

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 08.08.2001
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 11.08.2000
(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/637054
(33) Země priority: US
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.11.2003
(Věstník č. 11/2003)
(86) PCT číslo: PCT/US01/24822
(87) PCT číslo zveřejnění: WO02/014536

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 680

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7:

C 12 Q 1/48

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

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

(74) Zástupce:
Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob modulace kinasových proteinů s
vícenásobnou vazbou a vyhledávání sloučenin
modulujících kinasové proteiny s vícenásobnou
vazbou**

(57) Anotace:

Popisují se způsoby identifikace sloučenin modulujících aktivitu kinasových proteinů s vícenásobnou vazbou a podporujících přežívání buněk nebo zánik buněk, které se skládají z kroků uvedení do kontaktu buňky obsahující kinasový protein s vícenásobnou vazbou na sloučeninou, stanovení, zda tato sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a stanovení, zda tato sloučenina podporuje přežívání buněk. Popisují se též způsoby identifikace sloučenin, které mohou být použitelné při léčení neurodegenerativních onemocnění a/nebo zánětu. Také se popisují způsoby pozměňování aktivity kinasových proteinů s vícenásobnou vazbou zahrnující uvedení proteinu nebo buňky obsahující tento protein do styku s idenovou nebo indolovou sloučeninou podle tohoto řešení. Rovněž se poskytují způsoby léčení neurodegenerativních poruch a/nebo zánětu.

CZ 2003 - 680 A3

Způsoby modulace kinasových proteinů s vícenásobnou vazbou a vyhledávání sloučenin modulujících kinasové proteiny s vícenásobnou vazbou

Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobů modulace látek ze skupiny kinas s vícenásobnou vazbou (MLK), způsobů identifikace sloučenin, které pozměňují kinasový protein s vícenásobnou vazbou a buď podporují přežívání buněk nebo podporují zánik buněk, způsobů určení sloučenin, které mohou být použitelné při léčení neurodegenerativních poruch a/nebo zánětu a způsobů léčení neurodegenerativních poruch sloučeninami, které inhibují kinasový protein s vícenásobnou vazbou.

Dosavadní stav techniky

Skupina MLK zahrnuje skupinu proteinů, ve kterých se proteinová sekvence kinasových domén členů této skupiny velice podobá MAPKKK, avšak mezi členy v rámci této skupiny je navzájem větší podobnost ve srovnání s jinými MAPKKK. Členové skupiny MLK zahrnují část velice složitých kinasových kaskád, jako je například kaskáda signalizující stres, která zahrnuje mimo jiné modulaci c-Jun N-terminální kinasy (JNK), která dále mimo jiné moduluje transkripční faktory včetně c-Jun, ATF2 a ELK-1. JNK se popisuje v US patentech č. 5 534 426, 5 593 884, 5 605 808 a WO 95/03324, které se zde všechny zahrnují v plném znění formou odkazu.

Skupina MLK zahrnuje následující skupiny: 1) kinasu 1 s vícenásobnou vazbou (MLK1), 2) kinasu 2 s vícenásobnou vazbou (MLK2), 3) kinasu 3 s vícenásobnou vazbou (MLK3), 4) kinasu nesoucí leucinový zipper (LZK), 5) kinasu nesoucí

dvojitý leucinový zipper (DLK) a 6) kinasu 6 s vícenásobnou vazbou (MLK6). MLK1 má katalytickou doménu podobnou oběma kinasám specifickým pro Tyr a Ser/Thr. Dorow a kol., Eur. J. Biochem., 213, 701-710 (1993). MLK2 má rovněž katalytickou doménu podobnou oběma kinasám specifickým pro Tyr nebo Ser/Thr. Dorow a kol., Eur. J. Biochem., 213, 701-710 (1993). MLK2 se též nazývá MST. Katoh a kol., Oncogene, 10, 1447-1451 (1995). MLK3 obsahuje protein, který navíc ke kinasové doméně obsahuje dva leucinové zippery s přilehlou karboxyterminální bázeickou oblastí a oblastí bohatou na prolin. Ing a kol., Oncogene, 9, 1745-1750 (1994). MLK3 se též popisuje jako SPRK [Gallo a kol., J. Biol. Chem., 269, 15092-15100 (1994)] a PTK1 [Ezoe a kol., Oncogene, 9, 935-938 (1994)]. LZK je kinasu nesoucí leucinový zipper. Sakuma a kol., J. Biol. Chem., 272, 28622-28629 (1997). DLK má kinasovou doménu a dva předpokládané motivy leucinového zipperu. Holzman a kol., J. Biol. Chem., 269, 30808-30817 (1994). DLK se též nazývá ZPK [Reddy a kol., Biochem. Biophys. Res. Comm., 202, 613-620 (1994)] a MUK [Hirai a kol., Oncogene, 12, 641-650 (1996)]. Členové skupiny MLK se též popisují například v US patentech č. 5 676 945, 5 554 523, WO 93/15201, kanadském patentu 2 148 898, Diener a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 9687-9692 (1997), DeAizpurua a kol., J. Biol. Chem., 272, 16364-16373 (1997), Tung a kol., Oncogene, 14, 653-659 (1997), Sells a kol., Trends in Cell Biol., 7, 161-167 (1997), Mata a kol., J. Biol. Chem., 271, 16888-16896 (1996), Hirai a kol., J. Biol. Chem., 272, 15167-15173 (1997), Fan a kol., J. Biol. Chem., 271, 24788-24793 (1996), Blouin a kol., DNA and Cell Biol., 15, 631-642 (1996), Pombo a kol., Nature, 377, 750-754 (1995), Kiefer a kol., EMBO J., 15, 7013-7025 (1996), Hu a kol., Genes & Dev., 10, 2251-2264 (1996), Su a kol., EMBO J., 16, 1279-1290 (1997) a Dorow a kol., Eur. J. Biochem.,

234, 492-500 (1995). Nedávno byla v EST databázi identifikován další kinasa příbuzná MLK. Sekvence deoxyribonukleové kyseliny tohoto klonu, MLK6, se popisuje sedmi překrývajícími se částmi. Jejich čísla identifikace klonu jsou 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 a 178522 a jejich sekvence se zde v plném znění zahrnují formou odkazu. Každý z citovaných odkazů v tomto odstavci se zde zahrnuje v plném znění formou odkazu.

Nedávno se zjistilo, že stabilní exprese ZPK snižuje proliferační schopnost NIH 3T3 fibroblastů, jak lze zjistit studií tvorby kolonií. Bergeron a kol., Biochem. Biophys. Res. Comm., 231, 153-155 (1997). Bergeron a kol. však neposkytli žádné údaje ukazující, že ZPK moduluje aktivitu ZPK substrátu nebo zda ZPK podporuje zánik buněk.

Expresí konstruktů kódujícího Myc-MLK2 v buňkách Swiss 3T3 též způsobuje apoptózu zhruba 20 h po injekci. Nagata a kol., EMBO J., 17, 149-158 (1998).

Původci této přihlášky vyvinuli četné indolové a indenové sloučeniny, které mimo jiné inhibují růst buněk související s hyperproliferačními stavy a inhibují zánik buněk v řadě embryonálních kultur, jako jsou kultury buněk dorsálního kořenového ganglia, striata, horního cervikálního ganglia a motoneuronů. US patenty č. 5 475 110, 5 591 855, 5 594 009, 5 461 146, 5 621 100, 5 621 101, 5 705 511 a 5 756 494, které jsou všechny přidělené původci této přihlášky a které se zde zahrnují v plném znění formou odkazu. Sloučeniny vyjmenované v patentu 5 705 511 obecného vzorce G se v tomto vynálezu popisují jako sloučeniny obecného vzorce I. Původci této patentové přihlášky též prokazují, že se apoptóza motoneuronů potlačuje derivátem K-252a, indolo-

karbazolu, který též moduluje kaskádu signalizace stresu. Maroney a kol., J. Neurosci, 18, 104-111 (1998), publikace, která se zde zahrnuje v plném znění formou odkazu.

Vzhledem k nedostatku vyhledávání sloučenin modulujících členy kaskády signalizace stresu a podporujících buď zánik buněk nebo přežívání buněk stále trvá potřeba nových selektivních způsobů vyhledávání sloučenin. Navíc trvá potřeba vyhledávacích studií pro terapeutické prostředky, které lze použít při léčení zánětu a neurodegenerativních poruch. Tento vynález se zaměřuje na tyto stejně tak jako na další důležité cíle.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje způsoby identifikace sloučenin modulujících aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a podporujících přežívání buněk, které zahrnují kroky přivedení do styku buněk obsahujících kinasový protein s vícenásobnou vazbou se sloučeninou, stanovení zda sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a stanovení, zda sloučenina podporuje přežívání buněk.

Tento vynález též poskytuje způsoby identifikace sloučenin pozměňujících aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a podporujících zánik buněk, které zahrnují kroky přivedení do styku buňky obsahující kinasový protein s vícenásobnou vazbou se sloučeninou, stanovení, zda sloučenina zvyšuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a stanovení zda sloučenina podporuje zánik buněk.

Tento vynález též poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které lze použít při léčení neurodegenerativních

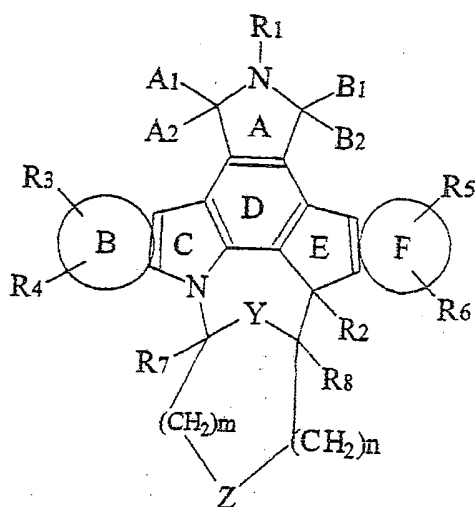
poruch a které zahrnují přivedení do styku buněk nebo buněčného extraktu obsahujícího kinasový protein s vícenásobnou vazbou se sloučeninou a stanovení, zda tato sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou.

Tento vynález též poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které lze použít při léčení zánětu, zahrnující přivedení do kontaktu buňky či buněčného extraktu obsahujícího kinasový protein s vícenásobnou vazbou se sloučeninou a stanovení, zda tato sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou.

Tento vynález též poskytuje způsoby léčby savce, který má nebo u kterého je podezření na to, že má neurodegenerativní poruchu, které zahrnují podávání tomuto savci sloučeniny inhibující nebo snižující aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou.

Tento vynález též poskytuje způsoby léčení savce, který má zánět, které spočívají v podávání tomuto savci sloučeniny, která inhibuje nebo snižuje aktivitu protein kinas s vícenásobnou vazbou.

Tento vynález též poskytuje způsoby modulace aktivity protein kinas s vícenásobnou vazbou, které zahrnují přivedení do kontaktu proteinu nebo buňky obsahující protein se sloučeninou obecného vzorce II



(II)

ve kterém

kruhy B a F nezávisle na sobě a každý spolu s atomy uhlíku, ke kterým se připojuje, se volí z následujících případů:

nenasycený šestičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém lze 1 až 3 atomy uhlíku nahradit atomy dusíku,

nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh a

nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém

jeden atom uhlíku je nahrazen atomem kyslíku, dusíku nebo síry,

dva atomy uhlíku jsou nahrazeny atomem síry a dusíku, kyslíku a dusíku nebo 2 atomy dusíku

nebo

tři atomy uhlíku jsou nahrazeny třemi atomy dusíku,

R^1 se volí z případů:

atom vodíku, substituovaná či nesubstituovaná alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná arylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná heteroarylová skupina nebo substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

$-C(=O)R^9$, kde R^9 se volí z případů alkylová skupina, arylová skupina a heteroarylová skupina,

$-OR^{10}$, kde R^{10} se volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku,

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

R^{11} a R^{12} se nezávisle volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku nebo

R^{11} a R^{12} spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, kde X^1 se volí z případů $-O-$, $-S-$ a $-CH_2-$,

R^2 se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina o 1

až 4 atomech uhlíku, hydroxylová skupina, alkoxy skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, skupina $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku a substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 se navzájem nezávisle volí z případů

atom vodíku, aryllová skupina, heteroaryllová skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, trifluormethylová skupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina OR^9 , $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$,

$-CH_2OR^{14}$, kde R^{14} je zbytek aminokyseliny po odstranění hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny,

$-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ nebo $-CH=NNR^2R^{2A}$, kde R^{2A} je stejný substituent jako R^2 ,

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

alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku, alkenylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku a alkynylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku,

kde každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je nesubstituovaná nebo

každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je substituovaná 1 až 3 skupinami zvolenými z případů aryllová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, heteroarylová skupina, arylalkoxyskupina, heterocykloalkoxyskupina, hydroxyalkoxyskupina, alkyloxy-alkoxyskupina, hydroxyalkylthioskupina, alkoxy-alkylthio-skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_p-$, $NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pCO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OCONHR^2$, $-O$ -tetrahydropyranylová skupina, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}C(=O)R^9$, $NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2OR^{10}$, $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ a skupina monosacharidu o 5 až 7 atomech uhlíku, kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je nezávisle buď substituovaná nebo nahrazená atomem vodíku, alkylovou skupinou o 1 až 4 atomech uhlíku, alkylkarbonyloxyskupinou o 2 až 5 atomech uhlíku nebo alkoxyskupinou o 1 až 4 atomech uhlíku,

X^2 je atom kyslíku, atom síry nebo skupina NR^{10} ,

R^7 a R^8 se oba nezávisle volí z případů atom vodíku, alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, alkoxyskupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku,

substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina, skupina $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ a $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$ nebo R^7 a R^8 spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce $-CH_2-X^3-CH_2-$, kde X^3 je X^2 nebo vazba,

m a n jsou nezávisle na sobě 0, 1 nebo 2,

Y se volí z případů $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ a $-CH_2-$,

Z se volí z případů vazba, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_YR^9)-$, $-N(S(O)_YNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ a $-CH(O(C(=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A}))-$, kde R^{9A} je stejný substituent jako R^9 ,

R^{15} a R^{16} se nezávisle na sobě volí z případů atom vodíku, hydroxylová skupina, skupina $-C(=O)R^{10}$, $-O(C(=O)R^9)$, hydroxyalkylová skupina a $-CO_2R^{10}$,

R^{17} se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina, aryllová skupina a heteroaryllová skupina,

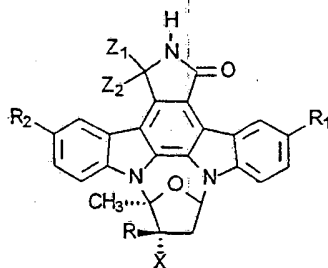
A^1 a A^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku, atom vodíku a skupina OR^2 , atom vodíku a skupina $-SR^2$, atom vodíku a skupina $-N(R^2)_2$ a skupina, ve které A^1 a A^2 spolu tvoří zbytek zvolený z případů $=O$, $=S$ a $=NR^2$,

B^1 a B^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku, atom vodíku a skupina OR^2 , atom vodíku a skupina $-SR^2$,

atom vodíku a skupina $-N(R^2)_2$ a skupina, ve které B^1 a B^2 spolu tvoří zbytek zvolený z případů $=O$, $=S$ a $=NR^2$,

s podmínkou, že alespoň jeden z párů A^1 a A^2 nebo B^1 a B^2 tvoří $=O$.

Tento vynález též poskytuje způsoby pozměňování aktivity kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou zahrnující přivedení do kontaktu buňky obsahující protein se sloučeninou obecného vzorce III



(III)

ve kterém

Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří $=O$,

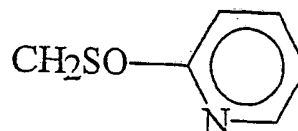
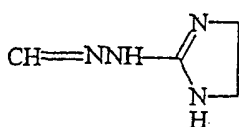
R_1 se volí z případů atom vodíku, atom chloru, skupina $CH_2SO_2C_2H_5$, atom bromu, skupina $CH_2S(CH_2)_2NH_2$,

2

45



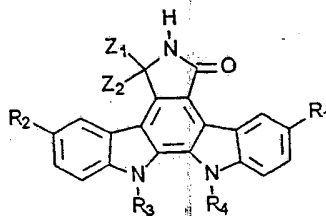
CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycin}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 ,
 CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serin}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH ,
 $\text{CH}_2\text{NH-Prolin}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, CH=NNHC(=NH)NH_2 ,
 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, CH=NNHCONH_2 , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$,
 $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2\text{n-hexyl}$, CONHCH_3 a
 $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ nebo skupina podle jednoho z
 následujících vzorců



a

R se volí z případů hydroxylové skupiny a methoxyskupiny.

Tento vynález též poskytuje způsoby pozměňování aktivity kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou zahrnující uvedení do kontaktu proteinu nebo buňky obsahující protein se sloučeninou obecného vzorce IV



(IV)

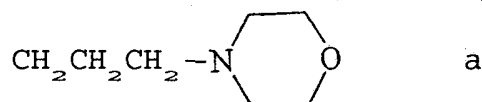
ve kterém

Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří =O,

R_1 je atom vodíku nebo atom bromu,

R_2 je atom vodíku,

R_3 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, nebo



R_4 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Přehled obrázků na výkresech

Pro znázornění ztělesnění podle tohoto vynálezu ukazují výkresy jejich určité vlastnosti. Je však třeba si uvědomit, že tento vynález se neomezuje na přesná znázorněná ztělesnění.

Obrázek 1 je schematický výkres ukazující obecnou přípravu indenopyrrolokarbazolů s můstkem.

Obrázek 2 je schematický výkres ukazující obecnou přípravu indenopyrrolokarbazolů s můstkem.

Obrázek 3 je schematický výkres ukazující přípravu indenopyrrolokarbazolů vázaných na pryskyřici.

Obrázek 4 je schematický výkres ukazující přípravu

chráněných rozpustných indenopyrrolokarbazolů.

Obrázek 5 je schematický výkres ukazující přípravu meziprojektu V.

Obrázek 6 je schematický výkres ukazující přípravu indenopyrrolokarbazolů s můstkem způsobem A.

Obrázek 7 je schematický výkres ukazující přípravu indenopyrrolokarbazolů s můstkem způsobem B.

Obrázek 8 je schematický výkres ukazující přípravu indenopyrrolokarbazolů se substituovaným kruhem B.

Obrázek 9 je schematický výkres ukazující derivatizaci kruhu E indenopyrrolokarbazolů s můstkem.

Obrázek 10 ukazuje výsledky dvou nezávislých experimentů znázorňující množství životných neuronově diferencovaných PC-12 buněk přežívajících po 5 d pěstování v nepřítomnosti NGF. Výsledky se vyjadřují jako procenta kontroly NGF v rámci každé skupiny (kontrola vektoru v nepřítomnosti NGF, $n = 12$, všechny ostatní skupiny $n = 3$). Rozdíl mezi kontrolou vektoru a stabilními celkovými soubory buněk exprimujících dominantní negativní MLK-3 mutant v nepřítomnosti NGF je statisticky významný podle hodnocení oboustranným T-testem ($p < 0,05$).

Obrázek 11A ukazuje fosforylaci GST-SEK-1 nereagujícího na kinasu bakulovirem exprimované FLAG-MLK-3 (směs plné délky a kinasové domény) s použitím radioaktivní gelové eseje.

Obrázek 11B ukazuje fosforylovaný myelinový bázeický proteinový produkt značený radionuklidem ^{32}P vytvořený kinasovou reakcí katalyzovanou bakulovirem exprimovanou FLAG-MLK-3 (směs plné délky a kinasové domény) nebo GST-MLK-3 kinasové domény.

Obrázek 12 je imunoblotová analýza ukazující fosforylaci GST-SEK-1 nereagujícího na bakulovirem exprimovanou kinasu FLAG-MLK-3 (směs plné délky a kinasové domény) podle detekce protilátkou SEK-1.

Obrázek 13 ukazuje fosforylaci myelinového bázeického proteinu bakteriálně exprimovanou kinasovou doménou GST-MLK-3 s použitím (o) multiscreeningové precipitační eseje s kyselinou trichloroctovou nebo (●) fosfocelulosového membránového způsobu.

Obrázek 14 ukazuje saturační vazebnou křivku [^3H]K252a inkubovaného s lyzátem MLK-3 bakulovirem infikovaných hmyzích buněk.

Obrázek 15A ukazuje množství c-jun značené ^{32}P v imunoprecipitační/kinasové reakci z buněk nadměrně exprimujících MLK-3, MLK-2 nebo DLK a zpracovaných buď 0,025% DMSO (kontrola) nebo 500 nM K-252a.

Obrázek 15B ukazuje grafické kvantitativní vyjádření procentické aktivity zbývajících v imunoprecipitační/kinasové reakci ze vzorků popsanych na obrázku 15A. Sloupce představují průměr z dvojic vzorků, kde úsečka pro chybu znázorňuje rozmezí střední hodnoty.

Obrázek 15C ukazuje množství c-jun značené ^{32}P

v imunoprecipitační/kinasové reakci z buněk nadměrně expri-
mujících HA-JNK1 samotných nebo s MEKK1 při různých množstvích
cDNA, jak se popisuje, a zpracovaných buď 0,025% DMSO
(kontroly) nebo 500 nM sloučeniny III-3 (viz tabulku 3).
Sloupce představují průměr výsledků dvojic vzorků, kde úseč-
ka chyby ukazuje rozmezí střední hodnoty.

Obrázek 16 ukazuje, že sloučenina III-3 podporuje ne-
uronové přežívání způsobem závislým na koncentraci. Disocio-
vané neurony se pěstují z ganglií sympatiku (SG) (A), dor-
sálních kořenových ganglií (DRG) (B), ciliárních ganglií
(CG) (C) a motoneuronů (MN) (D) v přítomnosti či nepřítom-
nosti daných trofických faktorů. Buňky se počítají 48 h po
nanesení na desku, jak se popisuje v materiálech a způsobech
provedení. Údaje představují střední hodnoty $\pm$ směrodatnou
odchylku ze tří či čtyř stanovení. Je znázorněn jeden ze tří
pokusů.

Obrázek 17 ukazuje fázově kontrastní mikrofotografie
kultur E12 DRG (A, E), E9 sympatiku (B, F), E8 ciliárního
ganglia (C, G) a E5.5 motorických neuronů (D, H) po 48
h v kultuře (24 h pro ciliární neurony) v přítomnosti či
nepřítomnosti neurotrofního faktoru (20 ng/ml NGF pro sympa-
tické a sensorické neurony, 10 ng/ml CNTF pro ciliární neu-
rony, 30 μ g/ml svalového extraktu (MEX) pro motoneurony
(A až D) nebo za přítomnosti 1 μ M sloučeniny III-3 (E až H).
Úsečka = 200 μ m.

Obrázek 18 ukazuje mikrofotografii explantů dorsální-
ho kořenového ganglia in vitro. Explanty z kuřecích DRG
(E9) se nanášejí na 96-jamkové misky s médiem obsahujícím
0,05 % BSA. Po době připojení 2 h se přidává (A) kontrolní
DMSO, (B) 20 ng/ml NGF, (C) 250 nM sloučeniny III-3. Po 48

h se médium odstraní a explanty se fixují s 4% formaldehydem ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem.

Obrázek 19 ukazuje počet kuřecích lumbálních motorických neuronů přežívajících na E10 po denním zpracování (E5-9) specifikovanými dávkami sloučeniny III-3. Ukázané údaje jsou střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka pro 5 až 6 zvířat/léčená skupina. Popisovaný experiment se opakoval dvakrát. Údaje jsou z jednoho reprezentativního experimentu a představují jednu stranu lumbálního sloupce $*p < 0,01$, $**p < 0,001$, na základě Studentova T-testu mezi sloučeninou III-3 a kontrolními skupinami s Bonferroniho opravou.

Obrázek 20 ukazuje počet motorických neuronů ve spinálním nukleu krysích samic z m. bulbospongiosus (SNB) přežívajících na PN10 nebo PN60 po denním zpracování (PN1-5) sloučeninou III-3 nebo kontrolním vehikulem (5% SolutolTM). Pro PN10 (A, B) nebo PN 60 (B) se krysy utratí a oblast míchy obsahující SNB se pitvá a zpracuje pro histologii. Motorické neurony obarvené Cresylechtovou violetí se poté počítají v sériových řezech v oblasti míchy lumbální-5-sakrální-1, jak se popisuje výše [Wingfield a kol. Steroidy, 26, 311-327 (1975)]. Experimentální údaje jsou střední hodnoty $\pm$ směrodatná odchylka od 4 až 8 zvířat/léčená skupina.

Obrázek 21 ukazuje ztrátu ChAT imunoreaktivity po hypoglosální axotomii u dospělých krys po ošetření sloučeninou III-3. Mikrofotografie hypoglosálního nukleu po přetnutí hypoglosálního nervu a ošetření roztokem vehikula (A) (5% SolutolTM) a (B) 200 μ g sloučeniny III-3 po aplikaci na místo přetnutí. (C) Počet ChAT imunoreaktivních hypoglosálních motorických neuronů po zpracování popsáném v (A) a (B) výše.

Výsledky se vyjadřují jako procento ChAT imunoreaktivních motorických neuronů s tím, že 100 % se definuje jako počet ChAT imunoreaktivních motorických neuronů v kontralaterálním nepoškozeném hypoglosálním nukleu.

Obrázek 22 ukazuje inhibici cesty MLK-3 a prokazuje účinnost in vivo a blokádu fosforylačních dějů v sestupném směru. Obrázek 22A ukazuje vzrůst imunoreaktivních tyrosin hydroxylasových neuronů substantia nigra po poškození MPTP na systematickém podávání sloučeniny III-3. Obrázek 22B je reprezentativní imunoblotové znázornění ukazující vzrůst hladin fosforylované MKK4 indukovaný MPTP. Obrázek 22C znázorňuje reprezentativní výsledky imunoblotové analýzy a ELISA prokazující zeslabení fosforylované MKK4 indukované MPTP za přítomnosti sloučeniny III-3.

Obrázek 23 ukazuje indukci IL-2 v Jurkatových buňkách. Obrázek 23A ukazuje časový průběh indukce IL-2. Obrázek 23B ukazuje inhibici indukce IL-2 sloučeninou III-3. Obrázek 23C ukazuje inhibici indukce IL-2 sloučeninou III-3 a sloučeninou I-4.

Následuje popis preferovaných ztělesnění tohoto vynálezu.

Následující termíny tak, jak se používají výše a v celém popisu, je třeba chápat následujícím způsobem, pokud se neurčuje jinak.

"Apoptóza" se týká specifické morfologické formy zániku buňky charakterizované fragmentací buněk a jejich jader na částice vázané na membránu. Apoptózu lze spouštět například zpracováním sloučeninami indukujícími apoptózu, jako je

etoposid, staurosporin, faktor nekrózy tumoru α , ceramid a podobně nebo vlivy, jako je Rentgenovo záření.

Pojem "zánik buněk" se týká zániku buněk apoptózou, nekrózou či jinými způsoby dobře známými tomu, kdo má zkušenost v oboru. Zánik buněk lze charakterizovat například jako pokles celkového počtu buněk nebo pokles buněčné životnosti ve srovnání s neléčenou kontrolní populací buněk. Sloučeniny, které "podporují zánik buněk" vedou k poklesu počtů buněk nebo poklesu buněčné životnosti ve srovnání s kontrolními populacemi. Oproti tomu sloučeniny, které "podporují přežívání buněk" vedou ke vzrůstu počtu buněk nebo buněčné životnosti nebo zpomalují či snižují rychlost zániku buněk.

Pojmy "specificky reaguje" nebo "specificky se váže" popisují sloučeniny, které fyzikálně či chemicky přímo interagují s proteinem MLK. Oproti tomu sloučeniny, které "nereagují specificky" nebo se "specificky nevážou" mohou ovlivnit proteiny v sestupném či vzestupném směru proteinu MLK a tak mohou ovlivnit aktivitu MLK proteinů, avšak neinteragují fyzikálně ani chemicky přímo s MLK proteinem.

Pojem "moduluje" (pozměňuje) se týká zvyšování či snižování aktivity konkrétního proteinu či jeho substrátu.

Tento vynález se částečně zaměřuje na způsoby identifikace sloučenin, které pozměňují aktivitu MLK proteinu a podporují buď přežívání buněk nebo zánik buněk. Sloučeniny způsobující vzrůst aktivity proteinu MLK mohou podporovat zánik buněk, zatímco sloučeniny, které snižují aktivitu proteinu MLK, mohou podporovat přežívání buněk.

Protein MLK může být jakýkoliv protein identifikovaný

v tom smyslu, že patří do skupiny MLK proteinů. Přednostně se protein MLK volí ze skupiny zahrnující MLK1, MLK2, MLK3 (SPRK, PTK1), LZK, DLK (ZPK, MUK) a MLK6, které se popisují výše. V preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu jsou způsoby identifikující sloučeniny, které interagují nebo se vážou s MLK proteinem, jak lze stanovit vazebnými esejemi, kinasovými esejemi či jinými ekvivalentními esejemi.

Pro identifikaci sloučenin modulujících aktivitu proteinu MLK a podporujících přežívání buněk nebo zánik buněk se buňka nebo buňky obsahující protein MLK uvádějí do kontaktu s testovanou sloučeninou. Uvedení do kontaktu může nastávat v pufrech nebo médiích dobře známých tomu, kdo má zkušenost v oboru. Alternativně může uvedení do kontaktu nastávat in vivo, kdy se zvíře, jako je například myš nebo jiné vhodné zvíře známé tomu, kdo má zkušenost v oboru, uvádí do kontaktu podáváním farmaceutického prostředku zahrnujícího zkoušenou látku a farmaceuticky přijatelné soli, nosiče či zředovací prostředky. Navíc lze použít různá množství buněk a koncentrací zkoušených látek. Stanoví se, zda testovaná sloučenina zvyšuje či snižuje aktivitu proteinu MLK. Navíc se též stanoví, zda tato testovaná sloučenina podporuje přežívání buněk nebo zánik buněk.

Buňky, které se uvádějí do kontaktu s testovanými sloučeninami, mohou být savčí buňky. Přednostně je touto buňkou neuronová buňka. Přednostně se tato buňka účastní některé neurodegenerativní choroby. Pro účely tohoto vynálezu lze pojmy "neurodegenerativní choroba" a "neurodegenerativní porucha" a "neurodegenerativní stav" navzájem zaměňovat a používat pro popis kterékoliv choroby či poruchy, kterých se účastní neuronové buňky nebo buňky, které jsou součástí neuronového systému včetně, avšak bez omezení, Alzhei-

merovy choroby, onemocnění motorického neuronu, amyotrofni laterální sklerózy, Parkinsonovy choroby, cerebrovaskulárního onemocnění, ischemických stavů, demence při AIDS, epilepsie, Huntingtonovy choroby a konkuzního (otřesem) či penetrujícího poškození mozku či míchy.

Aktivitu proteinu MLK lze stanovit řadou způsobů. Například lze aktivitu MLK stanovit měřením aktivity substrátu proteinu MLK. Tyto substráty jsou dobře známé a snadno rozlišitelné pro toho, kdo má zkušenost v oboru. Přednostně je tímto substrátem člen skupiny protein kinas aktivovaný mitogenem nebo skupina protein kinas aktivovaná mitogenem nebo další substráty v sestupném směru cesty, které zahrnují, avšak bez omezení, protein zvolený ze skupiny obsahující JNK1, JNK2, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38gamma, p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a savčí homolog AEX-3 a též obecné substráty Ser/Thr protein kinas, jako je myelinový bázeický protein (MBP). Chemické prostředky a způsoby měření aktivity substrátů jsou rovněž známy tomu, kdo má zkušenost v oboru. Přítomnost MLK lze též stanovit měřením množství MLK proteinu nebo mRNA kódující MLK protein. Reakční prostředky včetně protilátek a oligonukleotidových sond stejně tak jako způsoby měření množství DNA nebo proteinu včetně Northernova a Westernova blotování jsou dobře známy tomu, kdo má zkušenost v oboru. Aktivitu MLK proteinu lze též stanovit kinasovou esejí in vitro. Kinasové eseje in vitro zná dobře ten, kdo má zkušenost v oboru. Další způsoby měření aktivity proteinu zná ten, kdo má zkušenost v oboru a uvažují se tak, že se pokrývají tímto vynálezem. Proto ten, kdo má zkušenost v oboru, může stanovit, zda testovaná sloučenina moduluje, to jest zvyšuje či snižuje aktivitu proteinu MLK.

Řadou způsobů lze stanovit, zda zkoušená látka podporuje přežívání buněk nebo zánik buněk. Přednostně se podpora přežívání buněk nebo zániku buněk stanoví použitím buněk ohrožených zánikem a srovnáním množství buněk, které byly uvedeny do styku se zkoušenou sloučeninou a zůstávají živé, s množstvím buněk, které nebyly převedeny do styku s testovanou sloučeninou a zůstávají živé. Přednostně jsou těmito buňkami primární embryonální motoneuronové buňky, které jsou předem naprogramované na zánik. Primární embryonální motoneuronové buňky popisuje Maroney a kol., J. Neurosci., 18, 104-111 (1998) a tato práce se zde zahrnuje v plném znění formou odkazu. Primární embryonální motoneuronové buňky zahynou, pokud nejsou zachráněny zkoušenou sloučeninou. Proto vyšší počet žijících motoneuronových buněk v populaci motoneuronových buněk ošetřené testovanou sloučeninou ve srovnání s počtem motoneuronových buněk v populaci motoneuronových buněk, které nebyly ošetřeny testovanou sloučeninou, ukazuje, že testovaná sloučenina podporuje přežívání buněk. Oproti tomu nižší počet živých motoneuronových buněk v populaci motoneuronových buněk ošetřených zkoušenou látkou ve srovnání s počtem živých motoneuronových buněk v populaci motoneuronových buněk, které nebyly ošetřeny zkoušenou látkou, ukazuje, že zkoušená látka podporuje zánik buněk.

V dalším ztělesnění tohoto vynálezu se normální buňky či přirozené buňky převádějí na buňky s rizikem zániku nadměrnou expresí proteinu MLK, jak se popisuje níže v příkladech, a poté se přivedou do styku se zkoušenou látkou. Buňky nadměrně exprimující proteiny MLK mohou zahynout, pokud je nezachrání zkoušená látka. Nadměrná exprese proteinu MLK se může uskutečnit vektory schopnými exprese určitého proteinu uvnitř buňky. Expresní vektory zná dobře ten, kdo má zkušenost v oboru. Navíc jsou způsoby přípravy expresních vektorů

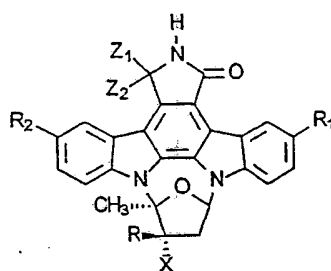
rovněž známé tomu, kdo má zkušenost v oboru. Expresní vektory exprimující kterýkoliv z proteinů MLK lze připravit způsobem podobným způsobům popsáným v příkladech. Velký počet živých buněk v populaci nadměrně exprimovaných buněk ošetřených zkoušenou látkou ve srovnání s počtem živých buněk v populaci nadměrně exprimovaných buněk, které nebyly ošetřeny zkoušenou látkou, ukazuje na zkoušenou látku podporující přežívání buněk. Oproti tomu menší počet živých buněk v populaci nadměrně exprimovaných buněk ošetřených zkoušenou látkou ve srovnání s počtem živých buněk v populaci nadměrně exprimovaných buněk, které nebyly ošetřeny zkoušenou látkou, ukazuje na zkoušenou látku, která podporuje zánik buněk.

