,97 (d, J=2,0 Гц, 1H) (ароматический и винильный), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 457,4 (M-1).

R и S стереоизомеры могут быть получены следующим образом.



Имидазоламид (7,0 г, 32,3 ммоль), амин (15,5 г, 96,9 ммоль), 5-хлороксиндол (5,48 г, 32,6 ммоль), триэтиламин (14 мл) и ТГФ (88 мл) смешивали и нагревали до 60°C. Образовывался красный раствор. После перемешивания в течение 16 ч при 60°C желтую суспензию охлаждали до к.т. и фильтровали. Лепешку осадка промывали 2x50 мл ТГФ и сушили в течение ночи при 50°C в вакууме. Получали 4,36 г с 29% химическим выходом.



Имидазоламид (6,8 г, 31,3 ммоль), амин (10,0 г, 62,5 ммоль), 5-хлороксиндол (5,3 г, 31,6 ммоль) и ТГФ (100 мл) смешивали и нагревали до 60°C. Образовывался красный раствор. После перемешивания в течение 68 ч при 60°C добавляли триэтиламин (14 мл) и перемешивали в течение 5 ч при 60°C. Реакция не была завершена. Добавляли 4,6 г аминной боковой цепи и перемешивали в течение 20 ч при 60°C. Желтую суспензию охлаждали до к.т. и фильтровали. Лепешку осадка промывали 2x50 мл ТГФ и сушили в течение ночи при 50°C в вакууме. Получали 5,48 г с 38% химическим выходом.

Пример 6. Синтез 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида.

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (72,2 мг, 0,2 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-олом (38 мг, 0,24 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)амида (55 мг, 55%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,27 (m, 1H), 2,32 (m, 1H), 2,39 (m, 4H), 2,41, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,13 (s, 1H), 3,35 (m, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,77 (m, 1H), 4,74 (d, J=4,4 Гц, 1H, OH), 6,80 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,24 (dd, J=2,0; 8,0 Гц, 1H), 7,51 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,09 (d, J=2,0 Гц, 1H) (ароматический и винильный), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 503,4 (M-1).

Пример 7. Синтез 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида.

Стадия 1.

Смесь 3-[1,2,3]триазола (2,0 г, 29 ммоль), эпихлоргидрина (3,4 мл, 43,5 ммоль) и N,N-диизопропил-этиламина (2,6 мл, 15 ммоль) в этаноле (50 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. После удаления растворителей остаток очищали с помощью флэш-хроматографии (CH₂Cl₂/CH₃OH=100/1-100/2-100/4) с получением 1-хлор-3(1,2,3)триазол-2-илпропан-2-ола (2,1 г, 45%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 3,52 (m, 2H, OH и CH₂), 3,60 (dd, J=5,2; 11,2 Гц, 1H), 4,36 (m, 1H, CH), 4,68 (m, 2H), 7,67 (s, 2H). МС (m/z) 162,1 (M+1) и 1-хлор-3-(1,2,3)триазол-1-илпропан-2-ола (2,3 г, 49%). ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 3,56 (s, 1H), 3,57 (s, 1H), 4,35 (m, 1H), 4,53 (dd, J=7,2; 14 Гц, 1H), 4,67 (dd, J=3,8; 14 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,71 (s, 1H). МС (m/z) 162,1 (M+1).

Стадия 2.

1-Хлор-3(1,2,3)триазол-1-илпропан-2-ол (2,3 г, 13 ммоль) обрабатывали раствором NH₃ в метаноле (25 мас.%, 20 мл) при 60°C в течение ночи в закрытом аппарате высокого давления. После охлаждения до комнатной температуры азот барботировали в реакционную смесь для удаления аммиака. Выпаривание растворителя дало соль гидрохлорид 1-амино-3(1,2,3)триазол-1-илпропан-2-ола (2,57 г, 100%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,68 (dd, J=8,8; 12,8 Гц, 1H), 2,97 (dd, J=3,6; 12,8 Гц, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,44 (dd, J=6,4; 14 Гц, 1H), 4,57 (dd, J=4,6; 14 Гц, 1H), 5,95 (d, J=5,2 Гц, 1H, OH), 7,77 (s, 1H), 8,01 (brs, 3H, NH₃⁺), 8,12 (s, 1H). МС (m/z) 143,1 (M+1).

Стадия 3.

5-(2-Оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (113 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3(1,2,3)триазол-1-ил-пропан-2-олом (85 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида (70 мг, 41%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,45, 2,48 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,35 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 4,32 (dd, J=7,6; 14 Гц, 1H), 4,53 (dd, J=3,4; 14 Гц, 1H), 5,43 (d, J=5,6 Гц, 1H, OH), 6,91 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,01 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,15 (t, J=8,0 Гц, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,12 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,77 (d, J=7,6 Гц, 1H), 8,11 (s, 1H), 10,93 (s, 1H, CONH), 13,68 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 405,4 (M-1).

Пример 8. Синтез 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида.

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (120 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3(1,2,3)триазол-1-ил-пропан-2-олом (85 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида (100 мг, 62%). ¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,42, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,27 (m, 2H), 3,98 (m, 1H), 4,27 (dd, J=7,6; 14 Гц, 1H), 4,50 (dd, J=3,4; 13,6 Гц, 1H), 5,38 (d, J=5,6 Гц, 1H, OH), 6,82 (dd, J=4,4; 8,4 Гц, 1H), 6,91 (td, ²J=2,4; ³J=9,0 Гц, 1H), 7,70 (m, 3H), 7,75 (dd, J=2,4; 9,2 Гц, 1H), 8,11 (s, 1H), 10,93 (s, 1H, CONH), 13,73 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 423,4 (M-1).

Пример 9. Синтез 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида.

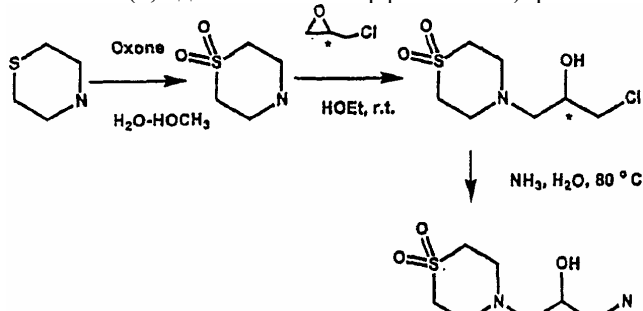
5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (126,6 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3(1,2,3)триазол-1-ил-пропан-2-олом (85 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида (48 мг, 27%). ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,42, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,27 (m, 2H), 3,99 (m, 1H), 4,28 (dd, J=7,8; 14 Гц, 1H), 4,51 (dd, J=3,2; 14 Гц, 1H), 5,39 (d, J=6,0 Гц, 1H, OH), 6,85 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,12 (dd, J=2,0; 8,2 Гц, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,97 (d, J=2,0 Гц, 1H), 8,07 (s, 1H), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,65 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 439,4 (M-1).

Пример 10. Синтез 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида.

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (144,4 мг, 0,4 ммоль) "конденсировали" с 1-амино-3(1,2,3)триазол-1-ил-пропан-2-олом (85 мг, 0,48 ммоль) с выпадением в осадок 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)амида (130 мг, 67%). ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,41, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 3,27 (m, 2H), 3,99 (m, 1H), 4,28 (dd, J=7,6; 14 Гц, 1H), 4,50 (dd, J=3,6; 14 Гц, 1H), 5,40 (d, J=5,6 Гц, 1H, OH), 6,81 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,24 (dd, J=2,0; 8,0 Гц, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,77 (s, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,10 (d, J=1,6 Гц, 1H), 11,0 (s, 1H, CONH), 13,64 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 485,4 (M-1).

Синтез 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты описан в заявке заявителей, поданной одновременно с настоящей заявкой 14 февраля 2001г., озаглавленной "Пирролзамещенные 2-индолиноновые ингибиторы протеинкиназ", серийный номер 09/783264, описание которой настоящим включено сюда полностью.

Пример 11. Синтез 1-амино-3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)пропан-2-ола.



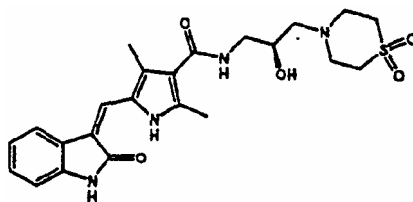
К раствору тиоморфолина (5,0 г, 48,7 ммоль) в HOCH_3 (200 мл) добавляли раствор оксона (36,0 г, 58,5 ммоль) в H_2O (100 мл). Смесь хорошо перемешивали при 40°C в течение 48 ч, а затем охлаждали до 0°C. Водный раствор NaOH добавляли по каплям, чтобы подвести pH=12. Твердое вещество отфильтровывали и промывали HOCH_3 (3x40 мл). Объединенную жидкость конденсировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}=3/1/0,1-2/1/0,1$) с получением 1,1-диоксида тиоморфолина (6,2 г) с 93% выходом. ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,97 (m, 4H), 3,07 (m, 4H), 3,42 (brs, 1H), МС (m/z) 136 (M+1).

Смесь 1,1-диоксида тиоморфолина (2,5 г, 18,5 ммоль) и (R)-(-)-эпихлоргидрина (1,55 мл, 20 ммоль) в смеси растворителей этанола (50 мл) и H_2O (5мл) перемешивали при 25°C в течение 24 ч. После удаления растворителя остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с получением (R)-1-хлор-3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)пропан-2-ола (4,0 г, 96%). ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2,50 (m, 2H), 2,94 (m, 4H), 3,05 (m, 4H), 3,54 (dd, J=5,8; 11,2 Гц, 1H), 3,63 (dd, J=4,4; 11,2 Гц, 1H), 3,78 (m, H, CH), 5,10 (d, J=5,2 Гц, 1H, OH), МС (m/z) 228,2 (M+1).

(R)-1-Хлор-3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)пропан-2-ол (2,27 г, 10 ммоль) обрабатывали раствором NH_3 в метаноле (25 мас.%, 20 мл) при 50°C в течение 12 ч. После выпаривания растворителей остаток обрабатывали анионообменной смолой (AG1x8, OH-форма) в воде с получением неочищенного (S)-1-амино-3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)пропан-2-ола (2,0 г).

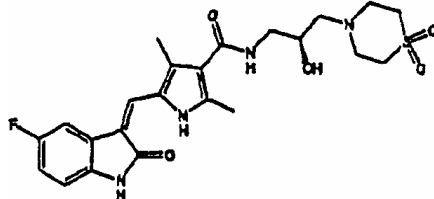
Он был загрязнен примерно на 30% своим димером и мог быть очищен только с помощью колонной хроматографии. МС (m/z) 209,2 (M+1). Конденсация (S)-1-амино-3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)пропан-2-ола с оксиндолами дала желаемые индолиноны (выход 50-80% после очистки).

[3-(1,1-Диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]амид (R)-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.



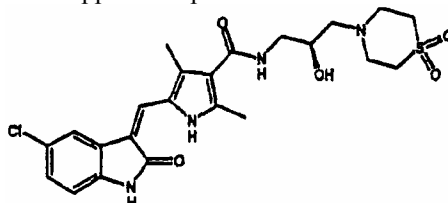
^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 2,39, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,49 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,97 (m, 4H), 3,07 (m, 4H), 3,16 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 4,83 (d, $J=4,8$ Гц, 1H, OH), 6,86 (d=7,6 Гц, 1H), 6,97 (t, $J=7,4$ Гц, 1H), 7,11 (t, $J=7,5$ Гц, 1H), 7,50 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,76 (d, $J=7,6$ Гц, 1H) (ароматический и винильный), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH), ЖХ-МС (m/z) 473,4 ($M+1$).

[3-(1,1-Диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]амид (R)-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.



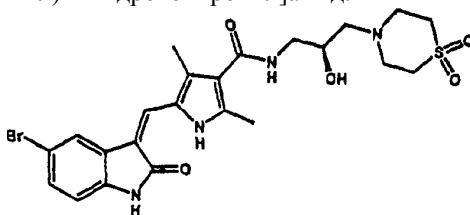
^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 2,40, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,47 (m, 1H), 2,54 (m, 1H), 2,97 (m, 4H), 3,06 (m, 4H), 3,17 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 4,83 (d, $J=4,4$ Гц, 1H), 6,82 (t, $J=4,0$ Гц, 1H), 6,91 (td, $^2J=2,8$; $^3J=9,0$ Гц, 1H), 7,53 (t, $J=5,8$ Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,75 (dd, $J=2,4$; 9,2 Гц, 1H), 10,88 (s, 1H), 13,67 (s, 1H). ЖХ-МС (m/z) 491,4 ($M+1$).

[3-(1,1-Диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]амид (R)-5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.



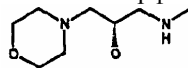
^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 2,40, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,45 (m, 1H), 2,53 (m, 1H), 2,96 (m, 4H), 3,06 (m, 4H), 3,17 (m, 1H), 3,33 (m, 1H), 3,75 (m, 1H), 4,83 (d, $J=4,4$ Гц, 1H, OH), 6,85 (t, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,11 (dd, $J=2,2$; 8,2 Гц, 1H), 7,53 (t, $J=5,5$ Гц, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,97 (d, $J=2,0$ Гц, 1H), 10,98 (s, 1H), 13,62 (s, 1H), ЖХ-МС (m/z) 507,2 ($M+1$).

(R)-5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [3-(1,1-диоксо- λ^6 -тиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]амид.

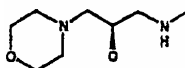


^1H ЯМР (DMSO-d_6) δ 2,41, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,47 (m, 1H), 2,54 (m, 1H), 2,97 (m, 4H), 3,06 (m, 4H), 3,18 (m, 1H), 3,30 (m, 1H), 3,74 (m, 1H), 4,83 (d, $J=4,8$ Гц, 1H), 6,81 (d, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,24 (dd, $J=1,8$; 8,2 Гц, 1H), 7,53 (t, $J=5,8$; 1H), 7,76 (s, 1H), 8,09 (d, $J=2,0$ Гц, 1H), 10,98 (s, 1H), 13,62 (s, 1H), ЖХ-МС (m/z) 553,6 ($M+1$).

Пример 12. Синтез (S)- или (R)-1-метиламино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ола.