V dalším ztělesnění tohoto vynálezu se podpora buněčného přežívání určuje pozorováním či měřením poklesu apoptózy. Cytoplasmatické smršťování a nukleární kondenzace jsou spojené s apoptózou. Proto ten, kdo má zkušenost v oboru, může zjišťovat pokles apoptózy měřením či pozorováním poklesu cytoplasmatického smršťování a/nebo nukleární kondenzace. Navíc ten, kdo má zkušenost v oboru, může měřit apoptózu použitím konvenčních způsobů barvení.

V dalším ztělesnění tohoto vynálezu lze použít normální, přirozené neuronové buňky pro identifikaci sloučenin podporujících zánik buněk. Normální neuronové buňky přežívají, pokud se neindukují k zániku zkoušenou látkou. Menší počet živých buněk v populaci normálních buněk ošetřených zkoušenou látkou ve srovnání s počtem živých buněk v populaci normálních buněk, které nebyly ošetřeny zkoušenou látkou, ukazuje na zkoušenou látku, která podporuje zánik buněk. Oproti tomu vyšší nebo stejný počet živých buněk v populaci normálních buněk, které nebyly ošetřeny zkoušenou látkou, ukazuje na zkoušenou látku, která podporuje zánik buněk.

Tento vynález se též zaměřuje částečně na způsob pozměňování aktivity proteinů MLK, který zahrnuje uvedení proteinu nebo buňky obsahující protein do styku se sloučeninou obecného vzorce G (zde označený vzorec I) v US patentu č. 5 705 511, který byl přiznán původci této přihlášky a zahrnuje se zde v celku formou odkazu.

Tento vynález se též částečně zaměřuje na způsoby pozměňování aktivity proteinu MLK zahrnující uvedení proteinu nebo buňky obsahující protein do styku se sloučeninou obecného vzorce III níže.



(III)

ve kterém

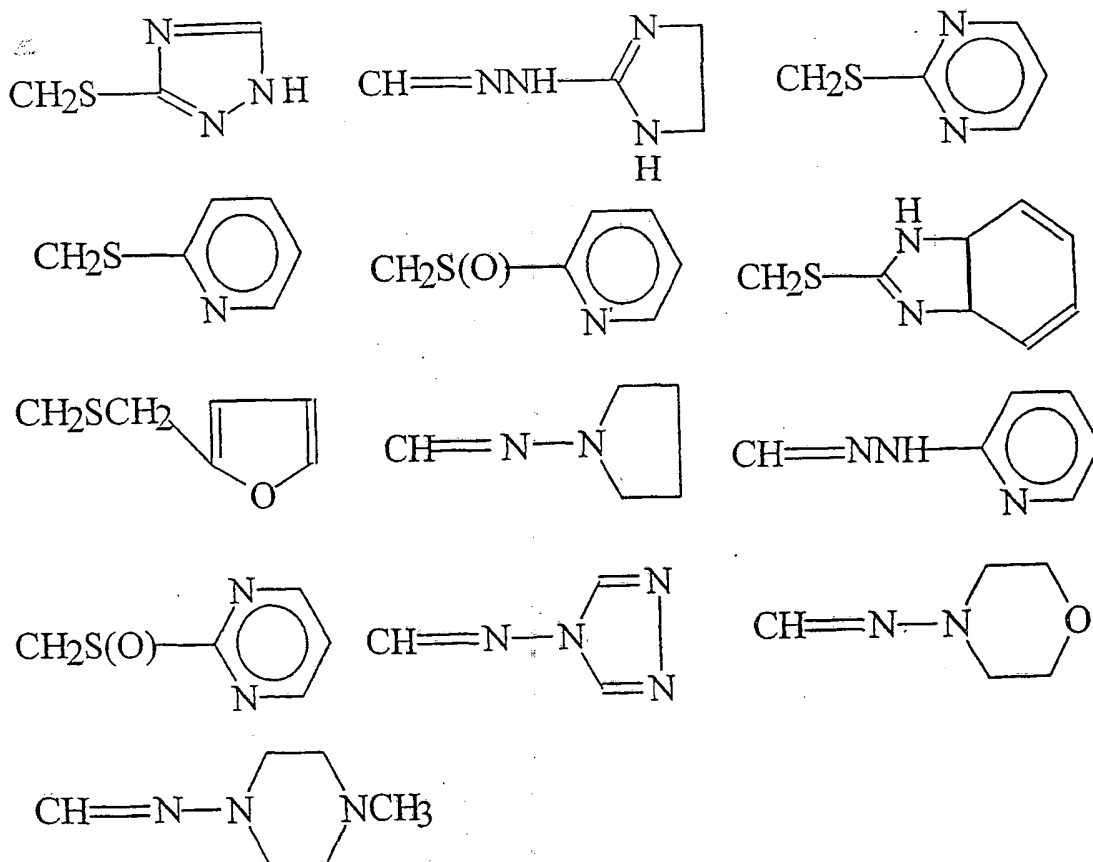
Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří =O,

R_1 se volí z případů atom vodíku, atom chloru, skupina $\text{CH}_2\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, atom bromu, skupina $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\text{-n-C}_4\text{H}_9$, $\text{NHCONHC}_6\text{H}_5$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_3 ,

07.05.03

- 26 -

$\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$, NHCO_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, OH ,
 $\text{O-n-propylová skupina}$, $\text{CH=NNH-C-(=NH)NH}_2$,
 $\text{CH=N-N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH-n-C}_4\text{H}_9$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$,
 $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazin})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$

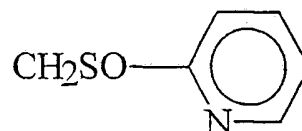
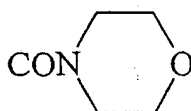
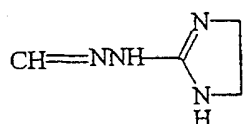


- R_2 se volí z případů atom vodíku, atom bromu, atom chloru, atom jodu, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazin})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ a CH_2OH ,
- X se volí z případů atom vodíku, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerinH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycin}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serin}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH , $\text{CH}_2\text{NH-Pro-}$

07.05.03

- 27 -

lin, CH_2CH_2 (2-Pyridyl), $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2$ -
 OH , $\text{CH}=\text{NNHCONH}_2$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$,
 $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, CO_2 n-hexyl, CONHCH_3 a $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ nebo
 skupina podle jednoho z následujících vzorců



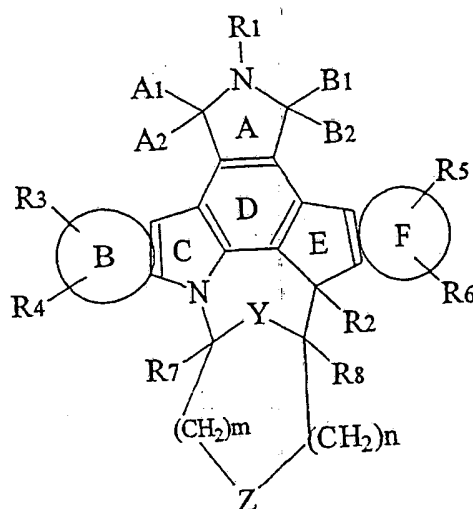
a

R se volí z případů hydroxylové skupiny a methoxyskupiny.

V preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 je skupina $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, R_2 je CH_2CH_2 (2-Pyridyl) a R je hydroxylová skupina. V dalších preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je CO_2CH_3 , R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 , Z_2 a R_1 jsou atomy vodíku, R_2 je skupina CH_2OH , X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{H}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazin})]$, X je skupina

CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, R_1 je atom bromu, R_2 je atom jodu, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina nebo Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je skupina OCH_3 nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří $=\text{O}$, R_1 a R_2 jsou atomy bromu, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

Tento vynález se též částečně zaměřuje na způsoby modulace aktivity proteinu MLK zahrnující přivedení proteinu nebo buňky obsahující protein do styku se sloučeninou obecného vzorce II níže.



(II)

ve kterém

kruhy B a F nezávisle na sobě a každý spolu s atomy uhlíku, ke kterému se připojuje, se volí z následujících případů:

(a) nenasycený šestičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém lze od 1 do 3 atomů uhlíku nahradit atomy dusíku,

(b) nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh a

(c) nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém buď

1) jeden atom uhlíku je nahrazen atomem kyslíku, dusíku nebo síry,

2) atomy uhlíku jsou nahrazeny atomem síry a atomem dusíku, atomem kyslíku a atomem dusíku nebo dvěma atomy dusíku nebo

3) tři atomy uhlíku jsou nahrazeny třemi atomy dusíku,

R^1 se volí z následujících případů:

a) atom vodíku, substituovaná či nesubstituovaná alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná arylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná heteroarylová skupina nebo substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

b) skupina $-C(=O)R^9$, ve které R^9 se volí z případů alkylová skupina, arylová skupina a heteroarylová skupina,

c) skupina $-OR^{10}$, ve které R^{10} se volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku,

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

1) R^{11} a R^{12} se nezávisle na sobě volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku nebo

2) R^{11} a R^{12} spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, ve kterém X^1 se volí z případů $-O-$, $-S-$ a $-CH_2-$,

R^2 se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, hydroxylová skupina, alkoxy skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, skupina $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku a substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 se navzájem nezávisle volí z případů

a) atom vodíku, arylová skupina, heteroarylová skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, trifluormethylová skupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$,

b) skupina $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$, ve které R^{14} je zbytek aminokyseliny po odstranění hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny,

c) skupina $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$ nebo $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$, ve které R^{2A} je substituent totožný se substituentem R^2 ,

d) skupina $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^2-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$, ve které y je 0, 1 nebo 2,

e) alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku, alkenylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku a alkynylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku, ve které

1) každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je nesubstituovaná nebo

2) každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je substituovaná 1 až 3 skupinami zvolenými z následujících případů: arylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, heteroarylová skupina, arylalkoxyskupina, heterocykloalkoxyskupina, hydroxyalkoxyskupina, alkyl-oxy-alkoxyskupina, hydroxyalkylthioskupina, alkoxy-alkylthioskupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina $-\text{OR}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$,

-OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahydropyranylová skupina, skupiny -NR¹¹R¹², -NR¹⁰C(=O)R⁹, -NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -NHC(=NH)NH₂, -NR¹⁰S(O)₂R⁹, -S(O)₂R⁹, -CO₂R², -C(=O)NR¹¹R¹², -C(=O)R², -CH₂OR¹⁰, -CH=NNR²R^{2A}, -CH=NOR², -CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -S(=O)₂NR²R^{2A}, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -OR¹⁴ a skupina monosacharidu o 5 až 7 atomech uhlíku, ve které každá hydroxylová skupina tohoto monosacharidu je nezávisle buď nesubstituovaná nebo nahrazena atomem vodíku, alkylovou skupinou o 1 až 4 atomech uhlíku, alkylkarbonyloxyskupinou o 2 až 5 atomech uhlíku nebo alkoxyskupinou o 1 až 4 atomech uhlíku,

X² je atom kyslíku, atom síry nebo skupina NR¹⁰,

R⁷ a R⁸ se nezávisle na sobě volí z případů atom vodíku, alkylová skupina, o 1 až 4 atomech uhlíku, alkoxy skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina, skupina -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)-NR¹¹R¹² a -(CH₂)_pNR¹¹R¹² nebo skupiny R⁷ a R⁸ spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce -CH₂-X³-CH₂-, ve kterém X³ je X² nebo vazba,

m a n jsou navzájem nezávisle 0, 1 nebo 2,

Y se volí z případů -O-, -S-, -N(R¹⁰)-, -N⁺(O⁻)(R¹⁰)-, -N(OR¹⁰)- a -CH₂-,

Z se volí z případů vazba, -O-, -CH=CH-, -S-, -C(=O)-,

$-\text{CH}(\text{OR}^{10})-$, $-\text{N}(\text{R}^{10})-$, $-\text{N}(\text{OR}^{10})-$, $\text{CH}(\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$,
 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{17})-$, $-\text{N}(\text{R}^{17})\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{N}(\text{S}(\text{O})_{\text{y}}\text{R}^9)-$,
 $-\text{N}(\text{S}(\text{O})_{\text{y}}\text{NR}^{11}\text{R}^{12})-$, $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^{17})-$, $-\text{C}(\text{R}^{15}\text{R}^{16})-$,
 $-\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{R}^{10})-$, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$ a $-\text{CH}(\text{O}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^9)\text{CH}-$
 $(\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{9\text{A}})-$, kde $\text{R}^{9\text{A}}$ je substituent totožný se sub-
stituentem R^9 ,

R^{15} a R^{16} se nezávisle volí z případů atom vodíku, hydroxy-
lová skupina, skupina $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{10}$, $-\text{O}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$, hydroxy-
alkylová skupina a skupina $-\text{CO}_2\text{R}^{10}$,

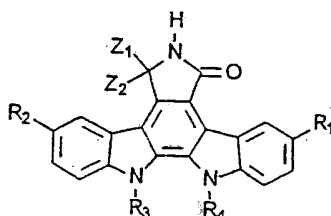
R^{17} se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina, ary-
lová skupina a heteroarylová skupina,

A^1 a A^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku, atom
vodíku a skupina $-\text{OR}^2$, atom vodíku a skupina $-\text{SR}^2$,
atom vodíku a skupina $-\text{N}(\text{R}^2)_2$ a skupina, ve které A^1
a A^2 spolu tvoří zbytek zvolený z případů $=\text{O}$, $=\text{S}$
a $=\text{NR}^2$,

B^1 a B^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku atom vo-
díku a skupina $-\text{OR}^2$, atom vodíku a skupina $-\text{SR}^2$, atom
vodíku a skupina $-\text{N}(\text{R}^2)_2$ a skupina, ve které B^1 a B^2
spolu tvoří zbytek zvolený ze skupiny zahrnující $=\text{O}$,
 $=\text{S}$ a $=\text{NR}^2$,

s podmínkou, že alespoň jeden z párů A^1 a A^2 nebo B^1 a B^2
tvoří $=\text{O}$.

Tento vynález se částečně též zaměřuje na způsoby
pozměňování aktivity proteinu MLK, který spočívá v uvedení
do styku proteinu nebo buňky obsahující protein se sloučení-
nou obecného vzorce IV níže



(IV)

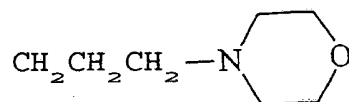
ve kterém

Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu vytvářejí =O,

R_1 je atom vodíku nebo atom bromu,

R_2 je atom vodíku,

R_3 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ nebo

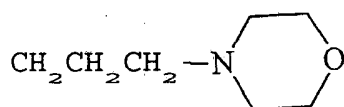


a

R_4 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

V preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu R_1 , R_2 , R_4 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku a R_3 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$.
V dalších preferovaných ztělesněních tohoto vynálezu R_1 je

atom bromu a R_2 , R_3 , R_4 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku nebo R_1 , R_2 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku a R_3 a R_4 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo R_1 , R_2 , R_3 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku a R_4 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo R_1 , R_2 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku a R_3 a R_4 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ nebo R_1 , R_2 , R_4 , Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku a R_3 je skupina



Tento vynález též poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které lze použít při léčení neurodegenerativních poruch a které spočívají v uvedení do styku buňky nebo buňčného extraktu obsahujícího kinasový protein s vícenásobnou vazbou se sloučeninou a stanovení, zda tato sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou. Tyto buňky a jejich extrakty zahrnují ty, které se popisují výše. Sloučeniny, které se identifikují těmito způsoby (to jest ty sloučeniny, které inhibují či snižují aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou), mohou být užitečné pro léčení neurodegenerativních poruch. Tento protein se přednostně volí ze skupiny zahrnující kinasu 1 s vícenásobnou vazbou, kinasu 2 s vícenásobnou vazbou, kinasu 3 s vícenásobnou vazbou, kinasu nesoucí leucinový zipper, kinasu nesoucí dvojitý leucinový zipper a kinasu 6 s vícenásobnou vazbou. Buňka se uvádí do styku in vitro nebo in vivo. Přednostně se aktivita proteinu stanoví měřením aktivity nebo fosforylačního stavu substrátu tohoto proteinu. Přednostně se tento substrát volí ze skupiny zahrnující JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38gamma, p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a savčí homolog AEX-3, stejně tak jako obecné substráty Ser/Thr, například myelinový bázeický protein (MBP). Aktivita proteinu se též může stanovit měřením aktivity substrátu

proteinu, množství substrátu proteinu nebo mRNA kódující substrát proteinu. Aktivita proteinu se též může stanovit esejí kinasy in vitro nebo vazebnou esejí. Buňky jsou přednostně primární embryonální motoneuronové buňky, buňky, které exprimují protein kinasu s vícenásobnou vazbou nebo neuronové buňky, avšak mohou to být jakékoliv buňky či jejich extrakty. Přednostně se sloučeniny, které přímo vážou kinasový protein s vícenásobnou vazbou, identifikují způsobem popsáním výše.

Tento vynález též poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které lze použít při léčení zánětu a které spočívají v uvedení buňky nebo buněčného extraktu obsahujícího kinasový protein s vícenásobnou vazbou do styku se sloučeninou a stanovení, zda tato sloučenina snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou. Buňky a jejich extrakty zahrnují ty, které se popisují výše. Sloučeniny identifikované těmito způsoby (to jest ty sloučeniny, které inhibují či snižují aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou) mohou být použitelné při léčení zánětů. Protein se přednostně volí ze skupiny zahrnující kinasu s vícenásobnou vazbou 1, kinasu s vícenásobnou vazbou 2, kinasu s vícenásobnou vazbou 3, kinasu nesoucí leucinový zipper, kinasu nesoucí dvojitý leucinový zipper a kinasu 6 s vícenásobnou vazbou. Buňka se uvádí do styku in vitro nebo in vivo. Přednostně se proteinová aktivita stanoví měřením aktivity nebo stavu fosforylace substrátu tohoto proteinu. Přednostně se tento substrát volí ze skupiny zahrnující JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a savčí homolog AEX-3 stejně tak jako obecné substráty Ser/Thr, jako je například myelinový bázeický protein (MBP). Proteinová aktivita se též může stanovit měřením aktivity substrátu

proteinu, množství substrátu proteinu nebo mRNA kódující substrát proteinu. Proteinová aktivita se též může stanovit kinasovou esejí in vitro nebo vazebnou esejí.

Buňky jsou přednostně primárními embryonálními moto-neuronovými buňkami, buňkami, které nadměrně exprimují kinasový protein s vícenásobnou vazbou nebo neuronovými buňkami, avšak může se použít jakýkoliv jejich buněčný extrakt. Buňky též zahrnují, avšak bez omezení, ty, které se účastní zánětu, jako jsou například lymfocyty, makrofágy a další bílé krvinky dobře známé tomu, kdo má zkušenost v oboru. Přednostně se identifikují sloučeniny, které se přímo vážou na kinasový protein s vícenásobnou vazbou.

Tento vynález též poskytuje způsoby léčení savce, který má neurodegenerativní poruchu nebo u kterého je podezření na tuto poruchu a tento způsob spočívá v podávání tomuto savci sloučeniny inhibující či snižující aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou. Sloučenina, která inhibuje či snižuje aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou, zahrnuje, avšak bez omezení, sloučeniny obecných vzorců I, II, III a IV. Preferované sloučeniny zahrnují ty, které se popisují výše vzhledem ke způsobu vyhledávání sloučenin modulujících aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a které podporují buď přežívání buněk nebo zánik buněk. Preferovaným savcem je člověk. U pacienta může být podezření na neurodegenerativní onemocnění, jestliže vykazuje symptomy konkrétního neurodegenerativního onemocnění, jestliže patří do vysoce rizikové skupiny nebo má rodinnou anamnézu neurodegenerativního onemocnění.

Tento vynález též poskytuje způsoby léčení savce se zánětem, který spočívá v podávání tomuto savci sloučeniny

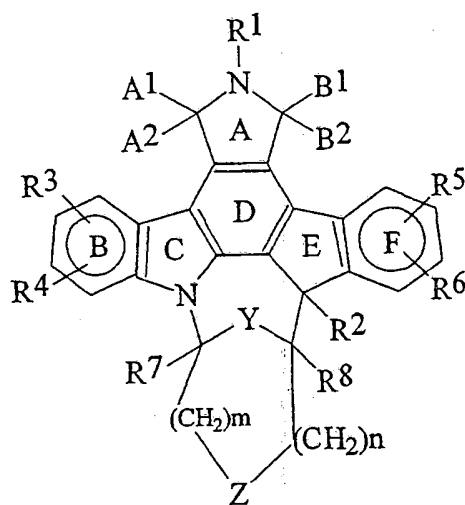
inhibující či snižující aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou. Sloučeniny inhibující či snižující aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou zahrnují, avšak bez omezení, sloučeniny obecných vzorců I, II, III a IV. Preferované sloučeniny zahrnují ty, které se popisují výše vzhledem ke způsobu vyhledávání sloučenin pozměňujících aktivitu kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou a podporujících buď přežívání nebo zánik buněk. Preferovaným savcem je člověk.

Uvedení do styku se sloučeninami obecných vzorců I až IV se může uskutečňovat v pufrech nebo médiích dobře známých tomu, kdo má zkušenost v oboru. Alternativně se toto uvedení do styku může uskutečnit podáním farmaceutického přípravku obsahujícího zkoušenou látku a farmaceuticky přijatelnou sůl, nosič nebo zředovací prostředek vhodnému živočichu či savci, jako je například myš nebo jiný vhodný živočich známý tomu, kdo má zkušenost v oboru. Navíc lze použít různé počty buněk a koncentrace sloučenin. Buňky, které byly uvedeny do styku se zkoušenými sloučeninami, mohou být jakékoliv savčí buňky. Přednostně je touto buňkou neuronová buňka. Přednostně se tato buňka účastní neurodegenerativního onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba, onemocnění motorických neuronů, amyotrofní laterální skleróza, Parkinsonova choroba, cerebrovaskulární onemocnění, ischemické stavy, demence při AIDS, epilepsie, Huntingtonova choroba a konkusivní či penetrující poškození mozku nebo míchy. Sloučeniny obecného vzorce I a způsoby, kterými se připravují, se popisují v US patentu č. 5 705 511, který se zde zahrnuje vcelku formou odkazu. Sloučeniny obecného vzorce III a způsoby jejich přípravy se popisují v US patentech č. 5 741 8098, 5 621 100, 5 621 101, 5 461 146 a 5 756 494 a WO 97/46567, které se zde zahrnují vcelku formou odkazu. Sloučeniny obec-

ného vzorce IV a způsoby jejich přípravy se popisují v US patentech č. 5 741 8098, 5 621 100, 5 621 101, 5 461 146 a 5 756 494 a WO 97/46567, které se zde všechny zahrnují vcelku formou odkazu.

Sloučeniny obecného vzorce II zahrnují diastereomery a enantiomery vzhledem k uspořádání okolo atomů uhlíku, ke kterému se připojují substituenty R^2 , R^7 a R^8 .

Preferované indenopyrrolokarbazoly s můstkem znázorňuje obecný vzorec II.



(II)

V některých preferovaných ztělesněních sloučenin obecného vzorce II je R^1 atom vodíku. V dalších preferovaných ztělesněních je R^2 atom vodíku, hydroxylová skupina nebo substituovaná či nesubstituovaná alkylová skupina.

V dalších preferovaných ztělesněních jsou R^3 , R^4 , R^5

a R^6 nezávisle na sobě atomy vodíku, substituované či nesubstituované alkylové skupiny, atomy halogenu, substituované či nesubstituované alkoxykupiny, substituované či nesubstituované aminoskupiny nebo substituované či nesubstituované arylové skupiny. V dalších preferovaných ztělesněních jsou R^7 a R^8 nezávisle na sobě atomy vodíku nebo substituované či nesubstituované alkylové skupiny.

V některých preferovaných ztělesněních je Y atom kyslíku. V dalších preferovaných ztělesněních je Z vazba, atom kyslíku, atom síry nebo substituovaný či nesubstituovaný atom dusíku. V dalších preferovaných ztělesněních jsou m a n nezávisle na sobě 1 nebo 2. V některých zvláště preferovaných ztělesněních je Y atom kyslíku, Z je vazba nebo atom kyslíku a m a n jsou nezávisle na sobě 1 nebo 2.

V dalších preferovaných ztělesněních jsou A^1A^2 a B^1B^2 =O nebo H, H.

V některých zvláště preferovaných ztělesněních jsou všechny R^1 , R^4 , R^6 a R^7 atomy vodíku, Y je =O a n je 1, A^1A^2 a B^1B^2 jsou =O nebo H, H, R^2 je atom vodíku, hydroxylová skupina nebo nižší alkylová skupina, R^3 je atom vodíku nebo substituovaná alkylová skupina, R^5 a R^8 jsou oba atomy vodíku nebo alkoxykupiny s preferencí methoxykupiny, Z je vazba nebo atom kyslíku a m je 1 nebo 2.

Některá zvláště preferovaná ztělesnění sloučenin obecného vzorce II jsou sloučeniny II-1, II-2, II-3, II-4a, II-4b, II-5, II-6, II-7a, II-7b, II-8, II-9, II-10, II-11 a II-12 vyjmenované v tabulce 1 níže.

Sloučeniny obecného vzorce II se zde dále citují jako

sloučenina (II).

Pojem "karbocyklický", jak se zde používá, se týká cyklických skupin, ve kterých se kruhová část skládá pouze z atomů uhlíku. Pojmy "heterocyklo" nebo "heterocyklický" se týkají cyklických skupin, ve kterých kruhová část zahrnuje alespoň jeden atom, jako je atom kyslíku, dusíku nebo síry.

Pojem "alkylová" skupina, jak se zde používá, znamená přímou cyklickou či rozvětvenou alkylovou skupinu o 1 až 8 atomech uhlíku, jako je methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina, isopropylová skupina, butylová skupina, isobutylová skupina, sek-butylová skupina, terc-butylová skupina, pentylová skupina, isoamylová skupina, neopentylová skupina, 1-ethylpropylová skupina, hexylová skupina, oktylová skupina, cyklopropylová skupina a cyklopentylová skupina. Alkylový zbytek skupin obsahujících alkylovou skupinu, jako jsou alkoxyskupiny, alkoxykarbonylové skupiny a alkylamino-karbonylové skupiny, má stejný význam jako alkylová skupina definovaná výše. Nižší alkylové skupiny, které se preferují, jsou alkylové skupiny podle definice výše o 1 až 4 atomech uhlíku. Pojem "alkenylová skupina" se uvažuje tak, že zahrnuje přímé nebo rozvětvené uhlovodíkové řetězce mající alespoň jednu dvojnou vazbu mezi atomy uhlíku. Příklady alkenylových skupin zahrnují ethenylové a propenylové skupiny. Pojem "alkynylová skupina" se uvažuje tak, že zahrnuje přímé či rozvětvené uhlovodíkové řetězce mající alespoň jednu trojnou vazbu mezi atomy uhlíku. Příklady alkylových skupin zahrnují ethynylové a propynylové skupiny.

Acylový zbytek skupin obsahujících acylovou skupinu, jako jsou acyloxyskupiny, se uvažuje tak, že obsahuje přímou či rozvětvenou alkanoylovou skupinu o 1 až 6 atomech uhlíku,

jako je formylová skupina, acetylová skupina, propanoylová skupina, butyrylová skupina, valerylová skupina, pivaloylová skupina nebo hexanoylová skupina.

Pojem "arylová skupina", jak se zde používá, znamená skupinu o 6 až 12 atomech uhlíku, jako je fenylová skupina, bifenylová skupina a naftylová skupina. Preferované arylové skupiny zahrnují nesubstituované nebo substituované fenylové a naftylové skupiny. Pojem "heteroarylová skupina", jak se zde používá, označuje arylovou skupinu, ve které je alespoň jeden atom uhlíku v kruhu nahrazen heteroatomem (to jest jiným než uhlíkovým atomem), jako je atom kyslíku, dusíku nebo síry. Preferované heteroarylové skupiny zahrnují pyridylovou skupinu, pyrimidylovou skupinu, pyrrolylovou skupinu, furylovou skupinu, thienylovou skupinu, imidazolylovou skupinu, triazolylovou skupinu, tetrazolylovou skupinu, chinolylovou skupinu, isochinolylovou skupinu, benzoimidazolylovou skupinu, thiazolylovou skupinu, pyrazolylovou skupinu a benzo-thiazolylovou skupinu.

Pojem "aralkylová skupina" (nebo "arylalkylová skupina") se uvažuje tak, že označuje skupinu o 7 až 15 atomech uhlíku skládající se z alkylové skupiny nesoucí arylovou skupinu. Příklady aralkylových skupin zahrnují benzylovou skupinu, fenethylovou skupinu, benzhydrylovou skupinu a naf-tylmethylovou skupinu.

Alkylové skupiny a alkylové zbytky, které jsou součástí skupin substituentů, jako je aralkylová skupina, arylalkoxyskupina, hydroxyalkoxyskupina, alkoxy-alkoxyskupina, hydroxy-alkylthioskupina, alkoxy-alkylthioskupina, alkylkarbonyloxyskupina, hydroxyalkylová skupina a acyloxyskupina, mohou být substituované nebo nesubstituované. Substituovaná

alkylová skupina má 1 až 3 nezávisle zvolené substituenty, kterými je přednostně hydroxylová skupina, nižší alkoxykupina, (nižší alkoxy)-alkoxykupina, substituovaná či nesubstituovaná arylalkoxy-(nižší alkoxykupina), substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkoxy-(nižší alkoxykupina), substituovaná či nesubstituovaná arylalkoxykarbonylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná heterocykloalkoxykupina, atom halogenu, karboxylová skupina, nižší alkoxykarbonylová skupina, nitroskupina, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkylaminoskupina), skupina dioxolanu, dioxanu, dithiolanu, dithionu, furanu, laktonu nebo laktamu.

Substituované arylové, substituované heteroarylové a substituované aralkylové skupiny mají 1 až 3 nezávisle zvolené substituenty, kterými jsou přednostně nižší alkylová skupina, hydroxylová skupina, nižší alkoxykupina, karboxylová skupina, nižší alkoxykarbonylová skupina, nitroskupina, aminoskupina, mono- nebo di-(nižší alkylaminoskupina) a atom halogenu.

Heterocyklické skupiny s atomem dusíku zahrnují pyrrolidinylovou skupinu, piperidinylovou skupinu, piperidinoskupinu, morfolinylovou skupinu, morfolinovou skupinu, thiomorfolinovou skupinu, N-methylpiperazinylovou skupinu, indolylovou skupinu, isoindolylovou skupinu, imidazolovou skupinu, imidazolinovou skupinu, oxazolinovou skupinu, oxazolovou skupinu, triazolovou skupinu, thiazolinovou skupinu, thiazolovou skupinu, pyrazolovou skupinu, pyrazolonovou skupinu a triazolovou skupinu. Heterocyklické sloučeniny s atomem kyslíku zahrnují skupinu furanu, tetrahydrofuranu, pyranu a tetrahydropyranu.

"Hydroxyalkylové" skupiny jsou alkylové skupiny, ke

kterým se připojuje hydroxylová skupina. Halogeny zahrnují atom fluoru, atom chloru, atom bromu a atom jodu.

Pojem "heteroarylalkylová" skupina, jak se zde používá, znamená arylalkylovou skupinu obsahující heteroatom. Pojem "oxy" znamená přítomnost atomu kyslíku. "Alkoxyskupiny" jsou tedy alkylové skupiny, které se připojují prostřednictvím atomu kyslíku a "karbonyloxyskupiny" jsou karbonylové skupiny, které se připojují prostřednictvím atomu kyslíku.

Pojem "heterocykloalkoxyskupina" znamená alkoxyskupinu, která má heterocyklickou skupinu připojenou k alkylovému zbytku a pojem "arylalkoxyskupina" znamená alkoxyskupinu, která má alkylovou skupinu připojenou k alkylovému zbytku. Pojem "alkylkarbonyloxyskupina" znamená skupinu obecného vzorce $-O-C(=O)-alkyl$.

Pojem "alkyloxy-alkoxy" znamená alkoxyskupinu, která obsahuje alkoxysubstituent připojený k alkylovému zbytku. Pojem "alkoxy-alkylthioskupina" znamená alkylthioskupinu (to jest skupinu vzorce $-S-alkyl$), která obsahuje alkoxysubstituent připojený k alkylovému zbytku. Pojem "hydroxy-alkylthioskupina" znamená alkylthioskupinu (to jest skupinu vzorce $-S-alkyl$), která obsahuje hydroxylovou skupinu připojenou k alkylovému zbytku.

Pojem "monosacharid", jak se zde používá, má běžný význam jednoduchého cukru.

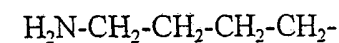
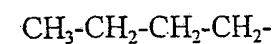
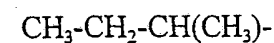
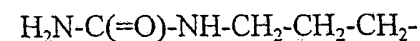
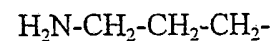
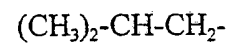
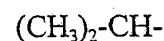
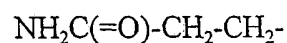
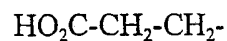
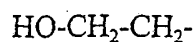
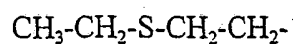
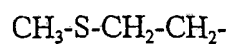
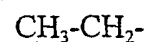
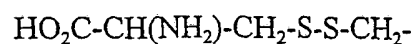
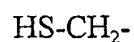
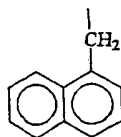
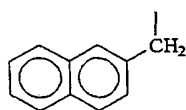
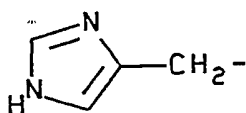
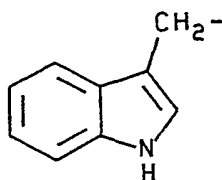
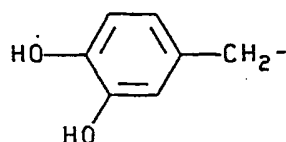
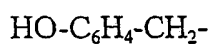
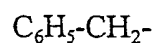
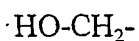
Pojem "aminokyselina", jak se zde používá, označuje molekulu s aminoskupinou a karboxylovou skupinou. Ztělesnění aminokyselin zahrnují α -aminokyseliny, to jest karboxylové kyseliny obecného vzorce $HOOC-CH(NH_2)-(postranní\ řetězec)$.

Postranní řetězec aminokyselin zahrnuje přirozené i nepřirozené zbytky. Nepřirozené (to jest nevyskytující se v přírodě) aminokyselinové postranní zbytky jsou zbytky, které se užívají místo přirozených postranních řetězců aminokyselin, například v případě aminokyselinových analogů. Viz například Lehninger, Biochemistry, 2. vydání, Worth Publishers, Inc., 1975, str. 73 až 75, zahrnuto zde formou odkazu.

Preferované α -aminokyseliny zahrnují glycin, alanin, prolin, kyselinu glutamovou a lysin v konfiguraci D, v konfiguraci L nebo v racemické směsi.

Postranní řetězce dalších reprezentativních α -aminokyselin ukazuje tabulka 1 níže.

Tabulka 1



V některých preferovaných ztělesněních substituenty sloučenin obecného vzorce II zahrnují zbytek aminokyselin po odstranění hydroxylového zbytku z karboxylové skupiny, to jest skupiny obecného vzorce $-C(=O)-CH(NH_2)-$ (postranní řetězec).

Funkční skupiny přítomné na sloučeninách obecného vzorce II mohou obsahovat chránicí skupiny. Například substituenty postranního řetězce aminokyselin sloučenin obecného vzorce II mohou být substituované chránicími skupinami, jako je benzyloxykarbonylová skupina nebo terc-butoxykarbonylová skupina. Chránicí skupiny jsou známy jako takové, jako chemické funkční skupiny, které lze selektivně připojit a odstranit od funkčních skupin, jako jsou hydroxylové skupiny a karboxylové skupiny. Tyto skupiny jsou umístěné na chemickou sloučeninu, aby učinily její funkční skupinu inertní za chemických reakčních podmínek, kterým je tato sloučenina vystavena. V rámci tohoto vynálezu lze použít jakoukoliv z řady chránicích skupin. Jednou z takových chránicích skupin je benzyloxykarbonylová skupina (Cbz, Z). Jiné preferované chránicí skupiny podle tohoto vynálezu lze nalézt v T. W. Green a P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2. vyd., Wiley & Sons, 1991.

Indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstkem prokazují důležité funkční farmakologické aktivity, které jsou použitelné v řadě uspořádání včetně oblastí výzkumu a terapie. Tyto deriváty jsou použitelné jako terapeutické prostředky. Aktivity těchto sloučenin vykazují pozitivní účinky na funkci a/nebo přežívání buněk reagujících na trofické faktory. Účinek na funkci a/nebo přežívání buněk citlivých na trofické faktory, například na buňky neuronové linie, se prokazuje kteroukoliv z následujících esejí: (1) esej cholin

acetyltransferasy ("ChAT") v kultuře míchy nebo (2) esej aktivity ChAT na kultuře bazálních neuronů předního mozku.

Pojem "účinek", jak se zde používá pro definici pojmů "funkce" a "přežívání", znamená pozitivní či negativní posměnění nebo změnu. Účinek, který je pozitivní, se zde může uvádět jako "posílení" nebo "posilující" a účinek, který je negativní, se zde může uvádět jako "inhibice" či "inhibující".

Pojmy "posílení" či "posilující" použité při popisu pojmů "funkce" nebo "přežívání" znamená, že přítomnost indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstkem má pozitivní účinek na funkci a/nebo přežívání buňky citlivé na trofický faktor ve srovnání s buňkou v nepřítomnosti této sloučeniny. Například, avšak nikoliv ve smyslu omezení, vzhledem k přežívání například cholinergního neuronu by sloučenina prokázala zvýšení přežívání cholinergní neuronové populace s rizikem zániku (například následkem poranění, chorobného stavu, degenerativního stavu nebo přirozené progrese) ve srovnání s cholinergní neuronovou populací bez této sloučeniny, pokud ošetřená populace má relativně větší trvání funkční schopnosti než neošetřená.

Pojem "inhibovat" a "inhibice" znamená, že specifická odpověď určeného materiálu (například enzymatická aktivita) je relativně snížena za přítomnosti indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstkem.

Zkratka "trk", jak se zde používá, se týká skupiny vysokoafinitních neurotrofinových receptorů zahrnujících v současné době trkA, trkB a trkC a dalších proteinů souvisejících s membránou, ke kterým se může vázat neurotrofin.

Pojem inhibice VEGFR, jak se zde používá, zahrnuje použitelnost například při onemocněních, ve kterých hraje důležitou roli angiogeneze, jako jsou solidní tumory, endometrióza, diabetická retinopatie, psoriáza, hemangioblastom stejně tak jako další oční choroby a karcinomy.

Inhibice trk zahrnuje použitelnost například při chorobách prostaty, jako je karcinom prostaty a benigní hyperplázie prostaty a léčení zánětlivé bolesti.

Inhibice receptoru růstového faktoru odvozeného od destiček (PDGFR) zahrnuje například použitelnost při různých formách neoplázie, revmatické arthritidy, plicní fibrózy, myelofibrózy, abnormálního hojení ran, chorobách s cílovým kardiovaskulárním poškozením, jako je ateroskleróza, restenóza, restenóza po angioplastice atd.

Pojem "rakovina" a "rakovinový" se týká jakékoliv maligní proliferace buněk u savce. Příklady zahrnují rakovinu prostaty, benigní hyperplázii prostaty, rakovinu ovárií, mléčné žlázy, mozku, plic, pankreasu, kolorekta, žaludku, solidní tumory, rakovinu hlavy a krku, neuroblastom, renální buněčný karcinom, lymfom, leukémii a další známé malignity hemopoetických systémů a další známé typy rakoviny.

Pojem "neuron", "neuronová buněčná linie" a "neuronová buňka", jak se zde používá, zahrnuje, avšak bez omezení, heterogenní populaci neuronových typů majících singulární či vícečetné transmitery a/nebo singulární či vícečetné funkce. Přednostně jsou to cholinergní a sensorické neurony. Pojem "cholinergní neuron", jak se zde používá, znamená neurony centrální nervové soustavy (CNS) a periferní nervové sousta-

vy (PNS), jejichž neurotransmiterem je acetylcholin. Příklady jsou bazální neurony předního mozku, striata a míchy. Pojem "sensorický neuron", jak se zde používá, zahrnuje neurony citlivé na vlivy prostředí (například teplotu, pohyb) například z kůže, svalů a kloubů. Příkladem je neuron dorzálního kořenového ganglia.

Pojem "buňka citlivá na trofický faktor", jak se zde definuje, je buňka, která zahrnuje receptor, ke kterému se může specificky vázat některý trofický faktor. Příklady zahrnují neurony (například cholinergní a sensorické neurony) a neneuronové buňky (například monocyty a neoplastické buňky).

Indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstky, které se zde popisují, jsou použitelné ve výzkumných i terapeutických uspořádáních, například při inhibici enzymatické aktivity. Například ve výzkumu lze tyto sloučeniny použít při vývoji esejí a modelů pro další zvyšování pochopení úlohy, kterou hraje serin/threonin nebo tyrosin protein kinasa (například PKC, trk tyrosin kinasa) v mechanistických aspektech přidružených poruch a onemocnění. V terapii lze tyto sloučeniny inhibující enzymatické aktivity použít pro inhibici škodlivých účinků těchto enzymů vzhledem k poruchám, jako je rakovina.

Jak ukazují příklady popsané níže, inhibice enzymatické aktivity indenopyrrolokarbazolovými sloučeninami s můstkem se může stanovit například v následujících esejích:

1. esej inhibice trkA tyrosin kinasové aktivity,

2. inhibice NGF-stimulované trk fosforylace v přípravku celých buněk,

2. esej inhibice kinasy receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR),

4. esej inhibice aktivity PKC,

5. esej inhibice PDGFR.

Popisované indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstky lze použít pro zvýšení funkce a/nebo přežívání buněk neuronové linie u savce, například u člověka. V těchto souvislostech lze tyto sloučeniny použít individuálně nebo s jinými kondenzovanými pyrrolokarbazoly a/nebo indolokarbazoly nebo v kombinaci s jinými výhodnými molekulami, které rovněž vykazují schopnost ovlivňovat funkci a/nebo přežívání určené buňky.

Řada neurologických poruch charakterizovaných neuronovými buňkami, které zanikají, jsou poškozené, funkčně ohrožené, podléhají axonové degeneraci, jsou vystaveny riziku zániku atd. Tyto poruchy zahrnují, avšak bez omezení, Alzheimerovu chorobu, poruchy motorických neuronů (například amyotrofní laterální sklerózu), Parkinsonovu chorobu, cerebrovaskulární poruchy (například mrtvice, ischemie), Huntingtonovu chorobu, demenci při AIDS, epilepsii, mnohočetnou sklerosu, periferní neuropatie (například ty, které ovlivňují neurony DRG při periferní neuropatii související s chemoterapií) včetně diabetické neuropatie a periferní neuropatie při AIDS, poruchy vyvolané excitujícími aminokyselinami a poruchy související s konkuzivním či penetrujícím poraněním mozku nebo míchy.

ChAT katalyzuje syntézu acetylcholinu neurotransmiterů acetylcholinu a považuje se za enzymatický marker funkčního cholinergního neuronu. Funkční neuron je rovněž schopen přežívání. Neuronové přežívání se hodnotí kvantitativním vyjádřením specifického zachycení a enzymatické konverze barviva (například kalceinu AM) živými neurony.

Sloučeniny, které se zde popisují, včetně sloučenin identifikovaných způsoby, které se zde popisují, nacházejí vzhledem ke své široké použitelnosti řadu použití v nejrůznějších uspořádáních. Tyto sloučeniny lze použít při vývoji modelů in vitro přežívání neuronových buněk, funkce, identifikace nebo pro vyhledávání dalších syntetických sloučenin, které mají aktivity podobné aktivitám sloučenin, které se zde popisují nebo sloučenin identifikovaných způsoby, které se zde popisují. Sloučeniny, které se zde popisují, stejně tak jako ty, které se identifikují způsoby, které se zde popisují, lze použít ve výzkumu pro zkoumání definici a stanovení molekulárních cílů souvisejících s funkčními odpověďmi. Například značením radionuklidem indenopyrrolokarbazolové sloučeniny s můstkem nebo sloučeniny identifikované způsoby, které se zde popisují, související se specifickou buněčnou funkcí (například mitogenezí), lze cílovou složku stanovit, izolovat a purifikovat pro účely charakterizace.

Sloučeniny, které se zde popisují, stejně tak jako ty, které se identifikují způsoby, které se zde popisují, jsou mimo jiné použitelné nejen pro zvyšování aktivit indukovaných trofickými faktory nebo buňkami citlivými na trofické faktory, například cholinergními neurony, avšak mohou též působit jako prostředky podporující přežívání jiných než neuronových buněčných typů například dopaminergních či glu-

tamatergních. Růstový faktor může regulovat přežívání neuronů signálními kaskádami sestupně od malých GTP vazebných proteinů zahrnujících, avšak bez omezení, ras, rac a cdc42 [Denhardt, Biochem. J., 318, 729 (1996)]. Konkrétně aktivace ras vede k fosforylaci a aktivaci extracelulární receptorem aktivované kinasy (ERK), která souvisí s biologickým růstem a diferenciací. Stimulace rac/cdc42 vede ke vzrůstu aktivace JNK a p38, což jsou odpovědi související se stresem, apoptózou a zánětem. I když odpovědi růstového faktoru probíhají primárně cestou ERK, ovlivnění těchto procesů může vést k alternativním mechanismům neuronového přežívání, které mohou napodobovat zvyšování přežívání růstovým faktorem [Xia a kol., Science, 270, 1326 (1995)]. Tyto sloučeniny mohou též působit jako prostředky podporující přežívání neuronových a jiných než neuronových buněk mechanismy, které jsou příbuzné s přežíváním zprostředkovaným růstovým faktorem, avšak jsou od něj odlišné, jako je například inhibice JNK a p38 cest, která může vést k přežívání inhibicí apoptózy buněk.

Tyto sloučeniny jsou použitelné při léčení poruch souvisejících s poklesem aktivity ChAT nebo se zánikem, s poškozením motoneuronů míchy a rovněž je lze použít například při chorobách souvisejících s apoptickým zánikem buněk centrální a periferní nervové soustavy s imunitním systémem a při zánětlivých onemocněních.

Sloučeniny, které se zde popisují, lze též použít při léčení chorobných stavů souvisejících s maligní proliferací buněk, jako je tomu u mnoha typů rakoviny.

Farmaceuticky přijatelné soli sloučenin, které se zde popisují, stejně tak jako sloučenin identifikovaných způso-

by, které se zde popisují, zahrnují farmaceuticky přijatelné kyselé adiční soli, soli kovů, amonné soli, adiční soli organických aminů a adiční soli aminokyselin. Příklady adičních solí kyselin jsou soli anorganických kyselin, jako je hydrochlorid, sulfát a fosfát a adiční soli organických kyselin, jako je acetát, maleát, fumarát, tartarát, citrát a laktát. Příklady solí kovů jsou soli kovů alkalických zemin, jako je lithná sůl, sodná sůl a draselná sůl, soli kovů alkalických zemin, jako je hořečnatá sůl a vápenatá sůl, hlinité soli a zinečnaté soli. Příklady amonných solí jsou amonná sůl a tetramethylamonná sůl. Příklady adičních solí organických aminů jsou soli s morfolinem a piperidinem a příklady adičních solí aminokyselin jsou soli s glycinem, fenylalaninem, kyselinou glutamovou a lysinem.

Sloučeniny, které se zde poskytují, včetně sloučenin, které se identifikují způsoby podle tohoto vynálezu, lze formulovat do farmaceutických přípravků přidavkem farmaceuticky přijatelných netoxických pomocných látek a nosičů. Tyto přípravky lze připravit pro použití při parenterálním podávání, zejména ve formě kapalných roztoků či suspenzí nebo perorálním podáváním, zejména ve formě tablet nebo tobolek nebo intranasálně, zejména ve formě prášků, nosních kapek či aerosolů nebo dermálně, například s použitím transdermálních náplastí.

Přípravek lze vhodně podávat v jednotkové dávkové formě a může se připravovat kterýmkoliv ze způsobů dobře známých v oboru farmacie, jak se například popisuje v Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Formulace pro parenterální podávání mohou obsahovat jako běžné pomocné látky sterilní vodu nebo fyziologický roztok, polyalkylenglykoly, jako je polyethylengly-

kol, minerální oleje a rostlinné oleje, hydrogenované naftaleny a podobně. Konkrétně mohou být použitelnými pomocnými látkami pro kontrolu uvolňování aktivních složek biokompatibilní, biodegradabilní laktidové kopolymery, kopolymery laktid/glykolid nebo kopolymery polyoxyethylen-polyoxypropylen. Ostatní potenciálně použitelné parenterální systémy dodávky těchto účinných látek zahrnují ethylen/vinyl-acetátové kopolymerní částice, osmotická čerpadla, implantovatelné infuzní systémy a liposomy. Formulace pro inhalační podávání zahrnují pomocné látky, například laktosu, nebo to mohou být vodné roztoky obsahující například polyoxyethylen-9-laurylether, glykocholát a deoxycholát, olejové roztoky pro podávání ve formě nosních kapek nebo gely pro intranasální podávání. Formulace pro parenterální podávání mohou též zahrnovat glykocholát pro bukalní podávání, salicylát pro rektální podávání nebo kyselinu citronovou pro vaginální podávání. Formulace pro transdermální náplasti jsou v preferovaných případech lipofilní emulze.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu lze používat jako jedinou účinnou složku ve farmaceutickém přípravku. Alternativně se mohou používat v kombinaci s jinými účinnými složkami, například s jinými růstovými faktory, které umožňují přežívání neuronů či regeneraci axonů při chorobách či poruchách.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelné soli lze podávat perorálně nebo jinak, například ve formě masti či injekce. Koncentrace sloučenin podle tohoto vynálezu v terapeutickém přípravku se mohou měnit. Koncentrace závisí na faktorech, jako jsou celkové dávkování podávaného léku, chemické vlastnosti (například hydrofobní charakter), použitých sloučenin, způsob podávání,

stáří, tělesná hmotnost a symptomy pacienta atd. Sloučeniny podle tohoto vynálezu se obvykle poskytují ve vodném fyziologickém roztoku pufro obsahujícím zhruba 0,1 % až 10 % (hmotnost/objem) sloučeniny pro parenterální podávání. Obvyklá dávková rozmezí jsou od zhruba 1 $\mu\text{g/kg}$ do zhruba 1 g/kg tělesné hmotnosti denně, preferované dávkové rozmezí je od zhruba 0,01 mg/kg do 100 mg/kg tělesné hmotnosti denně, přednostně zhruba 0,1 až 20 mg/kg jednou až čtyřikrát denně. Preferované dávkové rozmezí léku pravděpodobně závisí na proměnných, jako je typ a rozsah progresse onemocnění či poruchy, celkový zdravotní stav daného pacienta, celková biologická účinnost zvolené sloučeniny a formulace pomocných látek sloučeniny a způsob podávání.

Sloučeniny podle tohoto vynálezu včetně zkoušené sloučeniny a sloučenin identifikovaných způsoby podle tohoto vynálezu a jejich farmaceuticky přijatelné soli se mohou podávat samotné nebo ve formě různých farmaceutických přípravků podle farmakologické aktivity a účelu podávání. Farmaceutické přípravky v souladu s tímto vynálezem lze připravit jednotným promísením účinného množství sloučeniny nebo její farmaceuticky přijatelné soli jako aktivní složky s farmaceuticky přijatelným nosičem. Tento nosič může vykazovat široké rozmezí forem v závislosti na formách přípravku vhodného pro podávání. Požaduje se, aby se tyto farmaceutické přípravky připravovaly v jednotkové dávkové formě vhodné pro perorální nebo jiné podávání. Formy pro jiné než perorální podávání zahrnují masti a injekce.

Tablety lze připravit s použitím pomocných látek, jako je laktosa, glukosa, sacharosa, mannitol a methylcelulosa, rozvolňovadel, jako je škrob, alginát sodný, vápenatá sůl karboxymethylcelulosy a krystalická celulosa, maziv,

jako je stearát hořečnatý a mastek, pojiv, jako je želatina, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, hydroxypropylcelulosa a methylcelulosa, povrchově aktivních látek, jako je ester sacharosy a mastné kyseliny a ester sorbitolu a mastné kyseliny a podobně konvenčním způsobem. Preferuje se, aby každá tableta obsahovala 15 až 300 mg účinné složky.

Granule lze připravit s použitím pomocných látek, jako je laktosa a sacharosa, rozvolňovadel, jako je škrob, pojiv, jako je želatina a podobně, konvenčním způsobem. Prášky lze připravit s použitím pomocných látek, jako je laktosa a mannitol a podobně konvenčním způsobem. Tobolky lze připravit s použitím želatiny, vody, sacharosy, arabské klovatiny, sorbitolu, glycerolu, krystalické celulosy, stearátu hořečnatého, mastku a podobně, konvenčním způsobem. Preferuje se, aby každá tobolka obsahovala 15 až 300 mg účinné složky.

Sirupové přípravky lze připravit s použitím cukrů, jako je sacharosa, vody, ethanolu a podobně konvenčním způsobem.

Masti lze připravit s použitím mastových základů, jako je vazelina, kapalný parafin, lanolin a makrogol, emulgačních prostředků, jako je lauryllaktát sodný, benzalkonium-chlorid, monoester sorbitolu a mastné kyseliny, sodná sůl karboxymethylcelulosy a arabská klovatina a podobně konvenčním způsobem.

Injekční přípravky lze připravit s použitím rozpouštědel, jako je voda, fyziologický roztok, rostlinné oleje (například olivový olej a podzemnicový olej), ethyl-oleát a propylenglykol, solubilizačních prostředků, jako je benzo-

át sodný, salicylát sodný a urethan, isotonických prostředků, jako je chlorid sodný a glukosa, konzervačních prostředků, jako je fenol, kresol, ester kyseliny p-hydroxybenzoové a chlorbutanol, antioxidačních prostředků, jako je kyselina askorbová a pyrosulfit sodný a podobně konvenčním způsobem.

Tento vynález se dále znázorňuje následujícími příklady, které se uvažují tak, aby vynález objasňovaly. Tyto příklady se neuvažují v tom smyslu, že by omezovaly rozsah tohoto vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Obecný popis způsobů přípravy a příklady

Obecný způsob přípravy používané pro získání indeno-pyrrolokarbazolů s můstkem podle tohoto vynálezu obecného vzorce II ukazují obrázky 1 a 2. Obecné způsoby přípravy indenopyrrolokarbazolů III/VIII lze uskutečnit podle popisu v US patentu č. 5 705 511, jehož uveřejnění se zde zahrnuje jako celek formou odkazu. Pokud R^1 je atom vodíku, chrání se laktamový dusík indenopyrrolokarbazolů III/VIII příslušnou chránicí skupinou s obdržením IV/IX. Chráněné sloučeniny se zpracují příslušnou bází v bezvodém organickém rozpouštědle (rozpouštědlech), čímž se obdrží tmavě červený roztok, který lze považovat za karbanion. Reakce tohoto karbanionu s bifunkčním reakčním prostředkem V vede k elektrofilní adici na vazbu $C=Y$ v V s obdržením počátečního meziprojektu VI/X. Zpracování meziprojektu (meziprojektů) VI/X a/nebo VII/XI buď některou sulfonovou kyselinou nebo některou Lewisovou kyselinou, například etherátem fluoridu boritého, poskytuje

indenopyrrolokarbazoly s můstky I/II.

Ochranu laktamového dusíku (znázorněnou na obrázcích 3 a 4) lze provést katalyticky v kyselém nebo zásadickém prostředí. Reakce kyselé katalýzy se může provést s reakčním činidlem vázaným na pryskyřici, čímž se umožňuje immobilizace indenopyrrolokarbazolu III/VIII na polymerní nosič, jako je Rinkova kyselá pryskyřice na bázi polystyrenu XII (obrázek 3) s obdržením XIII. Alternativně lze provést kyselou katalýzu s rozpustným reakčním prostředkem s obdržením sloučeniny XIV (obrázek 4). Sloučenina XV chráněná silylovou skupinou se obdrží zásadickou katalýzou (obrázek 4).

Obrázek 5 popisuje několik způsobů přípravy meziproduktu V. Způsob (a) popisuje transformace různých acetalů XVI až XVII, Z = vazba. Například ester-acetal/ketal (XVI, D = COOR) se úplně redukuje na odpovídající alkohol a následně oxiduje (například Swernovou nebo Dessovou-Martínovou oxidací) na aldehyd-acetal/ketal (XVII, R^a = H). Alternativně se ester-acetal/ketal (XVI, D = COOR) částečně redukuje činidlem DIBAL s obdržením aldehydu (XVII, R^a = H) přímo. Podobně redukce nitril-acetalu (XVI, D = CN) prostředkem DIBAL poskytuje aldehyd (XVII, R^a = H). Keto-acetaly/ketaly se připraví přidavkem Grignardových činidel k Weinrebovu amid-acetal/ketalu (XVI, D = CON(OMe)Me).

Meziprodukt (XVII, Z = vazba) lze též obdržet ve dvou krocích popsaných ve způsobu (b). Přídavek organokovového činidla XIX k acetalu/ketalu XVIII poskytuje alken (XX), který ozonolýzou s následným redukčním zpracováním poskytuje keto-acetal/ketal XVII. Příprava meziproduktu (XVII, Z = heteroatom) ve dvou krocích je znázorněná ve způsobu (c). Spojení acetalu XVII s alkenem XXI s následnou ozonolýzou

(s redukčním zpracováním) výsledného alkeny poskytuje ketoacetal/ketal XVII. Alternativně se připraví meziprodukt (XVII, Z = heteroatom) ve dvou krocích popsaných ve způsobu (d). Reakce sloučeniny XXIV s acetal/ketalem XVIII poskytuje XXV, který se transformuje na keto-acetal/ketal XVII způsoby popsanými ve způsobu (a). Kondenzace keto-acetal/ketalu XVII hydroxylaminy, hydraziny, N-alkyl-N-alkoxyaminy a aminy poskytuje meziprodukt XXVI nesoucí elektrofilní skupinu C=N.

Indenopyrrolokarbazol vázaný na pryskyřici XIII (obr. 6, způsob A) se zpracuje přebytkem Grignardova činidla jako bázi, čímž se obdrží tmavě červený roztok karbanionu. Následná reakce s V vede k produktům odvozeným od elektrofilní adice na skupinu C=Y. Vodné zpracování a odštěpení produktu (produktů) zředěnou kyselinou (1% kyselina trifluoroctová v methylenchloridu) od pryskyřice vede k izolaci sloučeniny (sloučenin) XXVII a/nebo XXVIII. Zpracování meziproduktu (meziproduktů) XXVII a/nebo XXVIII buď sulfonovou kyselinou nebo Lewisovou kyselinou, například etherátem fluoridu boritého, poskytuje indenopyrrolokarbazoly s můstkem II.

Podobný přístup se používá pro reakci rozpustného laktamového chráněného meziproduktu, například XV (obr. 7, způsob B). Avšak v tomto případě se meziprodukt XV zpracuje tritonem B v pyridinu jako bázi místo Grignardovým činidlem. Meziprodukt (meziprodukty) XXIX a/nebo XXX lze izolovat s intaktní laktamovou chránicí skupinou, se kterou lze uskutečnit chromatografickou purifikaci. Podobně jako v případě A (obrázek 6) poskytuje zpracování Lewisovou kyselinou (jako je etherát trifluoridu boritého) indenopyrrolokarbazoly s můstkem II, kde $R^1 = H$.

Skupiny R^3 , R^4 , R^5 a R^6 lze zavést podle popisu v pa-

tentech č. 5 705 511 a 4 923 986, které se zde zahrnují vcelku formou odkazu. Substituent R^3 lze jinak zavést po vytvoření indenopyrrolokarbazolů s můstkem, jak ukazuje obrázek 8. Poloha 3 kruhu B se bromuje NBS s obdržením sloučeniny XXXI. Následně se zavede uhlíkatý fragment reakcemi Stilleho, Suzukiho, Hecka, Kumady nebo Castra-Stephense katalyzovanými palladiem s obdržením sloučenin typu XXXII, XXXIII atd. Navíc může sloučenina XXXI poskytnout přístup ke sloučeninám, ve kterých se skupina s bromem nahradí heteroatomem, například skupinou na bázi aminu použitím Buchwaldovy aminační reakce katalyzované palladiem.

Oxidativním procesem lze zavést skupinu =O připojenou na indenový atom kruhu E, jak ukazuje obrázek 9, sloučenina XXXIV. Tato reakce též vede k oxidaci methylenové skupiny laktamu (kruh A) s obdržením znázorněného imidového derivátu.

Příklad 2

Příprava meziproduktů vázaných na Rinkovu pryskyřici XIII-A, XIII-B a XIII-C (obrázek 3)

Příklad 2-A

Trojhrdlá baňka s kulatým hrdlem opatřená shora mechanickým míchadlem a Deanovým-Starkovým odlučovačem se postupně naplní Rinkovou pryskyřicí XII (10,00 g, 0,64 mmol/g), 1-methyl-2-pyrrolidinonem (80 ml), benzenem (350 ml), látkou VIII-A ($A^1, A^2 = H_2, B^1, B^2 = O, R^3 = R^4 = R^6 = H$) (3,00 g) a kyselinou p-toluensulfonovou (1,00 g). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu 20 h a poté se zfiltruje. Pryskyřice se promyje tetrahydrofuranem (5

x 175 ml) a filtrát se odloží. Poté se pryskyřice postupně promyje dimethylsulfoxidem (4 x 100 ml), 2% vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (4 x 100 ml), vodou (4 x 100 ml), dimethylsulfoxidem (2 x 200 ml), tetrahydrofuranem (4 x 100 ml) a ethyl-acetátem (4 x 100 ml). Pryskyřice se vysuší ve vakuu (24 h) s obdržením 11,70 g (0,47 mmol/g) sloučeniny VIII-A vázané na pryskyřici (XIII-A).

Původní tetrahydrofuranové promývací podíly se odpaří, zbytek se zředí vodou (750 ml) a výsledná sraženina se zfiltruje a postupně promyje vodou, 2% vodným hydrogenuhličitanem sodným (4 x 100 ml) a vodou (4 x 100 ml). Po vysušení ve vakuu se získá sloučenina VIII-A (1,28 g).

Příklad 2-B

Podobným způsobem se připojí sloučenina VIII-B (A^1 , $A^2 = O$, B^1 , $B^2 = H_2$, $R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = H$), (0,5 g) ke kyselé Rinkově pryskyřici XII (1,52 g) s obdržením 1,58 g sloučeniny VIII-B vázané na pryskyřici (XIII-B).

Příklad 2-C

Podobným způsobem se připojí sloučenina VIII-C (A^1 , $A^2 = H_2$, $B^1, B^2 = O$, $R^3 = R^4 = R^5 = H$, $R^6 = 10-OMe$), (1,02 g) na Rinkovu kyselou pryskyřici XII (3,12 g) s obdržením 3,70 (0,46 mmol/g) sloučeniny VIII-C vázané na pryskyřici (XIII-C) spolu se získaným výtěžkem sloučeniny VIII-C (0,44 g).

Příklad 3

Příprava sloučeniny II-1, sloučeniny II-2, sloučeniny II-3,

sloučeniny II-4a, sloučeniny II-4b, sloučeniny II-6 a sloučeniny II-8 (způsob A, obrázek 6)

Příklad 3-A

K suspenzi XIII-A (1,25 g) v tetrahydrofuranu (24 ml) se přidá 1,0 M roztok ethylmagnesiumbromidu (6,25 ml v tetrahydrofuranu) a reakční směs se míchá po dobu 1 h před přidáním HMPA (5,0 ml). Po míchání po dobu 10 min se přidá diethoxybutyraldehyd (3,0 g) [připravený podle způsobů v literatuře Paquetta a kol., J. Am. Chem. Soc., 119, 9662-71], reakční směs se míchá po dobu 20 h. Reakce se ukončí přidáním 10% vodného roztoku chloridu amonného (5 ml) a směs se zfiltruje. Pryskyřice se postupně promyje 10% vodným roztokem chloridu amonného (3 x 10 ml), vodou (3 x 10 ml), tetrahydrofuranem (3 x 10 ml), dimethylformamidem (3 x 10 ml), vodou (3 x 10 ml), tetrahydrofuranem (3 x 10 ml) a etherem (3 x 10 ml). Pryskyřice se vysuší ve vakuu, vyjme methylenchloridem (15 ml) a zpracuje kyselinou trifluoroctovou (0,15 ml). Po míchání po dobu 1 h se reakční směs zfiltruje a filtrát se odpaří. Výsledný zbytek se vyjme methylenchloridem (20 ml) a zpracuje pyridinium-tosylátem (50 mg) a výsledný roztok se míchá po dobu 4 h. V této době se reakční směs promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší síranem hořečnatým.

Po zfiltrování a odpaření rozpouštědla se zbytek purifikuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 8,4 x 25 cm, eluce 60% směsí acetonitril/voda s 0,1% kyseliny trifluoroctové). Příslušné frakce se zneutralizují hydrogenuhličitanem sodným a extrahují methylenchloridem (3 x 50 ml) a vysuší síranem hořečnatým.

Po filtraci a odpaření rozpouštědel se obdrží 70,2 mg sloučeniny II-1 ve formě bílého prášku s následujícími charakteristikami.

Nukleární magnetická resonance ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
171,8, 143,3, 142,4, 141,4, 140,1, 140,0, 136,6, 129,2,
127,9, 127,4, 127,1, 126,8, 124,1 (2C), 122,7, 121,6,
121,5, 118,3, 112,1, 88,1, 79,2, 56,6, 45,6, 33,4, 24,8.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,21
(d, $J = 7,5$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,86
(d, $J = 8,3$, 1H), 7,71 (d, $J = 7,3$, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,9$,
7,4, 1H), 7,41 (dd, $J = 7,5$, 7,4, 1H), 7,36-7,27 (m, 2H),
6,86 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,91 (s, 2H),
4,53 (d, $J = 3,3$, 1H), 2,23-2,14 (m, 1H), 1,96-1,92 (m,
1H), 0,96-0,88 (m, 1H), 0,60-0,57 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 379, nalezená hodnota 379.

Preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií této směsi reakčních produktů se rovněž oddělí sloučenina II-2 (0,5 mg), která vykazuje následující charakteristiky.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
9,17 (d, $J = 8,1$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,0$, 1H),
7,85 (d, $J = 6,8$, 1H), 7,57 (d, $J = 6,8$, 1H), 7,49 (dd,
 $J = 7,9$, 7,4, 1H), 7,44-7,26 (m, 3H), 6,81 (d, $J = 6,0$,
1H), 5,43-5,33 (m, 1H), 4,43 (s, 2H), 2,23-2,14 (m, 1H),
1,96-1,92 (m, 1H), 1,45-1,55 (m, 2H), 0,96-0,88 (m, 1H),
0,60-0,57 (m, 1H), 0,29 (t, $J = 7,0$, 3H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 407, nale-

zená hodnota 407.

Příklad 3-B

Způsobem podobným způsobu popsanému pro sloučeninu II-1 se pryskyřice XIII-A (70,3 mg) zpracuje 1,1-diethoxy-2-pentanone (0,75 ml), [který se připraví podle způsobu Sworina a kol., J. Org. Chem., 53, 4894-4896 (1988)] s obdržením sloučeniny II-3 (3,5 mg), která se oddělí preparativní chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, eluce 50% směsí ethyl-acetát/toluen) a vykazuje následující charakteristiky.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
9,42 (d, $J = 8,2$, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 7,4$, 1H),
7,79 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,71 (d, $J = 7,1$), 7,50-7,20 (m,
4H), 6,81 (d, $J = 5,9$, 1H), 4,90 (s, 2H), 4,46 (s, 1H),
2,35-2,20 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,75-1,60 (m, 1H),
1,25-1,00 (m, 1H), 0,35-0,15 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 393, nalezená hodnota 393.

Příklad 3-C

Podobným způsobem se sloučenina XIII-A (74,3 mg) zpracuje 1,1-diethoxy-2-hexanonem [který se připraví podle literatury způsobem Brennera, J. Org. Chem., 26, 22-27 (1961)] (0,75 ml) s obdržením sloučeniny II-4a (2,10 mg) a sloučeniny II-4b (1,06 mg), které se jednotlivě oddělí preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové). Sloučenina II-4a má následující vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
9,30 (d, $J = 8,3$, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,97 (d, $J = 7,2$, 1H),
7,65 (d, $J = 8,5$, 1H), 7,59 (d, $J = 7,5$), 7,48 (dd, $J =$
 $= 7,8$, 7,2, 1H), 7,39-7,15 (m, 3H), 6,31 (dd, $J = 5,9$, 5,5,
1H), 5,02 (s, 1H), 4,88 (s, 2H), 0,88 (s, 3H) další alifa-
tické signály se ztrácejí pod vrcholy rozpouštědla.

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 407, nale-
zená hodnota 407.