(S)-

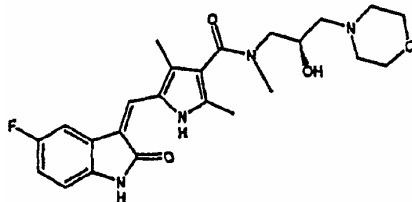


(R)S-

Смесь морфолина (1,74 мл, 20 ммоль) и (R)-эпихлоргидрина (1,56 мл, 20 ммоль) в этаноле (10 мл) перемешивали при к.т. в течение 48 ч. После удаления растворителя остаток обрабатывали раствором

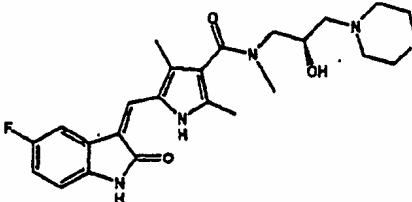
CH₃NH₂ в воде (40 мас.%, 20 мл) при к.т. в течение 14 ч. Удаление растворителей дало неочищенный (S)-1-метиламино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол, который можно было очистить с помощью вакуумной перегонки или колоночной хроматографии (2,4 г, 70%). (R)-1-Метиламино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол был с использованием (S)-эпихлоргидрина с 76% выходом. ¹H ЯМР (CDCl₃) δ 2,33 (dd, J=3,6; 12,4 Гц, 1H), 2,42 (m, 1H), 2,44 (dd, J=2,8; 9,8 Гц, 2H), 2,45 (s, 3H), 2,53 (dd, J=7,6; 11,8 Гц, 1H), 2,62 (m, 2H), 2,65 (dd, J=3,6; 12,0 Гц, 1H), 3,71 (m, 4H), 3,85 (m, 1H), ¹³C ЯМР (CDCl₃) δ 67,06, 65,58, 62,80, 55,87, 53,94, 36,72, МС (m/z) 175 (M+1).

(S)-1-Метиламино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол, "конденсированный" с 5-фтороксиндолом, давал (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)метиламид (R)-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.



¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,0 (s, 3H), 2,15 (m, 1H), 2,25 (m, 6H), 2,28 (m, 2H), 2,42 (s, 1H), 2,95 (s, 1H), 3,0 (s, 3H), 3,25 (m, 2H), 3,57 (m, 2H), 3,97 и 3,68 (2xbrs, 1H), 4,80 и 4,74 (2xbrs, 1H), 6,82 (dd, J=4,0; 8,0 Гц, 1H), 6,90 (td, ²J=2,3; ³J=8,7 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,71 (dd, J=2,2; 9,0 Гц, 1H), 10,86 (s, 1H), 13,57 (s, 1H), ЖХ-МС (m/z) 457,2 (M+1).

(R)-1-Амино-3-морфолин-4-ил-пропан-2-ол давал (S)-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)метиламид.



¹H ЯМР (DMSO-d₆) δ 2,0 (m, 3H), 2,10 (m, 1H), 2,22 (m, 6H), 2,25 (m, 2H), 2,38 (m, 1H), 2,90 (s, 1H), 2,96 (s, 3H), 3,27 (m, 2H), 3,52 (m, 2H), 3,93 и 3,64 (2xbrs, 1H), 4,75 и 4,70 (2xbrs, 1H), 6,77 (dd, J=4,6; 8,2 Гц, 1H), 6,85 (td, ²J=2,5; ³J=8,8 Гц, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,67 (dd, J=2,0; 9,6 Гц, 1H), 10,81 (s, 1H), 13,52 (s, 1H), ЖХ-МС (m/z) 457,2 (M+1).

Пример 13. Получение аминной боковой цепи 3-(1-Н-тетразол-1-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропан и 3-(2-Н-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропан.

6,905 г тетразола (100 ммоль), и 1,75 мл диизопропилэтиламина (10 ммоль), и 11,73 мл эпихлоргидрина (150 ммоль) в безводном ацетонитриле (30 мл) перемешивали при 60°C в течение 4 ч. Полученный раствор упаривали, сушили под высоким вакуумом и очищали на колонке из диоксида кремния в смеси хлороформа и метанола (соотношение 100:8). Первая фракция обеспечила чистый 3-(2-Н-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропан, 6,215 г (бесцветное масло, 38% выход), вторая фракция дала 9,208 г чистого 3-(1-Н-тетразол-1-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропана (липкая смола, 57% выход).

3-(1-Н-Тетразол-1-ил)-2-гидрокси-1-аминопропан.

9,110 г 3-(1-Н-тетразол-1-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропана, 15 г карбоната калия и 130 мл насыщенного метанольного аммиака перемешивали в течение 21 ч, затем фильтровали и упаривали. Остаток очищали на колонке с диоксидом кремния с использованием смеси хлороформа, метанола и водного раствора аммиака в соотношении 80:35:4. Выход=7,326 г белой липкой смолы (91,5% th (теоретический)).

3-(2-Н-Тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-аминопропан.

6,105 г 3-(2-Н-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропана, 10 г карбоната калия и 95 мл насыщенного метанольного раствора аммиака перемешивали в течение 21 ч, затем фильтровали и упаривали. Остаток очищали на колонке с силикагелем, используя смесь хлороформа, метанола и водного раствора аммиака в соотношении 60:25:2. Выход=3,726 г белого кристаллического твердого вещества (69,5% th).

3-[(2R,6S)-2,6-Диметилморфолин-4-ил]-2-гидрокси-1-аминопропан.

4,7 мл эпихлоргидрина (60 ммоль) добавляли к охлажденному на льду раствору цис-2,6-диметилморфолина (4,607 г, 40 ммоль) в трифторэтаноле (5 мл). Раствор перемешивали при 0-5°C в течение 1 ч, охлаждающую баню убирали и перемешивали при к.т. в течение дополнительных 5 ч. Смесь упаривали под высоким вакуумом, полученный маслянистый остаток растворяли в безводном этаноле (50 мл), раствор охлаждали на ледяной бане, твердый метилат натрия (2,27 г) добавляли двумя порциями и смесь перемешивали при 0-5°C в течение 2 ч. Реакционную смесь затем фильтровали, соли промывали этанолом (30 мл) и объединенные фильтраты добавляли к охлажденному на льду концентрированному водному раствору аммиака (200 мл). Смесь перемешивали при к.т. в течение 12 ч, затем упаривали под высоким вакуумом. Остаток очищали на колонке из кремнезема в смеси хлороформа, метанола и 7 М мета-

нольного раствора аммиака с соотношением 80:15:3. Выход=5,75 г белого кристаллического гигроскопичного твердого вещества (76,3% th).

(2S)-3-(3-Метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)-2-гидрокси-1-хлорпропан и (2S)-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)-2-гидрокси-1-аминопропан.

3,423 г 3-метил-2,5-диоксиимидазолидина (3,423 г) и 3,60 мл R эпихлоргидрина (-) (99% е.е. (errors excluded, ошибки в пределах допустимости)) и 0,30 мл основания Бартона (1,5 ммоль) в безводном ацетонитриле перемешивали при 60°C в течение 20 ч. Полученный раствор упаривали под высоким вакуумом и очищали на колонке с диоксидом кремния в смеси хлороформа и метанола (градиент от 5 до 20% метанола) для получения 5,572 г хлорсодержащего соединения в виде белого аморфного твердого вещества (90% выход). Хлорид превращали в амин следующим образом. Полученное гидроксихлорпромежуточное соединение растворяли в метанольном растворе аммиака (насыщенный газообразным аммиаком), добавляли карбонат калия и смесь перемешивали в закрытой колбе в течение 2,5 дней. Реакционную смесь фильтровали, фильтраты упаривали. Остаток очищали на колонке с диоксидом кремния в смеси хлороформа, метанола и конц. водного раствора аммиака с соотношением 80:15:1,5.

Пример 14. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида (соединение 22) (общая методика).

72 мг 3-(2H-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 105 мг (0,25 ммоль) 1-окси-7-азабензотриазольного эфира 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученного путем активации (3Z)-3-({3,3-диметил-4-карбокси-1H-пиррол-2-ил}метил)-5-фтор-1,3-дигидро-2H-индол-2-она (480 мг; 1,6 ммоль) реагентом HATU (570 мг; 1,5 ммоль) в присутствии основания Хюнига (3,0 моль; 0,525 мл) в ДМФ (5 мл) и выделенного в чистой форме путем осаждения хлороформом (5 мл) и высушивания под высоким вакуумом с 92% выходом (579 мг)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина с соотношением 20:1 (3 мл), давали кристаллизоваться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=106 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 15. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида (соединение 23) (общая методика).

72 мг 3-(2H-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 109 мг (0,25 ммоль) 1-окси-7-азабензотриазольного эфира 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученного путем активации (3Z)-3-({3,3-диметил-4-карбокси-1H-пиррол-2-ил}метил)-5-хлор-1,3-дигидро-2H-индол-2-она (1,520 г; 4,8 ммоль) реагентом HATU (1,768 г; 4,65 ммоль) в присутствии основания Хюнига (9,0 ммоль; 1,58 мл) в ДМФ (20 мл) и выделенного в чистой форме путем осаждения хлороформом (20 мл) и высушивания под высоким вакуумом с 94% выходом (1,907 г)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина в соотношении 20:1 (3 мл), давали кристаллизоваться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=109 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 16. N-[2-Гидрокси-3-(2H-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-трифторметокси]-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамида (соединение 24) (общая методика).

72 мг 3-(2H-тетразол-2-ил)-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 121,5 мг (0,25 ммоль) 1-окси-7-азабензотриазольного эфира 5-[(Z)-(5-трифторметокси-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученного путем активации (3Z)-3-((3,3-диметил-4-карбокси-1H-пиррол-2-ил)метил)-5-трифторметокси-1,3-дигидро-2H-индол-2-она (1,768 г; 4,8 ммоль) реагентом HATU (1,758 г; 4,8 ммоль) в присутствии основания Хюнига (9,0 ммоль; 1,58 мл) в ДМФ (25 мл) и выделенного в чистой форме путем упаривания и осаждения безводным ацетонитрилом и высушивания под высоким вакуумом с 85,5% выходом (1,929 г)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина в соотношении 20:1 (3 мл), давали кристаллизоваться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=113 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 17. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида (соединение 25).

Его получали в соответствии с методикой примера 14 из 72 мг соответствующего амина. Выход=113 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 18. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1H-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамида (соединение 26).

Его получали по методике примера 15 из 72 мг соответствующего амина. Выход=122 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 19. N-[2-Гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 27).

Его получали по методике примера 16 из 72 мг соответствующего амина. Выход=118 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 20. N-[3-[(2R,6S)-2,6-Диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 28).

Его получали по методике примера 14 из 95 мг соответствующего амина. Выход=99 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 21. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 29).

Его получали по методике примера 15 из 95 мг соответствующего амина. Выход=101 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 22. N-[3-[(2R,6S)-2,6-Диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 30).

Его получали по методике примера 16 из 95 мг соответствующего амина. Выход=89 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 23. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 34).

Его получали по методике примера 14 из 95 мг соответствующего амина. Выход=109 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 24. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 36).

Его получали по методике примера 15 из 95 мг соответствующего амина. Выход=107 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 25. N-[(2S)-2-Гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 35).

Его получали по методике примера 16 из 95 мг соответствующего амина. Выход=123 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 26. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 31).

Его получали по методике примера 14 из 95 мг соответствующего амина. Выход=110 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

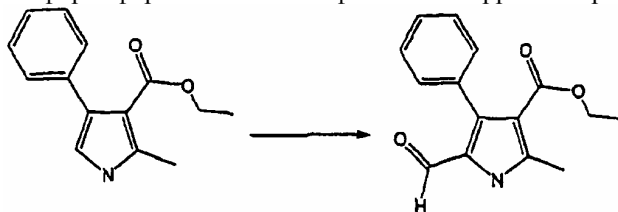
Пример 27. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 32).

Его получали в соответствии с методикой примера 15 из 95 мг соответствующего амина. Выход=103 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 28. N-[(2R)-2-Гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид (соединение 33).

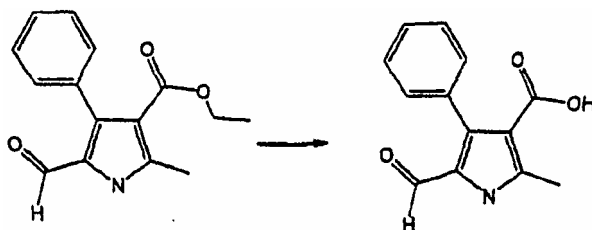
Его получали по методике примера 16 из 95 мг соответствующего амина. Выход=120 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 29. Этиловый эфир 5-формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.



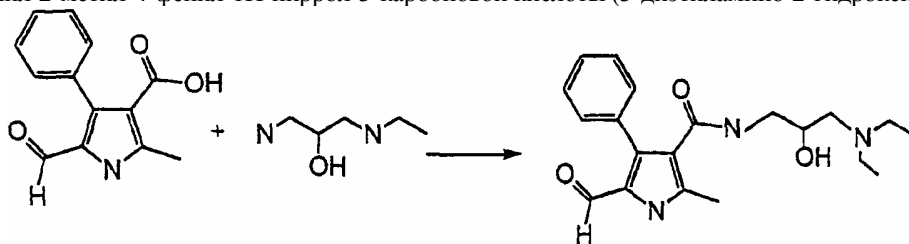
ДМФ (4 мл, 3 экв.) охлаждали при перемешивании в ледяной бане. К этому добавляли POCl_3 (1,1 экв., 1,8 мл). Через 30 мин раствор 3,5-диметил-4-этилового эфира пиррола (4 г, 17,4 ммоль) в ДМФ (2М, 9 мл) добавляли в реакционную смесь и перемешивание продолжали. Через 10 мин реакционная смесь затвердела. Ее разбавляли 5 мл ДМФ и нагревали при 90°C в масляной бане. Через 1 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (100 мл) и подщелачивали до pH=11 с помощью 1н. NaOH. Продукт экстрагировали в метилхлорид (3x200 мл) и органические слои промывали соляным раствором (200 мл), сушили (MgSO_4) и концентрировали с получением 4,3 г (95%) этилового эфира 5-формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты в виде коричневого твердого вещества. ^1H ЯМР (360 МГц, DMSO-d_6) δ 12,5 (br s, 1H, NH), 9,11 (s, 1H, CHO), 7,35 (s, 5H, ArH), 3,98 (q, J=6,8 и 7,2 Гц, 2H, OCH_2CH_3), 2,48 (s, 3H, CH_3), 0,98 (t, J=7 Гц, 3H, OCH_2CH_3).

5-Формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота.



Этиловый эфир 5-формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты растворяли в воде (100 мл) и метаноле (45 мл) при перемешивании. Добавляли КОН (2 экв., 1,9 г) и грели при 100°C. Через 2,5 ч охлаждали до комнатной температуры, оставшийся эфир удаляли путем экстрагирования в этилацетат (200 мл), сушили и концентрировали. Водный слой подкисляли до pH=3, используя 2н. HCl. Белое твердое вещество удаляли путем фильтрования, с промывкой водой. Твердое вещество повторно концентрировали из толуола, растирали с гексанами и сушили с получением 2 г (52%) грязно-белого твердого вещества. ^1H ЯМР (360 МГц, DMSO- d_6) δ 12,46 (br s, 1H, CO₂H), 11,95 (s, 1H, NH), 9,08 (s, 1H, CHO), 7,36 (s, 5H, ArH), 2,49 (s, 3H, CH₃). МС m/z (относительная интенсивность %, ионы) обнаружено 229 (100, M⁺); вычисл. 229,2.

5-Формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидроксипропил)амид.



Смесь 5-формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (1,0 г, 4,36 ммоль), 1-амино-3-диэтиламино-2-пропанола (950 мг, 6,54 ммоль), DDC (диэтилдитиокарбамат) (900 мг, 4,36 ммоль) и HOBT (884 мг, 6,54 ммоль) в хлороформе (60 мл) перемешивали при к.т. в течение 12 ч. Реакционную смесь выливали в нас. бикарбонат натрия (60 мл) и к этому добавляли 1н. NaOH (8 мл). Затем это экстрагировали EtOAc (3x100 мл), промывали водой и соляным раствором, сушили и концентрировали с получением 400 мг 5-формил-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (3-диэтиламино-2-гидроксипропил)амида.

Пример 30. Методика синтеза соединений 11-21.

0,36 М раствор каждого оксиндола получают в DMSO, так же как и 0,576 М раствор каждого альдегида. 300 мкл соответствующего оксиндола смешивают с 300 мкл соответствующего альдегида в присутствии 200 мкл DMSO. Затем добавляют 40 мг диэтиленetriамин-акцепторной смолы. Смесь помещают в блок Роббинса и этот блок закупоривают и помещают в сушильный шкаф при 60°C, где его встряхивают в течение 18 ч.

Через 18 ч блок Роббинса удаляют из шкафа. Верхнюю крышку блока удаляют и 800 мкл DMSO добавляют к смеси. Затем блок вновь закупоривают и снова помещают в сушильный шкаф при 60°C, где он вращается непрерывно в течение 1 ч.

После того как 1 ч пройдет, блок Роббинса удаляют из сушильного шкафа и дают ему остыть. Нижнюю крышку блока Роббинса осторожно удаляют и весь блок помещают в фильтрационное устройство, которое позволяет отфильтровать вновь синтезированные соединения из смолы.

Пример 31. 3-[1-Н-(7-Азабензотриазолил)окси]-2-гидрокси-1-аминопропан.

4,083 г 1-гидрокси-7-азабензотриазола (30 ммоль), и 0,53 мл диизопропиламина (3 ммоль), и 4,70 мл эпихлоргидрина в безводном хлороформе перемешивали при 60°C в течение 2 ч. Реакционную смесь выливали на колонку с диоксидом кремния и элюировали смесью хлороформа и метанола с соотношением 100:3. Полученное гидроксичлор-промежуточное соединение (4,83 г, бледно-желтое масло, 70% выход) растворяли в метанольном растворе аммиака (100 мл, насыщенный газообразным аммиаком), добавляли 8,3 г карбоната калия и смесь перемешивали в закрытой колбе в течение 2,5 дней. Реакционную смесь фильтровали, фильтраты упаривали. Остаток очищали на колонке с диоксидом кремния, используя смесь хлороформа, метанола и конц. водного аммиака с соотношением 80:15:1,5. Выход=2,793 г белого кристаллического твердого вещества (63% th. от хлорида).

3-[1-Н-(Бензотриазолил)окси]-2-гидрокси-1-хлорпропан и 3-[1-Н-(бензотриазолил-3-Н-оксидо)]-2-гидрокси-1-хлорпропан.

12,162 г гидроксизабензотриазола (90 ммоль), 1,59 мл диизопропилэтиламина (9 ммоль) и 14,1 мл эпихлоргидрина (180 ммоль) в безводном хлороформе перемешивали при 55°C в течение 2 ч. Реакционную смесь упаривали, остаток сушили под высоким вакуумом, затем очищали на колонке с диоксидом кремния смесью хлороформа и метанола с соотношением 100:5. Первые фракции обеспечили 3-[1-Н-(бензотриазолил)окси]-2-гидрокси-1-хлорпропан, 10,570 г (бледно-желтый мед, 51,5% выход), за чем следовала фракция 3-[1-Н-(бензотриазолил-3-Н-оксидо)]-2-гидрокси-1-хлорпропана, 9,990 г (белое кристаллическое твердое вещество, 48,5% выход).

3-[1-Н-(Бензотриазолил-3-Н-оксидо)]-2-гидрокси-1-аминопропан.

Получили путем аминолизиса 3-[1-Н-(бензотриазолил-3-Н-оксидо)]-2-гидрокси-1-хлорпропана по аналогии с синтезом 3-[1-Н-(7-азабензотриазолил)окси]-2-гидрокси-1-аминопропана.

Пример 32. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-илокси)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (общая методика).

105 мг 3-(1-Н-7-азабензотриазолил)окси-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 105 мг (0,25 ммоль) 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты 1-окси-7-азабензотриазольного эфира (полученного путем активации (3Z)-3-(3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пиррол-2-ил)метил)-5-фтор-1,3-дигидро-2Н-индол-2-она (480 мг; 1,6 ммоль; 0,525 мл) в ДМФ (5 мл) и выделенного в чистой форме путем осаждения хлороформом (5 мл) и высушивания под высоким вакуумом с 92% выходом (579 мг)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина с соотношением 20:1 (3 мл), давали кристаллизаться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=121 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 33. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-илокси)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (общая методика).

105 мг 3-(1-Н-7-азабензотриазолил)окси-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 109 мг (0,25 ммоль) 1-окси-7-азабензотриазольного эфира 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученного путем активации (3Z)-3-(3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пиррол-2-ил)метил)-5-хлор-1,3-дигидро-2Н-индол-2-она (1,520 г; 4,8 ммоль) реагентом НАТУ (1,768 г; 4,65 ммоль) в присутствии основания Хюнига (9,0 ммоль; 1,58 мл) в ДМФ (20 мл) и выделенного в чистой форме путем осаждения хлороформом (20 мл) и высушивания под высоким вакуумом с 94% выходом (1,907 г)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина с соотношением 20:1 (3 мл), давали кристаллизаться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=130 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 34. 5-[(Z)-(5-Трифторметокси-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]пиридин-3-илокси)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид (общая методика).

105 мг 3-(1-Н-7-азабензотриазолил)окси-2-гидрокси-1-аминопропана добавляли к суспензии 121,5 мг (0,25 ммоль) 1-окси-7-азабензотриазольного эфира 5-[(Z)-(5-трифторметокси-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученного путем активации (3Z)-3-(3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пиррол-2-ил)метил)-5-трифторметокси-1,3-дигидро-2Н-индол-2-она (1,768 г; 4,8 ммоль) реагентом НАТУ (1,758 г; 4,8 ммоль) в присутствии основания Хюнига (9,0 ммоль; 1,58 мл) в ДМФ (25 мл) и выделенного в чистой форме путем упаривания и осаждения безводным ацетонитрилом и высушивания под высоким вакуумом с 85,5% выходом (1,929 г)) в безводном диметилацетамиде (1,5 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин и упаривали под высоким вакуумом. Остаток суспендировали в смеси метанола и диэтиламина с соотношением 20:1 (3 мл), давали кристаллизаться в холодильнике (5°C) в течение 1 ч, фильтровали, осадок промывали ледяным метанолом и сушили под высоким вакуумом. Выход=142 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 35. 5-[(Z)-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид.

Его получали в соответствии с методикой примера 32 из 105 мг соответствующего амина. Выход=120 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 36. 5-[(Z)-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид.

Его получали в соответствии с методикой примера 33 из 105 мг соответствующего амина. Выход=127 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Пример 37. N-[2-Гидрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид.

Его получали в соответствии с методикой примера 34 из 105 мг соответствующего амина. Выход=141 мг оранжевого кристаллического твердого вещества.

Биологические примеры

Для обнаружения тех соединений, которые демонстрируют оптимальную степень желаемой активности, используют следующие анализы.

А. Методы анализа.

Следующие анализы могут быть использованы для определения уровня активности и действия различных соединений по настоящему изобретению на одну или более чем одну из РК. Для любой РК могут быть разработаны подобным же образом аналогичные анализы с использованием методик, хорошо известных в данной области техники.

Некоторые из анализов, описанных здесь, осуществляют в формате ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Sandwich Assay, твердофазный иммуноферментный анализ) (Voller, et al., 1980, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", Manual of Clinical Immunology, 2d ed., Rose and Friedman, Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C., pp. 359-371). Общая процедура состоит в следующем: соединение вводят в клетки, экспрессирующие тестируемую киназу, либо естественным образом, либо рекомбинантным, в течение выбранного периода времени, после истечения которого, если тестируемая киназа представляет собой рецептор, добавляют лиганд, про который известно, что он активирует рецептор. Клетки лизируют и лизат переносят в лунки планшета для ELISA, предварительно покрытые специфичным антителом, распознающим субстрат реакции ферментативного фосфорилирования. Компоненты клеточного лизата, не являющиеся субстратом, вымывают и количество фосфорилирования на субстрате определяют с помощью антитела, специфически распознающего фосфотирозин, по сравнению с контрольными клетками, которые не подвергали контакту с тестируемым соединением.

Протоколы, предпочтительные в настоящем изобретении для проведения ELISA-экспериментов для конкретных РК, предложены ниже. Однако адаптация этих протоколов для определения активности соединений против других RTK, а также для СТК и STK входит в пределы знаний специалистов в данной области. Другие анализы, описанные здесь, измеряют количество ДНК, производимой в ответ на активацию тестируемой киназы, что представляет собой общую меру пролиферативного ответа. Общая процедура для этого анализа представляет собой следующее: соединение вводят в клетки, экспрессирующие тестируемую киназу, либо естественным образом, либо рекомбинантным, в течение выбранного периода времени, по прошествии которого, если тестируемая киназа представляет собой рецептор, добавляют лиганд, про который известно, что он активирует этот рецептор. После инкубации, по меньшей мере, в течение ночи добавляют ДНК-метящий реагент, такой как 5-бромдезоксисуридин (BrdU) или H^3 -тимидин. Количество меченой ДНК определяют с помощью либо анти-BrdU-антитела, либо путем измерения радиоактивности, и сравнивают с контрольными клетками, которые не подвергали контакту с тестируемым соединением.

Биоанализ GST-FLK-1.

С помощью этого анализа исследуют тирозинкиназную активность GST-FLK-1 на poly(glu, tyr)пептидах.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ELISA Corning (каталог Corning № 5805-96).
2. Poly(glu, tyr) 4:1, лиофилизат (каталог Sigma # P0275).
3. Приготовление планшетов для анализа, покрытых poly(glu, tyr) (pEY): наносят покрытие с использованием 2 мкг/лунку poly(glu, tyr) (pEY) в 100 мкл PBS (физиологический раствор, забуференный фосфатом), выдерживают при комнатной температуре в течение 2 ч или при 4°C в течение ночи. Хорошо накрывают планшеты для предупреждения испарения.
4. PBS-буфер: для 1 л смешивают 0,2 г KH_2PO_4 , 1,15 г Na_2HPO_4 , 0,2 г KCl и 8 г NaCl в приблизительно 900 мл dH_2O (деионизованная вода). Когда все реагенты растворены, подводят pH до 7,2 с помощью HCl. Доводят общий объем до 1 л, используя dH_2O .
5. PBST-буфер: к 1 л PBS-буфера добавляют 1,0 мл Tween-20.
6. TBV - блокирующий буфер: для 1 л смешивают 1,21 г Трис, 8,77 г NaCl, 1 мл TWEEN-20 в приблизительно 900 мл dH_2O . Подводят pH до 7,2 с помощью HCl. Добавляют 10 г BSA (бычий сывороточный альбумин), перемешивают для растворения. Доводят общий объем до 1 л с помощью dH_2O . Фильтруют для удаления частиц веществ.
7. 1% BSA в PBS: для приготовления 1х рабочего раствора добавляют 10 г BSA к приблизительно 990 мл PBS-буфера, перемешивают для растворения. Доводят общий объем до 1 л с помощью PBS-буфера, фильтруют для удаления частиц веществ.
8. 50 mM Hepes pH 7,5.
9. GST-Flk1cd, очищенная из sf9 рекомбинантной бакуловирусной трансформации (SUGEN, Inc.).
10. 4% DMSO в dH_2O .
11. 10 mM АТФ в dH_2O .
12. 40 mM $MnCl_2$.
13. Буфер для разведения киназ (KDB): смешивают 10 мл Hepes (pH 7,5), 1 мл 5M NaCl, 40 мкл 100 mM ортованадата натрия и 0,4 мл 5% BSA в dH_2O с 88,56 мл dH_2O .
14. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC, Applied Scientific Catalog № AS-72092.
15. EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота): смешивают 14,12 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) с приблизительно 70 мл dH_2O . Добавляют 10н. NaOH до тех пор, пока EDTA не растворится. Подводят pH до 8. Доводят общий объем до 100 мл с помощью dH_2O .
16. 1° буфер для разведения антител: смешивают 10 мл 5% BSA в PBS-буфере с 89,5 мл TBST (забуференный Трисом изотонический раствор HCl, содержащий Tween-20).
17. Антифосфотирозинное моноклональное антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).
18. 2,2'-Азинобис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновая кислота (ABTS, Moss, номер по каталогу ABST).
19. 10% SDS (додецилсульфат натрия).

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты для ELISA Corning 2 мкг полиЕУ-пептида в стерильном PBS, как описано на стадии 3 в "Материалах и реагентах".
2. Удаляют несвязавшуюся жидкость из лунок путем переворачивания планшета. Промывают 1 раз TBST. Похлопывают планшетом по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
3. Добавляют 100 мкл 1% BSA в PBS в каждую лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 1 ч при комнатной температуре.
4. Повторяют стадию 2.
5. Промывают лунки 50 mM HEPES (pH 7,5) (150 мкл/лунку).
6. Разбавляют тестируемое соединение dH₂O/4% DMSO в 4-кратной желаемой конечной концентрации в анализе в 96-луночных полипропиленовых планшетах.
7. Добавляют 25 мкл разбавленного тестируемого соединения в планшет для ELISA. В контрольные лунки помещают 25 мкл dH₂O/4% DMSO.
8. Добавляют 25 мкл 40 mM MnCl₂ с 4x АТФ (2 мкМ) в каждую лунку.
9. Добавляют 25 мкл 0,5 M EDTA в лунки с негативным контролем.
10. Разбавляют GST-Flk1 до 0,005 мкг (5 нг)/лунку с помощью KDB.
11. Добавляют 50 мкл разбавленного фермента в каждую лунку.
12. Инкубируют, при встряхивании, в течение 15 мин при комнатной температуре.
13. Останавливают реакцию добавлением 50 мкл 250 mM EDTA (pH 8,0).
14. Промывают 3x, используя TBST, и похлопывают планшетом по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
15. Добавляют 100 мкл на лунку конъюгата антифосфотирозин-HRP, разведение 1:5000 в буфере для разведения антител. Инкубируют, при встряхивании, в течение 90 мин при комнатной температуре.
16. Промывают как на стадии 14.
17. В каждую лунку добавляют 100 мкл раствора ABTS комнатной температуры.
18. Инкубируют, при встряхивании, в течение 10-15 мин при комнатной температуре. Удаляют любые пузырьки.
19. Останавливают реакцию добавлением 20 мкл 10% SDS в каждую лунку.
20. Считывают результаты на устройстве для чтения планшетов для ELISA Dynatech MR7000 с тест-фильтром при 410 нм и эталонным фильтром при 630 нм.