Sloučenina II-4b má následující vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
9,43 (d, $J = 8,1$, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,99 (d, $J = 7,3$, 1H),
7,75-7,65 (m, 2H), 7,49 (dd, $J = 7,0$, 6,4, 1H), 7,43 (dd,
 $J = 8,2$, 8,1, 1H), 7,36-7,25 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,91 (s,
2H), 4,50 (s, 1H), 1,95 (s, 3H) další alifatické signály se
ztrácejí pod vrcholy rozpouštědla.

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 407, nale-
zená hodnota 407.

Příklad 3-D

Podobným způsobem se sloučenina XIII-C (1,00 g) zpra-
cuje diethoxybutyraldehydem (3,65 g) s obdržením sloučeniny
II-6 (87,8 mg), která se izoluje preparativní vysokovýkonnou
kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65%
směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové) a vy-
kazuje následující charakteristiky.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ

9,09 (d, $J = 8,6$, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,95 (d, $J = 7,4$, 1H), 7,84 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,47 (dd, $J = 7,2$, 7,0, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (dd, $J = 7,0$, 7,0, 1H), 6,98 (dd, $J = 8,6$, 1,9, 1H), 6,83 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,65-5,55 (m, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,48 (d, $J = 3,9$, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,25-2,10 (m, 1H), 2,08-1,85 (m, 1H), 0,96-0,75 (m, 1H), 0,65-0,50 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 431, nalezená hodnota 431.

Příklad 3-E

Podobným způsobem se zpracuje pryskyřice XIII-B (153,2 mg) diethoxybutyraldehydem (1,5 ml) s obdržením sloučeniny II-8 (3,6 mg), která se separuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové), která vykazuje následující charakteristiky.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 9,09 (d, $J = 7,9$, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,48-7,35 (m, 3H), 7,24 (dd, $J = 7,6$, 7,5, 1H), 6,85 (d, $J = 6,2$, 1H), 5,63-5,59 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,61 (d, $J = 3,6$, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,21-2,13 (m, 1H), 1,96-1,90 (m, 1H), 0,87-0,79 (m, 1H), 0,61-0,56 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 379, nalezená hodnota 379.

Příklad 4

Příprava sloučeniny II-7a a sloučeniny II-7b (způsob A, obrázek 6)

Příklad 4-A

Příprava (1,1-diethoxyethoxy)acetonu

Ke chladné (0 °C) suspenzi hydridu sodného (2,68 g, 60%) v tetrahydrofuranu (150 ml) se přidá roztok 1,1-diethoxyethanolu [který se připraví podle literatury Zirkle a kol., J. Org. Chem., 26, 395-407 (1961)] (9,00 g) v tetrahydrofuranu (20 ml) a reakční směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 1 h před přidáním methallychloridu (8,0 ml). Reakční směs se vaří pod zpětným chladičem přes noc, ochladí a zfiltruje vrstvou celitu. Rozpouštědlo se odstraní rotačním vypařováním a zbytek se purifikuje sloupcovou chromatografií (silikagel, 20 % směs ether/hexan) s obdržením 1,1-diethoxyethyl(methallyl)etheru (11,5 g, 90 %). Ozonolýza vychlazeného roztoku (-30 °C) tohoto etheru (6,00 g) v ethyl-acetátu (80 ml) se provádí tak dlouho až již nelze detekovat žádnou výchozí látku na základě chromatografie na tenké vrstvě (1 h). V tomto času se reakční směs promyje proudem kyslíku, zpracuje hydroxidem palladnatým (150 mg) a míchá přes noc pod atmosférou vodíku. Katalyzátor se odfiltruje a filtrát se odpaří na rotačním odpařovacím zařízení. Výsledný zbytek se purifikuje sloupcovou chromatografií (silikagel, 20% směs ethyl-acetát/hexan) s obdržením sloučeniny podle nadpisu (4,53 g, 82 %).

Příklad 4-B

Způsobem A (obrázek 6) se pryskyřice XIII-A (230,2 mg) zpracuje ethylmagnesiumbromidem (1,25 ml) a poté (1,1-diethoxyethoxy)acetonem (příklad 3-A) (1,2 ml). Po zpracování a odštěpení od pryskyřice se podíl surové směsi

reakčních produktů (10,5 mg) vyjme methylenchloridem (20 ml) a zpracuje etherátem fluoridu boritého (20 μ l). Po míchání po dobu 2,5 h se roztok promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného před vysušením síranem hořečnatým. Po filtraci a odstranění rozpouštědla se výsledný zbytek purifikuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové) s obdržením sloučeniny II-7a (2,34 mg) a sloučeniny II-7b (1,34 mg). Sloučenina (II-7a) má následující vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR (CDCl_3) δ
9,35-9,20 (m, 1H), 7,87 (d, $J = 7,6$, 1H), 7,62 (d, $J = 7,0$, 1H), 7,60-7,45 (m, 1H), 7,49 (dd, $J = 7,7$, 7,5, 1H), 7,40 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,37-7,26 (m, 3H), 6,22 (s, 1H), 5,20-4,85 (m, 1H), 4,47 (s, 1H), 3,67 (d, $J = 12,7$, 1H), 3,52 (d, $J = 11,8$, 1H), 3,40 (d, $J = 12,7$, 1H), 3,38 (d, $J = 11,8$, 1H), 1,91 (s, 3H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 409, nalezená hodnota 409.

Sloučenina II-7b má následující vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ
9,58-9,22 (m, 1H), 7,82 (d, $J = 7,4$, 1H), 7,60-7,40 (m, 3H), 7,37-7,27 (m, 3H), 7,21 (d, $J = 8,1$, 1H), 5,81 (s, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,10-4,80 (m, 1H), 4,59 (d, $J = 13,5$, 1H), 4,38 (dd, $J = 13,5$, 5,3, 1H), 4,21 (d, $J = 13,1$, 1H), 3,82 (d, $J = 13,2$, 1H), 1,13 (s, 3H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 409, nale-

zená hodnota 409.

Příklad 5

Příprava sloučeniny II-5 (obrázek 8)

K roztoku sloučeniny II-1 (8,1 mg) v tetrahydrofuranu (2 ml) se přidá NBS (4,6 mg) a reakční směs se míchá přes noc. Přidá se další NBS (4,5 mg) a reakční směs se míchá podobu 2,5 h. Nerozpustná látka se odfiltruje a filtrát se odpaří na rotačním odpařovacím zařízení. Výsledný zbytek se purifikuje sloupcovou chromatografií (C-18, 65% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové). Příslušné frakce se neutralizují hydrogenuhličitanem sodným a extrahují methylenchloridem (3 x 20 ml) a vysuší síranem hořečnatým. Po zfiltrování a odpaření rozpouštědel se obdrží sloučenina II-5 (5,1 mg) ve formě bílého prášku s následujícími charakteristikami.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR (DMSO-d_6) δ
9,22 (d, $J = 7,4$, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,86 (d, $J = 8,7$, 1H), 7,72 (d, $J = 7,0$, 1H), 7,63 (d, $J = 7,8$, 1H), 7,42 (dd, $J = 7,5$, 7,3, 1H), 7,35 (dd, $J = 7,3$, 7,2, 1H), 6,86 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,94 (s, 2H), 4,54 (d, $J = 3,1$, 1H), 2,30-2,14 (m, 1H), 2,00-1,82 (m, 1H), 0,96-0,88 (m, 1H), 0,62-0,50 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 457/9 (1:1), nalezená hodnota 457/9 (1:1).

Příklad 6

Příprava meziprojektu XV (obrázek 4)

K roztoku VIII-A [A^1 , $A^2=H_2$, B^1 , $B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$] (1,05 g) v dimethylformamidu (25 ml) se přidá triethylamin (0,75 ml) a terc-butyldimethylsilylchlorid (TBS-Cl) (0,65 g). Po míchání po dobu 3 h se reakce ukončí přidavkem nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a provede se extrakce ethyl-acetátem. Organická vrstva se promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší síranem hořečnatým. Po zfiltrování a odpaření rozpouštědla se výsledný zbytek trituruje etherem s obdržením sloučeniny XV (848 mg). Promývací podíly se odpaří s obdržením zbytku, který se purifikuje sloupcovou chromatografií (silikagel, 1% směs ethyl-acetát/dichlormethan) s obdržením dalšího produktu (502 mg, celkový výtěžek 94 %) s následujícími spektrálními vlastnostmi.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 11,94 (s, 1H), 9,32 (d, $J = 7,6$, 1H), 8,03 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,64 (d, $J = 7,2$, 1H), 7,58 (d, $J = 8,1$, 1H), 7,44 (dd, $J = 7,7$, 7,6, 1H), 7,39 (dd, $J = 7,7$, 7,6, 1H), 7,32 (d, $J = 7,3$, 1H), 7,25 (dd, $J = 7,6$, 7,3, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,14 (s, 2H), 0,99 (s, 9H), 0,46 (s, 6H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 425, nalezená hodnota 425.

Příklad 7

Příprava sloučeniny II-1 způsobem B (obrázek 7)

Roztok Tritonu B v pyridinu (0,45 M) se připraví rozpouštěním 40% roztoku Tritonu B v methanolu (10 ml) v pyridinu (10 ml). Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku (2,66

kPa) do konečného objemu zhruba 8 ml. Zbytek se zředí pyridinem na 50 ml, zfiltruje a uchovává pod atmosférou dusíku. Roztok XV (20,3 mg) v pyridinu (2,0 ml) se promyje argonem a zpracuje 300 μ l Tritonu B (0,45 M v pyridinu) a diethoxybutyraldehydem (50 μ l). Po míchání po dobu 2 h se reakční směs extrahuje do ethyl-acetátu, promyje 1N vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, nasyceným roztokem chloridu sodného a vysuší se síranem hořečnatým. Po zfiltrování a odpaření rozpouštědla se adukt vyjme dichlormethanem (10 μ l) a zpracuje etherátem fluoridu boritého (10 μ l). Po míchání po dobu 2,0 h se roztok promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného před vysušením síranem hořečnatým. Odpaření rozpouštědel na rotačním odpařovacím zařízení poskytuje zbytek, který se purifikuje vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 65% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové). Příslušné frakce se neutralizují hydrogenuhlíčitanem sodným a extrahují methylenchloridem (3 x 20 ml) a vysuší síranem hořečnatým. Po filtraci a odpaření rozpouštědla se obdrží sloučenina II-1 (11,8 mg, výtěžek 65 %), jejíž spektra ^1H NMR a hmotnostní spektra a retenční čas při vysokovýkonné kapalinové chromatografii jsou identické látce připravené a izolované způsobem A popsaným v příkladu 3-A.

Příklad 8

Příprava sloučeniny II-9 (obrázek 8)

K suspenzi bromované sloučeniny II-5 (6,2 mg) v 1-propanolu (4,0 ml) se přidá kyselina 3-aminofenylboritá (3,8 mg). Po míchání po dobu 0,25 h se postupně přidá octan palladnatý (2,0 mg), trifenylfosfin (4,8 mg), uhlíčitan sod-

ný (2,8 mg) a voda (2,0 ml). Směs se vaří pod zpětným chladičem po dobu 0,75 h, ochladí, extrahuje dichlormethanem a promyje vodou a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organická vrstva se vysuší síranem hořečnatým a rozpouštědlo se odpaří na rotačním odpařovacím zařízení s obdržením zbytku, který se purifikuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 2,5 x 25 cm, 50% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové). Příslušné frakce se neutralizují hydrogenuhlíčitanem sodným a extrahují methylenchloridem (3 x 20 ml) a vysuší síranem hořečnatým. Po filtraci a odpaření rozpouštědla se obdrží sloučenina II-9 (3,1 mg, výtěžek 49 %), která vykazuje následující spektrální vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,22 (d, $J = 7,5$, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,00-7,25 (m, 8H), 7,12 (dd, $J = 7,1$, 7,0, 1H), 6,95-6,80 (m, 3H), 6,53 (d, $J = 6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 4,55 (s, 1H), 2,25-2,10 (m, 1H), 1,95-1,90 (m, 1H), 0,98-0,88 (m, 1H), 0,65-0,57 (m, 1H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 470, nalezená hodnota 470.

Příklad 9

Příprava sloučeniny II-10 (obrázek 9)

K roztoku sloučeniny II-1 (5,0 mg) v dimethylsulfoxidu (1 ml) se přidá kyanid sodný (4,3 mg) a směs se zahřívá na teplotu 145 °C po dobu 1 h. Směs se ochladí, extrahuje ethyl-acetátem a promyje vodou (3 x 20 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného. Organická vrstva se vysuší síranem

hořečnatým, zfiltruje a odpaří s obdržením zbytku, který se purifikuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, 55% směs acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové). Příslušné frakce se neutralizují hydrogenuhlíčitanem sodným, extrahují methylenchloridem (3 x 20 ml) a vysuší síranem hořečnatým. Po zfiltrování a odpaření rozpouštědla se obdrží sloučenina II-10 (2,7 mg, výtěžek 50 %) vykazující následující spektrální vlastnosti.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 11,4 (s, 1H), 8,86 (d, $J = 7,9$, 1H), 8,79 (d, $J = 7,6$, 1H), 7,90 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,62-7,55 (m, 2H), 7,49 (dd, $J = 7,6$, 7,4, 3H), 7,40 (dd, $J = 7,4$, 7,3, 1H), 7,35 (dd, $J = 7,5$, 7,4, 1H), 6,86 (d, $J = 6,0$, 1H), 6,03 (s, 1H), 5,40-5,30 (m, 1H), 2,25-2,14 (m, 1H), 2,03-1,90 (m, 1H), 1,10-0,98 (m, 1H), 0,82-0,77 (m, 1H).

Příklad 10

Příprava sloučeniny II-11 (způsob A, obrázek 6)

Podle způsobu A reaguje pryskyřice XIIIa (150,2 mg) s ethylmagnesiumbromidem (1,0 ml) a poté s ethyl-(2,5-di-oxopentanoátem) [Schmidt, a kol., Synthesis, 809 (1993)] (1,5 ml). Po zpracování a odštěpení od pryskyřice se surová směs reakčních produktů vyjme methylenchloridem (20 ml) a zpracuje se etherátem fluoridu boritého (20 μl). Po míchání po dobu 2,5 h se roztok promyje nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného a poté se vysuší síranem hořečnatým. Po zfiltrování a odpaření rozpouštědla se zbývající látka purifikuje preparativní vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií (Zorbax

RX-8, 4 x 25 cm, gradient 55% až 75% směsi acetonitril/voda s 0,1 % kyseliny trifluoroctové) s obdržením sloučeniny II-11 (6,4 mg) s následujícími vlastnostmi.

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,36 (d, $J = 7,7$, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,00 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,83 (d, $J = 8,3$, 1H), 7,58-7,15 (m, 5H), 6,97 (d, $J = 5,9$, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,82 (s, 1H), 4,48 (q, $J = 7,1$, 2H), 2,42-1,92 (m, 2H), 1,37 (t, 3H, $J = 7,1$), 1,25-0,63 (m, 2H).

Příklad 11

Příprava sloučeniny II-12

Roztok sloučeniny II-11 (3,4 mg) v tetrahydrofuranu (2 ml) se zpracuje 2M roztokem lithiumborohydridu (1,0 ml v tetrahydrofuranu) a reakční směs se míchá po dobu 1,5 h. Reakce se ukončí přidáním 1N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (4 ml). Po míchání po dobu 20 min se přidá 10% vodný roztok hydroxidu sodného (15 ml) a směs se extrahuje methylenchloridem (3x10 ml). Po vysušení síranem hořečnatým se směs zfiltruje a rozpouštědlo se odpaří s obdržením sloučeniny II-12 (0,32 mg) s následujícími vlastnostmi.

Nukleární magnetická resonance ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,35 (d, $J = 7,7$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 7,7$, 1H), 7,83 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,75 (d, $J = 8,2$, 1H), 7,50-7,25 (m, 4H), 6,84 (d, $J = 7,7$, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,71 (s, 1H), 4,50-4,40 (m, 1H), 4,30-4,20 (m, 1H), 2,42-1,91 (m, 2H), 1,25-0,63 (m, 2H).

Hmotnostní spektrometrie m/z ($M+H$) výpočet 409, nalezená hodnota 409.

Příklad 12

Zvýšení aktivity ChAT míchy

ChAT je specifický biochemický marker pro funkční cholinergní neurony. Cholinergní neurony představují hlavní cholinergní vstup do hipokampu, olfaktorického nukleu, interpedunkulárního nukleu, kůry, amygdalu a částí thalamu. Motoneurony v míše jsou cholinergní neurony obsahující ChAT [Phelps a kol., J. Comp. Neurol., 273, 459-472 (1988)]. Aktivita ChAT se využívá pro studium účinků neurotrofinů (například NGF nebo NT-3) na přežívání a/nebo funkci cholinergních neuronů. Esej ChAT rovněž slouží jako indikace regulace hladin ChAT v rámci cholinergních neuronů.

Způsoby provedení

Buňky z míchy plodu krysy se rozdělí a provedou se pokusy podle popisu [Smith a kol., J. Cell Biology, 101, 1608-1621 (1985), Glicksman a kol., J. Neurochem., 61, 210-221 (1993)]. Rozdělené buňky se připraví z mích vyjmутých z krys (embryonální den 14 až 15) standardními trypsinovými disociačními způsoby (Smith a kol., výše). Buňky se nanášejí na poly-L-ornithinem potažené plastové jamky pro tkáňové kultury v množství 6×10^5 buněk/cm² v N2 médiu bez séra doplněném 0,05 % bovinního serumalbuminu (BSA) [Bottenstein a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 514-517 (1979)]. Kultury se inkubují při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře 5 % oxidu uhličitého/95 % vzduchu po dobu 48 h. Aktivita ChAT se měří po 2 d in vitro s použitím modifikace Fonnumova způsobu provedení [Fonnum, Neurochem., 24, 407-409 (1975)] podle McManamana a kol. Glicksmana a kol.

[McManaman a kol., Develop. Biol., 125, 311-320 (1988),
Glicksman a kol., J. Neurochem., výše].

Sloučeniny obecného vzorce II popsané v příkladech
jsou vyjmenované v tabulce 2. R^1 , R^4 , R^6 a R^7 jsou atomy vo-
díku, Y je atom kyslíku a n je 1.

Tabulka 2

Sloučenina	A_1A_2	B_1B_2	R_2	R_3	R_5	R_6	Z	m
II-1	O	H,H	H	H	H	H	vazba	1
II-2	O	H,H	Et	H	H	H	vazba	1
II-3	O	H,H	H	H	H	Me	vazba	1
II-4a	O	H,H	H	H	H	Me	vazba	2
II-4b	O	H,H	H	H	H	Me	vazba	2
II-5	O	H,H	H	Br	H	Me	vazba	1
II-6	O	H,H	H	H	10-OMe	H	vazba	1
II-7a	O	H,H	H	H	H	Me	O	1
II-7b	O	H,H	H	H	H	Me	O	1
II-8	H,H	O	H	H	H	H	vazba	1
II-9	O	H,H	H	3'-NH ₂ -Ph	H	H	vazba	1
II-10	O	O	OH	H	H	H	vazba	1
II-11	O	H,H	H	H	H	CO ₂ - Et	vazba	1
II-12	O	H,H	H	H	H	CH ₂ - OH	vazba	1

Příklad 13

pCDNA3-EE-MLK3, pCDNA3-EE-MLK3(K144R)

MLK3 se klonuje podle popisu [Lee a kol., Oncogene,

8, 3403-3410 (1993), Ezoe a kol., Oncogene, 9, 935-938 (1994)]. cDNA se připraví z 200 ng polyadenylované melanocytové mRNA a 5 % směsi se použije jako templát pro amplifikaci repertoáru PTK cDNA s použitím směsí buď dvou nebo čtyř degenerovaných oligonukleotidových primerů odvozených ze sekvencí konsensu zachovaných VIB a IX subdomén známých PTK: PTK1, 5'-CGGATCCACMGIGAYYT-3' (č. identifikace sekvence: 1), PTK2, 5'-GGAATTCCAWAGGACCASACRTC-3' (č. identifikace sekvence: 2), PTK3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYYTIGCIGCIMGIAA-3' (č. identifikace: 3) PTK4, 5'-GGAATTIAYIGGAWAIGWCCAIACRTCISW-3' (č. identifikace: 4). Čtyřicet cyklů PCR se provede s použitím Taq DNA polymerasy (AmpliTag, Perkin-Elmer/Cetus) a automatizovaného termálního cyklovače DNA. Každý cyklus trvá 40 s při teplotě 94 °C, 2 min při teplotě 37 °C a 3 min při teplotě 63 °C. Produkty osmi PCR se smísí, zpracují DNA polymerasou (Klenow), štěpí BamH1 s EcoR1 a podrobí elektroforéze v 5% polyakrylamidovém gelu. Ethidiumbromidové barvení identifikuje převládající pás 200 až 230 bp, který se vyřízne, eluuje a klonuje do M13mp18. V jednom experimentu se část cDNA amplifikované PCR neštěpí, avšak místo toho se klonuje do M13mp18 štěpené Sma1. Nukleotidové sekvence se stanoví způsobem sekvenování zakončení řetězce.

Jedna cDNA identifikovaná jako PTK1 se používá jako sonda pro screening knihoven lidského melanomu a melanocytové cDNA. Klon označený PTK1-3.2 zahrnuje celý otevřený čtecí rámec 2541 nt kódující protein 847 aminokyselin. Tato cDNA se vyřízne Nco1, upraví DNA polymerasou (Klenow), vyřízne opět EcoR1 a liguje do vektoru pCDNA3-EE vyříznutého s BamH1, zkrátí a poté vyřízne EcoR1. Vektor pCDNA3-EE se tvoří vložením do místa HindIII/BamH1 oligonukleotidu, který kóduje zahájení kodonu následované epitopem EE, MEEEEYMPME (č. identifikace sekvence: 5) [Grussenmeyer a kol., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7952-7954 (1985)]. Verze MLK3 bez kinasové aktivity se připraví mutací K144R s použitím PCR a dříve publikovaného způsobu [Chen a kol., Biotechniques, 17, 657-659 (1994)]. První mutagenní oligonukleotid je 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCCAG-3' (č. identifikace sekvence: 6) a druhý oligonukleotid je 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (č. identifikace sekvence: 7). S použitím MLK3 jako templátu se použijí tyto oligonukleotidy v PCR pro tvorbu fragmentu 806 bp a v druhé reakci PCR s použitím primeru T7 jako dalšího amplimeru a MLK3 jako templátu pro tvorbu fragmentu 1285 bp. Tento fragment se separuje elektroforesou na agarosovém gelu, izoluje, klonuje do pGEM-5 (Promega) a sekvenuje. Fragment se vyřízne HindIII a HpaI a vloží do pCDNA3-EE-MLK3, vyřízne HindIII a HpaI. Další bodová mutace se detekuje při nukleotidu 1342. Pro opravu se vyřízne fragment (nt 1093-1418) z přirozené MLK3 a použije se pro náhradu K144R mutovaného MLK3.

Příklad 14

pFB-FLAG-MLK3

Pro obdržení proteinu MLK3 se cDNA klonuje do bakulovirového expresního vektoru pFB-FLAG. MLK3 se vyřízne z PTK1-3.2 digescí s NcoI, upraví DNA polymerasou (Klenow), vyřízne opět NotI a liguje do pFB-FLAG digеровané StuI a NotI. pFB-FLAG se odvozuje od pFB (Life Technologies) a má kódovací sekvenci pro epitop FLAG [Hopp a kol., Biotechnology, 6, 1205-1210 (1988)] se zahajovacím kodonem MDYKDDDDK (č. identifikace sekvence: 8) přidaným k polylinkeru v místě BamHI.

Příklad 15

pFB-GST-MLK3 (KD)

Bakulovirová exprese kinasové domény MLK3 se dosáhne vyříznutím fragmentu MLK3 z pGEXKG-MLK3(KD) s použitím EcoR1 a Xho1 a ligací do vektoru pFB vyříznutého EcoR1 a Xho1, kde se vzestupně klonuje kódovací sekvence pro glutathion S-transferasu (GST). Toho se dosáhne obdržáním GST kódovací sekvence a polylinkeru z vektoru pGEXKG pomocí PCR s použitím tohoto vektoru jako templátu [Guan a kol., Anal. Bioch., 192, 262-267 (1991)]. 5'oligonukleotid pro PCR vytváří Bgl2 restriční místo na konci 5' fragmentu. Tento izolovaný fragment se poté digeruje pomocí Bgl2 a HindD3 a liguje do pFB digerovaného BamH1 a HindD3.

Příklad 16

pGEXKG-MLK3 (KD)

Fragment cDNA zahrnující MLK3 kinasovou doménu a část leucinového zipperu (nt 736-1791) se obdrží způsobem PCR s použitím PTK1 cDNA. Izolovaný fragment se digeruje restričními enzymy EcoR1 a Xho1, místa zahrnutá v oligonukleotidech PCR, a klonuje do pGEX-KG digerovaného s EcoR1 a Xho1. Tento fragment v pGEX-KG se poté zkrátí způsobem PCR, aby zahrnoval pouze kinasovou doménu (nt 736-1638).

Příklad 17

pKH3-MLK2, pKH3-MLK2 (KA)

MLK2 se klonuje s použitím degenerované PCR [Dorow a kol., Eur. J. Biochem., 213, 701-710 (1993), Dorow a kol.,

Eur. J. Biochem., 234, 492-500 (1995)]. Segmenty cDNA kódující katalytické subdomény proteinových kinas exprimované v linii Colo 16 tumorových buněk epithelu se amplifikují z RNA reversní transkriptasou PCR. Degenerované PCR primery se zakládají na sekvencích kódujících zachované motivy subdomén Vib a VIII katalytických domén skupiny kinas receptoru epidermálního růstového faktoru. Sekvence primerů jsou následující: forward primer, 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G-(A)ACC(T)T-3' (č. identifikace sekvence: 9), reversní primer, 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTCCAG(C)ACATC-3' (č. identifikace sekvence: 10). Několik produktů PCR se klonuje do M13 a sekvenuje s použitím sekvenovacího kitu T7 Super-Base (Bresatec.). Jeden produkt 216-bp PCR se použije jako sonda pro screening knihovny lambdagt11 cDNA lidského kolonu (Clontech, katalog HL10346). Fragment se náhodně značí, hybridizace se provádí při teplotě 65 °C a filtry se promývají do síly 0,2x chlorid sodný/citrát (150 mM chlorid sodný, 15 mM citrát sodný, pH 7,0) a 0,5 % SDS při teplotě 65 °C. Filtry se podrobí autoradiografii po dobu 16 h při teplotě -70 °C na filmu Kodak XAR-5. Izolují se čtyři klony a nejdelší, 1,2 kb, se použije pro opětovné sondování téže knihovny s použitím stejných podmínek. Zvolí se čtyři další klony a jeden z těchto klonů představuje fragment 1034 bp MLK2. Tento klon se použije pro sondování knihovny lambdagt10 lidského mozku. Prohlíží se zhruba 500000 klonů a izoluje se jeden klon 3454 bp představující celou kódovací oblast MLK2.

Klonuje se MLK2, od ATG do koncové části polyA, do vektoru pKH3 mezi místy BamH1 a EcoR1 ve dvou krocích, takže místo BamH1 je ve středu sekvence MLK2. Vektor pKH3 se tvoří vložením tří kopií tag HA epitopu s následujícím místem BamH1 mezi místy Xba1 a EcoR1 polylinkeru pRK7. Pro mutage-

nizovanou verzi, K125A, se fragment MLK2 5' BamH1 klonuje do vektoru Promega pAlter a mutuje podle doporučení výrobce. Fragment se poté klonuje zpět do vektoru MLK2 pKH3.

Příklad 18

pCDNA3-HA-JNK1

JNK1 cDNA se obdrží podle popisu [Coso a kol., Cell, 81, 1137-1146 (1995)]. cDNA se obdrží způsobem PCR s použitím jako templátu cDNA lidského kosterního svalu (Invitrogen) a klonuje do míst Bgl2/Sal1 pCDNA3-HA, modifikovaného pCDNA3 expresního plasmidu kódujícího epitop HA [Wilson a kol., Cell, 37, 767-778 (1984)]. Ten se poté vyřízne z pCDNA3 včetně epitopu HA a liguje do pGEX-4T3 (Pharmacia). JNK1 cDNA se vyřízne z pGEX-4T3 konstruktů jako Bgl2/Sal1 fragment a liguje do pCDNA3-HA, vektoru s HA epitopem přidaným do místa Hind3/BamH1 pCDNA3.

Příklad 19

pFLAG-DLK

DLK se klonuje do expresního vektoru pCDNA3 s epitopem FLAG přidaným podle popisu [Holzman a kol., J. Biol. Chem., 269, 30808-30817 (1994)]. Fragment cDNA pro DLK se izoluje degenerovaným klonováním PCR založeným na oligonukleotidu. Celková RNA se extrahuje z ledvin embryonálního dne 13,5 (32 orgánů) a ledvin embryonálního dne 17,5 (16 orgánů) s použitím komerčně připraveného fenol/guanidinového činidla podle návodu výrobce (TRIzol Reagent, Life Technologies, Inc.). Po digesci DNase I prostou RNase se celková RNA přepisuje RNase H-reversní transkriptasou (Superscript,

Life Technologies, Inc.) z oligo(dt) syntetického oligonukleotidové primeru na jednovláknovou cDNA. Degenerované oligonukleotidové primery odpovídající protein tyrosin kinasovému katalytickému subdoménám Vib a IX původně navrženým Wilksem [Wilks, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86, 1603-1607 (1989)] se modifikují na místa 5' EcoRI a HindIII (5'-ATAA-TTC(GT)GC(TAGC)GCCA(GA)GTC(TAGC)CGGTG-3' (č. identifikace sekvence: 11), 5'-ATAAGCTTCC(TC)(AG)T(GC)AAGTGGA(TC)GC-(AGC)CC(CT)GA-3' (č. identifikace sekvence: 12)). Proveďte se 40 PCR cyklů po dobu 1,5 min při 94 °C, 2 min při 37 °C a 3 min při 63 °C. Přidají se čerstvá činidla a provede se dalších 40 cyklů před konečnou 10-min extenzí při teplotě 72 °C. Výsledný DNA amplifikační produkt 200 až 210 bp se podrobí gelové izolaci, subklonuje do připraveného pGEM7zf(+) plasmidu (Promega) a transformuje do *Escherichia coli*. Plasmid DNA miniprep se připraví z transformovaných bakterií a části digerované s EcoRI a HindIII restriktčními nukleasami. Sekvenují se klony obsahující vložené části.

195-bp DLK cDNA fragment obdrženy z degenerované PCR se označí radionuklidem a použije pro screening zhruba 1×10^6 rekombinací Uni-ZAPII (Stratagene, La Jolla, CA), knihovny oligo(dt)-primed cDNA mozku dospělých myší [Holzman a kol., Mol. Cell. Biol., 10, 5830-5838 (1990)]. Filtry se hybridizují v pufru obsahujícím 50 % formamid, 5 x SSC, 3 x Denhardtův roztok, 0,25 % SDS, 1 mg/ml polyadenylové kyseliny a 200 mg/ml DNA spermatu lososa při 42 °C. Filtry se promyjí jednou při teplotě místnosti v 2 x SSC, 0,2 % SDS a dvakrát po dobu 30 min při teplotě 65 °C. Identifikuje se 25 jedinečných klonů. 10 klonů se purifikuje do dosažení homogenity, vyřízne in vivo podle postupu výrobce a podrobí restriktčnímu mapování. Dva nejdelší klony (3401 respektive 3397 bp, lišící se pouze ve svých koncích 5') se sekvenují

podél obou vláken v průběhu celkové délky.

Fragment plné délky NotI-XhoI DLK cDNA (3401 bp) se subklonuje do eukaryotního expresního vektoru pcDNA3 založeného na cytomegalovirovém promotoru (Invitrogen, San Diego, CA) (konstrukt označený pcDNA3-DLK). Dále se připraví konstrukt (pFLAG-DLK) značený NH₂-Met FLAG epitopem (DYKDDDDK) (č. identifikace sekvence: 13). PCR se použije pro amplifikaci cDNA fragmentů kódujících místo 5' HindIII, DLK Kozakovu sekvenci konsensu včetně iniciace ATG, FLAG epitop a sekvenci DLK cDNA otevřeného čtecího rámce od nukleotidu 88 k vnitřnímu místu EcoRI při nukleotidu 758. (HPLC purifikované syntetické oligonukleotidy použité v ekvimolárních množstvích 5'-ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAA-GGCCTGCCTCCATGAAACCCGAACA-3' (č. identifikace sekvence: 14) pro primer ve směru FLAG konstruktů a 5'-GACAGGGCGGCCGGCTCT-3' (č. identifikace sekvence: 15) pro primer v opačném směru). Gelově purifikované HindIII a EcoRI-digerované amplifikované fragmenty se subklonují do HindIII-EcoRI do připraveného plasmidu pcDNA3-DLK. Konstrukty se sekvenují podél obou vláken pro zajištění věrnosti Taq polymerasy a udržení čtecího rámce.

Příklad 20

pcDNA3-MLK1

Část 5' MLK1 se obdrží z databáze EST (pod číslem AA160611). Tento klon je spojením mezi MLK1 a další cDNA neznámé identity. Obsahuje dříve publikovanou sekvenci 5' MLK1 spolu s částí dříve publikované kinasové domény MLK1 [Dorow a kol., Eur. J. Biochem., 213, 701-710 (1993)]. Sekvence MLK1 cDNA z klonu EST je následující:

GAATTCGGCACGAGAGGACTCGCAGGTGTCCGGCGACGAG
GGCTGGTGGACCGGGCAGCTGAACCAGCGGGTGGGCATCTTCCCCAGCAA
CTACGTGACCCCGCGCAGCGCCTTCTCCAGCCGCTGCCAGCCCGGCGGGCG
AGGACCCCAAGTTGCTACCCGCCCATTTCAGTTGTTAGAAATTGATTTTGCG
GAGCTCACCTTGGAAGAGATTATTGGCATCGGGGGCTTTGGGAAGGTCTA
TCGTGCTTTCTGGATAGGGGATGAGGTTGCTGTGAAAGCAGCTCGCCACG
ACCCTGATGAGGACATCAGCCAGACCATAGAGAATGTTGCGCAAGAGGGC
AAGCTCTTCGCCATGCTGAAGCAGCCCAACATCATTGCCCTAAGAGGGGT
ATGTCTGAAGGAGCCCAACCTCTGCTTGGTCATGGAGTTTGCTCGTGGAG
GACCTTTGAATAGAGTGTTATCTGGGAAAAGGATTCCCCCAGACATCCTG
GTGAATTGGGCTGTGCAGATTGCCAGAGGGATGAACTACTTACATGATGA
GGCAATTGTTCCCATCATCCACCGCGACCTTAAGTCCAGCAAC

(č. identifikace sekvence: 16). To se překládá na

NSAREDSQVS GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTPRSFSS
RCQPGGEDPS CYPPIQLEI DFAELTLEEI IGIGGFGKVY RAFWIGDEVA
VKAARHDPDE DISQTIENVR QEAKLFAMLK HPNIIALRGV CLKEPNLCLV
MEFARGGPLN RVLSGKRIPP DILVNWAVQI ARGMNYLHDE AIVPIIHRDL KSSN

(č. identifikace sekvence: 17).