Биоанализ РYК2.

Этот анализ используют для измерения *in vitro* киназной активности HA-эпитоп-меченой полноразмерной рyк2 (FL.pуk2-HA) в ELISA-анализе.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ELISA Corning.
2. 12CA5 моноклональное анти-HA-антитело (SUGEN, Inc.).
3. PBS (солевой раствор Дульбекко, забуференный фосфатом (каталог Gibco № 450-1300EB)).
4. TBST-буфер: для 1 л смешивают 8,766 г NaCl, 6,057 г Трис и 1 мл 0,1% Тритон X-100 приблизительно в 900 мл dH₂O. Подводят pH до 7,2, доводят объем до 1 л.
5. Блокирующий буфер: для 1 л смешивают 100 г 10% BSA, 12,1 г 100 mM Трис, 58,44 г 1M NaCl и 10 мл 1% TWEEN-20.
6. FL.pуk2-HA из sf9 клеточных лизатов (SUGEN, Inc.).
7. 4% DMSO в MilliQue H₂O.
8. 10 mM АТФ в dH₂O.
9. 1M MnCl₂.
10. 1M MgCl₂.
11. 1M дитиотрейтол (DTT).
12. 10x киназный буфер фосфорилирования: смешивают 5,0 мл 1M Hepes (pH 7,5), 0,2 мл 1M MnCl₂, 1,0 мл 1M MgCl₂, 1,0 мл 10% Тритона X-100 в 2,8 мл dH₂O. Непосредственно перед применением добавляют 0,1 мл 1M DTT.
13. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC.
14. 500 mM EDTA в dH₂O.
15. Буфер для разведения антитела: для 100 мл: 1 мл 5% BSA/PBS и 1 мл 10% Tween-20 в 88 мл TBS.
16. HRP-конъюгированный анти-Ptyr PY99, Santa Cruz Biotech номер по каталогу SC-7020.
17. ABTS (2,2'-азино-ди-(3-этилбензотиазолин)-6-сульфоукислота), Moss, номер по каталогу ABST-2000.
18. 10% SDS.

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты для ELISA Corning 0,5 мкг на лунку 12CA5 анти-HA-антителом в 100 мкл PBS. Хранят в течение ночи при 4°C.

2. Удаляют несвязавшееся НА-антитело из лунок путем переворачивания планшета. Промывают планшет dH₂O. Похлопывают планшетою по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
3. Добавляют 150 мкл блокирующего буфера в каждую лунку. Инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре.
4. Промывают планшет 4х TBS-T.
5. Разбавляют лизат PBS (1,5 мкг лизата/100 мкл PBS).
6. Добавляют 100 мкл разбавленного лизата в каждую лунку. Встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч.
7. Промывают, как на стадии 4.
8. Добавляют 50 мкл 2х киназного буфера в планшеты для ELISA, содержащие захваченный рек2-НА.
9. Добавляют 25 мкл 400 мкМ тестируемого соединения в 4% DMSO в каждую лунку. Для контрольных лунок используют лишь 4% DMSO.
10. Добавляют 25 мкл 0,5М EDTA в лунки с негативным контролем.
11. Добавляют 25 мкл 20 мкМ АТФ во все лунки. Инкубируют при встряхивании в течение 10 мин.
12. Останавливают реакцию добавлением 25 мкл 500 мМ EDTA (pH 8,0) во все лунки.
13. Промывают, как на стадии 4.
14. Добавляют 100 мкл HRP-конъюгированного анти-Ртг, разведенного 1:6000 в буфере для разведения антитела, в каждую лунку. Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.
15. Промывают планшет 3х TBST и 1х PBS.
16. Добавляют 100 мкл раствора ABST в каждую лунку.
17. Если необходимо, останавливают развитие реакции добавлением 20 мкл 10% SDS в каждую лунку.
18. Читают планшет на устройстве для чтения планшетов для ELISA с тест-фильтром при 410 нМ и эталонным фильтром при 630 нМ.

Биоанализ FGFR1.

Этот анализ используют для измерения киназной активности *in vitro* FGF1-R методом ELISA-анализа.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ELISA Costar (каталог Corning № 3369).
2. Poly(glu, tyr) (каталог Sigma № P0275).
3. PBS (каталог Gibco № 450-1300EB).
4. 50 мМ буферный раствор Hepes.
5. Блокирующий буфер (5% BSA/PBS).
6. Очищенная GST-FGFR1 (SUGEN, Inc.).
7. Буфер для разведения киназы: смешивают 500 мкл 1М Hepes (GIBCO), 20 мкл 5% BSA/PBS, 10 мкл 100 мМ ортованадата натрия и 50 мкл 5М NaCl.
8. 10 мМ АТФ.
9. АТФ/MnCl₂ смесь фосфорилирования: смешивают 20 мкл АТФ, 400 мкл 1М MnCl₂ и 9,56 мл dH₂O.
10. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC (Applied Scientific Catalog № AS-72092).
11. 0,5М EDTA.
12. 0,05% TBST. Добавляют 500 мкл TWEEN к 1 л TBS.
13. Кроличья поликлональная антифосфотирозинная сыворотка (SUGEN, Inc.).
14. Пероксидазный конъюгат козьего антикроличьего IgG (Biosource, номер по каталогу ALI0404).
15. Раствор ABTS.
16. Раствор ABTS/H₂O₂.

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты Costar для ELISA 1 мкг на лунку poly(glu, tyr) в 100 мкл PBS. Хранят в течение ночи при 4°C.
2. Промывают покрытые планшеты 1 раз PBS.
3. Добавляют 150 мкл 5% BSA/PBS блокирующего буфера в каждую лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 1 ч при комнатной температуре.
4. Промывают планшет 2х PBS, затем 1 раз 50 мМ Hepes. Похлопывают планшетами по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости и пузырьков.
5. Добавляют 25 мкл 0,4 мМ тестируемого соединения в 4% DMSO или один 4% DMSO (контроли) в планшет.
6. Разводят очищенную GST-FGFR1 в буфере для разведения киназы (5 нг киназы/50 мкл KDB/лунку).
7. Добавляют 50 мкл разбавленной киназы в каждую лунку.
8. Начинают киназную реакцию добавлением 25 мкл/лунку свежеприготовленного АТФ/Mn⁺⁺ (0,4 мл 1М MnCl₂, 40 мкл 10 мМ АТФ, 9,56 мл dH₂O), свежеприготовленный.
9. Это быстрая киназная реакция, и она должна быть остановлена 25 мкл 0,5М EDTA подобным добавлением АТФ образцом.
10. Промывают планшет 4х свежим TBST.

11. Готовят буфер для разведения антитела (antibody dilution buffer, ADB): на 50 мл: смешивают 5 мл 5% BSA, 250 мкл 5% молока и 50 мкл 100 мМ ванадата натрия, доводят до конечного объема 0,05% TBST.
12. Добавляют 100 мкл на лунку антифосфотирина (разведение 1:10000 в ADB). Инкубируют, при встряхивании, в течение 1 ч при комнатной температуре.
13. Промывают, как на стадии 10.
14. Добавляют 100 мкл на лунку пероксидазного конъюгата козьего антикроличьего IgG Biosource (разведение 1:6000 в ADB). Инкубируют, при встряхивании, в течение 1 ч при комнатной температуре.
15. Промывают, как на стадии 10, а затем PBS для удаления пузырьков и избытка TWEEN.
16. Добавляют 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂ в каждую лунку.
17. Инкубируют, при встряхивании, в течение 10-20 мин. Удаляют любые пузырьки.
18. Считывают результаты анализа на устройстве Dynatech MR7000 для чтения планшетов для ELISA с тест-фильтром при 410 нМ и эталонным фильтром при 630 нМ.

Биоанализ EGFR.

Этот анализ используют для киназной активности EGFR in vitro в ELISA-анализе.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ELISA Corning.
2. SUMO1 моноклональное анти-EGFR-антитело (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. TBST-буфер.
5. Блокирующий буфер: для 100 мл смешивают 5,0 г Carnation Instant Non-fat Milk[®] со 100 мл PBS.
6. Лизат клеток A431 (SUGEN, Inc.).
7. TBS-буфер.
8. TBS + 10% DMSO: для 1 л смешивают 1,514 г Трис, 2,192 г NaCl и 25 мл DMSO; доводят до общего объема 1 л с помощью dH₂O.
9. АТФ (аденозин-5'-трифосфат, из лошадиной мышцы, номер по каталогу Sigma A-5394), 1,0 мМ раствор в dH₂O. Этот реагент должен быть приготовлен непосредственно перед применением и храниться на льду.
10. 1,0 мМ MnCl₂.
11. Смесь фосфорилирования АТФ/MnCl₂: для приготовления 10 мл смешивают 300 мкл 1 мМ АТФ, 500 мкл MnCl₂ и 9,2 мл dH₂O. Готовят непосредственно перед применением, хранят на льду.
12. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC.
13. EDTA.
14. Кроличья поликлональная антифосфотириновая сыворотка (SUGEN, Inc.).
15. Пероксидазный конъюгат козьего антикроличьего IgG (номер по каталогу Biosource ALI0404).
16. ABTS.
17. 30% пероксид водорода.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0,2M HCl.

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты для ELISA Corning 0,5 мкг SUMO1 в 100 мкл PBS на лунку, хранят в течение ночи при 4°C.
2. Удаляют несвязавшееся SUMO1 из лунок путем переворачивания планшета для удаления жидкости. Промывают 1х dH₂O. Похлопывают планшетами по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
3. Добавляют 150 мкл блокирующего буфера в каждую лунку. Инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре.
4. Промывают планшеты 3х деионизированной водой, затем 1 раз TBST. Похлопывают планшетами по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости и пузырьков.
5. Разбавляют лизат PBS (7 мкл лизата/100 мкл PBS).
6. Добавляют 100 мкл разбавленного лизата в каждую лунку. Встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч.
7. Промывают планшеты, как на стадии 4 выше.
8. Добавляют 120 мкл TBS в планшеты для ELISA, содержащие захваченный EGFR.
9. Разбавляют тестируемое соединение в соотношении 1:10 в TBS, помещают в лунку.
10. Добавляют 13,5 мкл разбавленного тестируемого соединения в планшеты для ELISA. В контрольные лунки добавляют 13,5 мкл TBS в 10% DMSO.
11. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30 мин при комнатной температуре.
12. Добавляют 15 мкл смеси фосфорилирования во все лунки, за исключением лунок с негативным контролем. Конечный объем в лунке должен составлять приблизительно 150 мкл с конечной концентрацией АТФ/5 мМ MnCl₂ в каждой лунке, равной 3 мМ. Инкубируют при встряхивании в течение 5 мин.
13. Останавливают реакцию добавлением 16,5 мкл раствора EDTA при встряхивании. Встряхивают в течение дополнительной минуты.
14. Промывают 4х деионизированной водой, 2х TBST.

15. Добавляют 100 мкл антифосфотирина (разведение 1:3000 в TBST) на лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30-45 мин при комнатной температуре.
16. Промывают, как на стадии 4 выше.
17. Добавляют 100 мкл пероксидазного конъюгата козьего антикроличьего IgG Biosource (разведение 1:2000 в TBST) в каждую лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30 мин при комнатной температуре.
18. Промывают, как на стадии 4 выше.
19. Добавляют 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂ в каждую лунку.
20. Инкубируют 5-10 мин при встряхивании. Удаляют любые пузырьки.
21. Если необходимо, останавливают реакцию добавлением 100 мкл 0,2M HCl на лунку.
22. Считывают результаты анализа на устройстве Dynatech MR7000 для чтения планшетов для ELISA: тест-фильтр - при 410 нМ, эталонный фильтр - при 630 нМ.

Биоанализ PDGFR.

Этот анализ используют для киназной активности FGF1-R in vitro в ELISA-анализе.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ELISA Corning.
2. 28D4C10 моноклональное анти-PDGFR-антитело (SUGEN, Inc.).
3. PBS.
4. TBST-буфер.
5. Блокирующий буфер (такой же, как для биоанализа EGFR).
6. Лизат NIH 3T3 клеток, экспрессирующих PDGFR- β (SUGEN, Inc.).
7. TBS-буфер.
8. TBS+ 10% DMSO.
9. АТФ.
10. MnCl₂.
11. Киназная буферная смесь фосфорилирования: для 10 мл смешивают 250 мкл 1M Трис, 200 мкл 5M NaCl, 100 мкл 1M MnCl₂ и 50 мкл 100 мМ Тритона X-100 в достаточном количестве dH₂O для приготовления 10 мл.
12. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC.
13. EDTA.
14. Кроличья поликлональная антифосфотириновая сыворотка (SUGEN, Inc.).
15. Пероксидазный конъюгат козьего антикроличьего IgG (Biosource, номер по каталогу ALI0404).
16. ABTS.
17. Пероксид водорода, 30% раствор.
18. ABTS/H₂O₂.
19. 0,2 M HCl.

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты для ELISA Corning 0,5 мкг 28D4C10 в 100 мкл PBS на лунку, хранят в течение ночи при 4°C.
2. Удаляют несвязавшееся 28D4C10 из лунок путем переворачивания планшета для удаления жидкости. Промывают 1x dH₂O. Похлопывают планшетом по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
3. Добавляют 150 мкл блокирующего буфера в каждую лунку. Инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании.
4. Промывают планшеты 3x деионизированной водой, затем 1 раз TBST. Похлопывают планшетом по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости и пузырьков.
5. Разбавляют лизат HNTG (10 мкл лизата/100 мкл HNTG).
6. Добавляют 100 мкл разбавленного лизата в каждую лунку. Встряхивают при комнатной температуре в течение 60 мин.
7. Промывают планшеты, как описано на стадии 4.
8. Добавляют 80 мкл рабочей киназной буферной смеси в планшеты для ELISA, содержащие захваченный PDGFR.
9. Разбавляют тестируемое соединение в соотношении 1:10 в TBS в 96-луночных полипропиленовых планшетах.
10. Добавляют 10 мкл разбавленного тестируемого соединения в планшет для ELISA. В контрольные лунки добавляют 10 мкл TBS + 10% DMSO. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30 мин при комнатной температуре.
11. Добавляют 10 мкл АТФ непосредственно во все лунки, за исключением лунок с негативным контролем (конечный объем в лунке должен составлять приблизительно 100 мкл с 20 мкМ АТФ в каждой лунке). Инкубируют 30 мин при встряхивании.
12. Останавливают реакцию добавлением 10 мкл раствора EDTA в каждую лунку.
13. Промывают 4x деионизированной водой, дважды - TBST.

14. Добавляют 100 мкл антифосфотирина (разведение 1:3000 в TBST) на лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30-45 мин при комнатной температуре.
15. Промывают, как на стадии 4.
16. Добавляют 100 мкл пероксидазного конъюгата козьего антикроличьего IgG Biosource (разведение 1:2000 в TBST) в каждую лунку. Инкубируют, при встряхивании, в течение 30 мин при комнатной температуре.
17. Промывают, как на стадии 4.
18. Добавляют 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂ в каждую лунку.
19. Инкубируют 10-30 мин при встряхивании. Удаляют любые пузырьки.
20. Если необходимо, останавливают реакцию добавлением 100 мкл 0,2 М HCl на лунку.
21. Считывают результаты анализа на устройстве для чтения планшетов для ELISA Dynatech MR7000 с тест-фильтром при 410 нМ и эталонным фильтром - при 630 нМ.

Анализ клеточной HER-2 киназы.

Этот анализ используют для измерения киназной активности HER-2 в целых клетках в формате ELISA.

Материалы и реагенты

1. DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла) (GIBCO, номер по каталогу 11965-092).
2. Фетальная бычья сыворотка (FBS, номер по каталогу GIBCO 16000-044), термоинактивированная в водяной бане в течение 30 мин при 56°C.
3. Трипсин (GIBCO, номер по каталогу 25200-056).
4. L-Глутамин (GIBCO, номер по каталогу 25030-081).
5. HEPES (GIBCO, номер по каталогу 15630-080).
6. Ростовая среда. Смешивают 500 мл DMEM, 55 мл термоинактивированной FBS, 10 мл HEPES и 5,5 мл L-глутамина.
7. Голодная среда. Смешивают 500 мл DMEM, 2,5 мл термоинактивированной FBS, 10 мл HEPES и 5,5 мл L-глутамина.
8. PBS.
9. Плоскостонные 96-луночные микротитрационные планшеты для культуры тканей (Corning, номер по каталогу 25860).
10. 15 см чашки для культуры тканей (Corning, номер по каталогу 08757148).
11. 96-луночные планшеты для ELISA Corning.
12. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC.
13. Картриджи переноса Costar для Transtar 96 (Costar, номер по каталогу 7610).
14. SUMO1: моноклональное анти-EGFR-антитело (SUGEN, Inc.).
15. TBST-буфер.
16. Блокирующий буфер: 5% Carnation Instant Milk® в PBS.
17. EGF лиганд: EGF-201, Shinko American, Japan.
- Суспендируют порошок в 100 мкл 10 мМ HCl. Добавляют 100 мкл мМ NaOH. Добавляют 800 мкл PBS и переносят в пробирки Eppendorf, хранят при -20°C до тех пор, пока не будет готово к применению.
18. HNTG-буфер для лизиса. Для исходного 5x HNTG смешивают 23,83 г Hepes, 43,83 г NaCl, 500 мл глицерина, 100 мл Тритона X-100 и достаточное количество dH₂O для приготовления 1 л общего раствора. Для 1x HNTG* смешивают 2 мл HNTG, 100 мкл 0,1М Na₃VO₄, 250 мкл 0,2М Na₄P₂O₇ и 100 мкл EDTA.
19. EDTA.
20. Na₃VO₄. Для приготовления исходного раствора смешивают 1,84 г Na₃VO₄ с 90 мл dH₂O. Подводят pH до 10. Варят в микроволновой печи в течение 1 мин (раствор становится прозрачным). Охлаждают до комнатной температуры. Подводят pH до 10. Повторяют цикл нагревания/охлаждения до тех пор, пока pH не останется на 10.
21. 200 мМ Na₄P₂O₇.
22. Кроличья поликлональная антисыворотка, специфичная к фосфотириназу (анти-Ptyr-антитело, SUGEN, Inc.).
23. Афинноочищенная антисыворотка, антитело, представляющее собой козий антикроличий IgG, пероксидазный конъюгат (Biosource, номер по каталогу ALI0404).
24. ABTS раствор.
25. 30% раствор пероксида водорода.
26. ABTS/H₂O₂.
27. 0,2М HCl.

Методика

1. Покрывают 96-луночные планшеты для ELISA Corning SUMO1 в концентрации 1,0 мкг на лунку в PBS, 100 мкл конечный объем/лунку. Хранят в течение ночи при 4°C.
2. В день применения удаляют покрывающий буфер и промывают планшеты 3 раза dH₂O и 1 раз TBST-буфером. Все промывки в этом анализе должны быть сделаны этим способом, если не указано иначе.

3. Добавляют 100 мкл блокирующего буфера в каждую лунку. Инкубируют планшет, при встряхивании, в течение 30 мин при комнатной температуре. Непосредственно перед применением планшет промывают.
4. Используют EGF/HER-2 химера/3T3-C7 клеточную линию для этого анализа.
5. Выбирают чашки, имеющие 80-90% конфлоенцию. Собирают клетки путем трипсинизации и центрифугирования при 1000 об./мин при комнатной температуре в течение 5 мин.
6. Ресуспенсируют клетки в голодной среде и подсчитывают с помощью триптанового синего. Необходимо жизнеспособность выше 90%. Высевают клетки в голодную среду с плотностью 2500 клеток на лунку, 90 мкл на лунку, в 96-луночном микротитрационном планшете. Инкубируют высеянные клетки в течение ночи при 37° в атмосфере 5% CO₂.
7. Начинают анализ через 2 дня после посева.
8. Тестируемые соединения растворяют в 4% DMSO. Образцы затем дополнительно разводят непосредственно на планшетах голодной DMEM. Обычно это разведение должно быть 1:10 или больше. Все лунки затем переносят на клеточный планшет в дополнительном разведении 1:10, 10 мкл образца и среды в 90 мкл голодной среды. Конечная концентрация DMSO должна быть 1% или ниже. Стандартное серийное разведение может также быть использовано.
9. Инкубируют в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 2 ч.
10. Готовят EGF лиганд путем разведения исходного EGF (16,5 мкМ) в теплой DMEM до 150 нМ.
11. Готовят свежий HNTG* в количестве, достаточном для 100 мкл на лунку, помещают на лед.
12. Через 2 ч инкубации с тестируемым соединением добавляют приготовленный EGF лиганд к клеткам, 50 мкл на лунку, для конечной концентрации 50 нМ. Лунки с позитивным контролем получают то же самое количество EGF. Негативные контроли не получают EGF. Инкубируют при 37°C в течение 10 мин.
13. Удаляют тестируемое соединение, EGF и DMEM. Промывают клетки 1 раз PBS.
14. Переносят HNTG* к клеткам, 100 мкл на лунку. Помещают на лед на 5 мин. Тем временем удаляют блокирующий буфер из планшета для ELISA и промывают.
15. Соскабливают клетки с планшета с помощью микропипетки и гомогенизируют клеточный материал путем повторяющегося отсасывания и диспергирования HNTG*-буфера для лизиса. Переносят лизат в сенсibiliзирoванные, блокирoванные, промытые планшеты для ELISA. Либо используют картридж переноса Costar для переноса лизата на планшет.
16. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 1 ч.
17. Удаляют лизат, промывают. Переносят свежеразведенное анти-Ptyг-антитело (1:3000 в TBST) на планшет для ELISA, 100 мкл на лунку.
18. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 30 мин.
19. Удаляют анти-Ptyг-антитело, промывают. Переносят свежеразведенное антитело BIOSOURCE на планшет для ELISA (1:8000 в TBST, 100 мкл на лунку).
20. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 30 мин.
21. Удаляют антитело BIOSOURCE, промывают. Переносят свежеприготовленный раствор ABTS/H₂O₂ на планшет для ELISA, 100 мкл на лунку.
22. Инкубируют, при встряхивании, в течение 5-10 мин. Удаляют любые пузырьки.
23. Останавливают реакцию добавлением 100 мкл 0,2 М HCl на лунку.
24. Считывают результаты анализа на устройстве Dynatech MR7000 для чтения планшетов для ELISA с тест-фильтром, установленным при 410 нМ, и эталонным фильтром - при 630 нМ.

Анализ CDK2/циклина А.

Этот анализ используют для измерения *in vitro* серин/треонинкиназной активности cdk2/циклина А человека в анализе сцинтилляционной близости (SPA).

Материалы и реагенты

1. 96-луночные полиэтилентерепфталатные (гибкие) планшеты Wallac (номер по каталогу Wallac 1450-401).
2. Amersham Redivue [γ^{33} P] АТФ (номер АН 9968 по каталогу Amersham).
3. Покрытые стрептавидином поливинилтолуоловые SPA-гранулы Amersham (номер RPNQ0007 по каталогу Amersham). Гранулы должны быть разведены в PBS без магния или кальция, в концентрации 20 мг/мл.
4. Активированный ферментный комплекс cdk2/циклин А, очищенный из Sf9 клеток (SUGEN, Inc.).
5. Биотинилированный пептидный субстрат (Debtide). Пептид биотин-Х-РКTPKKAKKL растворяют в dH₂O в концентрации 5 мг/мл.
6. Смесь пептид/АТФ: для 10 мл смешивают 9,979 мл dH₂O, 0,00125 мл "холодной" АТФ, 0,010 мл Debtide и 0,010 мл γ^{33} P АТФ. Конечная концентрация на лунку должна составлять 0,5 мкМ "холодной" АТФ, 0,1 мкг Debtide и 0,2 мКи γ^{33} P АТФ.
7. Киназный буфер: для 10 мл смешивают 8,85 мл dH₂O, 0,625 мл Трис (pH 7,4), 0,25 мл 1М MgCl₂, 0,25 мл 10% NP40 и 0,025 мл 1М DTT, добавленного свежим непосредственно перед применением.
8. 10 мМ АТФ в dH₂O.
9. 1М Трис, pH подводят до 7,4 с помощью HCl.
10. 1М MgCl₂.

11. 1M DTT.
12. PBS (номер по каталогу Gibco 14190-144).
13. 0,5M EDTA.
14. Стоп-раствор: для 10 мл смешивают 9,25 мл PBS, 0,005 мл 100 мМ АТФ, 0,1 мл 0,5M EDTA, 0,1 мл 10% Тритона X-100 и 1,25 мл 20 мг/мл SPA-гранул.

Методика

1. Готовят растворы тестируемых соединений в 5% DMSO в концентрации 5х желаемой конечной концентрации. Добавляют 10 мкл в каждую лунку. В качестве негативных контролей используют 10 мкл одного 5% DMSO в лунках.
2. Разбавляют 5 мкл раствора cdk2/циклина А 2,1 мл 2х киназного буфера.
3. Добавляют 20 мкл фермента в каждую лунку.
4. Добавляют 10 мкл 0,5 М EDTA в лунки с негативным контролем.
5. Чтобы запустить киназную реакцию, добавляют 20 мкл смеси пептид/АТФ в каждую лунку. Инкубируют в течение 1 ч без встряхивания.
6. Добавляют 200 мкл стоп-раствора в каждую лунку.
7. Выдерживают по меньшей мере 10 мин.
8. Центрифугируют планшет при 2300 об./мин в течение 3-5 мин.
9. Считывают планшет с использованием Trilux или аналогичного устройства для чтения планшетов.

Анализ MET(метионин)-трансфосфорилирования.

Этот анализ используют для измерения уровней фосфотирозина на поли(глутаминовая кислота:тирозин (4:1)) субстрате как средство идентификации агонистов/антагонистов met-трансфосфорилирования субстрата.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты Corning для ELISA, номер по каталогу Corning 25805-96.
2. Poly(glu, tyr) 4:1, Sigma, номер по каталогу P 0275.
3. PBS, номер по каталогу Gibco 450-1300EB.
4. 50 мМ HEPES.
5. Блокирующий буфер: растворяют 25 г бычьего сывороточного альбумина, номер по каталогу Sigma A-7888, в 500 мл PBS, фильтруют через 4 мкм фильтр.
6. Очищенный GST(глутатион-S-трансфераза)-слитый белок, содержащий Met-киназный домен, Sugen, Inc.
7. TBST-буфер.
8. 10% водный (MilliQue H₂O) DMSO.
9. 10 мМ водный (dH₂O) аденозин-5'-трифосфат, номер по каталогу Sigma A-5394.
10. 2х буфер для разведения киназы: для 100 мл смешивают 10 мл 1М HEPES, pH 7,5, с 0,4 мл 5% BSA/PBS, 0,2 мл 0,1М ортованадата натрия и 1 мл 5М хлорида натрия в 88,4 мл dH₂O.
11. 4хАТФ реакционная смесь: для 10 мл смешивают 0,4 мл 1 М хлорида марганца и 0,02 мл 0,1М АТФ в 9,56 мл dH₂O.
12. 4х смесь негативных контролей: для 10 мл смешивают 0,4 мл 1М хлорида марганца в 9,6 мл dH₂O.
13. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC, № S-72092 в Applied Scientific Catalog.
14. 500 мМ EDTA.
15. Буфер для разведения антитела: для 100 мл смешивают 10 мл 5% BSA/PBS, 0,5 мл 5% Carnation Instant Milk® в PBS и 0,1 мл 0,1М ортованадата натрия в 88,4 мл TBST.
16. Кроличье поликлональное антифосфотирозинное антитело, Sugen, Inc.
17. Козье антикроличье антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена, Biosource, Inc.
18. ABTS раствор: для 1 л смешивают 19,21 г лимонной кислоты, 35,49 г Na₂HPO₄ и 500 мг ABTS с достаточным для приготовления 1 л количеством dH₂O.
19. ABTS/H₂O₂: смешивают 15 мл ABST раствора с 2 мкл H₂O₂ за 5 мин до использования.
20. 0,2M HCl.

Методика

1. Покрывают планшеты для ELISA 2 мкг poly(glu, tyr) в 100 мкл PBS, хранят в течение ночи при 4°C.
2. Блокируют планшеты 150 мкл 5% BSA/PBS в течение 60 мин.
3. Промывают планшет дважды PBS и 1 раз 50 мМ буфером HEPES, pH 7,4.
4. Добавляют 50 мкл разведенной киназы во все лунки. (Очищенную киназу разводят буфером для разведения киназы. Конечная концентрация должна составлять 10 нг/лунку.)
5. Добавляют 25 мкл тестируемого соединения (в 4% DMSO) либо только DMSO (4% в dH₂O) - для контролей - в планшет.
6. Инкубируют смесь киназы и соединения в течение 15 мин.
7. Добавляют 25 мкл 40 мМ MnCl₂ в лунки с негативным контролем.
8. Добавляют 25 мкл смеси АТФ/MnCl₂ во все остальные лунки (за исключением негативных контролей). Инкубируют в течение 5 мин.
9. Добавляют 25 мкл 500 мМ EDTA для остановки реакции.
10. Промывают планшет TBST 3х.

11. Добавляют 100 мкл кроличьего поликлонального анти-Ptyr, разведенного в соотношении 1:10000 буфером для разведения антитела, в каждую лунку. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 1 ч.

12. Промывают планшеты TBST 3х.

13. Разводят HRP-конъюгированное антикроличье антитело Biosource буфером для разведения антитела в соотношении 1:6000. Добавляют 100 мкл на лунку и инкубируют при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 ч.

14. Промывают планшеты 1х PBS.

15. Добавляют 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂ в каждую лунку.

16. Если необходимо, останавливают развитие реакции добавлением 100 мкл 0,2 М HCl на лунку.