Část 3' MLK1 se nejprve klonuje degenerovaným PCR podle dřívějšího popisu [Dorow a kol., Eur. J. Biochem., 213, 701-710 (1993)]. Protokol pro klonování části 3' MLK1 je podle popisu výše pro MLK2 s následujícími výjimkami. Ze čtyř klonů obdržených z opětovného prohlížení knihovny

s klonem 1,2 kb představují tři až čtyři klony MLK1. Žádný z klonů neobsahuje celou kinasovou doménu, která se obdrží pomocí PCR.

Fág z alikvotů 1 μ l amplifikovaných knihoven (cDNA normálních lidských epiteliálních buněk kolonu a buněčné linie karcinomu kolonu T84 v lambda Uni-ZAPXR (Stratagene, kat. 937204) se podrobí cytolýze suspendováním ve 20 μ l vody a zmrazením. 5 μ l vzorku fágu po cytolýze se použije jako templát PCR ve dvou reakcích pro každou knihovnu. Primery představující vektory se vezmou z nukleotidových sekvencí obklopujících klonovací místa. V případě knihovny linie buněk kolonu T84 se použijí sekvenovací primery T3 a T7 (Promega). V každé reakci je jeden primer z vlákna 3' až 5' MLK1 genu, zhruba 100 bp od konce 5' známé sekvence. Druhý primer je jeden ze dvou vektorových primerů. Směs pro PCR obsahuje 1x PCR pufr, 2,5 mM chlorid hořečnatý, 1 jednotku Taq polymerasy (vše od Bresatec), 0,2 mM dNTP a 0,4 mM každého primeru v celkovém objemu 50 μ l. Reakční podmínky jsou 60 s při 95 °C, 90 s při 52 °C, 90 s při 72 °C po 30 cyklů s časem extenze 15 min v konečném cyklu. Produkty PCR se klonují a sekvenují podle popisu výše. Nejdelší klon z prohledávání knihovny a PCR fragment zahrnující další sekvenci MLK1 se spolu ligují s vytvořením 1,08 kb MLK1 cDNA v pUC18.

Klon MLK1 z databáze EST se obdrží ve vektoru pBlue-script (Stratagene). MLK1 cDNA z knihovny pro kolon se liguje do klonu EST digescí prvního klonu EcoRI, upraví podle Klenowa a odřízne AfIII. Tento izolovaný fragment se klonuje do MLK1 cDNA z EST databáze odříznuté XhoI, upravené podle Klenowa a odřízne AfIII. Tento nový konstrukt se potom vyřízne z pBluescript digescí s NotI a ApaI a liguje do pcDNA3-EE rovněž odříznuté NotI a ApaI. Veškerá klonovací

spojení se ověřují.

Příklad 21

Exprese GST-MLK3_{KD} v E. coli

pGEXKG-MLK3(KD) se transformuje do E. coli, kmen BL21, elektroporací. Bakterie obsahující plasmid se očkují do 15-litrového fermentoru Applikon s 10 litry následujícího bohatého média. 1,95 g/litr hydrogenfosforečnanu draselného, 0,9 g/litr dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,1 g/litr ampicilinu, 0,3 g/litr síranu amonného, 0,92 g/litr krystalického síranu hořečnatého, 42,7 mg/litr citrátu sodného, 21,8 mg/litr krystalického síranu železnatého, 0,5 ml stopových kovů Pichia [Higgins a kol., Methods Molecular Biology, 103, 149-177 (1998)]. 20 g g/litr kasaminokyselin, 40 g/litr glycerolu, 25,5 mg/litr chloridu vápenatého. Bakterie se pěstují přes noc při frekvenci otáčení 800 min^{-1} , s 68 % rozpuštěného kyslíku při 30 °C do dosažení hodnoty v kultuře $\text{OD}_{600} = 4,4$. Tvorba rekombinantního proteinu se indukuje přidávkem 1 mM isopropyl- β -D-thiogalaktosidu s pokračující fermentací při teplotě 25 °C po dobu až 6 h. Bakterie se poté získají centrifugací a buněčná pasta se zamrazí na teplotu -20 °C do doby purifikace.

Příklad 22

Purifikace bakteriální GST-MLK3_{KD}

Částečně purifikovaná GST-MLK3_{KD} se připraví vystavním ultrazvuku 100 g bakteriální buněčné pasty ve 100 mM Tris-HCl, 150 mM chloridu sodném, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitolu (DTT), pH 7,5 (pufr A). Roztok se upraví na kon-

centraci 1 % Tritonem X-100, poté se míchá na ledu po dobu 1 h. Supernatant po centrifugaci po dobu 45 min při 20000 g se míchá po dobu 1 h na ledu s 10 ml glutathionové pryskyřice Sepharose 4B (Pharmacia) ekvilibrované v pufru A. Peletovaná pryskyřice se promyje dvakrát 12,5 objemu pufru A a zředí 20 ml roztoku 100 mM Tris HCl, 150 mM chloridu sodného, 5 mM DTT (pufr B) s 20 mM glutathionu, pH 7,5. Protein se dialyzuje přes noc proti pufru B a ukládá v alikvótech při teplotě -80 °C.

Příklad 23

Bakulovirová exprese FLAG-MLK3 a GST-MLK3_{KD}

Rekombinantní bakuloviry exprimující FLAG-MLK3 a GST-MLK3_{KD} se tvoří ze svých příslušných transferových vektorů, pFB-FLAG-MLK3 a pFB-GST-MLK3_{KD} s použitím systému BAC-TO-BAC (Life Technologies) podle příručky s pokyny. Kultury suspenze buněk Sf21 [Vaughn a kol., *In Vitro*, 13, 213-217 (1977)] se pěstují při 27 °C, frekvence otáčení 120 min⁻¹ v obohaceném Graceho médiu [Hink, *Nature*, 226, 466-467 (1970)] s 10% tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS). Pro tvorbu rekombinantní FLAG-MLK3, Sf21 se buňky při hustotě 1,5 x 10⁶ buněk/ml obohaceného Graceho média s 5 % FBS infikují při multiplicitě infekce (MOI) 3,1 a sbírají v čase 39 h po infekci. Pro získání rekombinantní GST-MLK3_{KD}, se buňky Sf21 při hustotě 1,5 x 10⁶ buněk/ml obohaceného Graceho média s 5 % FBS infikují MOI 2 a sbírají v čase 41 h po infekci. V obou případech se peletované buňky resuspendují v pufru obsahujícím 100 mM HEPES, 50 mM chloridu sodného, 0,5 mM Pefabloc SC, 5 μM pepstatinu, 10 μg/ml aprotininu, 10 μg/ml leupeptinu, pH 7,4. Supernatant po centrifugaci po dobu 1 h při 147000 g se znovu upraví na pH

7,4 3 M Tris báží a poté se ukládá při teplotě -70°C do purifikace.

Příklad 24

Purifikace bakulovirové GST-MLK3_{KD}

Částečně purifikovaná bakulovirová GST-MLK3_{KD} se připraví glutathionovou afinitní chromatografií. Na 10 ml buněčného extraktu (26,6 mg celkového proteinu) se přidá 1 ml glutathionové pryskyřice Sepharose 4B (Pharmacia) ekvilibrované v 10 mM HEPES, 150 mM chloridu sodném, pH 7,4 (pufr C) a umožní se navázání proteinu po dobu 45 min při teplotě 4°C . Pryskyřice se poté promyje ve sloupcovém formátu 30 objemy sloupce pufru C, poté se eluuje 5 objemy sloupce pufru C s 20 mM glutathionu. Spojený konečný produkt se dialyzuje přes noc proti pufru C a ukládá v alikvótech při teplotě -70°C .

Příklady 25

Purifikace bakulovirové FLAG-MLK3

Částečně purifikovaná bakulovirová FLAG-MLK3 se připraví protilátkovou afinitní chromatografií. Protein z 15 ml extraktu (19,5 mg celkového proteinu) s dalším 0,1 M chloridem sodným se váže na sloupec 0,25 ml M2 monoklonální FLAG peptidové protilátky připojené na agarosovou pryskyřici (Sigma) opakovaným přidáním (celkem třikrát). Pryskyřice se uvede do rovnováhy s 5 objemy sloupce 50 mM Tris-HCl, 150 mM chloridu sodného, pH 7,4 (TBS), 3 objemy sloupce 0,1 M glycinu, pH 3,5 a poté 5 objemy sloupce TBS před chromatografií. Rekombinantní protein se primárně eluuje 5 objemy

sloupce 0,2 mM FLAG peptidu (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (č. identifikace sekvence: 18) v TBS. Protein se ukládá v alikvótech při teplotě -80 °C před esejí.

Příklad 26

Dominantní negativní mutant: dominantní negativní mutant skupiny MLK blokuje zánik diferencovaných buněk PC12 po odstranění faktoru růstu nervů

Buněčná linie PC-12 odvozená od krysího feochromocytomového tumoru se používá v rozsáhlé míře jako neuronový buněčný model pro zkoumání molekulárních událostí vedoucích k zániku neuronů [přehled viz Troy a kol., Adv. Neurology, 103-111 (1997)]. Faktor růstu nervů (NGF) indukuje PC-12 buňky k diferenciaci na sympatický neuronový fenotyp [Greene, Cell. Biol., 78, 747-755 (1978)]. PC-12 buňky diferencované NGF jsou závislé na NGF ohledně přežívání a prodělávají morfologicky popsaný apoptický zánik při odstranění NGF z média. Byl vyvinut systém buněk pro stanovení účinků členů kinasové skupiny směsné linie na zánik buněk PC-12 po odstranění NGF. Provede se transfekce PC-12 buněk s cDNA kódující dominantní negativní (DN) mutant MLK-3 s použitím systému transferu Pfx lipidu, jak doporučuje výrobce (Invitrogen, Carlsbad, CA). Stabilní zásoba transfektantu exprimujícího DN-MLK-3 se zvolí s použitím G418 sulfátu (Mediatech Inc., Herndon, VA). Zhruba 30 % buněk v těchto objemech exprimuje DN MLK3, jak lze stanovit imunohistochemicky. Soubory buněk stabilně exprimujících mutantní kinasu se nanesou na tkáňové kultury v 96-jamkových miskách potažených polyornithinem/lamininem (10 µg/ml každé z těchto látek ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem) v množství $2 \cdot 10^4$ buněk/jamka a zpracují se 100 ng/ml NGF v průběhu 7 d. Médi-

um obsahující NGF se odstraní, monovrstva buněk se promyje fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem a médiu obsahující neutralizační protilátku NGF (kat. N6655, Sigma, St. Louis, MO) při konečném zředění 1:1000 se vyměňuje po dobu 1 až 5 d. Životnost buněk se vyjádří kvantitativně v eseji životnosti buněk s použitím konverze tetrazoliové soli, MTS, na barevný formazan, jehož absorbance se odečítá při vlnové délce 570 nm na CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) podle doporučení výrobce (Promega, Madison, WI). Stabilní objemy buněk exprimujících DN-MLK-3 se částečně zachrání před zánikem způsobeným odejmutím NGF (obrázek 10).

Příklad 27

Esej enzymatické aktivity rekombinantního MLK proteinu

Pro průkaz, že MLK protein exprimovaný v bakulovirovém nebo bakteriálním expresním systému je enzymaticky aktivní, lze použít několik formátů eseje. MLK protein může být konstruktem plné délky nebo kinasovou doménou exprimovanou buď v bakulovirovém nebo v bakteriálním expresním systému. Esej se může zakládat na protilátkách, jako je imunobentní esej spojená s enzymem (ELISA), časově rozlišená fluorescence (TRF) nebo fluorescenční polarizace (FP). Protilátka může být monoklonální či polyklonální s reaktivitou pro fosfoserinový, fosfothreoninový nebo fosfospecifický substrát. Alternativně lze použít metodu, která není založená na protilátkách, jako je radioaktivní gelová esej (viz obrázek 11), multiscreeningová precipitační esej s kyselinou trichloroctovou (TCA) (obrázek 13), scintilační esej proximity (SPA), způsob flashplate nebo formát eseje fosfocelulového filtru (obrázek 13). Tato esej může být určena pro sledování přímé fosforylace substrátu nebo připojeného

systému eseje s použitím sestupných kinas při signalizační cestě. Substrát může být specifickým substrátem, jako je SEK-1 nebo relativně nespecifickým substrátem, jako je myelinový bázeický protein (MBP).

Příklad 28

Kinasové eseje

(1) Radionuklidová gelová kinasová eseje

Kinasová aktivita MLK-3 se stanoví sledováním inkorporace radionuklidu ^{32}P z [gamma- ^{32}P]-ATP do substrátu MLK (např. SEK-1 bez kinasové aktivity, myelinový bázeický protein). 50 μl směsi pro eseje obsahuje pufr A (20 mM MOPS, pH 7,2, 2,2 mM β -glycerol-fosfátu, 5 mM EGTA, 1 mM orthovana-dičnanu sodného, 1 mM dithiothreitolu), 15 mM chloridu hořečnatého, 100 μM ATP, 10 μCi [gamma- ^{32}P]-ATP a 0,1 μg SEK-1 substrátu bez kinasové aktivity (Stressgen, Inc., vázaná glutathion S-transferasa-SEK-1 (GST-SEK-1) se uvolňuje z glutathion-agarosových kuliček s 10 mM glutathionu, pH 8,0) nebo 25 μg MBP (Sigma Chemical Co.). Reakce se zahajuje přidáním MLK proteinu (kinasová doména nebo přípravek obsahující obě domény, plné délky a kinasovou) nebo kontrolního proteinu. Směs se inkubuje po dobu 30 min při teplotě 30 °C. Na konci reakce se přidá 2x redukující pufr vzorku. Směs se vaří po dobu 5 min, nanese na gel 12 % SDS-PAGE (s použitím MBP jako substrátu) nebo 8% gel (SEK-1) jako substrát. Po elektroforéze se gel vysuší. Kvantitativní vyjádření inkorporace fosfátu do substrátu, SEK-1 se provede na zařízení Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, CA). Výsledky experimentů ukazují enzymatické aktivity bakulovirem-expresované MLK-3 (označené FLAG plné délky nebo kinasové domény

označené GST) s použitím GST-SEK-1 bez kinasové aktivity nebo MBP jako substrátu, jak znázorňují obrázky 11A a 11B.

(2) Westernovo blotování

Kinasová aktivita MLK-3 exprimované bakulovirem se zjišťuje imunoblotovací analýzou. 20 μ l směsi pro esej obsahuje pufr A, 15 mM chloridu hořečnatého, 100 μ M ATP a 0,1 μ g substrátu SEK-1 necitlivého na kinasu. Reakce pokračuje po dobu 30 min při teplotě 30 °C, poté se ukončí přidávkem 10 μ l 4x redukujícího pufru vzorku. Proteiny se oddělí na 8% Trisglycinovém gelu a elektroforeticky přenesou na membránu Immobilon PVDF. Membrána se inkubuje s fosfo-specifickou protilátkou SEK-1 (Thr223) (New England Biolabs, Inc.) a poté s protikráličím kozím IgG značeným křenovou peroxidasou (Bio-Rad). Detekce imunoreaktivních pásů se provede zvýšenou chemiluminiscencí (Amersham). Fosforylace GST-SEK-1 necitlivého na kinasu proteinem FLAG-MLK-3 (bakulovirový preparát obsahující doménu plné délky a kinasovou doménu) se znázorňuje na obrázku 12.

(3) Multiscreeningová precipitační esej s kyselinou trichloroctovou (TCA)

Kinasová aktivita bakteriálně exprimované GST-MLK-3 kinasové domény se vyhodnotí s použitím eseje s kyselinou trichloroctovou (TCA) Millipore Multiscreen "in -plate", jak popisuje Pitt a kol., J. Biomol. Screening, 1, 47-51 (1996). Eseje se provádějí v 96-jamkových miskách Multiscreen Durapore (Millipore). Každých 50 μ l směsi pro esej obsahuje 20 mM Hepes, pH 7,4, 20 mM chloridu hořečnatého, 20 mM chloridu manganatého, 2 mM DTT, 0,1 mM vanadičnanu sodného, 1 μ Ci [gamma-P³²] ATP a 30 μ g substrátu MBP. Reakce

se zahajuje přidavkem proteinu MLK a ponechá se pokračovat po dobu 15 min při teplotě 37 °C. Reakce se zastaví přidavkem 25 μ l 50% kyseliny trichloroctové. Misky se ponechají do dosažení rovnováhy v průběhu 30 min při teplotě 4 °C, poté se promyjí ledově chladnou kyselinou trichloroctovou. Opět se umožní dosažení rovnováhy v průběhu 30 min při teplotě 4 °C a misky se promyjí ledově chladnou 25% kyselinou trichloroctovou. K miskám se přidá kapalný scintilátor a radioaktivita se měří s použitím scintilačního počítače Wallac MicroBeta 1450 PLUS. Odpověď dávky proteinu proti tvorbě ^{32} P značeného MBP ukazují obrázek 13.

(4) Fosfocelulosoová filtrační esej

Kinasová esej se provádí v 50 μ l reakční směsi obsahující 20 mM Hepes, pH 7,4, 20 mM chloridu hořečnatého, 20 mM chloridu manganatého, 2 mM DTT, 0,1 mM vanadičnanu sodného, 1 μ Ci [gamma- ^{32} P] ATP a 30 μ g MBP. Reakce se zahajuje přidavkem MLK proteinu a ponechá se pokračovat po dobu 15 min při teplotě 37 °C. Reakce se zastaví 75 μ l 75 mM kyseliny fosforečné. Alikvót roztoku po skončení reakce se nanese přímo na fosfocelulósovou membránu (Pierce). Alternativně lze použít 96-jamkovou fosfocelulósovou multiscreeningovou desku (Millipore). Membrány se promyjí 75 mM roztokem kyseliny fosforečné. Navázaný fosforylovaný MBP značený radionuklidem ^{32} P se eluuje ve sběrných zkumavkách přidavkem 1 M roztoku hydroxidu sodného. Radioaktivita se stanovuje měřením Čerenkovova záření v Beckmanově scintilačním počítači (Someset, NJ). Tvorba fosforylovaného MBP se vzrůstající koncentrací bakteriálně exprimované GST-MLK-3 kinasové domény je znázorněná na obrázku 13.

Esej pro stanovení vazby sloučenin na skupinu rekombinantních MLK

K-252a (sloučenina III-3, viz tabulku 4), indolokarbazolový metabolit *Nocardia* sp., se váže na řadu serin/threonin a tyrosin kinas [Angeles a kol., *Anal. Biochem.*, **236**, 49-55 (1996), Knight a kol., *Anal. Biochem.*, **247**, 376-381 (1997)]. Tritiovaný ligand K-252a se používá pro hodnocení vazby na rekombinantní MLK-3 plné délky ze surového preparátu buněk infikovaných bakulovirem. [^3H]K-252a se specificky značí tritiem v polohách 3 a 9 stykem s produkty NEN Research (Billerica MA) a má specifickou aktivitu 40 Ci/mmol. Vazebné reakce se provádějí v 1 ml na 96-jamkové misce. Reakční směs obsahuje pufr 50 mM MOPS, pH 7, 150 mM chloridu sodného, 5 mM chloridu manganatého. 1 mg/ml BSA, 1 % DMSO a 0,25 nM [^3H]K252a. Vzorky se analyzují po trojicích při koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ surové MLK-3 odvozené od bakuloviru. Nespecifická vazba se určí jako vazba za přítomnosti neznačené 1,2 μM K252a a odečítá se od celkové vazby pro obdržení hodnoty specifické vazby. Při tomto zředění se 12 až 15 % celkové četnosti impulsů váže nespecificky na protein a 75 až 85 % četnosti se váže specificky na MLK-3 (obrázek 14). Veškeré experimenty se provádějí v průběhu 2 h při teplotě 4 °C. Komplexy [^3H]K252a/MLK-3 se shromažďují na filtrech GF/C Whatman s použitím zařízení pro sběr Brandel, promyjí chladným pufrům MOPS/chlorid sodný a četnost impulsů se měří na čítači Wallac Micro Beta. Provede se saturační vazebný experiment pro obdržení K_d pro K252a. Příklad výsledků z těchto experimentů ukazuje obrázek 14. Obdrží se K_d 0,89 nM (meze spolehlivosti 0,2 až 1,2 nM).

Esej intaktních buněk

(A) Systém nadměrné exprese Cos 7 (A)

Materiály

K-252a a deriváty této sloučeniny jsou od společnosti Kyowa-Hakko Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) (Kaneko a kol., 1997). Sloučeniny se rozpustí v dimethylsulfoxidu (DMSO) pro buněčnou kulturu a uloží ve tmě při teplotě 4 °C. Zředění sloučenin se provádějí v modifikovaném médiu Eagle, Dulbecco (DMEM) s obsahem 1 % bovinního serumalbuminu. Hemaglutininní protilátka (HA) je od BABCO (Richmond, CA). AP-1 (c-jun) je od Promega (Madison, WI). [gamma-³²P]ATP (6000 Ci/mmol) pochází od Amersham (Arlington Heights, IL).

Kultura buněk Cos7

Buňky Cos7 z ledvin kočkodana zeleného se obdrží od ATCC, Rockville, Maryland (CRL 1651) a uchovávají se v DMEM s obsahem 10 % bovinního séra, 2 mM glutaminu, 1 mM pyruvátu, 50 jednotek/ml penicilinu/streptomycinu při teplotě 37 °C, 10 % CO₂, 90 % vzduchu. Buňky Cos7 se odpojují pro pasážování přidávkou 0,25% trypsinu.

(1) Nadměrná exprese členů skupiny MLK a JNK1 v buňkách Cos7

Buňky Cos7 se nanášejí při propojení 80 % a podrobí transfekci s 2 µg každého z konstruktů cDNA s použitím lipofektaminu podle doporučení dodavatele (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). cDNA lidské MLK-3, MLK-2 plné délky nebo myší DLK nebo částečné humánní MLK-1, jak se popisuje výše a hemaglu-

tininem A značené lidské JNK1 plné délky, laskavě dodané J. Silvien Gutkindem (NIH, Bethesda, MD) se subklonuje do vektoru pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). Po 48 h transfekce se buňky zpracují 0,025% DMSO nebo 500 nM daných sloučenin během 2 h s následnou cytolýzou v 0,4 ml Tritonového pufru (1 % Triton X-100, 50 mM chloridu sodného, 10 mM Tris (pH 7,6), 0,1 % bovinního serumalbuminu, 30 μ M pyrofosforečnanu sodného, 50 mM fluoridu sodného, 20 μ g/ml aprotininu, 1 mM fenylmethylsulfonylchloridu, 1 mM vanadičnanu sodného). Aktivita JNK z lyzátu se stanoví imunoprecipitační/kinasovou esejí, jak se popisuje níže.

(2) Imunoprecipitační a kinasová esej z celých buněk

Lyzát z buněk Cis 7 se analyzuje ohledně koncentrace proteinu s použitím soupravy Micro BCA od Pierce (Rockford, IL) a stejná množství proteinu se podrobí imunoprecipitaci s protilátkou HA po dobu 1 h při teplotě 4 °C. Imunoprecipitáty se peletují centrifugací v mikrocentrifuze po dobu 20 s, resuspendují v pufru Triton, promyjí centrifugací ještě dvakrát a nakonec se promyjí kinasovým pufrem (20 mM Hepes pH 7,4, 20 mM chloridu hořečnatého, 2 mM dithiothreitolu 0,1 mM vanadičnanu sodného). Imunoprecipitát se resuspenduje v kinasovém pufru obsahujícím 1 μ M ATP a 5 μ Ci [gamma- ^{32} P]-ATP a substrát (1 μ g/vzorek AP-1) a inkubuje po dobu 15 min při teplotě 30 °C. Kinasová reakce se zastaví přidávkem redukčního pufru vzorku [Laemmli, Nature, 227, 680-685 (1970)]. Vzorky se zahřívají na teplotu 80 °C po dobu 5 min a nanášejí na 10% SDS-polyakrylamidové gely. Proteiny se separují elektroforézou. Gel se vysuší a kvantitativní stanovení radioaktivity v substrátu AP-1 se provede na přístroji Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, Ca). Výsledky z experimentů, ve kterých se MLK-3, MLK-2 a DLK exprimuje

spolu s HA-JNK1 a inkubuje v nepřítomnosti či přítomnosti K-252a ukazují obrázky 15A a 15B. Naproti tomu derivát mateřské sloučeniny K-252a zvaný sloučenina III-3 (viz tabulku 4), který je selektivnějším kinasovým inhibitorem, neinterferuje s cestou JNK aktivovanou jinou MAPKKK vzestupně od JNK, MEKK1 (obrázek 15C).

(B) Reportérová esej celých buněk pro JNK aktivovanou MLK

Snahy o odvození klonů konstitutivně exprimujících skupinu MLK byly neúspěšné, což ukazuje, že nadměrná exprese MLK může ovlivnit přežívání buněk [(Bergeron a kol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231, 153-155 (1997), Nagata a kol., *EMBO J.*, 17, 149-158 (1998)]. Proto se při vývoji esejí z celých buněk pro stopování biochemických dějů indukovaných MLK může požadovat buněčná linie obsahující induktibilní expresní systém dané kinasy vytvořený způsoby genetického inženýrství. Například buněčná linie PC-12 po transfekci s tetracyklinem kontrolovaným transaktivátorem. Pokud se buňky podrobí další transfekci s daným genem řízeným induktibilním promotorem tetO, je exprese tohoto genu těsně kontrolována tetracyklinem v médiu [Shockett a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6522 (1995)].

Pro kvantitativní vyjádření aktivace MLK lze měřit fosforylaci sestupných substrátů, jako je MLK4, JNK nebo c-jun ve formátech vícečetných esejí, jak se popisuje výše. Další přístup ke kvantitativnímu vyjádření aktivace MLK v celkových buňkách je použití reportérové enzymatické aktivity, jako je c-jun luciferasový reportérový systém komerčně dostupný jako PathDetect™ (Stratagene, LaJolla, CA). V tomto systému se provádí transfekce tetracyklinem indukovatelné buněčné linie dvěma plasmidy. Jeden plasmid konstitutivně

exprimuje hybridizaci c-jun NH_2 -terminální transaktivační domény s vazebnou doménou GAL4 DNA kvasinek (cJun-DBD hybridní protein). Druhý plasmid nese kódovací sekvence pro luciferasu světlušek řízené pěti tandemovými opakováními vazebného místa GAL4. Při aktivaci MLK se hybridní protein sestupného substrátu JNK, cJun-DBD fosforyluje, váže se na vazebná místa GAL4 a indukuje luciferasovou genovou transkripci. Luciferasa se snadno stanovuje v buněčných lyzátech přidavkem jejího substrátu (Promega, Madison, WI) a měřením chemiluminiscence.

Příklad 31

Souvislost inhibice kinas ze skupiny MLK s přežíváním neuronů

Přežívání kultur krysí míchy obohacených motoneurony

Míchy se vypitvají z plodů krys Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) embryonálního stáří (E) 14,5 až 15. Disociují se pouze buňky z ventrální strany míchy a dále se obohacují o motoneurony centrifugací při 6,5% stupňovém metrizamidovém gradientu jak popisuje Henderson a kol. (1993) a analyzují se ohledně čistoty barvením nízkofinitní neurotrofinovou receptorovou protilátkou (IgG-192, Boehringer-Mannheim) (data se neuvádějí). Buňky se přenesou na 96-jamkové misky předem potažené poly-L-ornithinem a lamininem (po 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) při hustotě 6×10^4 buněk/ cm^2 v chemicky definovaném médiu N2 prostém séra (Bottenstein a kol., 1979, výše). Pro odlišení připojení od jevů přežívání se ke kulturám přidávají sloučeniny po počátečním obnovení připojení 1 až 3 h. Neuronové přežívání se vyhodnotí po době 4 d s použitím kalceinu AM (Molecular Probes, Eugene, OR) ve

fluorometrické eseji životnosti (Bozycko-Coyne a kol., 1993, výše). Mikroskopické počítání neuronů koreluje přímo s relativními hodnotami fluorescence. Ve stručnosti se médium sériově zředí v DPBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátem Dulbecco) a poté se přidá kalcein AM (konečná koncentrace 6 μM) do každé z 96 jamek. Misky se inkubují po dobu 30 min při teplotě 37 °C s následujícím sériovým zředěním v DPBS. Fluorescenční signál se odečítá s použitím fluorimetru pro odečítání desek Millipore (Cytofluor 2350) při vlnových délkách excitace 485 nm a emise 538 nm. Pro každou misku se od všech hodnot odečítá střední hodnota pozadí odvozená od jamek s kalceinem AM, avšak bez buněk. Linearita fluorescenčního signálu se ověřuje ohledně koncentrace a inkubačního času pro rozmezí buněčných hustot v těchto experimentech. Příklad procenta přežívání motoneuronů za přítomnosti zkušebních látek při 250 nM nad hodnotu kontrol ukazuje tabulka 3.

Přežívání kortikálních neuronů

Mozkové kůry se získají pitvou z krysích plodů embryonálního dne 18 a enzymaticky se zpracují pro obdržení jednotlivé buněčné suspenze. Buňky se nanášejí při hustotě $1,56 \times 10^5/\text{cm}^2$ na 96-jamkové misky pro tkáňové kultury potažené poly-ornithinem/lamininem v neurálním bazálním médiu bez séra s obsahem doplňků B27. Misky se potáhnou roztokem poly-ornithinu/lamininu (po 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v PBS v průběhu alespoň dvou h při teplotě 37 °C. Ve dny in vitro 5 až 7 se kortikální neurony exponují Ab25-35 (20 μM) v přítomnosti či v nepřítomnosti zkoušených látek. Zásobní roztoky (1 mM) Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) se připraví v deionizované destilované sterilní vodě. Relativní přežívání neuronů se stanoví v době 48 h po přidavku peptidu s použitím uvolňová-

ní laktát dehydrogenasy (LDH) jako indikátoru integrity plasmatické membrány/buněčné životnosti. LDH se měří s použitím soupravy pro detekci cytotoxicity (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) v souladu s pokyny výrobce. Data se vyjadřují jako procento inhibice uvolněné DLH vzhledem ke kulturám zpracovaným samotným AB25-35.

Tabulka 3

Vzo- rec	Přežívání kortikál- ních neuronů	Motoneurony		Cos-7 buňky	Cos-7 buňky	Cos-7 buňky	Cos-7 buňky
		Přež.	% JNK	DLK	MLK3	MLK2	MLK1
	% kontr.	% kontr.	Inhib.	% JNK	% JNK	% JNK	% JNK
	250 nm	250 nM	500 nm	Inhib. 500 nm	Inhib. 500 nm	Inhib. 500 nm	Inhib. 500 nm
III ¹	46,56	300	65	63,73	98,99	89,67	97,96
III ²	47,80	315	88	36,22,42	94,94	69,44	92,64
I ³	22,54	177	88	20,25	94,93	0	79,29
I ⁴	29,39	165	97	58,13	84,92	0	63,38
				52,8	90		

¹Sloučenina má obecný vzorec III, ve kterém Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

²Sloučenina má obecný vzorec III, ve kterém Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je CO_2CH_3 , R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina.

³Sloučenina má obecný vzorec I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu představují atom

kyslíku, R_2 je $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$, R_4 je CH_2CH_2 (2-Pyridyl) a X je CH_2 .

⁴Sloučenina má obecný vzorec I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je atom vodíku, R_4 je CH_2CH_2 (2-pyrimidinyl) a X je CH_2 .

Příklad 32

Imunoprecipitace endogenní aktivity JNK z motoneuronových kultur v nepřítomnosti či přítomnosti indolokarbazolů nebo kondenzovaných pyrrolokarbazolů

Purifikované motoneurony se nanasou na misky při hustotě 6×10^4 buněk/ cm^2 v jamkách o průměru 16 mm. Buňky se ponechají připojit v průběhu 2 h před zpracováním. Buňky se ošetřují buď 0,0125% DMSO nebo 500 nM roztokem sloučeniny podobu 2 h v definovaném médiu N2. Poté se buňky opláchnou ledově chladným fyziologickým roztokem pufrovaným fosfátem a následuje cytolýza v 0,4 ml pufru Triton podle popisu výše v příkladu 30. Lyzát z motoneuronových buněk se normalizuje na počet buněk a vystaví imunoprecipitaci protilátkou JNK1 (kat. #sc-474) od Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Aktivita JNK z imunoprecipitátů se stanoví za přítomnosti ³²P-ATP a substrátu c-jun, jak se popisuje výše. Profil inhibiční aktivity 4 zkušebních látek se srovnává v motoneuronech a v buňkách Cos7 nadměrně exprimujících buď DLK, MLK-1, MLK-2 nebo MLK-3 (tabulka 3).

Příklad 33

Korelace mezi inhibicí JNK aktivity indukované MLK3 v buňkách Cos7 a aktivity cholinacetyl transferasy v primárních

embryonálních kulturách

Pro stanovení, zda inhibice cesty JNK regulované těmito kinasami koreluje s neurotrofními sloučeninami, se vyhodnocuje účinek sloučenin na aktivitu JNK v buňkách Cos7 nadměrně exprimujících HA-JNK a MLK3. Po období transfekce 48 h se buňky inkubují se sloučeninami při koncentraci 500 nM po dobu 2 h s následující cytolýzou. Lyzát se podrobí imunoprecipitaci a kinasová aktivita se měří jako výše. Výsledky se uvádějí jako procento inhibice kontrolního vzorku, kde kontrolou je aktivita JNK za přítomnosti DMSO. Jak ukazuje tabulka 4, většina sloučenin, které jsou aktivní v míře a/nebo při působení ChAT bazálního předního mozku, jsou účinnými inhibitory aktivace MLK-3 JNK.

Tabulka 4

Účinek indolo- a indenokarbazolů na aktivitu JNK v buňkách Cos7 nadměrně exprimujících MLK3

Sloučenina	Aktivita cholinacetyl transferasy		% inhibice aktivity JNK (průměr) MLK3 v buňkách Cos7
	Mícha	Bazální přední mozek	
III-1 ¹	+	+	84
III-2 ²	+	+	96
III-3 ³	+	+	94
I-1 ⁴	+	+	93
I-2 ⁵	+	+	85
I-3 ⁶	+	+	93,5
I-4 ⁷	-	+	95
I-5 ⁸	-	+	97
I-6 ⁹	-	+	58
I-7 ¹⁰	-	+	85,5

III-4 ¹¹	-	+	66
III-5 ¹²	-	+	96
III-7 ¹³	-	+	54
I-8 ¹⁴	+	-	89
III-8 ¹⁵	+	-	94
III-9 ¹⁶	+	+	98,5
III-10 ¹⁷	+	-	78
I-9 ¹⁸	+	-	88
I-10 ¹⁹	+	-	94
III-11 ²⁰	-	-	92,5
I-11 ²¹	-	+	33
I-12 ²²	-	-	11
I-13 ²³	-	-	1

¹Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 je $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$,

R_2 je CH_2CH_2 (2-pyridyl) a R je hydroxylová skupina.

²Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina.

³Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 a R_2 je skupina $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina.