17. Прочитывают планшеты на устройстве Dynatech MR7000 для чтения планшетов для ELISA с тест-фильтром при 410 нМ и эталонным фильтром при 630 нМ.

Анализ IGF-1-трансфосфорилирования.

Этот анализ используют для измерения уровня фосфотирозина в поли(глутаминовая кислота:тирозин (4:1)) для идентификации агонистов/антагонистов *gst* - IGF-I - трансфосфорилирования субстрата.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты Corning для ELISA.
2. Poly(glu, tyr) (4:1), Sigma, номер по каталогу P 0275.
3. PBS, номер по каталогу Gibco 450-1300EB.
4. 50 мМ HEPES.
5. Блокирующий буфер TBB: для 1 л смешивают 100 г BSA, 12,1 г Трис (pH 7,5), 58,44 г хлорида натрия и 10 мл 1% TWEEN-20.
6. Очищенный GST-слитой белок, содержащий IGF-I-киназный домен (Sugen, Inc.).
7. TBST буфер: для 1 л смешивают 6,057 г Трис, 8,766 г хлорида натрия и 0,5 мл TWEEN-20 с достаточным для приготовления 1 л количеством dH₂O.
8. 4% DMSO в Milli-Q H₂O.
9. 10 мМ АТФ в dH₂O.
10. 2х буфер для разведения киназы: для 100 мл смешивают 10 мл 1М HEPES (pH 7,5), 0,4 мл 5% BSA в dH₂O, 0,2 мл 0,1М ортованадата натрия и 1 мл 5М хлорида натрия с достаточным для приготовления 100 мл количеством dH₂O.
11. 4х АТФ реакционная смесь: для 10 мл смешивают 0,4 мл 1М MnCl₂, 0,008 мл 0,01М АТФ и 9,56 мл dH₂O.
12. Смесь 4х негативных контролей: смешивают 0,4 мл 1М хлорида марганца в 9,60 мл dH₂O.
13. 96-луночные V-донные полипропиленовые планшеты NUNC.
14. 500 мМ EDTA в dH₂O.
15. Буфер для разведения антитела: для 100 мл смешивают 10 мл 5% BSA в PBS, 0,5 мл 5% Carnation Instant Non-fat Milk[®] в PBS и 0,1 мл 0,1М ортованадата натрия в 88,4 мл TBST.
16. Кроличье поликлональное антифосфотирозинное антитело, SUGEN, Inc.
17. Козье антикроличье антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP), Biosource.
18. ABTS-раствор.
20. ABTS/H₂O₂: смешивают 15 мл ABTS-раствора с 2 мкл H₂O₂ за 5 мин до использования.
21. 0,2М HCl в dH₂O.

Методика

1. Покрывают планшеты для ELISA 2 мкг/лунку poly(glu, tyr) с соотношением 4:1 (Sigma P0275) в 100 мкл PBS, хранят планшеты в течение ночи при 4°C.
2. Промывают планшеты 1 раз PBS.
3. Добавляют 100 мкл блокирующего буфера TBB в каждую лунку. Инкубируют планшеты в течение 1 ч при встряхивании при комнатной температуре.
4. Промывают планшеты 1 раз PBS, затем дважды 50 мМ буфером Hepes, pH 7,5.
5. Добавляют 25 мкл тестируемого соединения в 4% DMSO (полученного путем разведения исходного 10 мМ раствора тестируемого соединения в 100% DMSO добавлением dH₂O) в планшеты.
6. Во все лунки добавляют 10,0 нг *gst* - IGF-1 - киназы в 50 мкл буфера для разведения киназы.
7. Запускают киназную реакцию добавлением 25 мкл 4х АТФ реакционной смеси во все тестируемые лунки и лунки с позитивным контролем. Добавляют 25 мкл смеси 4х негативных контролей во все лунки негативного контроля. Инкубируют в течение 10 мин при встряхивании при комнатной температуре.
8. Добавляют 25 мкл 0,5 EDTA (pH 8,0) во все лунки.
9. Промывают планшеты 4х TBST буфером.
10. Добавляют кроличью поликлональную антифосфотирозинную антисыворотку в разведении 1:10000 в 100 мкл буфера для разведения антитела во все лунки. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 1 ч.
11. Промывают планшеты, как на стадии 9.

12. Добавляют 100 мкл антикроличьего антитела-HRP Biosource в разведении 1:10000 в буфере для разведения антитела во все лунки. Инкубируют, при встряхивании, при комнатной температуре в течение 1 ч.

13. Промывают планшет, как на стадии 9, с последующей одной промывкой PBS для уменьшения количества пузырьков и избытка Tween-20.

14. Проявляют добавлением 100 мкл/лунку ABTS/H₂O₂ в каждую лунку.

15. Примерно через 5 мин прочитывают на устройстве для чтения планшетов для ELISA с тест-фильтром при 410 нМ и эталонным фильтром при 630 нМ.

Анализы включения BRDU (5-бромдезоксимуридина).

В следующих анализах используют клетки, полученные инженерным путем, которые экспрессируют выбранный рецептор, и затем оценивают эффект интересующего соединения на активность лиганд-индуцированного синтеза ДНК путем определения включения BrdU в ДНК.

Следующие материалы, реагенты и методики являются общими для каждого из следующих анализов включения BrdU. Вариации в конкретных анализах отмечены.

Материалы и реагенты

1. Соответствующий лиганд.
2. Соответствующие клетки, полученные инженерным путем.
3. BrdU-метящий реагент: 10 мМ в PBS (pH 7,4) (Boehringer Mannheim, Germany).
4. FixDenat: фиксирующий раствор (готовый к применению) (Boehringer Mannheim, Germany).
5. Анти-BrdU-POD: мышинное моноклональное антитело, конъюгированное с пероксидазой (Boehringer Mannheim, Germany).
6. Субстратный раствор TMB: тетраметилбензидин (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).
7. PBS промывочный раствор: 1x PBS, pH 7,4.
8. Альбумин, бычий (BSA), фракция V порошка (Sigma Chemical Co., USA).

Общая методика

1. Клетки высевают в концентрации 8000 клеток/лунку в 10% CS, 2 мМ Gln в DMEM, в 96-луночном планшете. Клетки инкубируют в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

2. Через 24 ч клетки промывают PBS, а затем подвергают сывороточному голоданию в среде без сыворотки (0% CS DMEM с 0,1% BSA) в течение 24 ч.

3. На 3 сутки соответствующий лиганд и тестируемое соединение добавляют к клеткам одновременно. Лунки с негативным контролем получают DMEM, свободную от сыворотки, только с 0,1% BSA; клетки, представляющие собой позитивный контроль, получают лиганд, но не получают тестируемого соединения. Тестируемые соединения готовят в DMEM, свободной от сыворотки, с лигандом, в 96-луночном планшете, и серийно разводят с получением 7 тестируемых концентраций.

4. Через 18 ч активации лиганда добавляют разведенный BrdU-метящий реагент (1:100 в DMEM, 0,1% BSA) и клетки инкубируют с BrdU (конечная концентрация=10 мкМ) в течение 1,5 ч.

5. После инкубации с метящим реагентом среду удаляют путем декантирования и похлопывания перевернутым планшетом по бумажному полотенцу. Добавляют раствор FixDenat (50 мкл/лунку) и планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 45 мин на шейкере для планшетов.

6. FixDenat раствор тщательно удаляют путем декантирования и постукивания перевернутым планшетом по бумажному полотенцу. Добавляют молоко (5% дегидратированное молоко в PBS, 200 мкл/лунку) в качестве блокирующего раствора и планшеты инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере для планшетов.

7. Блокирующий раствор удаляют путем декантирования и лунки промывают 1 раз PBS. Раствор анти-BrdU-POD (разведение 1:200 в PBS, 1% BSA) добавляют (50 мкл/лунку) и планшеты инкубируют в течение 90 мин при комнатной температуре на шейкере для планшетов.

8. Конъюгат антитела тщательно удаляют путем декантирования и промывания лунок 5 раз PBS и планшеты сушат путем переворачивания и постукивания по бумажному полотенцу.

9. Субстратный раствор TMB добавляют (100 мкл/лунку) и инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре на шейкере для планшетов до тех пор, пока развитие окрашивания не будет достаточным для фотометрического обнаружения.

10. Оптическую плотность образцов измеряют при 410 нм (в режиме "двойной длины волны" с фильтром, считывающим при 490 нм, в качестве эталонной длины волны) на устройстве Dynatech для чтения планшетов для ELISA.

Анализ EGF-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (Toyoobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFRc7.

Анализ EGF-индуцированного Her-2-управляемого включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr с Her-2-киназным доменом).

Анализ EGF-индуцированного Her-4-управляемого включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr с Her-4-киназным доменом).

Анализ PDGF-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Человеческий PDGF B/B (Boehringer Mannheim, Germany).
2. 3T3/EGFRc7.

Анализ FGF-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Человеческий FGF2/bFGF (Gibco BRL, USA).
2. 3T3c7/EGFr.

Анализ IGF1-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Человеческий рекомбинантный (G511, Promega Corp., USA).
2. 3T3/IGF1r.

Анализ инсулин-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Инсулин, кристаллический, бычий, цинк (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

Анализ HGF (фактор роста гепатоцитов)-индуцированного включения BrdU.

Материалы и реагенты

1. Рекомбинантный человеческий HGF (номер по каталогу 249-HG, R&D Systems, Inc. USA).
2. ВхРС-3 клетки (ATCC CRL-1687).

Методика

1. Клетки высевают в концентрации 9000 клеток/лунку в среде RPMI, содержащей 10% FBS, в 96-луночном планшете. Клетки инкубируют в течение ночи при 37°C в 5% CO₂.

2. Через 24 ч клетки промывают PBS, а затем подвергают сывороточному голоданию в 100 мкл среде, свободной от сыворотки, (RPMI с 0,1% BSA) в течение 24 ч.

3. На 3 сутки 25 мкл, содержащие лиганд (приготовленный в концентрации 1 мкг/мл в RPMI, содержащей 0,1% BSA; конечная концентрация HGF составляет 200 нг/мл) и тестируемые соединения, добавляют к клеткам. Лунки с негативным контролем получают 25 мкл RPMI, свободной от сыворотки и содержащей только 0,1% BSA; клетки, представляющие собой позитивный контроль, получают лиганд (HGF), но не получают тестируемого соединения. Тестируемые соединения готовят в 5-кратной от конечной концентрации в свободной от сыворотки RPMI с лигандом, в 96-луночном планшете, и серийно разводят с получением 7 тестируемых концентраций. Обычно самая высокая конечная концентрация тестируемого соединения составляет 100 мкМ, и используют разведения 1:3 (то есть диапазон конечной концентрации тестируемого соединения составляет 0,137-100 мкМ).

4. Через 18 ч активации лиганда 12,5 мкл разведенного BrdU-метящего реагента (1:100 в RPMI, 0,1% BSA) добавляют в каждую лунку и клетки инкубируют с BrdU (конечная концентрация составляет 10 мкМ) в течение 1 ч.

5. Так же, как в общей методике.

6. Так же, как в общей методике.

7. Блокирующий раствор удаляют путем декантирования и лунки промывают 1 раз PBS. Раствор анти-BrdU-POD (разведение 1:100 в PBS, 1% BSA) добавляют (100 мкл/лунку) и планшет инкубируют в течение 90 мин при комнатной температуре на шейкере для планшетов.

8. Так же, как в общей методике.

9. Так же, как в общей методике.

10. Так же, как в общей методике.

Анализ HUV-EC-C.

Этот анализ используют для измерения активности соединения против PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF или Flk-1/KDR, все из которых естественным образом экспрессируются HUV-EC клетками.

Сутки 0.

1. Промывают и трипсинизируют клетки HUV-EC-C (человеческие эндотелиальные клетки пупочной вены (Американская коллекция типовых культур, номер по каталогу 1730 CRL)). Промывают физиологическим раствором, забуференным фосфатом Дульбекко (D-PBS, получен от Gibco BRL, номер по каталогу 14190-029), 2 раза в количестве примерно 1 мл/10 см² колбы для культивирования тканей. Трипсинизируют 0,05% трипсин-EDTA в неферментативном растворе клеточной диссоциации (Sigma Chemical Company, номер по каталогу C-1544). 0,05% Трипсин готовят разведением 0,25% трипсина/1 mM EDTA (Gibco, номер по каталогу 25200-049) в растворе клеточной диссоциации. Трипсинизируют примерно 1 мл/25-30 см² колбы для культивирования тканей в течение примерно 5 мин при 37°C. После того как клетки отделились от колбы, добавляют равный объем среды для анализа и переносят в 50 мл стерильную центрифужную пробирку (Fisher Scientific, номер по каталогу 05-539-6).

2. Промывают клетки примерно 35 мл среды для анализа в 50 мл стерильной центрифужной пробирке путем добавления среды для анализа, центрифугируют в течение 10 мин при приблизительно 200x g, отсасывают супернатант и ресуспендируют в 35 мл D-PBS. Повторяют промывку D-PBS еще 2 раза, ресуспендируют клетки примерно в 1 мл среды для анализа/15 см² колбы для культивирования тканей. Среда для анализа состоит из среды F12K (Gibco BRL, номер по каталогу 21127-014) и 0,5% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки. Подсчитывают клетки с помощью Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) и добавляют среду для анализа к клеткам для достижения концентрации 0,8-1,0x10⁵ клеток/мл.

3. Клетки добавляют в плашки 96-луночных плоскодонных планшетов в концентрации 100 мкл/лунку или 0,8-1,0x10⁴ клеток/лунку, инкубируют ~24 ч при 37°C, 5% CO₂.

Сутки 1.

1. Делают двухкратные титрования тестируемого соединения в отдельных 96-луночных планшетах, обычно от 50 до 0 мкМ. Используют ту же самую среду для анализа, которая упомянута для суток 0, стадии 2, выше. Титрования делают путем добавления 90 мкл/лунку тестируемого соединения в концентрации 200 мкМ (4x-кратная конечная концентрация в лунке) в верхнюю лунку отдельной колонки планшета. Поскольку исходный раствор тестируемого соединения составляет обычно 20 mM в DMSO, 200 мкМ концентрация лекарства содержит 2% DMSO.

Разбавитель, добавленный к 2% DMSO в среде для анализа (F12K + 0,5% фетальная телячья сыворотка), используют в качестве разбавителя для титровании тестируемого соединения, для того чтобы разбавить тестируемое соединение, но сохранить концентрацию DMSO постоянной. Добавляют этот разбавитель в оставшиеся лунки в колонке в количестве 60 мкл/лунку. Отбирают 60 мкл из 120 мкл 200 мкМ-разведения тестируемого соединения в верхней лунке колонки и смешивают с 60 мкл во второй лунке колонки. Отбирают 60 мкл из этой лунки и смешивают с 60 мкл в третьей лунке этой колонки, и так далее до тех пор, пока двухкратные титрования не будут завершены. Когда предпоследнюю лунку смешивают, отбирают 60 мкл из 120 мкл в этой лунке и отбрасывают их. Последнюю лунку оставляют с 60 мкл разбавителя DMSO/среда в качестве контроля, не содержащего тестируемого соединения. Готовят 9 колонок разлитого тестируемого соединения, достаточных для трехкратных лунок для каждого из: (1) VEGF (полученный от Pepro Tech Inc., номер по каталогу 100-200), (2) фактора роста эндотелиальных клеток (ECGF) (также известный как кислотный фактор роста фибробластов, или aFGF) (полученный от Boehringer Mannheim Biochemica, номер по каталогу 1439 600), либо (3) человеческого PDGF B/B (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany) и контроля среды для анализа. ECGF поступает в виде препарата с гепарином натрия.

2. Переносят 50 мкл/лунку разведения тестируемого соединения в 96-луночные планшеты для анализа, содержащие 0,8-1,0x10⁴ клеток/100 мкл/лунку клеток HUV-EC-C из суток 0 и инкубируют ~2 ч при 37°C, 5% CO₂.

3. В трех параллелях добавляют 50 мкл/лунку 80 мкг/мл VEGF, 20 нг/мл ECGF или контрольной среды в тестируемое соединение в каждом условии. Как и в отношении тестируемых соединений, концентрации фактора роста представляют собой четырехкратные от желаемой конечной концентрации. Используют среду для анализа из суток 0, стадии 2, для приготовления концентраций факторов роста. Инкубируют приблизительно 24 ч при 37°C, 5% CO₂. Каждая лунка будет содержать 50 мкл разведения тестируемого соединения, 50 мкл фактора роста или среды и 100 мкл клеток, что достигает в сумме 200 мкл/лунку. Таким образом, четырехкратные концентрации тестируемого соединения и факторов роста становятся однократными, как только все компоненты будут добавлены в лунки.

Сутки 2.

1. Добавляют ³H-тимидин (Amersham, номер по каталогу TRK-686) в концентрации 1 мКи/лунку (10 мкл/лунку раствора 100 мКи/мл, приготовленного в среде RPMI, + 10% термоинактивированная фетальная телячья сыворотка) и инкубируют ~24 ч при 37°C, 5% CO₂. RPMI получают от Gibco BRL, номер по каталогу 11875-051.

Сутки 3.

1. Замораживают планшеты в течение ночи при -20°C.

Сутки 4.

Оттаивают планшеты и собирают с помощью харвестера для 96-луночных планшетов (Tomtec Harvester 96®) на фильтровальные матрасы (Wallac, номер по каталогу 1205-401), считывают импульсы на жидкостном сцинтилляционном счетчике Wallac Betaplate™.

Биоанализы, которые были использованы или которые могут быть использованы для оценки соединений, подробно описаны ниже. Соединения 1-9 были протестированы, и было обнаружено, что они активны в анализах с flkGST, FGFR1 и PDGF.

Животные модели in vivo

Животные модели ксенотрансплантата.

Способность человеческих опухолей расти в качестве ксенотрансплантантов у бестимусных мышей (например, Balb/c, nu/nu) обеспечила полезную in vivo модель для изучения биологического ответа на терапию человеческих опухолей. Со времени первой удачной ксенотрансплантации человеческих опухолей бестимусным мышам (Rygaard and Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 77:758-760), много разных клеточных линий человеческих опухолей (например, опухоль молочной железы, легкого, мочеполовых путей, желудочно-кишечного тракта, головы и шеи, глиобластомы, опухоли кости и злокачественных меланом) были трансплантированы и успешно растут у голых (nude) мышей. Следующие анализы могут быть использованы для определения уровня активности, специфичности и эффекта различных соединений по настоящему изобретению. Три основных типа анализов используют для оценки соединений: клеточный/каталитический, клеточный/биологический и in vivo. Целью клеточных/каталитических анализов является определение эффекта соединения на способность ТК (тирозинкиназа) фосфорилировать остатки тирозина на известном субстрате в клетке. Целью клеточных/биологических анализов является определение эффекта соединения на биологический ответ, стимулируемый ТК в клетке. Целью in vivo анализов является определение эффекта соединения в животной модели конкретного расстройства, как, например, рака.

Подходящие клеточные линии для экспериментов с подкожной ксенотрансплантацией включают клетки С6 (глиома, ATCC # CCL 107), клетки A375 (меланома, ATCC # (номер в Американской Коллекции Типовых Культур) CRL 1619), клетки A431 (эпидермоидная карцинома, ATCC # CRL 1555), клетки Calu 6 (легкое, ATCC # HTB 56), клетки PC3 (простата, ATCC # CRL 1435), клетки SKOV3TP5 и NIH 3T3 фибробласты, разработанные с помощью генной инженерии сверхэкспрессирующими EGFR, PDGFR, IGF-1R или любую другую тестируемую киназу. Следующий протокол может быть использован для осуществления экспериментов по ксенотрансплантации.

Самки бестимусных мышей (BALB/C, nu/nu) получают от Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Всех животных содержат в условиях чистых помещений в микроизоляторных клетках с подстилкой Альфа-драй (Alpha-dri). Они получают стерильный корм для грызунов и воду по желанию.

Клеточные линии выращивают в соответствующей среде (например, MEM, DMEM, Ham's F10 или Ham's F12 плюс 5-10% фетальная телячья сыворотка (FBS) и 2 мМ глутамин (GLN)). Все среды для культур клеток, глутамин и фетальную телячью сыворотку закупают у Gibco Life Technologies (Grand Island, NY), если не указано иначе. Все клетки выращивают во влажной атмосфере 90-95% воздуха и 5-10% CO₂ при 37°C. Все клеточные линии традиционным образом пересевают дважды в неделю, и они являются отрицательными в отношении микоплазмы, что определяют с помощью метода Mycotect (Gibco).

Клетки собирают при конfluентности или в состоянии, близком к конfluентности, 0,05% Трипсин-EDTA и осаждают центрифугированием при 450 x g в течение 10 мин. Осадки ресуспендируют в стерильном PBS или среде (без FBS) до определенной концентрации и эти клетки имплантируют в заднюю боковую поверхность мыши (8-10 мышей в группе, 2-10x10⁶ клеток/животное). Рост опухоли измеряют в течение 3-6 недель, используя штангенциркуль. Объем опухоли вычисляют как произведение длина x ширина x высота, если не указано иначе.

P-величины вычисляют, используя t-критерий Стьюдента. Тестируемые соединения в 50-100 мкл эксципиента (DMSO или VPD:D5W) могут быть доставлены путем IP (интраперитонеальной) инъекции в различных концентрациях, обычно начиная в первый день после имплантации.

Модель инвазии опухоли.

Разработана следующая модель инвазии опухоли, и она может быть использована для оценки терапевтической ценности и эффективности соединений, которые идентифицированы как селективно ингибирующие KDR/FLK-1 рецептор.

Методика.

8-недельных голых мышей (самки) (Simonsen Inc.) используют в качестве экспериментальных животных. Имплантацию опухолевых клеток можно осуществлять в вытяжном шкафу с ламинарным потоком. Для анестезии ксилазин/кетаминую смесь (100 мг/кг кетамина и 5 мг/кг ксилазина) вводят интраперитонеально. Срединный разрез делают для раскрытия брюшной полости (приблизительно 1,5 см в длину), чтобы сделать инъекцию 10⁷ опухолевых клеток в объеме среды 100 мкл. Клетки инъецируют либо в дуоденальную долю поджелудочной железы, либо под серозную оболочку ободочной кишки. Брюшину и мышцы закрывают непрерывным швом шелковой нитью 6-0 и кожу закрывают с использованием зажимов для раны. Животных наблюдают ежедневно.

Анализ.

Через 2-6 недель, в зависимости поверхностных наблюдений за животными, мышей умервщляли и локальные опухолевые метастазы в различные органы (легкое, печень, головной мозг, желудок, селезенка, сердце, мышца) вырезали и анализировали (измерение размера опухоли, степени инвазии, иммунохимия, определение *in situ* гибридизации и т.д.).

C-KIT анализ.

Этот анализ используют для определения уровня фосфорилирования c-kit тирозина.

Клетки MO7E (человеческая острая миелоидная лейкемия) подвергают сывороточному голоданию в течение ночи в 0,1% сыворотке. Клетки предварительно обрабатывают соединением (одновременно с сывороточным голоданием) перед стимуляцией лигандом. Клетки стимулируют 250 нг/мл rh-SCF в течение 15 мин. После стимуляции клетки лизируют и осуществляют иммунопреципитацию с помощью анти-c-kit антитела. Уровни фосфотирозина и белка определяют с помощью вестерн-блоттинга.

Анализ пролиферации МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид).

Клетки MO7E подвергают сывороточному голоданию и предварительно обрабатывают соединением, как описано для экспериментов с фосфорилированием. Клетки пересевают в концентрации 4×10^5 клеток/лунку в 96-луночном планшете, в 100 мкл RPMI + 10% сыворотка. rh-SCF (100 нг/мл) добавляют и планшет инкубируют в течение 48 ч. Через 48 ч добавляют 10 мкл 5 мг/мл МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] и инкубируют в течение 4 ч. Добавляют кислотный изопропанол (100 мкл 0,04 н. HCl в изопропанол) и измеряют оптическую плотность при длине волны 550 нм.

Анализ апоптоза.

Клетки MO7E инкубируют +/- SCF (фактор стволовых клеток) и +/-соединение в 10% FBS с rh-GM-CSF (10 нг/мл) и rh-IL-3 (10 нг/мл). Образцы анализируют через 24 и 48 ч. Для измерения активированной каспазы-3 образцы промывают PBS и делают проницаемыми с помощью ледяного 70% этанола. Клетки затем окрашивают PE(фикоэритрин)-конъюгированным поликлональным кроличьим антителом против активной каспазы-3 и анализируют с помощью FACS (клеточный анализатор по интенсивности флуоресценции, fluorescence-activated cell sorter). Для измерения расщепленной PARP (поли-АДФ-рибозилполимеразы) образцы лизируют и анализируют с помощью вестерн-блоттинга с анти-PARP антителом.

Дополнительные анализы.

Дополнительные анализы, которые могут быть использованы для оценки соединений по настоящему изобретению, включают, без ограничения, био-flk-1-анализ, анализ химерного рецептора EGF рецептор-HER2 в целых клетках, био-src-анализ, био-lck анализ и анализ измерения функции фосфорилирования raf. Протоколы для каждого из этих анализов могут быть найдены в заявке США № 09/099842, которая включена сюда путем ссылки, включая любые графические материалы.

Измерение клеточной токсичности.

Лекарственные соединения должны быть более сильнодействующими в ингибировании рецепторной тирозинкиназной активности, чем в проявлении цитотоксического эффекта. Мера эффективности и клеточной токсичности соединения может быть получена путем определения терапевтического индекса, то есть IC_{50}/LD_{50} . IC_{50} , доза, необходимая для достижения 50% ингибирования, может быть измерена с использованием стандартных методик, таких как те, которые описаны здесь. LD_{50} , доза, которая дает 50%-ную токсичность, может также быть измерена с помощью стандартных методик (Mossman, 1983, J. Immunol. Methods, 65:55-63), путем измерения количества высвободившейся LDH (лактатдегидрогеназа) (Korzeniewski and Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 64:313. Decker and Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods, 10 115:61) или путем измерения летальной дозы на животных моделях. Соединения с большим терапевтическим индексом предпочтительны. Терапевтический индекс должен быть больше чем 2, предпочтительно по меньшей мере 10, более предпочтительно по меньшей мере 50.

Специалист в данной области с легкостью поймет, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для осуществления задач и достижения упомянутых, а также присущих ему целей и преимуществ. Молекулярные комплексы и способы, методики, пути лечения, молекулы, конкретные соединения, описанные здесь, в настоящее время отражают предпочтительные воплощения, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема изобретения. Специалисты в данной области смогут осуществлять изменения в этом изобретении или придумывать другие способы его использования, которые входят в идею настоящего изобретения и определяются объемом формулы изобретения.

Специалисту в данной области будет очевидно, что могут быть сделаны различные замены и модификации в раскрытом здесь изобретении без отступления от объема и сущности изобретения.

Все патенты и публикации, упомянутые в описании, являются показателями уровня специалистов в данной области, на которых рассчитано изобретение. Все патенты и публикации включены сюда путем ссылки до такой степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и отдельно указана как включенная путем ссылки.

Изобретение, иллюстративно описанное здесь, может быть применено на практике удобным образом в отсутствие любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые конкретно здесь не раскрыты. Таким образом, например, в каждом случае здесь любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов. Термины и выражения, которые использованы, использованы в качестве терминов описания, а не огра-

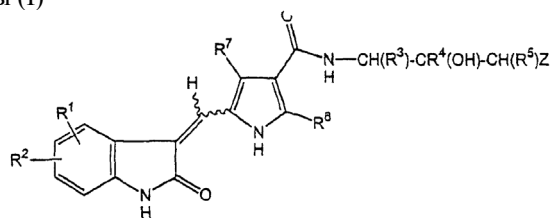
нения, и при применении таких терминов и выражений отсутствует намерение исключить любые эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, при этом подразумевается, что возможны различные модификации в рамках заявленного изобретения. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее изобретение конкретно описано предпочтительными воплощениями и возможными признаками, специалистами в данной области могут осуществляться модификация и варьирование идей, описанных здесь, и что такие модификации и вариации рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения, который определен прилагаемой формулой изобретения.

В дополнение, когда признаки или аспекты изобретения описаны в виде групп Маркуша, специалисту в данной области будет понятно, что изобретение, таким образом, также характеризуется любым конкретным членом или подгруппой членов группы Маркуша. Например, если X описан как выбранный из группы, состоящей из брома, хлора и иода, то притязания на X, являющийся бромом, и притязания на X, являющийся бромом и хлором, полностью описаны.