⁴Sloučenina obecného vzorce I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 a R_4 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, R_5 a R_6 jsou skupiny OCH_3 a X je skupina CH_2 .

⁵Sloučenina obecného vzorce I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$, R_4 je atom bromu a X je skupina CH_2 .

⁶Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O , R_2 je $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$, R_4 je CH_2CH_2 (2-pyridyl) a X je CH_2 .

⁷Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O , R_2 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ a X je skupina CH_2 .

⁸Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O , R_2 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ a X je skupina CH_2 .

⁹Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O a X je atom síry.

¹⁰Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O , R_2 je skupina $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}(4-(\text{OH})\text{Ph})$ a X je skupina CH_2 .

¹¹Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina.

¹²Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 , Z_2 a R_1 jsou atomy vodíku, R_2 je skupina CH_2OH , X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

¹³Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 spolu tvoří $=\text{O}$, R_1 a R_2 jsou atomy bromu, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

¹⁴Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří atom kyslíku, R_2 je atom vodíku, R_4 je skupina CH_2CH_2 (2-pyrimidinyl) a X je skupina CH_2 .

¹⁵Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, R_1 je atom bromu, R_2 je atom jodu, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

¹⁶Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

¹⁷Sloučenina obecného vzorce III, ve které Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

¹⁸Sloučenina obecného vzorce I, ve které A_1 , A_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_4 je skupina CH_2CH_2 (2-pyridazinyl) a X je skupina CH_2 .

¹⁹Sloučenina obecného vzorce I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 společně představují O, R_2 je atom vodíku, R_4 je skupina CH_2CH_2 (2-pyridyl) a X je skupina CH_2 .

²⁰Sloučenina obecného vzorce III, ve kterém Z_1 , Z_2 , R_1 a R_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je skupina OCH_3 .

²¹Sloučenina obecného vzorce I, ve kterém A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je skupina $(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C(=O)-3,5-dihydroxyfenyl}$ a X je skupina

CH_2 .

²²Sloučenina obecného vzorce I, ve které $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$ a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je benzoylová skupina a X je skupina CH_2 .

²³Sloučenina obecného vzorce I, ve které $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_5$ a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_4 je $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}\equiv\text{N}$ a X je skupina CH_2 .

Příklad 34

Esej gelového posunu pro stanovení aktivace MLK

Aktivace MLK může vést k indukci transkripce c-jun se zvýšením proteinu c-Jun. Zvýšené množství proteinu c-Jun lze měřit standardním způsobem popisovaným jako esej gelového posunu. Garner a kol., Nucleic Acids Res., 9, 3047-3060 (1981) v práci, která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu. Oligomery dvouvláknové deoxyribonukleové kyseliny značené radionuklidem, které kódují vazebné místo DNA c-Jun, se inkubují s extraktem nukleárních buněk s následující elektroforézou na akrylamidovém gelu a kvantitativním vyhodnocením DNA označené radionuklidem posunuté k pomalejší pohyblivosti. To představuje podíl DNA, která se váže na protein c-Jun, který je přímo úměrný množství proteinu c-Jun v extraktu.

Aktivace MLK může též vyvolávat fosforylaci c-Jun. Tu lze detekovat protilátkami, které specificky rozpoznávají fosforylovanou formu proteinu v detekčních systémech, jako je například Westernovo blotování nebo ELISA.

Příklad 35

Přežívání kuřecích embryonálních neuronů

Materiály

Leibovitzova média L15, glukosa, hydrogenuhličitan sodný, trypsin a protilátky pocházejí od Gibco. Svalový extrakt se připraví podle popisu práce [Henderson a kol., Nature, 302, 609-611 (1983), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Veškerá další činidla pocházejí od Sigma, pokud se nepopisuje jinak.

Buněčná kultura

Motoneurony (embryonální den 5,5) se izolují imunologickým způsobem podle způsobu popsaného v Bloch-Gallego a kol., Development, 111, 221-232 (1991), který se zde zahrnuje vcelku formou odkazu s modifikacemi popsanými v práci Weng a kol., NeuroReport, 7, 1077-1081 (1996), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu. Purifikované motoneurony se přenášejí na misky pro tkáňové kultury 35 mm (Nunc) předem povlečené poly-DL-ornithinem a lamininem (1 $\mu\text{g/ml}$, Upstate Biochem). Médium je L15 s hydrogenuhličitanem sodným (22,5 mM), glukosou (20 mM), progesteronem (2×10^{-8} M), seleničitanem sodným (3×10^{-8} M), konalbuminem (0,1 mg/ml), insulinem (5 $\mu\text{g/ml}$), penicilin-streptomycinem a 10% tepelně inaktivovaným koňským sérem. Svalový extrakt se doplňuje v množství 30 $\mu\text{g/ml}$. Sloučenina III-3 se připraví jako 4 mM zásobní roztok v dimethylsulfoxidu a uchovává při ochraně před světlem při teplotě 4 °C. Konečná koncentrace dimethylsulfoxidu v ošetřovaných kontrolních kulturách je 0,125 %.

Paravertebrální sympatická ganglia (SG, embryonální den 12 (E12)), dorzální kořenová ganglia (DRG, E9) a ciliární ganglion (CG, E8) se vyjmou z kuřecích embryí v daný embryonální den, jak popisuje Lindsay a kol. v práci Dev. Biol., 112, 319-328 (1985), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu. Po trypsinizaci a disociaci se suspenze nervových buněk nanáší na misky pro kultury potažené polyornithinem-lamininem v Hamově médiu F14 obohaceném o 10 % koňského séra. Ihned po nanesení na misky se přidávají faktory pro přežití v následujících koncentracích: faktor růstu nervů (NGF) 20 ng/ml, ciliární neurotrofní faktor (CNTF) 10 ng/ml. Misky se udržují při teplotě 37 °C ve zvlhčovaném prostředí s 5 % oxidu uhličitého.

Počítání buněk

Neurony se nanesou na misky 35 mm s mřížkami (Nunc). Zvolené plochy každé z misek představující celkem zhruba 10 % povrchu se snímají ohledně přítomnosti fázově zářících buněk ihned po nanesení a opět po 48 h pro vyhodnocení procenta přežití. Přežívání buněk se potvrdí vitálním barvením tryptanovou modří (výsledky se neuvádějí).

Intaktní DRG

Ganglia se umístí do 96 jamkových misek předem potažených poly-1-ornithinem a lamininem (5 µg každého v 1 ml fyziologického roztoku pufovaného fosfátem). V prostředí N2 bez séra (práce Bottenstein a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 514-517 (1979), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu, s 0,05 % bovinního sérumalbuminu a udržuje při teplotě 37 °C po dobu 48 h ve zvlhčeném prostředí s 5 % oxidu uhličitého. Ganglia se ošetřují 250 nM roztokem

sloučeniny III-3 nebo 20 ng/ml NGF 2 h po umístění na misky.

Sloučenina III-3 podporuje přežívání kuřecích embryonálních periferních neuronů způsobem závislým na koncentraci

Odstranění NGF z disociovaných kultur sensorických neuronů dorsálního kořenového ganglia E9 (DRG) a neuronů sympatického ganglia E12 (SG) způsobuje jejich zánik PCD v průběhu 48 h. Tomu se zabrání přidavkem sloučeniny III-3 do média v době odstranění NGF. Při koncentraci 1 μ M sloučenina III-3 udržuje 94 % neuronů SG a 89 % neuronů DRG živých po 48 h (kontrola ošetřená NGF: SG 65 %, DRG 66 %). Podobně sloučenina III-3 podporuje přežívání 76 % CNTF-dependentních neuronů ciliárního ganglia (CG) po 24 h (kontrola ošetřená CNTF 67 %). Za přítomnosti 10 % séra jsou účinky sloučeniny III-3 na přežívání závislé na koncentraci s plató okolo 1 μ M pro všechny tři neuronové populace (obrázky 16 A až C). Přežívající neurony vykazují rozsáhlé vyrůstání neuritů s tlustšími a zakřivenějšími neurity ve srovnání s kontrolními kulturami (obrázky 17 E až H). Po 4 d je aktivita podporující přežívání dosud zachovaná: DRG - sloučenina III-3 52 %, kontroly ošetřené růstovým faktorem 41 %, SG - sloučenina III-3 83 %, kontroly ošetřené NGF 55 %, CG - sloučenina III-3 58 %, kontroly ošetřené CNTF 50 %). Za optimálních podmínek lze kultury udržovat se sloučeninou III-3 po dobu jednoho týdne nebo déle (není znázorněno).

Sloučenina III-3 podporuje přežívání kuřecích embryonálních motoneuronů způsobem závislým na koncentraci

Kuřecí motoneurony mohou přežívat a pokračovat v procesech za přítomnosti svalového extraktu, zatímco za jeho nepřítomnosti rychle odumírají. V experimentech přežívá po

48 h 65 % motoneuronů za přítomnosti svalového extraktu oproti 14 % neléčených kontrol. Za podmínek bez séra je účinek sloučeniny III-3 na přežívání maximální při koncentraci 300 nM a poněkud vyšší (79 %) ve srovnání s účinkem svalového extraktu. Koncentrační závislost efektu přežívání u sloučeniny III-3 v tomto systému se odlišuje od případu periferních neuronů, jelikož koncentrace sloučeniny III-3 převyšující 300 nM vykazují progresivně snížený účinek (obrázek 16 A). To by mohlo ukazovat na zvláštní citlivost motoneuronů na některé aspekty aktivity sloučeniny III-3. Morfologicky vykazují motoneurony zachráněné sloučeninou III-3 fázově jasná buněčná tělíska a jsou schopny vysílat dlouhé neurity, které jsou mírně silnější než ty, které jsou indukované svalovým extraktem (obrázek 17). Po čtyřech dnech bylo v kultuře 56 % živých neuronů se sloučeninou III ve srovnání se 42 % se svalovým extraktem. Při koncentraci 300 nM přežívaly neurony ošetřené sloučeninou III in vitro alespoň po dobu jednoho týdne (data se neuvádějí).

Sloučenina III-3 podporuje vyrůstání neuritů z neporušeného dorsálního kořenového ganglia.

Výsledky z výše popsaných experimentů prokazují, že sloučenina III-3 nejen podporuje přežívání embryonálních neuronů z periferního a centrálního nervového systému, ale též vede k vyrůstání robustních neuritů. Mnohé z těchto neuritů jsou silnější než ty, které vznikají za přítomnosti růstových faktorů (srovnej obrázek 17 A až D z obrázkem 17 E až H). Tento účinek se podporuje při vyrůstání neuritů z neporušeného embryonálního dorsálního kořenového ganglia při pěstování za přítomnosti 250 nM sloučeniny III-3 (obrázek 18C). Neurity vyrůstaly v rámci odpovědi na NGF (obrázek 18B) i na sloučeninu III-3. Ty, které vznikaly za přítomnos-

ti NGF byly mnohem jemnější a více rozvětvené než neurity vyrůstající za přítomnosti sloučeniny III-3, které byly silné a pravděpodobně fascikulované.

Příklad 36

Zpracování in vivo

Vývojově regulovaný zánik motorických neuronů u kuřecího embrya

Tento příklad podrobně popisuje Glicksman a kol., J. Neurobiol., 35, 361-370 (1998) a tato citace se zde zahrnuje jako celek formou odkazu. Na E6 se vytvoří okénko ve skořápce kuřecích vajec (Spafas, Preston, CT) a přímo na vaskularizovanou chorioallantoidní membránu jednou denně ode dne E6 do dne E9 aplikuje buď vehikulum (5% Solutol™ HS 15, polyethylenglykol 660 hydroxystearát, BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Německo (ve fyziologickém roztoku pufrovaném fosfátem, pH 7,2)) nebo specifikovaná dávka sloučeniny III-3 ve vehikulu, jak popisuje Oppenheim a kol., Science, 251, 1616-1617 (1991) a tato citace se zde zahrnuje formou odkazu jako celek). Embrya se usmrtí v den E10 a jejich míchy se vyjmou, fixují v Carnoyově roztoku (10% ledová kyselina octová, 60% absolutní ethanol, 30% chloroform), zpracují pro zhotovení sériových parafínových řezů a barví thioninem. Každý 20. řez lumbálních segmentů 1 až 8 se podrobí počítání podle dříve popsanych kritérií (Clarke a kol., Methods In Cell Biology: Cell Death, 1995, Schwart & Osborne, red., Academic Press, New York, s. 277-321 a tyto práce se zde zahrnují vcelku formou odkazu).

Vývojově regulovaný zánik motorických neuronů u neonatálních

krys

Březí krysy Sprague-Dawley se obdrželi od Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Krysí mláďata samičího pohlaví dostávají denně subkutánní injekci nad cílové perineální svaly sloučeniny III-3 v 5% Solutolu™ HS 15 nebo vehikula počínaje od dne narození (P1) s pokračováním po dobu 5 d (P5). Ve dnech P10 nebo P60 se mláďata dekapitují, krev se sbírá do heparinizovaných kapilárních trubiček a oblast míchy obsahující pohlavně dimorfní spinální nukleus m. bulbospongiosus (SNB) a perineální oblast obsahující m. bulbospongiosus (BC) a svaly levator ani (LA) se vyjmu po perfuzi zvířat fyziologickým roztokem/formalinem. Oblast míchy obsahující SNB se dodatečně fixuje, zalévá do Paraplastu, řeže na 10 μ m a barví Cresylechtovou violetí [práce Nordeen a kol., Science, 229, 671-673 (1985), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Motorické neurony se počítají při zvětšení 500x v seriových řezech z oblasti lumbální 5 až sakrální 1 míchy, jak se popisuje výše (Nordeen a kol., výše). Mikroskopické vyhodnocení se provádí na kódovaných řezech se zaslepením léčených skupin pro pozorovatele. Počty motorických neuronů se korigují ohledně velikosti buňky a tloušťky řezu (Monografie Konisgsmark, Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, Nauta & Ebbesson, 1970, Springer-Verlag, New York, s. 315 až 340, která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu) a statistická analýza se provádí jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA). Perineální svalovina se fixuje, dekalcifikuje, zalévá do Paraplastu, řeže na tloušťku 10 μ m a barví Milliganovým barvivem Trichrome. S použitím mikroskopie v zářícím světle (X250) se svaly BC a LA u normálních samic a samic ošetřených sloučeninou III-3 (405 zvířat/skupina) pozitivně identifikují jejich lokalizací i přítomností pruhovaných vláken. Obvod svalové

tkáně se sleduje ze střídavých řezů s použitím mikroskopu (62,5) a průřez se měří s použitím digitalizační podložky a morfometrického systému podporovaného počítačem (Sigma-scan, Jandel Scientific). Svalový objem se vypočítá z celkového průřezu, který se násobí tloušťkou řezu a koriguje na procento odebrané struktury.

Sbíraná krev se centrifuguje po dobu 5 min při teplotě místnosti, poté se plasma odstraní a zamrazí při teplotě -20 °C. Hladiny testosteronu v krevním séru (6 až 7 zvířat/skupina) se měří radioimunoesejí podle způsobů popsaných v práci Wingfield a kol., *Steroids*, 26, 311-327 (1975), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu.

Diferenciace motorických neuronů u dospělých krys vyvolaná axotomií

Levý hypoglosální nerv se přetne v oblasti krku dospělých krysích samic Sprague-Dawley (120 až 180 g) pod Neumbutolovým znecitlivěním a aplikuje se 50 μ l sloučeniny III-3 nebo jejího vehikula (5% Solutol™ HS 15) na kousek pěnové hmoty Gelfoam™ (A. J. Buck, Owings Mills, MD), který se ovine okolo proximálního konce přetnutého nervu. Po 7 d se zvířata podrobí anestézi a perfuzi 4% roztokem paraformaldehydu v Sorensenově pufu, 0,07 M fosfát, pH 7,2. Vyjme se mozkový kmen a na kryostatu se řežou koronární řezy o tloušťce 40 μ m [práce Chiu a kol., *NeuroReport*, 5, 693-696 (1994), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Každý pátý řez se zpracuje pro imunohistochemii ChAT, jak se popisuje výše [práce Chiu a kol., *J. Comp. Neurol.*, 328, 351-363 (1993), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu] s použitím zředění 1:350 monoklonální protilátky proti ChAT obdržené od Chemicon. Buňky, které se obarví zřetelně nad

pozadí, se počítají v obarvených řezech. Počet vyhodnocených buněk se vyjádří jako poměr počtu ChAT-imunoreaktivních buněk na straně s přetnutým nervem hypoglosálního nukleu proti počtu imunoreaktivních buněk na kontrolní (nepoškozené) straně.

Sloučenina III-3 zachraňuje motorické neurony kryšího embrya od apoptického zániku *in vitro* a inhibuje signální cestu s výsledkem aktivace JNK1 v těchto buňkách [práce Maroney a kol., *J. Neurosci.*, **18**, 104-111 (1998), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Pro stanovení potenciální aktivity *in vivo* se sloučenina III-3 hodnotí ve dvou modelech vývojově regulovaného programovaného zániku motorických neuronů a v modelu dediferenciace indukované axotomií u dospělých motorických neuronů. U kuřat zhruba 50 % neuronů míchy podléhá zániku PCD v průběhu E5 až 10 [práce Hamburger a kol., *J. Neurosci.*, **1**, 38-55 (1982), Purves a kol., *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*, 1988, Harvard University Press, Cambridge, MA, které se zde obě zahrnují vcelku formou odkazu]. Aplikace sloučeniny III-3 na chorioallantoidní membránu v průběhu tohoto období zabraňuje smrti motorických neuronů způsobem závislým na dávce (obrázek 19). Čtyřicet procent motorických neuronů, které normálně zahynou, se zachraňuje při dvou nejvyšších testovaných dávkách (2,3 a 7 $\mu\text{g/d}$), zatímco při nižších dávkách (1,2 a 1,8 $\mu\text{g/d}$) se zachraňuje 25 % motorických neuronů (obrázek 19).

V průběhu časného perinatálního života kryších samic (pozdní embryonální stádium do postnatálního dne (PC) 4) se více než 50 % motorických neuronů v SNB eliminuje cestou PCD [práce J. Breedlove, *Neurobiol.*, **17**, 157-176 (1986), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. U samců motorické ne-

urony v tomto nukleu inervují pruhované penilní svaly účastnící se kopulačních reflexů. Testikulární sekrece androgeních steroidů snižuje zánik motorických neuronů SNB u samců a brání z větší části atrofii svalů BC a LA inervovaných těmito neurony. Podání testosteronu mláďatům samičího pohlaví vede k plně maskulinnímu počtu motorických neuronů SNB (Nordeen a kol., výše) a brání svalové atrofii BC a LA [práce Waiman a kol., *Endocrinology*, **29**, 955-978 (1941), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Denní podkožní podávání sloučeniny III-3 (PN 1 až 5) krysím samicím významně zeslabuje zánik motorických neuronů (obrázek 20A). Zachránění motorických neuronů SNB před zánikem sloučeninou III-3 nastává při dvou dávkách (0,5 a 1 mg/kg denně). Při maximálně účinných dávkách 0,5 a 1 mg/kg denně vede podávání sloučeniny III-3 k 70% zvýšení přežívání motorických neuronů, což se rovná účinku testosteronu (obrázek 20A). Sloučenina III-3 nepozměňuje hladiny testosteronu léčených samic. Radioimunitní měření hladin testosteronu v krevní plazmě ve skupině 1 mg/kg denně nevede k žádnému významnému rozdílu ve srovnání s kontrolní skupinou vehikula ($0,016 \pm 0,008$ ng/ml a $0,029 \pm 0,015$ ng/ml směrodatné odchyly střední hodnoty).

Pro stanovení, zda je léčení sloučeninou III-3 účinné při dlouhodobém udržování přežívání motorických neuronů, se samice ošetřily sloučeninou III-3 (0,5 a 1 mg/kg denně) po stejné období PN (1 až 5). Polovina zvířat ve skupinách vehikula a léčby se utratí v den PN10. Zbývajících zvířata se poté udržují bez dalšího léčení sloučeninou III-3 do utracení v den PN60. Jak se popisuje výše (obrázek 20A) ošetření sloučeninou III-3 vede k 70% zvýšení přežívání motorických neuronů (obrázek 20 B). Dále 100 % z těchto zachráněných motorických neuronů lze identifikovat morfologicky 55 d po posledním ošetření sloučeninou III-3 (obrázek 20B). Inhibice

zániku motorických neuronů sloučeninou III-3 v průběhu neonatálního období umožňuje přežívání motorických neuronů v dospělosti.

Přes zřejmý důkaz a přes devastační účinky ztráty motorických neuronů v lidských chorobách u dospělých, jako je amyotrofní laterální sklerosa, jsou dospělé motorické neuro-ny u většiny zvířecích modelů rezistentní vůči zániku. Avšak axonové poškození vede k morfologickým (Oppenheim a kol., výše) i biochemickým změnám [práce Oppenheim a kol., výše, Rende a kol., J. Comp. Neurol., 319, 285-298, která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu, Chiu a kol., J. Comp. Neurol., 328, 351-363, (1993), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu] v dospělých motorických neuronech, které mohou napodobovat degenerativní změnu před zánikem v nemocných a degenerujících motorických neuronech. Jeden příklad tohoto typu změny je axotomie hypoglosálního nervu inervujícího jazyk. Unilaterální přetnutí tohoto nervu u dospělé krysy vede ke ztrátě 95 % Chat-imunoreaktivních hypoglosálních motorických neuronů v ipsilaterálním jádru po 7 d [práce Chiu a kol., NeuroReport, 5, 693-696 (1994), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Ztráta imunoreaktivity ChAT není trvalá. Čtyři týdny po axotomii se 100 % motorických nervů zotaví na kontrolní hladiny imunoreaktivity ChAT [práce Burke a kol., J. Neurocytol., 22, 141-153 (1993), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu]. Imunoreaktivita ChAT v kontralaterálních hypoglosálních motorických neuronech zůstává bez ovlivnění (Chiu a kol., výše) (obrázek 21 a tabulka 5).

Při aplikaci Gelfoam™ na proximální konec hypoglosálního nervu zeslabuje sloučenina III-3 dávkově dependentním způsobem pokles imunoreaktivity ChAT v ipsilaterálních

hypoglosálních motorických neuronech podle hodnocení 7 d po axotomii. Maximálně účinná dávka (50 μ g) vede ke zvýšení ChAT imunoreaktivních motorických neuronů o 40 % ve srovnání s neléčenou kontrolou po axotomii (obrázek 21B a tabulka 5). Ukazuje se závislost ve tvaru zvonu při nižších i vyšších dávkách s přežíváním vyšším než u neléčených kontrol, avšak nižším než se dosahuje při dávce 50 μ g. Jak je tomu u modelu SNB, nedochází k žádné související ztrátě hmotnosti, k mortalitě nebo k makroskopickému poškození tkání u těchto zvířat při žádné z testovaných dávek.

Ve třech samostatných modelech neuronové degenerace in vivo vykazovala sloučenina III-3 neuroprotektivní aktivitu: vývojově regulovanou PCD motorických neuronů lumbální páteře u embryí (obrázek 19), androgen-senzitivní zánik postnatálních motorických neuronů SNB (obrázek 20) a axotomií indukovanou ztrátu funkčního markeru, ChAT, v dospělých hypoglosálních motorických neuronech (obrázek 21 a tabulka 5). Sloučenina III-3 byla účinná při periferním podávání subkutánní injekcí k řezu nervu nebo přímo na chorioallantoidní membránu kuřecího embrya. Oproti mateřské molekule K-252a je sloučenina III-3 zhruba pětikrát účinnější při zprostředkování přežívání v kulturách obohacených motorickými neurony (data se neuvádějí) a nevykazuje inhibiční aktivitu proti trkA tyrosin kinase a několika serin threonin kinasám [práce Maroney a kol., výše, Kaneko a kol., J. Med. Chem., 40, 1863-1869 (1997), které se zde zahrnují vcelku formou odkazu].

Tabulka 5

Účinek sloučeniny III-3 na cholin acetyltransferasovou imunoreaktivitu v axotomizovaných hypoglosálních motorických

neuronech

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

Sloučenina III-3 nebo vehikulum se přidává do gelové pěny k proximálnímu konci hypoglosálního nervu ihned po přetrnutí. Po době 7 d se zvířata utratí a zhotovují se sériové řezy hypoglosálního nukleu a každý pátý řez se podrobí imunitnímu značení protilátkami anti-ChAT. Počítání ChAT-pozitivních neuronů se uskutečňuje na ipsilaterálních (experimentálních) a kontralaterálních (kontrolních) stranách nukleu.

* $p < 0,05$ statisticky významný rozdíl proti kontrolním zvířa-

tům ošetřeným vehikulem.

Inhibitor cesty MLK-3 prokazuje účinnost in vivo a blokuje případy fosforylace sestupně od MLK-3 v modelu MPTP

MPTP se podává v dávce 40 mg/kg, která způsobuje ztrátu striatálních dopaminergních terminálů a buněčných tělísek v substantia nigra. Tyrosin hydroxylasa se používá jako marker pro dopaminergní nervové terminály v substantia nigra. Systémově podávaná sloučenina III-3 zeslabuje ztrátu tyrosin hydroxylasa imunoreaktivních neuronů substantia nigra po poškození MPTP (obrázek 22A, Saporito a kol., 1999). Jelikož sloučenina III-3 je známá jako inhibitor MLK-3, měří se aktivace sestupného substrátu od MLK-3 u myší ošetřených MPTP. Hladiny fosforylované MKK4 se měří s použitím fosfo-MKK4 specifické protilátky (New England Biolabs, Beverly, MA), která rozpoznává monofosforylovanou formu MKK4, buď imunoblotováním (obrázek 22B) nebo způsobem ELISA (obrázek 22C). Podávání MPTP zvyšuje hladiny fosforylované MKK4 v substantia nigra až 5x oproti kontrolním hladinám (obrázek 22B). Vrcholová zvýšení nastávají 4 h po podání MPTP a koincidují s vrcholy hladin MPP⁺ CNS. Fosforylace MKK4 zprostředkovaná MPTP se zeslabuje předchozím zpracováním 1-deprenylem, což ukazuje, že jsou tyto fosforylační děje zprostředkované MPP⁺ (obrázek 22C). Navíc se fosforylace MKK4 částečně inhibuje předběžným zpracováním sloučeninou III-3 v dávce 1 mg/kg, která poskytuje ochranu proti MPTP-indukovaným nigrostriatálním dopaminergním ztrátám (obrázek 22C). Tyto údaje prokazují, že MPTP (MPP⁺) aktivuje MKK4, sestupný substrát MLK-3. Navíc tyto data prokazují, že známý inhibitor MLK-3 inhibuje aktivaci této kinasové cesty in vivo.

Zánět

Indukce IL-1 a TNF- α LPS v THP-1 buňkách a účinek indolokarbazolů a pyrrolokarbazolů na jejich indukci

Volí se buňky imunitního systému, jelikož se mnohé kinasy účastní regulace četných imunologických funkcí, například indukce syntézy cytokinů a indukce biologické odpovědi cytokinů. Nedávná zpráva [Hambleton a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2774-2778 (1996), která se zde zahrnuje vcelku formou odkazu] ukazuje, že zpracování buněčných linií odvozených od monocytů LPS způsobuje rychlou aktivaci aktivity JNK. Když přicházejí monocyty do styku s bakteriálními endotoxiny, jako je lipopolysacharid (LPS), tvoří zánětlivé cytokiny, IL-1 a TNF- α . Inhibice tvorby těchto dvou cytokinů může být použitelná při léčení určitých zánětlivých poruch imunitního systému. Tyto cytokiny lze snadno měřit komerčními soupravami ELISA. Experimenty jsou naplánované pro stanovení (1) zda indolokarbazoly a kondenzované pyrrolokarbazoly mohou inhibovat syntézu IL-1 a TNF- α v buněčné linii monocytů THP-1, (2) zda se JNK aktivuje LPS v buňkách THP-1 a (3) zda lze aktivaci JNK pomocí LPS inhibovat indolokarbazoly a kondenzovanými pyrrolokarbazoly.

Způsoby provedení experimentu

Buňky THP-1 se pěstují v médiu RPMI 1640 doplněném 10 % fetálního bovinního séra. LPS (E. coli serotyp 0111.B4, extrahovaný TCA) od firmy Sigma se rozpustí ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem. Soupravy ELISA pro stanovení IL-1 a TNF- α jsou od Boehringer-Mannheim a eseje na médiu THP-1 se provádějí podle návodu výrobce. S každou

esejí se obdrží standardní křivky podle návodu.

Experimenty se provádějí ve 12-jamkových miskách buď s 1 nebo se 2 ml THP-1 buněk při koncentraci 4×10^5 buněk/ml. IL-1 a TNF- α se indukují přidavkem LPS k médiu a médium se odebírá v různých časech pro esej cytokinů. Buňky se odstraní centrifugací a supernatanty se zamrazí při teplotě -70°C do provedení analýzy. Pro minimalizaci nákladů se experimenty provádějí v duplikátních kulturách a duplikátní supernatanty se po centrifugaci spojují. Každý spojený supernatant se analyzuje ve dvojicích. Zásobní roztoky indolokarbazolů a kondenzovaných pyrrolokarbazolů ve 100% dimethylsulfoxidu se zředí na žádané koncentrace v médiu s 10 % fetálního bovinního séra nebo v médiu obsahujícím 0,5 mg/ml bovinního sérumalbuminu. Pokud se nepopisuje jinak, přidávají se sloučeniny k buňkám THP-1 1 h před přidavkem LPS.

Eseje aktivity JNK se provádějí po imunoprecipitaci proteinu JNK z extraktu THP-1 buněk po cytolýze. Peletované buňky THP-1 se podrobí cytolýze na ledu po dobu 15 min v 500 μl pufru Frac (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM chloridu sodného, 30 μM pyrofosfátu sodného, 1 mg/ml bovinního serumalbuminu, 1 % Tritonu-X-100). Extrakt se centrifuguje po dobu 10 min při 14K a k supernatantu se přidá 5 μl protilátky JNK (Santa Cruz). Extrakt se otáčí po dobu 60 min při teplotě 4°C , přidá se 75 μl promyté protein A Sepharosy (20 % hmotnost/objem v Frac) a extrakt se otáčí po dalších 30 min pro navázání protilátkového komplexu na protein A Sepharosu. Protein A Sepharosa se promyje dvakrát pufrem Frac, jednou 20 mM Hepes, pH 7,6, 20 mM chloridu hořečnatého, 2 mM DTT, poté se inkubuje po dobu 15 min při teplotě 30°C v 30 μl kinasového pufru (20 mM hepes, 20 mM chloridu hořečnatého,

2 MM DTT, 1 μg rekombinantní c-jun a 2 μM ATP-gama- ^{32}P , 2 μCi . Reakce se ukončí přidavkem 10 μl pufru pro 4 x SDS gel, směs se zahřívá po dobu 3 min při teplotě 80 $^{\circ}\text{C}$ a proteiny se analyzují na 10% SDS gelu. Gel se vysuší, exponuje s deskou Phosforimager a radioaktivní pásy se analyzují na zařízení Phosphorimager.

Výsledky prvních experimentů ukazují, že LPS při koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ poskytuje maximální výtěžek IL-1 a tato koncentrace LPS se používá v dalších experimentech. Minimální čas po přidání LPS pro dosažení maximálního výtěžku cytokinů se stanoví z alikvótů média pro eseje v různých časech po přidání LPS. První experiment ukazuje, že IL-1 i TNF- α dosahují maximálního výtěžku v čase kratším než 5 h po přidání LPS. Jelikož nejčasnější doba odběru byla v prvním experimentu 2,4 h, prováděl se druhý experiment s odebráním média od 15 min po přidání LPS. Výsledky tohoto experimentu, kde byl stanovován pouze TNF- α , ukazují dosažení maxima v čase 3 h po přidání LPS. Do 90 min po přidání LPS nebylo v médiu žádné významné množství TNF- α .

Rychlé dosažení maximálního výtěžku ukazuje na velice těsnou regulaci tvorby 2 cytokinů - rychlá syntéza a rychlá sestupná regulace. Kultury buněk se zpracovávají po dobu 30 min před přidavkem LPS buď aktinomycinem D, inhibitorem syntézy ribonukleové kyseliny, nebo cykloheximidem, inhibitorem syntézy proteinu. Médium se odebírá 3 h po přidání LPS a stanovuje se TNF- α . Nová ribonukleová kyselina i nový protein se požadují pro indukci TNF- α , jelikož v buňkách zpracovaných inhibitorem není žádný TNF- α . Další experimenty se provádějí pro zjištění, zda by sloučenina III-3 inhibovala indukci IL-1 a TNF- α . Sloučenina III-3 inhibuje indukci obou, IL-1 i TNF- α , s hodnotami IC₅₀ 267 nM respektive 139

nM. Výsledky těchto experimentů se obdrží s buňkami v médiu s 10 % fetálního bovinního séra. Jelikož esej s tkání míchy a tkání bazálního předního mozku pro stanovení neurotrofní aktivity sloučenin se provádějí v médiu bez séra (500 $\mu\text{g/ml}$ bovinního serumalbuminu), je zajímavé stanovit hodnoty IC_{50} pro inhibici IL-1 a $\text{TNF-}\alpha$ v médiu bez séra. Když se buňky THP-1 zpracují sloučeninou III-3 v médiu bez séra (500 $\mu\text{g/ml}$ BSA) IC_{50} se sníží 10x z 269 nM na 23 nM. Pokud se neuvádí jinak, provádějí se všechny další experimenty v médiu bez séra. Inhibice IL-1 a $\text{TNF-}\alpha$ v THP-1 buňkách sloučeninou III-3 ukazuje, že by sloučenina III-3 mohla být použitelná jako terapeutický prostředek při léčení patologických stavů způsobených tvorbou těchto normálních množství cytokinů. Takovým stavem je septický šok. Septický šok je způsobený růstem gramnegativních bakterií v oběhu, které uvolňují velká množství endotoxinu LPS. LPS poté stimuluje primárně monocyty a makrofágy ke tvorbě velkých množství IL-1 a $\text{TNF-}\alpha$, která potom způsobují masivní poškození tkáně a v mnoha případech smrt.

Několik sloučenin se testuje ohledně jejich schopnosti inhibovat $\text{TNF-}\alpha$ ve srovnání se schopností inhibovat JNK. Výsledky ukazuje tabulka 6.

Tabulka 6

Sloučenina	Buňky THP-1		Nadměrně exprimovaná MLK3 v buňkách Cos 7
	$\text{TNF-}\alpha$ IC_{50} nM	JNK % inh. 500 nM	JNK % inh. 500 nM
III-1	49,5	93,5	83,8
III-3	29	93	94
I-2	>5000	78,5	85

I-3	366	80,5	93,7
I-4	75,5	79,5	95
I-5	514	89	97,2
I-6	817,5	77,5	57,8
I-7	1009	74	85,5
III-4	462,5	81	66
III-5	4	84,5	96
III-7	590,5	11,5	54
III-8	11,5	51	94
III-10	4298	48	59
I-10	4500	62	94
I-11	686	51	92,5

Účinek sloučeniny III-3 na indukci IL-2 v Jurkatových buňkách

Experimenty se provádějí pro zjištění, zda sloučenina III-3 inhibuje indukci IL-2 v Jurkatových buňkách.

Způsoby experimentálního provedení

Jurkatovy buňky se pěstují v médiu RPMI 1640 doplněném 10 % fetálního bovinního séra. TNF- α je od firmy Promega a protilátky proti CD3 a proti CD28 jsou od Pharmigen. Jurkatovy experimenty se provádějí ve 200 μ l na 96-jamkové desce. IL-2 se měří soupravou ELISA od Boehringer Mannheim. Protilátky proti CD3 a CD28 se ponechají navázat na plastovou 96-jamkovou desku (18 h v PBS) před přidáním Jurkatových buněk. Buňky se zpracují sloučeninami 1 h před přidáním k protilátkou potažené desce. Protilátky proti CD3 a CD28 se používají pro aktivaci T buněčného receptoru a indukci IL-2. IL-2 se uvolňuje z Jurkatových buněk mezi 6 h a 24

07.05.03

- 126 -

h po zahájení indukce (obrázek 23A). Žádný IL-2 nevzniká konstitučně (obrázek 23A CNT). Účinek sloučeniny III-3 (zpracování 1 h se sloučeninou III-3 před indukcí) na indukcii IL-2 se dále hodnotí (obrázek 23B). Koncentrace sloučeniny III-3 500 nM inhibuje indukci IL-2 o více než 80 % (obrázek 23B). Rozsáhlejší experiment zaměřený na vztah mezi dávkou a odpovědí se provádí se sloučeninou III-3 a se sloučeninou I-4 s obdržením hodnot IC_{50} 139 nM pro sloučeninu III-3 a 207 nM pro sloučeninu I-4 (obrázek 23C).

Uvažuje se, že veškeré patenty, přihlášky a vytištěné publikace citované v tomto patentu se zde zahrnují v plném znění formou odkazu.

Jak je zřejmé tomu, kdo má zkušenost v oboru, lze uskutečnit četné změny a modifikace preferovaných ztělesnění tohoto vynálezu bez odchylky od ducha tohoto vynálezu. Všechny tyto odchylky spadají do rámce tohoto vynálezu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob identifikace sloučeniny použitelné při léčení periferní neuropathie při AIDS, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se buňka nebo buněčný extrakt obsahující kinasový protein s vícenásobnou vazbou uvede do styku se sloučeninou a stanoví se, zda tato sloučenina snižuje aktivitu tohoto kinasového proteinu s vícenásobnou vazbou.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tento kinasový protein zvolí ze skupiny zahrnující kinasu 1 s vícenásobnou vazbou, kinasu 2 s vícenásobnou vazbou, kinasu 3 s vícenásobnou vazbou, kinasu nesoucí leucinový zipper, kinasu nesoucí dvojité leucinový zipper a kinasu 6 s vícenásobnou vazbou.

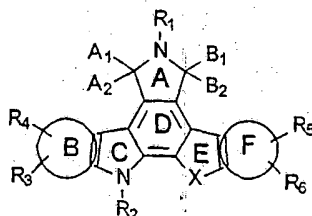
3. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato proteinová aktivita stanoví měřením aktivity nebo stavu fosforylace substrátu tohoto proteinu a tento substrát se zvolí z případů JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 a savčí homolog AEX-3.

4. Způsob podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato aktivita stanoví měřením aktivity substrátu tohoto proteinu, množství substrátu tohoto proteinu nebo mRNA kódující tento substrát tohoto proteinu.

5. Způsob léčení člověka majícího periferní neuropatii při AIDS, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tomuto člověku podává sloučenina inhibující kinasový protein s vícenásobnou vazbou ve farmaceuticky přijatelné soli či

zředovacím prostředku.

6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že tato sloučenina má obecný vzorec



ve kterém

B a F jsou nezávisle na sobě, každý spolu s atomy uhlíku,
ke kterým se připojuje tvoří buď

nenasycený 6-členný karbocyklický aromatický
kruh, ve kterém lze jeden až tři atomy uhlíku
nahradit atomem (atomy) dusíku nebo

nenasycený 5-členný karbocyklický aromatický
kruh, ve kterém je buď jeden atom uhlíku na-
hrazen atomem kyslíku, dusíku nebo síry nebo

jsou dva atomy uhlíku nahrazeny atomem síry
a atomem dusíku nebo atomem kyslíku a atomem
dusíku,

A¹ a A² společně představují O a B¹ a B² společně představu-
jí O,

R^1 je atom vodíku, alkylová skupina o 1 až 4 atomech (včetně) arylová skupina, arylalkylová skupina, heteroarylová skupina a heteroarylalkylová skupina, skupina COR^9 , kde R^9 je alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně) nebo arylová skupina, přednostně fenylová skupina či naftylová skupina, $-OR^{10}$, kde R^{10} je atom vodíku nebo alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), skupina $-CONH_2$, $-NR^7R^8$, $-(CH_2)_nNR^7R^8$, kde n je celé číslo 1 až 4 (včetně) nebo $-O(CH_2)_nNR^7R^8$ a buď

R^7 a R^8 jsou nezávisle na sobě atom vodíku nebo alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně) nebo

R^7 a R^8 se spojují společně s vytvořením spojovací skupiny obecného vzorce $-(CH_2)_2-X^1-$ $-(CH_2)_2-$, kde X^1 je atom kyslíku, atom síry nebo skupina CH_2 ,

R^2 je atom vodíku, skupina $-SO_2R^9$, $-CO_2R^9$, $-COR^9$, alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) přednostně alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), přednostně alkenylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně) nebo alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), přednostně alkynylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně) nebo skupina monosacharidu o 5 až 7 atomech uhlíku (včetně), kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je nezávisle buď substituovaná nebo nahrazená atomem vodíku, alkylovou skupinou o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), al-

kylkarbonyloxyskupinou o 2 až 5 atomech uhlíku (včetně) nebo alkoxy skupinou o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně) a buď

každá alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) nebo alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) je nesubstituovaná nebo

každá alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) nebo alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) je nezávisle substituovaná 1 až 3 arylovými skupinami o 6 až 10 atomech uhlíku (včetně), přednostně fenylovou skupinou či naftylovou skupinou, heteroarylovou skupinou, atomem fluoru, atomem chloru, atomem bromu, atomem jodu, kyanoskupinou, nitroskupinou, hydroxylovou skupinou, skupinou $-OR^9$, $-O(CH_2)_nNR^7R^8$, $-OCOR^9$, $-OCONHR^9$, O-tetrahydropyranylovou skupinou, aminoskupinou, skupinou $-NR^7R^8$, $-NR^{10}COR^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}CONR^7R^8$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-NR^{10}SO_2R^9$, $-S(O)_yR^{11}$, kde R^{11} je atom vodíku nebo alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, arylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, přednostně fenylová skupina či naftylová skupina nebo heteroarylová skupina a y je 1 nebo 2, skupinou $-SR^{11}$, $-CO_2R^9$, $-CONR^7R^8$, $-CHO$, COR^9 , $-CH_2OR^7$, $-CH=NNR^{11}R^{12}$, $-CR=NOR^{11}$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-SO_2NR^{12}R^{13}$, $-PO(OR^{11})_2$ nebo OR^{14} , kde R^{14} je zbytek ami-

nokyseliny po odstranění hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny a buď

R^{12} a R^{13} jsou nezávisle atom vodíku, alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), arylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, přednostně fenylová či naftylová skupina nebo heteroarylová skupina nebo

R^{12} a R^{13} se spolu spojují s vytvořením spojovací skupiny, přednostně $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2$,

každý R^3 , R^4 , R^5 a R^6 je nezávisle atom vodíku, arylová skupina přednostně arylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku (včetně), přednostněji fenylová skupina či naftylová skupina, heteroarylová skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, trifluormethylová skupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina $-OR^9$, $-O(CH_2)_nNR^7R^8$, $-OCOR^9$, $-OCONHR^9$, NH_2 , $-CH_2OH$, $-CH_2OR^{14}$, $-NR^7R^8$, $-NR^{10}COR^9$, $-NR^{10}CONR^7R^8$, $-SR^{11}$, $-S(O)_yR^{11}$, kde y je 1 nebo 2, $-CO_2R^9$, $-COR^9$, $-CONR^7R^8$, $-CHO$, $-CH=NOR^{11}$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_nSR^9$, kde n je celé číslo 1 až 4 (včetně), skupina $-(CH_2)_nS(O)_yR^9$, $-CH_2SR^{15}$, kde R^{15} je alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), skupina $-CH_2S(O)_yR^{14}$, $-(CH_2)_nNR^7R^8$, $-(CH_2)_nNHR^{14}$, alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), přednostně alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), přednostně alkenylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), přednostně alkynylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku včetně

a buď

každá alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně), alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) nebo alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) je nesubstituovaná nebo

každá alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku včetně, alkenylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku včetně nebo alkynylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku (včetně) je substituovaná, jak se popisuje v d)2) výše,

X je buď

nesubstituovaná alkylenová skupina o 1 až 3 atomech uhlíku (včetně) nebo

X je alkylenová skupina o 1 až 3 atomech uhlíku (včetně) substituovaná jednou skupinou R^2 , přednostně skupinou OR^{10} , $-SR^{10}$, R^{15} , kde R^{15} je alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku (včetně), fenylová skupina, naftylová skupina, arylalkylová skupina o 7 až 14 atomech uhlíku (včetně), přednostně benzylová skupina nebo

X je skupina $-CH=CH-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-(CR^{10})_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})-$, $-C(OR^{11})(R^{11})-$, $-C(=O)CHR^{15}-$, $-(CHR^{15})C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})CHR^{15}-$, $-CHR^{15}-$, $C(=NOR^{11})-$, $-CH_2Z-$, $-Z-CH_2-$, $-CH_2ZCH_2-$, ke

Z je $C(OR^{11})(R^{11})$, O, S, $C(=O)$, $C(=NOR^{11})$ nebo NR^{11}

nebo

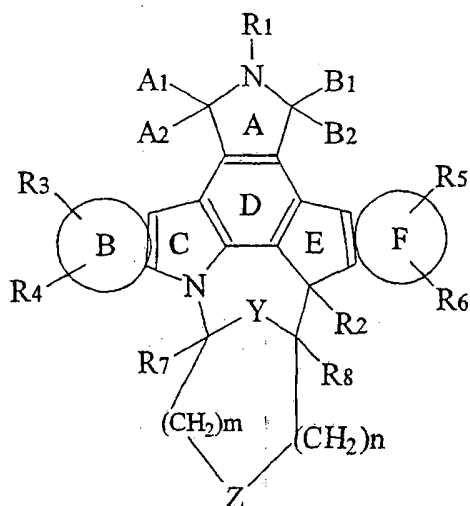
A^1 a A^2 jsou nezávisle atom vodíku a atom vodíku, atom vodíku a skupina $-OR^{11}$, atom vodíku a skupina $-SR^{11}$, atom vodíku a skupina $-(NR^{11})_2$ nebo společně představují $=S$ nebo $=NR^{11}$, B^1 a B^2 spolu představují O a každý ze substituentů R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 a X jsou podle definice popsané výše

nebo

A^1 a A^2 společně představují O a B^1 a B^2 jsou nezávisle na sobě atom vodíku a atom vodíku, atom vodíku a $-OR^{11}$, atom vodíku a $-SR^{11}$, atom vodíku a $-(NR^{11})_2$ nebo společně představují $=S$ nebo $=NR^{11}$ a každý ze substituentů R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 a X mají stejný význam jako výše.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 a R_6 jsou atomy vodíku, B_1 a B_2 spolu tvoří O, R_2 je CH_2CH_2OH a X je CH_2 .

8. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato sloučenina má obecný vzorec



ve kterém

kruhy B a F nezávisle na sobě a každý spolu s atomy uhlíku, ke kterému se připojuje, se volí z následujících případů:

a) nenasycený šestičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém lze 1 až 3 atomy uhlíku nahradit atomy dusíku,

b) nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh a

c) nenasycený pětičlenný karbocyklický aromatický kruh, ve kterém

1) jeden atom uhlíku je nahrazen atomem kyslíku, dusíku nebo síry,

2) dva atomy uhlíku jsou nahrazeny atomem síry a dusíku, kyslíku a dusíku nebo 2 atomy dusíku nebo

3) tři atomy uhlíku jsou nahrazeny třemi atomy dusíku,

R^1 se volí z případů:

a) atom vodíku, substituovaná či nesubstituovaná alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná arylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina, substituovaná či nesubstituovaná heteroarylová skupina nebo substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

b) $-C(=O)R^9$, kde R^9 se volí z případů alkylová skupina, arylová skupina a heteroarylová skupina,

c) $-OR^{10}$, kde R^{10} se volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku,

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

1) R^{11} a R^{12} se nezávisle volí z případů atom vodíku a alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku nebo

2) R^{11} a R^{12} spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, kde X^1 se volí z případů $-O-$, $-S-$ a $-CH_2-$,

R^2 se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina o 1

až 4 atomech uhlíku, hydroxylová skupina, alkoxy skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, skupina $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, substituovaná či nesubstituovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku a substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina,

R^3 , R^4 , R^5 a R^6 se navzájem nezávisle volí z případů

a) atom vodíku, aryllová skupina, heteroaryllová skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, trifluormethylová skupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina OR^9 , $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^7$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{10}$, $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NR}^{10}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$,

b) $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$, kde R^{14} je zbytek aminokyseliny po odstranění hydroxylové skupiny z karboxylové skupiny,

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

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

e) alkylová skupina o 1 až 8 atomech uhlíku, alkenylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku a alkynylová skupina o 2 až 8 atomech uhlíku,

1) kde každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je nesubstituovaná nebo

2) každá alkylová, alkenylová nebo alkynylová skupina je substituovaná 1 až 3 skupinami zvolenými z případů arylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, heteroarylová skupina, arylalkoxyskupina, heterocykloalkoxyskupina, hydroxyalkoxyskupina, alkyloxy-alkoxyskupina, hydroxyalkylthioskupina, alkoxy-alkylthio-skupina, atom fluoru, atom chloru, atom bromu, atom jodu, kyanoskupina, nitroskupina, hydroxylová skupina, skupina $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_P-$, $NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_P C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_P OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_P CO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_P S(O)_Y R^9$, $-X^2(CH_2)_P NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OCONHR^2$, -O-tetrahydropyranylová skupina, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}C(=O)R^9$, $NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_Y R^9$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2OR^{10}$, $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ a skupina monosacharidu o 5 až 7 atomech uhlíku, kde každá hydroxylová skupina monosacharidu je nezávisle buď substituovaná nebo nahrazená atomem vodíku, alkylovou skupinou o 1 až 4 atomech uhlíku, alkylkarbonyloxyskupinou o 2 až 5 atomech uhlíku nebo alkoxyskupinou o 1 až 4 atomech uhlíku,

X^2 je atom kyslíku, atom síry nebo skupina NR^{10} ,

R^7 a R^8 se oba nezávisle volí z případů atom vodíku, alkylová skupina o 1 až 4 atomech uhlíku, alkoxyskupina o 1 až 4 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstitu-

ovaná arylalkylová skupina o 6 až 10 atomech uhlíku, substituovaná či nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina, skupina $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ a $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$ nebo R^7 a R^8 spolu tvoří spojovací skupinu obecného vzorce $-CH_2-X^3-CH_2-$, kde X^3 je X^2 nebo vazba,

m a n jsou nezávisle na sobě 0, 1 nebo 2,

Y se volí z případů $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ a $-CH_2-$,

Z se volí z případů vazba, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ a $-CH(O(C(=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, kde R^{9A} je stejný substituent jako R^9 ,

R^{15} a R^{16} se nezávisle na sobě volí z případů atom vodíku, hydroxylová skupina, skupina $-C(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, hydroxyalkylová skupina a $-CO_2R^{10}$,

R^{17} se volí z případů atom vodíku, alkylová skupina, aryllová skupina a heteroaryllová skupina,

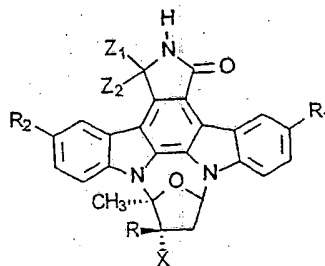
A^1 a A^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku, atom vodíku a skupina OR^2 , atom vodíku a skupina $-SR^2$, atom vodíku a skupina $-N(R^2)_2$ a skupina, ve které A^1 a A^2 spolu tvoří zbytek zvolený z případů $=O$, $=S$ a $=NR^2$,

B^1 a B^2 se volí z případů atom vodíku a atom vodíku, atom

vodíku a skupina OR^2 , atom vodíku a skupina $-SR^2$, atom vodíku a skupina $-N(R^2)_2$ a skupina, ve které B^1 a B^2 spolu tvoří zbytek zvolený z případů $=O$, $=S$ a $=NR^2$,

s podmínkou, že alespoň jeden z párů A^1 a A^2 nebo B^1 a B^2 tvoří $=O$.

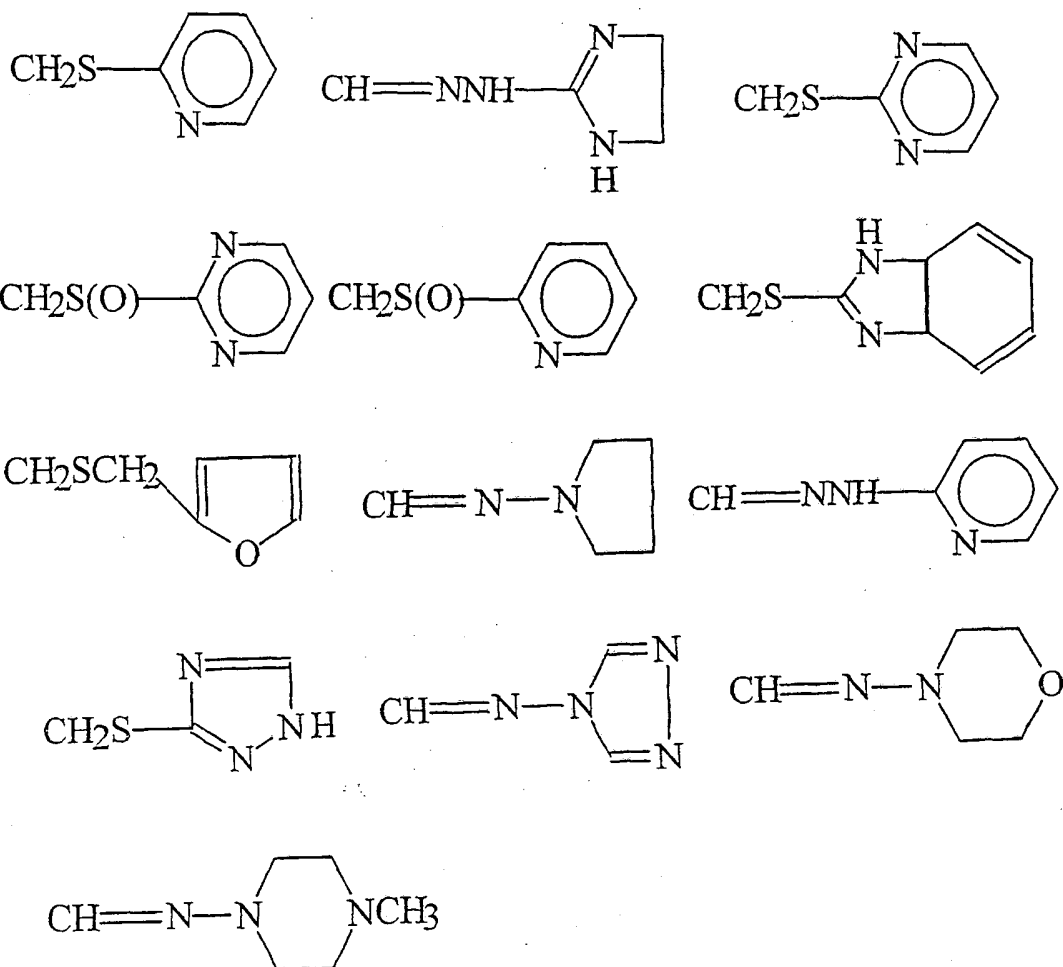
9. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e tím, že tato sloučenina má obecný vzorec



ve kterém

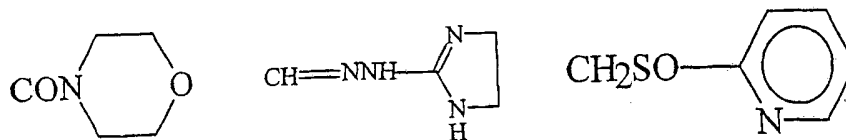
Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří $=O$,

R_1 se volí z případů atom vodíku, atom chloru, skupina $CH_2SO_2C_2H_5$, atom bromu, skupina $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2n-C_4H_9$, $NHCONHC_6H_5$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_6H_5$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, OH , O - n -propylová skupina, $CH=NNH-C-(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-triazin)]$, $CH_2CH_2SCH_3$



R_2 se volí z případů atom vodíku, atom bromu, atom chloru, atom jodu, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazin})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ a CH_2OH ,

X se volí z případů atom vodíku, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerinH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycin}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serin}$, CH_2SOCH_3 , $\text{CH}=\text{NOH}$, $\text{CH}_2\text{NH-Prolin}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{CH}=\text{NNHCONH}_2$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2n\text{-hexyl}$, CONHCH_3 a $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ nebo skupina podle jednoho z následujících vzorců



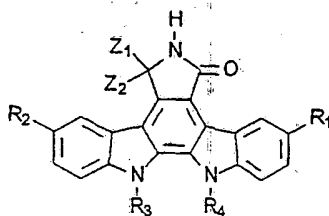
a

R se volí z případů hydroxylové skupiny a methoxyskupiny.

10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 a R je hydroxylová skupina.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Z_1 a Z_2 jsou atomy vodíku, X je skupina CO_2CH_3 , R_1 a R_2 jsou skupiny $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$ a R je hydroxylová skupina.

12. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tato sloučenina má obecný vzorec



ve kterém

07.05.03

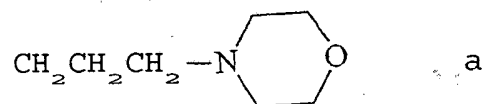
- 142 -

Z_1 je atom vodíku a Z_2 je atom vodíku nebo Z_1 a Z_2 spolu tvoří =O,

R_1 je atom vodíku nebo atom bromu,

R_2 je atom vodíku,

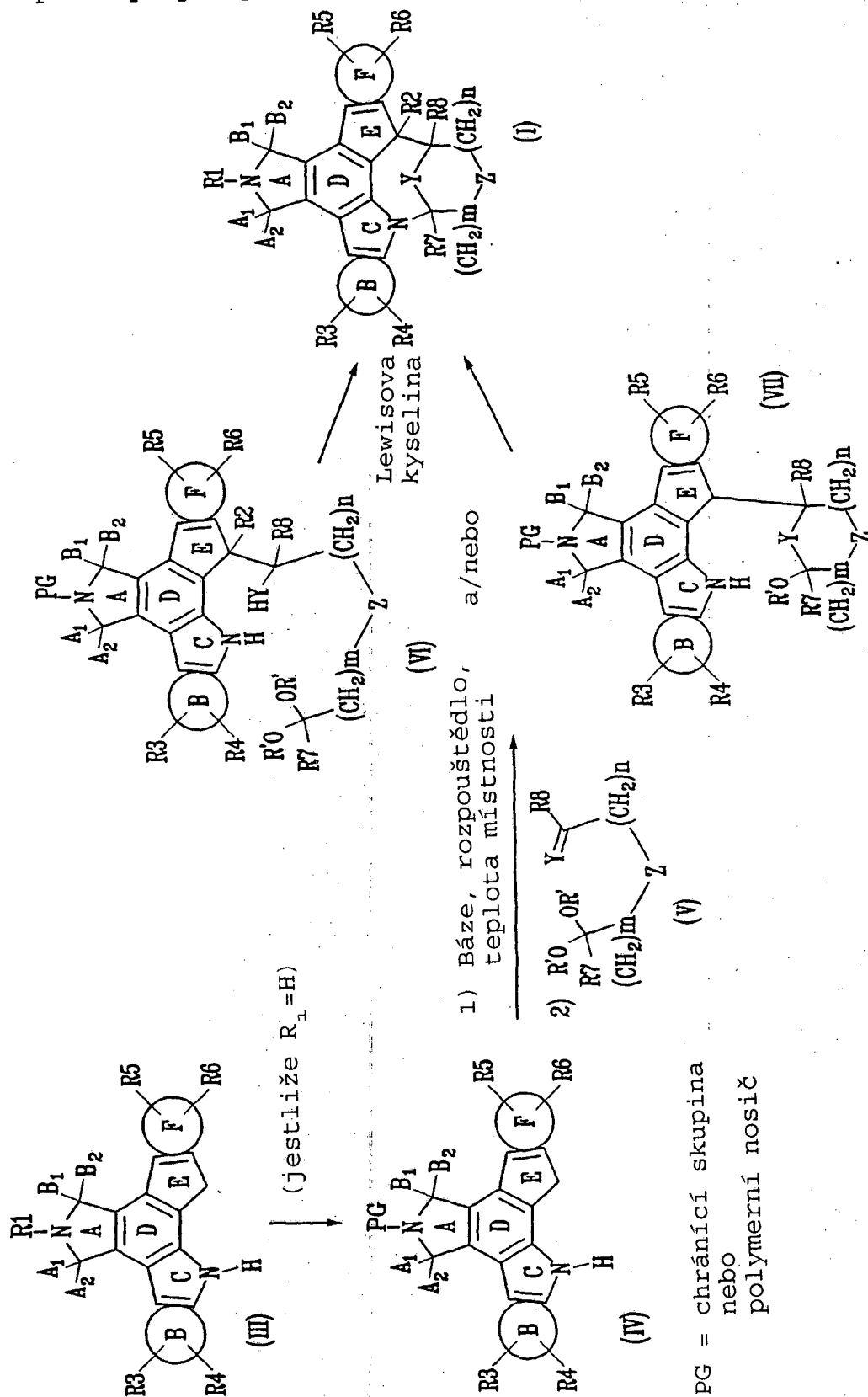
R_3 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, nebo



R_4 je atom vodíku, skupina $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ nebo $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