Другие воплощения входят в объем прилагаемой формулы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



(I)

где R^1 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, галогеноалкокси, циклоалкила, гидроксид, алкокси, $-C(O)R^8$ и $-C(O)NR^{12}R^{13}$;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, тригалогенометила, гидроксид, алкокси и $-C(O)R^8$;

R^3 , R^4 и R^5 представляют собой независимо водород или алкил;

Z представляет собой арил, гетероарил, гетероцикл или $-NR^{15}R^{16}$, где R^{15} и R^{16} независимо представляют собой водород или алкил; либо R^{15} и R^{16} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоаминогруппу;

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода или алкила;

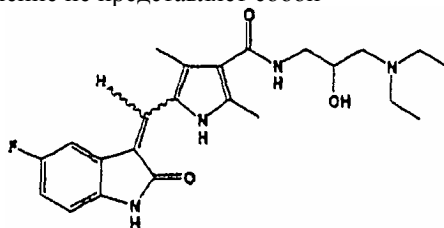
R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила и гетероарила;

R^8 выбран из группы, состоящей из гидроксид и алкокси;

R^{12} и R^{13} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила и арила; либо R^{12} и R^{13} вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоамино;

или его фармацевтически приемлемая соль;

при условии, что это соединение не представляет собой



и где алкил означает C_1 - C_{10} алкил, возможно замещенный галогеном или гидроксид;

циклоалкил означает C_{3-8} моноциклическое кольцо или C_{11-12} конденсированное или полициклическое кольцо, где одно или более чем одно из колец может содержать одну и более чем одну двойную связь, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной пи-электронной системы;

арил означает моноциклическую или конденсированную полициклическую C_{6-12} кольцевую группу, имеющую полностью сопряженную пи-электронную систему и возможно замещенную одним или более чем одним галогеном или циано;

гетероарил означает моноциклическую или конденсированную кольцевую группу из 5-12 атомов, содержащую 1-4 кольцевых гетероатомов, выбранных из N, O или S, имеющих полностью сопряженную пи-электронную систему и возможно замещенную гидроксид;

гетероцикл означает насыщенное циклическое кольцо из 3-8 атомов, в котором один или два кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или $S(O)_n$ (где n представляет собой целое число от 0 до 2), где один или два C атома гетероцикла возможно могут быть замещены карбонильной группой и где гетероциклическое кольцо возможно замещено одним незамещенным C_1 - C_4 алкилом или двумя незамещенными C_1 - C_4 алкилами;

гетероциклоамино означает насыщенное циклическое кольцо из 3-8 атомов, в котором по меньшей мере один из кольцевых атомов представляет собой азот и возможно один или два дополнительных кольцевых атома представляют собой гетероатомы, выбранные из N, O или S(O)_n (где n представляет собой целое число от 0 до 2), где один или два атома C могут быть возможно замещены карбонильной группой и где гетероциклоаминокольцо возможно замещено одним незамещенным C₁-C₄алкилом или двумя незамещенными C₁-C₄алкилами; и

арилокси означает -O-C₆₋₁₂арил или O-гетероарил.

2. Соединение по п.1, где

R¹ выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, циклоалкила, гидроксид, алкокси, -C(O)R⁸ и -C(O)NR¹²R¹³;

R² выбран из группы, состоящей из водорода, галогено, алкила, тригалогенометила, гидроксид, алкокси;

R³, R⁴ и R⁵ представляют собой независимо водород или алкил;

Z представляет собой арил, гетероарил, гетероцикл или -NR¹⁵R¹⁶, где R¹⁵ и R¹⁶ независимо представляют собой водород или алкил; либо R¹⁵ и R¹⁶ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклоаминогруппу;

R⁶ выбран из группы, состоящей из водорода или алкила;

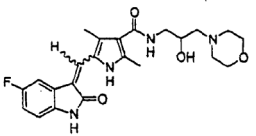
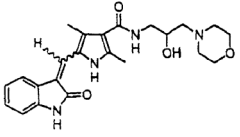
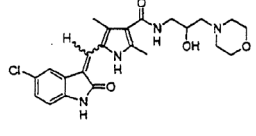
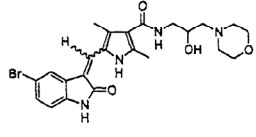
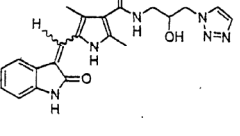
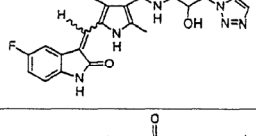
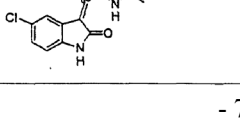
R⁷ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, арила, и гетероарила;

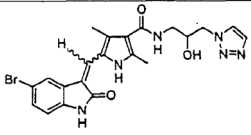
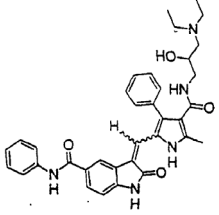
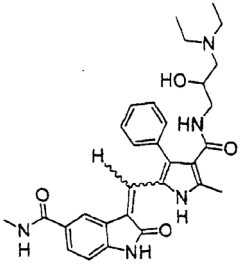
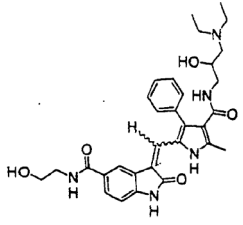
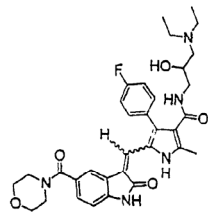
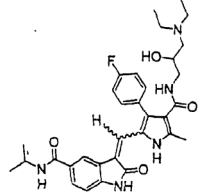
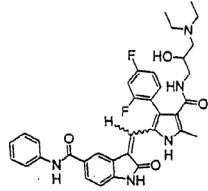
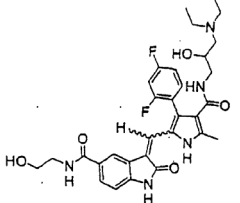
R⁸ выбран из группы, состоящей из гидроксид и алкокси;

R¹² и R¹³ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила и арила, либо R¹² и R¹³ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероцикл;

или его фармацевтически приемлемая соль.

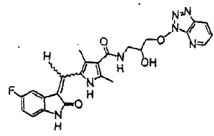
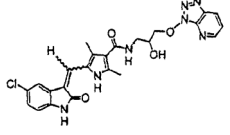
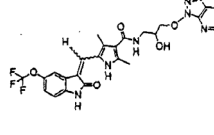
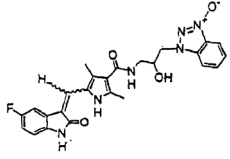
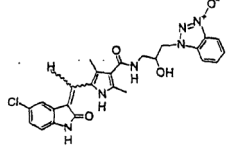
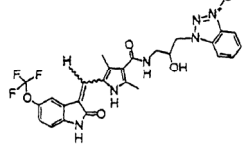
3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

№ соединения	Структура	Название
2N		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
3N		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
4N		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
5N		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
6N		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
7N		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
8N		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидроксид-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид

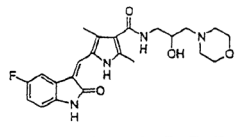
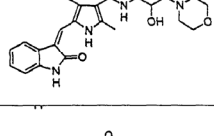
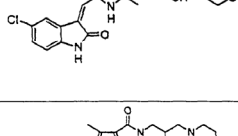
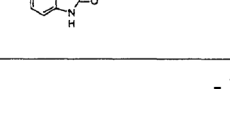
9N		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
11N		3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н]-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
12N		(3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н)-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
13N		(3Z)-3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-5-метил-3-фенил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
14N		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-[[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
15N		3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(4-фторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
16N		3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н]-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
17N		3-[[4-([3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино)карбонил]-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метиле́н)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид

18N		3-((3-(4-цианофенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метил)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
19N		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-((5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-1Н-пиррол-3-карбоксамида
20N		3-((3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метил)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
21N		3-((3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метил)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамида
22N		5-((5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамида
23N		5-((5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамида
24N		N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-((2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-1Н-пиррол-3-карбоксамида
25N		5-((5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамида
26N		5-((5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил)-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамида

27N		N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-([2-оксо-5-трифторметокси]-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
28N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
29N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
30N		N-[3-[2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-([2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид
34N		5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
35N		N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид
36N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
37N		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-([2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-1Н-пиррол-3-карбоксамид
38N		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
39N		5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид
40N		5-[(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоксамид

47N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
48N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

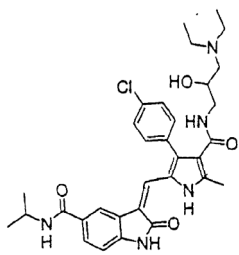
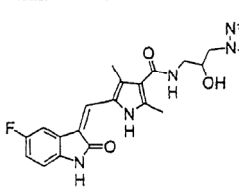
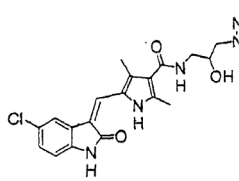
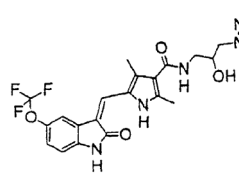
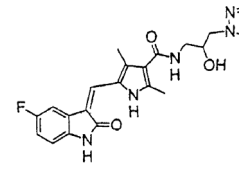
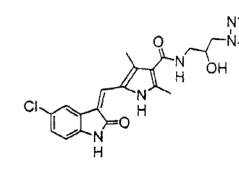
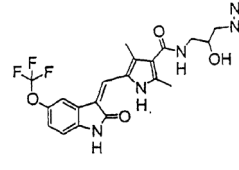
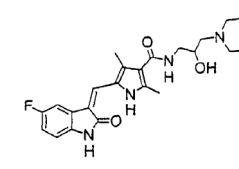
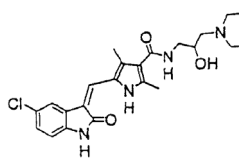
№ соединения	Структура	Название
2S		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3 <i>Z</i>)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
3S		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3 <i>Z</i>)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
4S		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3 <i>Z</i>)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид
5S		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3 <i>Z</i>)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-амид

6S		2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
7S		5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
8S		5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид
9S		5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-индол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ил-пропил)-амид

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

11S		(3Z)-3-([4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1H-пиррол-2-ил]метил)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксамида
12S		(3Z)-3-([4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1H-пиррол-2-ил]метил)-N-метил-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксамида
13S		(3Z)-3-([4-({[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]амино}карбонил)-5-метил-3-фенил-1H-пиррол-2-ил]метил)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-карбоксамида
14S		N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-4-(4-фторфенил)-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил)-1H-пиррол-3-карбоксамида

15S		(3Z)-3-({4-({3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил}амино)карбонил}-3-(4-фторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
16S		(3Z)-3-({4-({3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил}амино)карбонил}-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
17S		(3Z)-3-({4-({3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил}амино)карбонил}-3-(2,4-дифторфенил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N-(2-гидроксиэтил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
18S		(3Z)-3-({3-(4-цианофенил)-4-({3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил}амино)карбонил}-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид
19S		4-(4-цианофенил)-N-[3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил]-2-метил-5-{(Z)-[5-(морфолин-4-илкарбонил)-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил}-1Н-пиррол-3-карбоксамид
20S		(3Z)-3-({3-(4-хлорфенил)-4-({3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил}амино)карбонил}-5-метил-1Н-пиррол-2-ил]метилен)-2-оксо-N-фенил-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоксамид

21S		(3Z)-3-((3-(4-хлорфенил)-4-((3-(диэтиламино)-2-гидроксипропил)амино)карбонил)-5-метил-1Н-пиррол-2-ил)метиле́н)-N-изопропил-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбокса́мид
22S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
23S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
24S		N-[2-гидрокси-3-(2Н-тетразол-2-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
25S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
26S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
27S		N-[2-гидрокси-3-(1Н-тетразол-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден]метил]-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
28S		N-[3-((2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид
29S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3Н-индол-3-илиден)метил]-N-[3-((2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбокса́мид

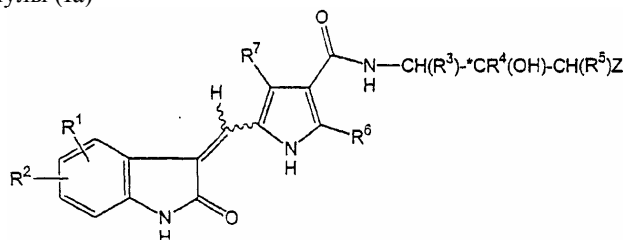
30S		N-{3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолин-4-ил]-2-гидроксипропил}-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
31S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
32S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
33S		N-[(2R)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
34S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
35S		N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
36S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-(3-метил-2,5-диоксиимидазолидин-1-ил)пропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
37S		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден]метил]-1H-пиррол-3-карбоксамид
38S		N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
39S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
40S		5-[(Z)-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[3-(1,1-диоксидиоморфолин-4-ил)-2-гидроксипропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид

41S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
42S		5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
43S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид
44S		5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)метил]-N-[(2S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-илпропил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоксамид

6. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

47S		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
48S		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
49S		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]пиридин-3-илокси)-пропил]-амид
50S		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
51S		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид
52S		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигидро-индол-3-илиденметил)-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты [2-гидрокси-3-(3-окси-бензотриазол-1-ил)-пропил]-амид

7. Соединение формулы (Ia)



где R^1 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой водород;
 R^2 представляет собой фтор и находится в положении 5 индолинового кольца и
 Z представляет собой морфолин-4-ил;
 R^6 и R^7 представляют собой метил и
 стереохимия по $*C$ представляет собой (S).

8. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, выбранное из группы, состоящей из

№ соединения	Структура	Название
45N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
45S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((S)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид
46S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты ((R)-2-гидрокси-3-морфолин-4-ил-пропил)-метил-амид

9. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или соль по пп.1, 2, 3, 4, 5, 6 или 8 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение или фармацевтически приемлемую соль по п.7 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

11. Способ модуляции каталитической активности протеинкиназы, при котором указанную протеинкиназу приводят в контакт с соединением или солью по любому из пп.1, 3 или 6.

12. Способ по п.11, где указанная протеинкиназа выбрана из группы, состоящей из рецепторной тирозинкиназы, нерецепторной тирозинкиназы и серинтреонинкиназы.

13. Способ лечения или предупреждения расстройства, связанного с протеинкиназой, у организма, при котором указанному организму вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей соединение или соль по любому из пп.1, 3 или 6 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

14. Способ по п.13, где указанное расстройство, связанное с протеинкиназой, выбрано из группы, состоящей из расстройства, связанного с рецепторной тирозинкиназой, расстройства, связанного с нерецепторной тирозинкиназой, и расстройства, связанного с серинтреонинкиназой.

15. Способ по п.13, где указанное расстройство, связанное с протеинкиназой, выбрано из группы, состоящей из расстройства, связанного с рецептором эпителиального фактора роста (EGFR), расстройства, связанного с рецептором тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), расстройства, связанного с рецептором инсулиноподобного фактора роста (IGFR), и расстройства, связанного с киназой печени эмбриона (flk).

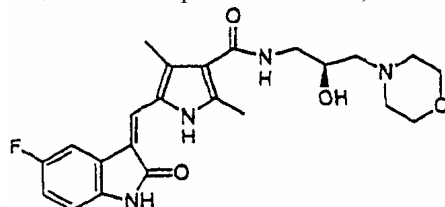
16. Способ по п.13, где указанное расстройство, связанное с протеинкиназой, представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из плоскоклеточного рака, астроцитомы, саркомы Капоши, глиобластомы, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака яичников, рака простаты.

ты, рака молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, глиомы, рака ободочной и прямой кишки, рака мочеполювых путей и рака желудочно-кишечного тракта.

17. Способ по п.13, где указанное расстройство, связанное с протеинкиназой, выбрано из группы, состоящей из диабета, аутоиммунного расстройства, гиперпролиферативного расстройства, рестеноза, фиброза, псориаза, болезни Гиппеля-Линдау, остеоартрита, ревматоидного артрита, ангиогенеза, воспалительного расстройства, иммунологического расстройства и сердечно-сосудистого расстройства.

18. Способ по п.13, где указанный организм представляет собой человека.

19. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее следующую формулу



20. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество соединения или фармацевтически приемлемой соли по п.19 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6