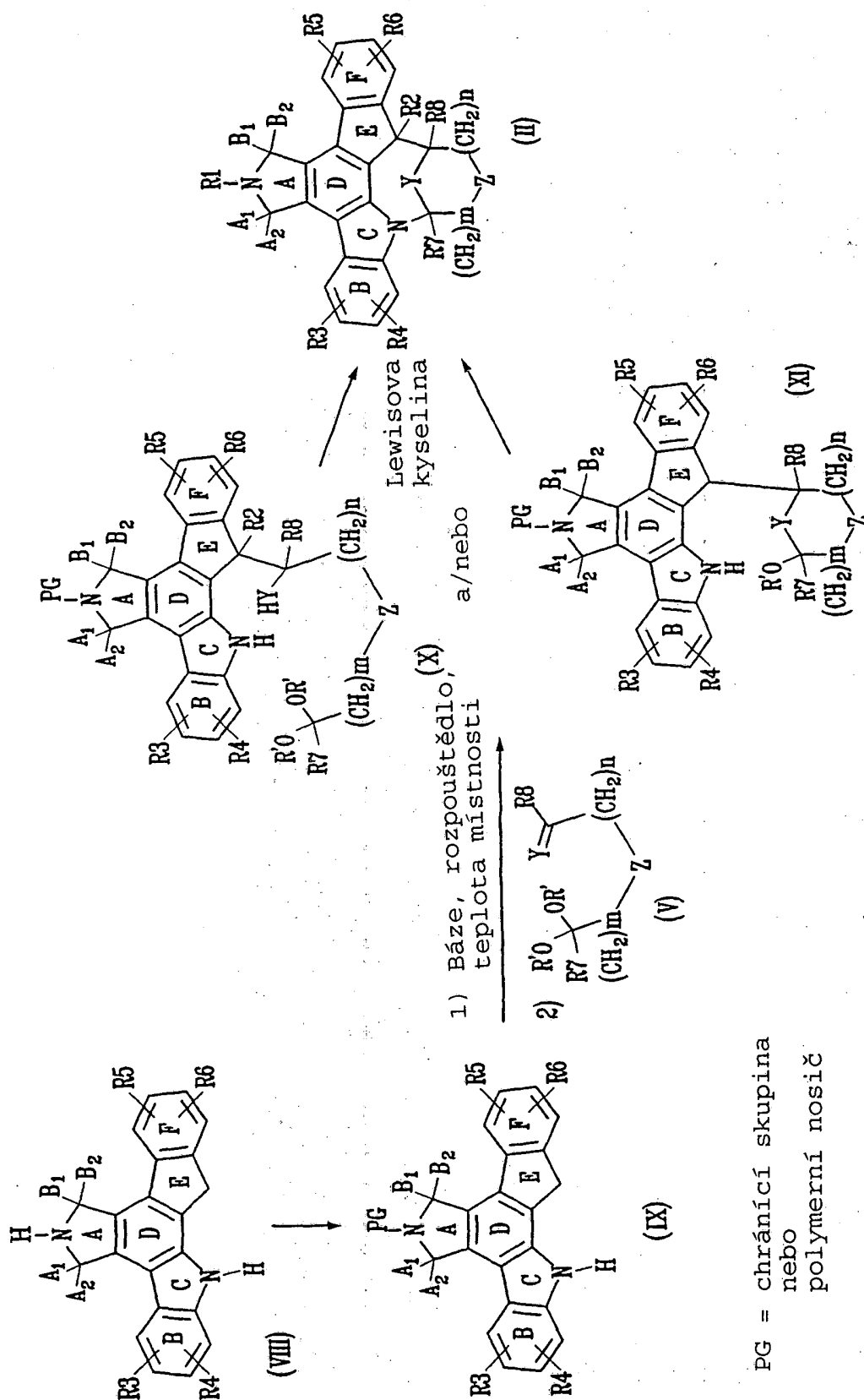
Obrázek 1

Obecný způsob přípravy indenopyrrolokarbazolů s můstkem



Obrázek 2

Obecný způsob přípravy indenopyrrollokarbazolů s můstkem

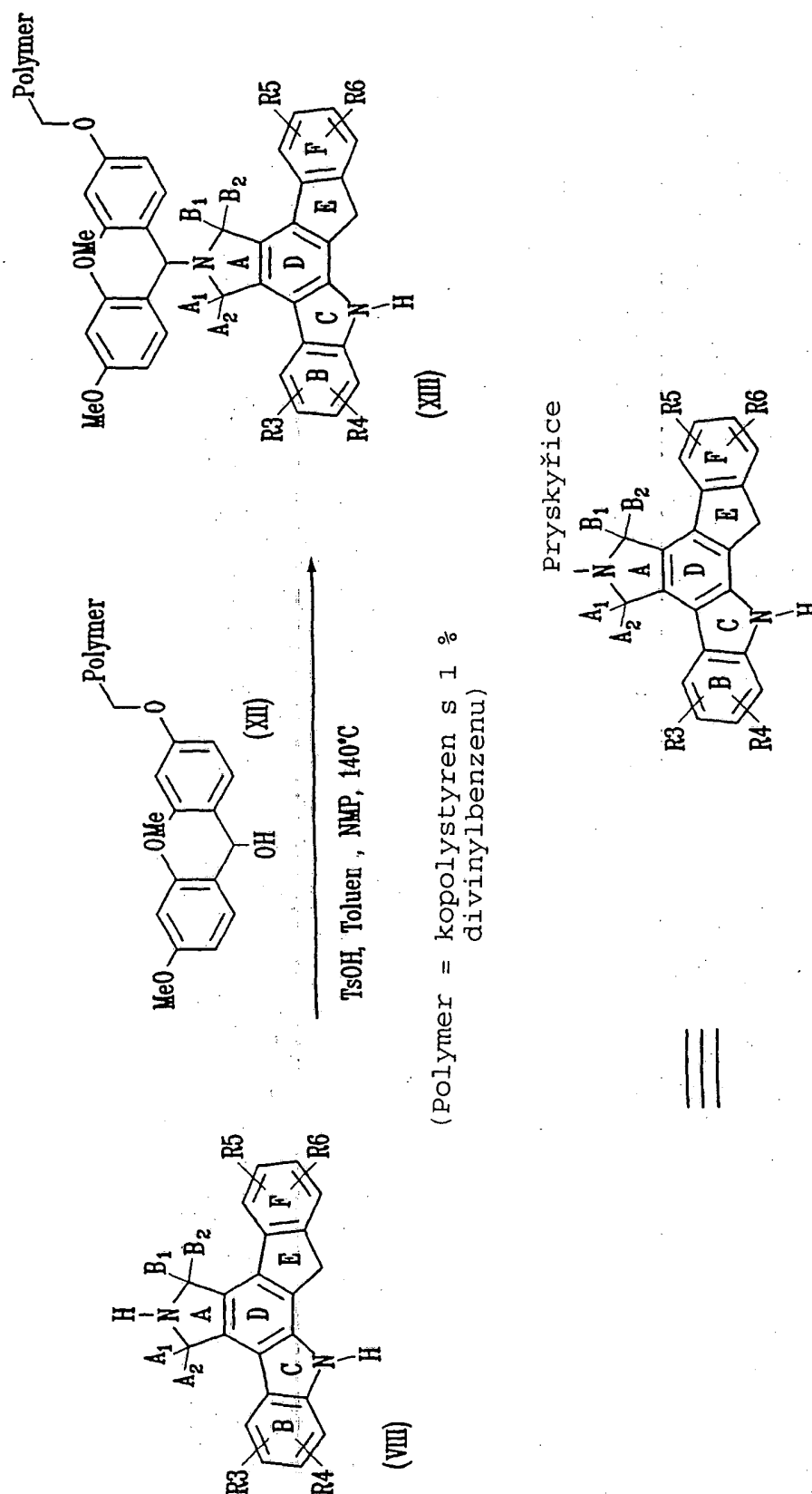


07.05.03

PV 2003-680

Obrázek 3

Příprava indenopyrrolokarbazolů vázaných na pryskyřici

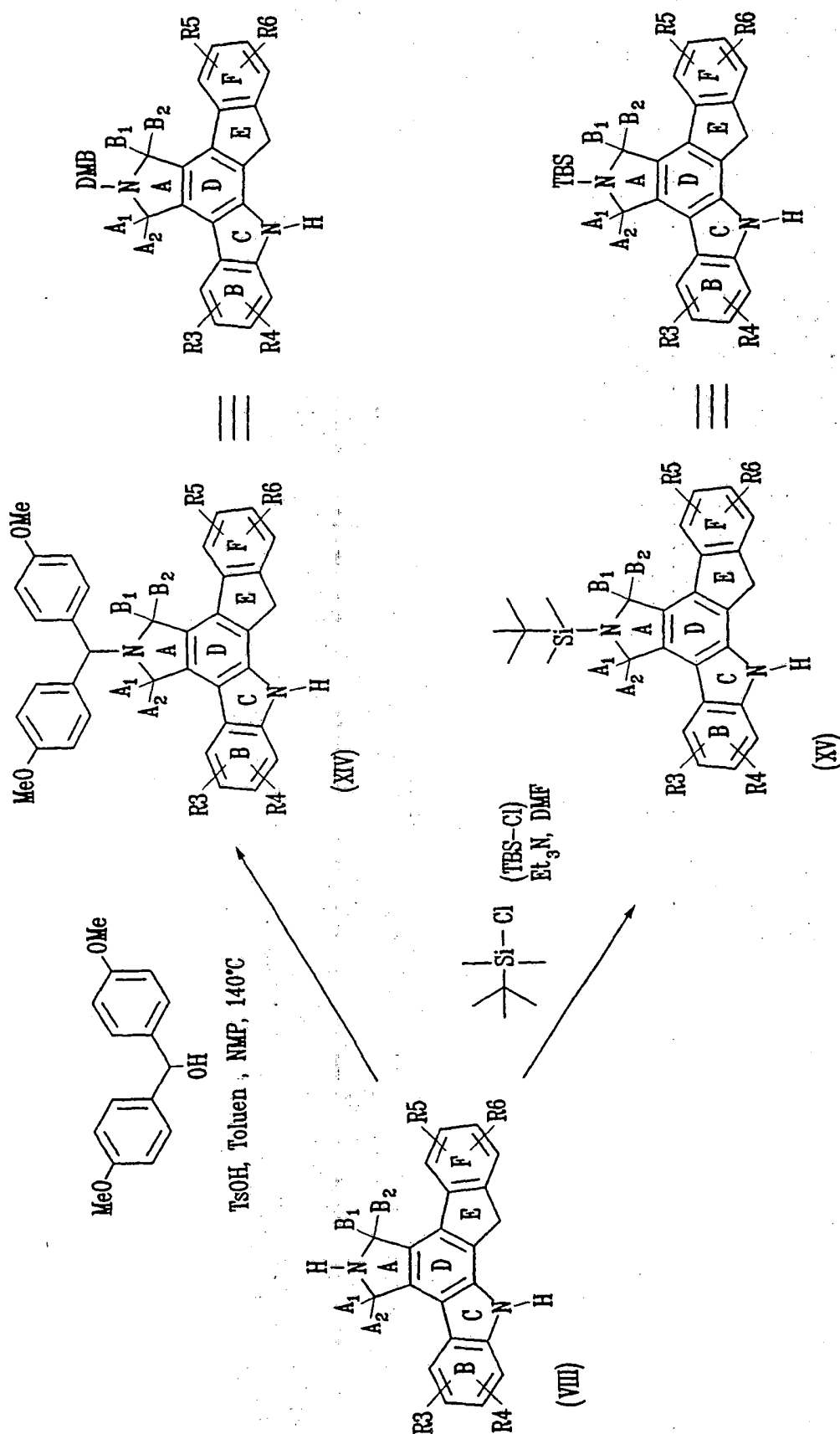


Obrázek 4

Příprava chráněných rozpustných indenopyrrolotkarbazolů

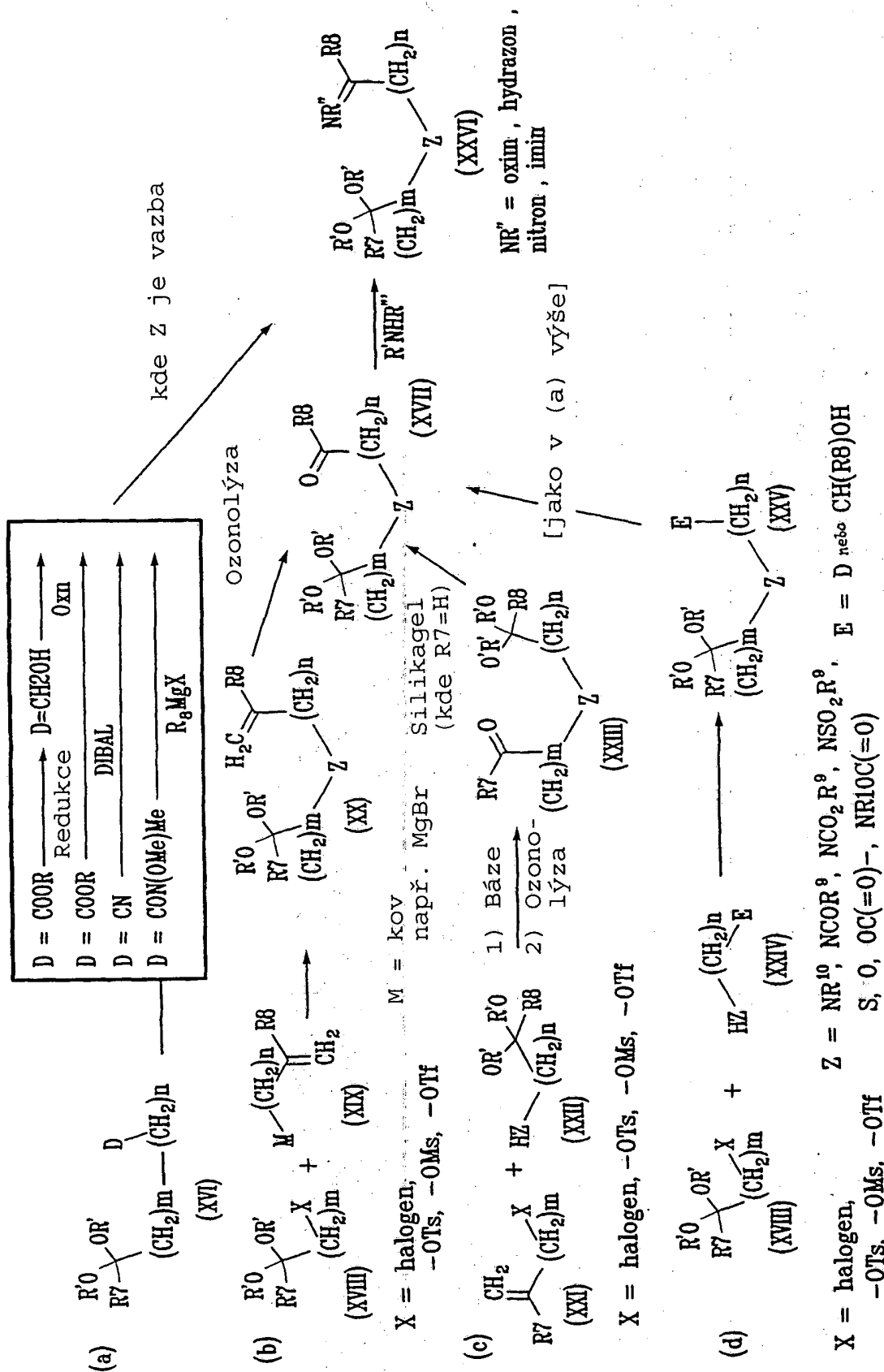
07.05.00

2005-680



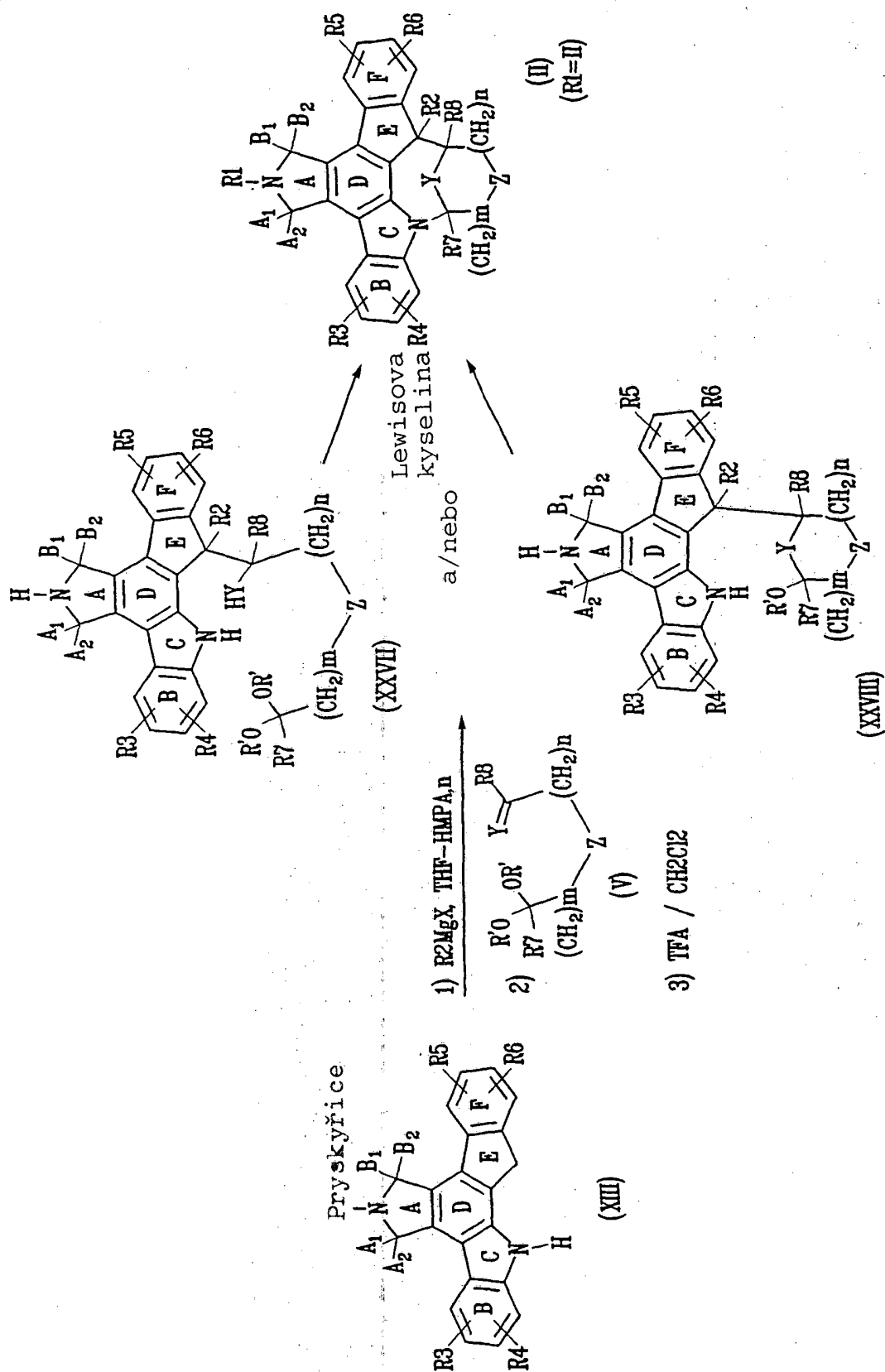
Obrázek 5

Příprava meziprojektu (V)



Obrázek 6

Příprava indenopyrrollokarbazolů s můstkem
Způsob A

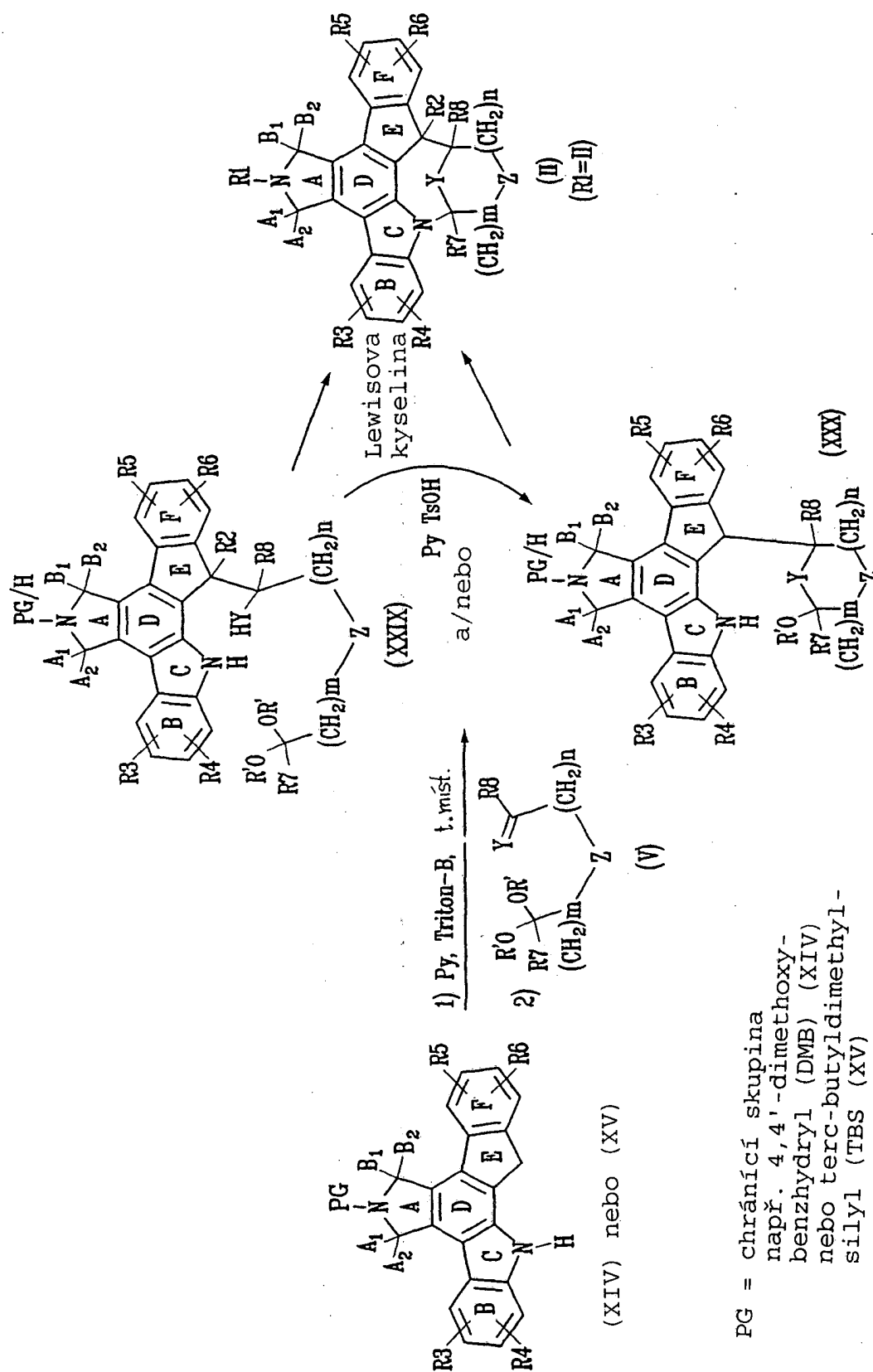


07.09.03

P2055-680

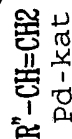
Obrázek 7

Příprava indenopyrrolokarbazolů s můstkem
Způsob B



PG = chránicí skupina
např. 4,4'-dimethoxy-
benzhydrol (DMB) (XIV)
nebo terc-butylidimethyl-
silyl (TBS) (XV)

Příprava indenopyrrolokarbazolů s můstkem se substituovaným kruhem B

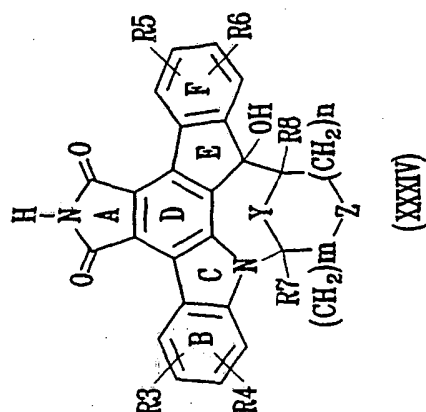


07.05.03

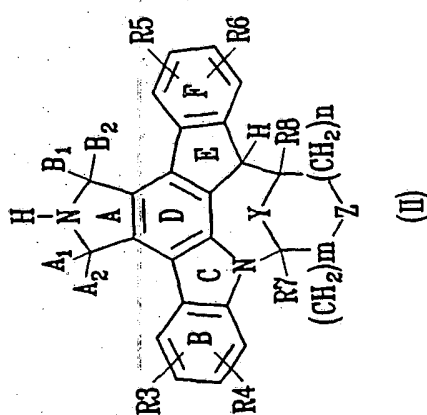
70 2055-680

Obrázek 9

Derivatizace kruhu E indenopyrrolokarbazolů s můstkem



DMSO, NaCN



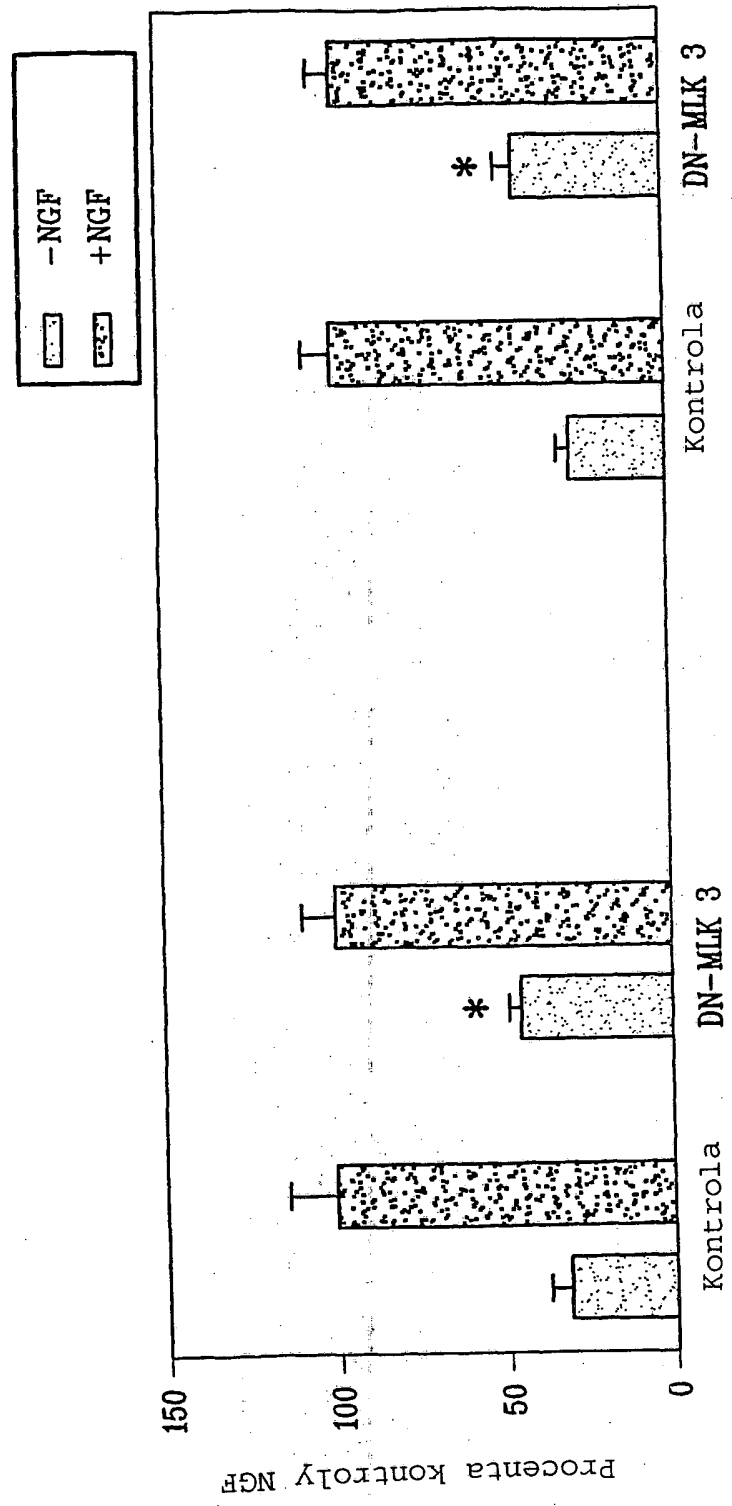
jestliže

 $A_1 \text{ \& } A_2 = H_2, \quad B_1 \text{ \& } B_2 = O$

nebo

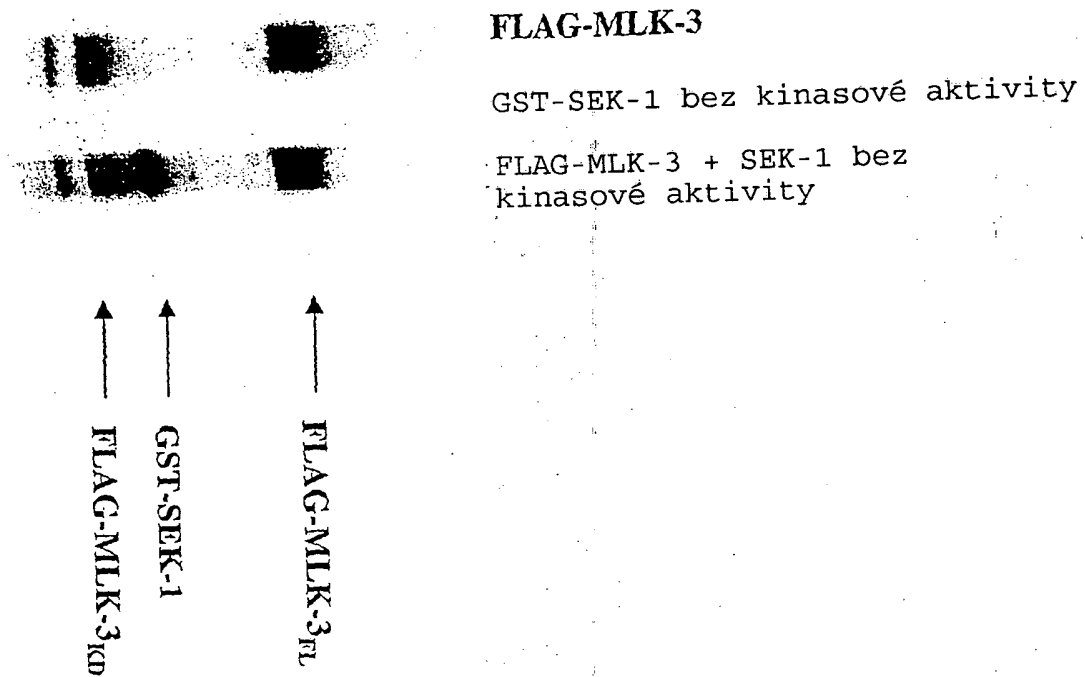
 $A_1 \text{ \& } A_2 = O, \quad B_1 \text{ \& } B_2 = H_2$

Obrázek 10

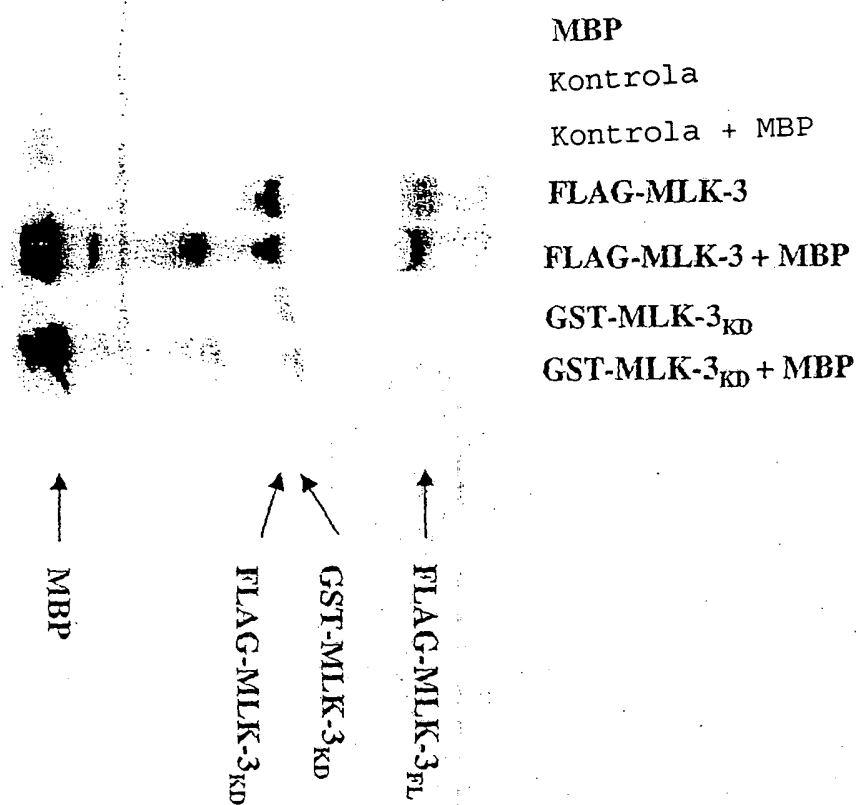


*statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a DN-MLK-3 v nepřítomnosti NGF ($p < 0,05$)
T-test oboustranná analýza)

Obrázek 11A

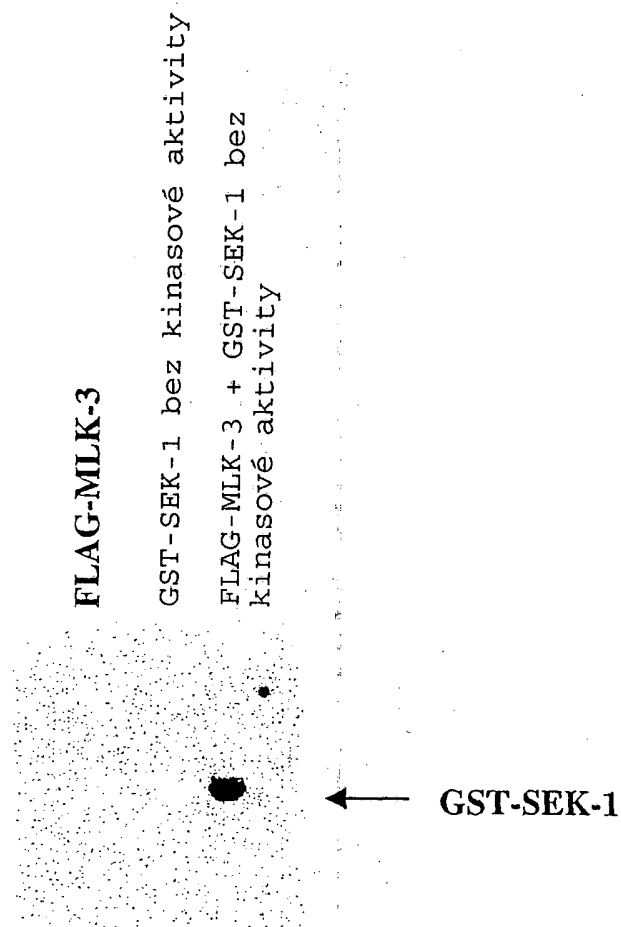


Obrázek 11B

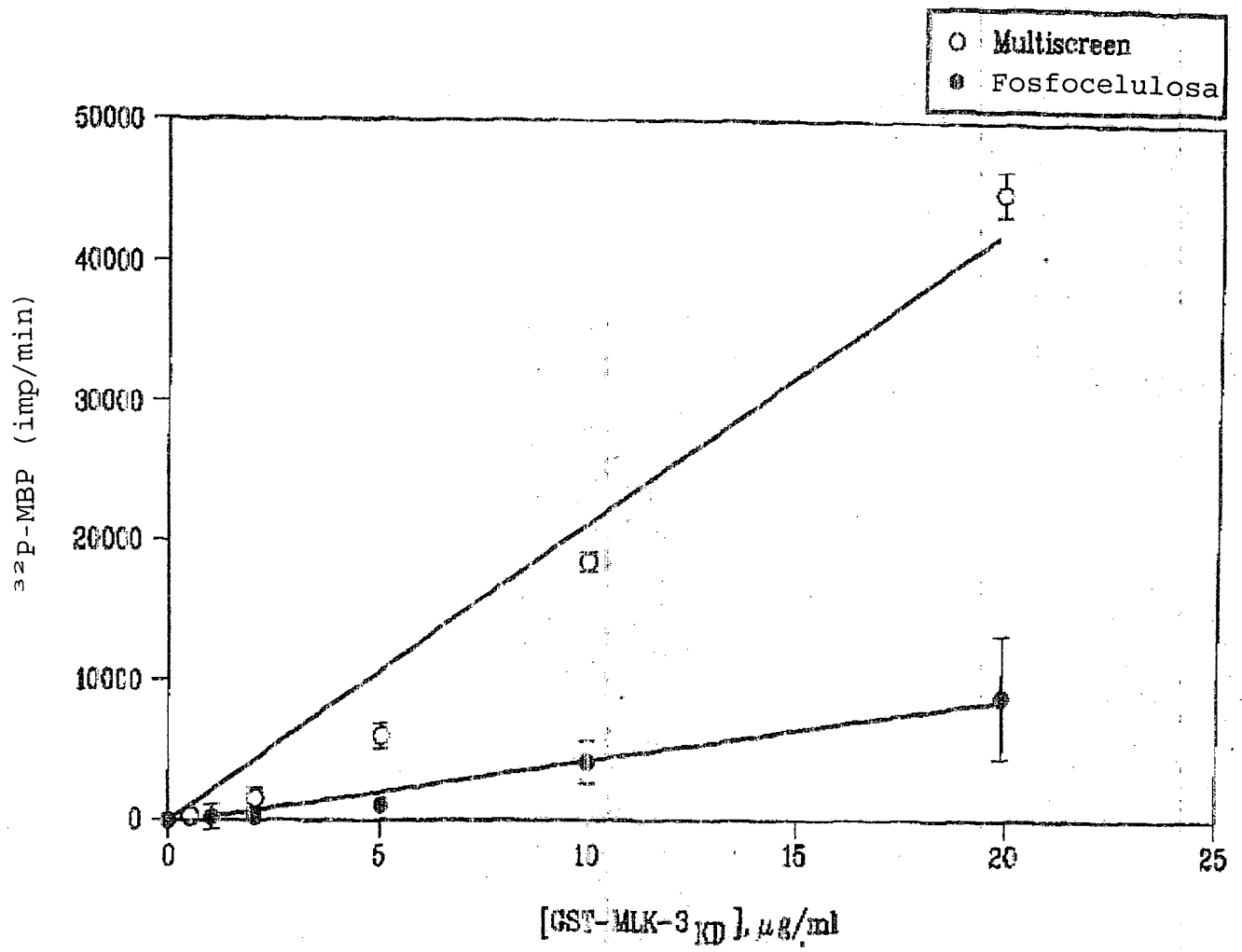


07.05.03 21.005-680

Obrázek 12

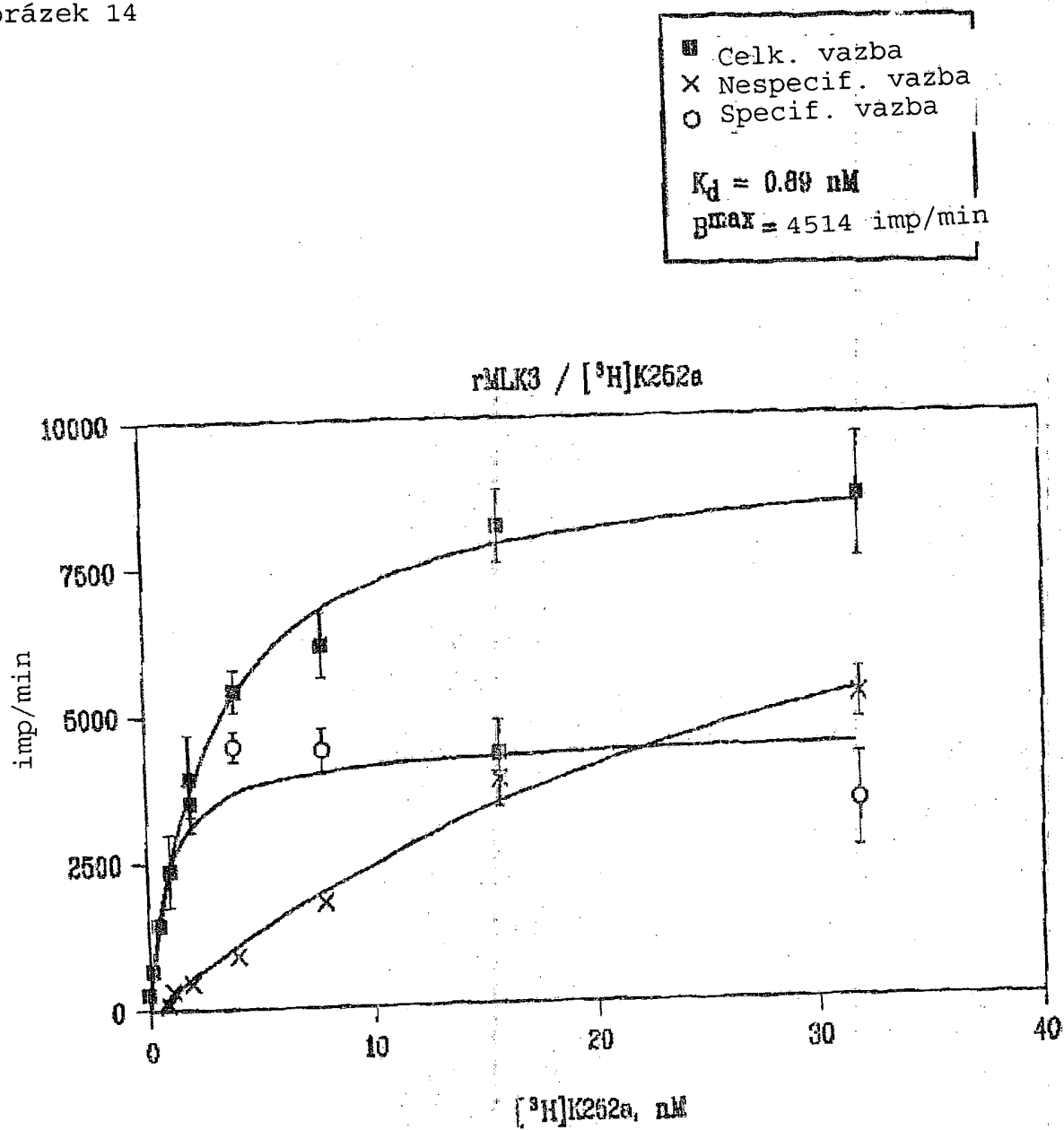


Obrázek 13

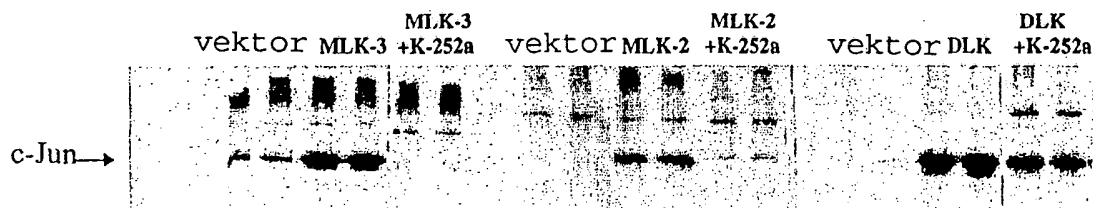


PJ 2055-680
07.05.03

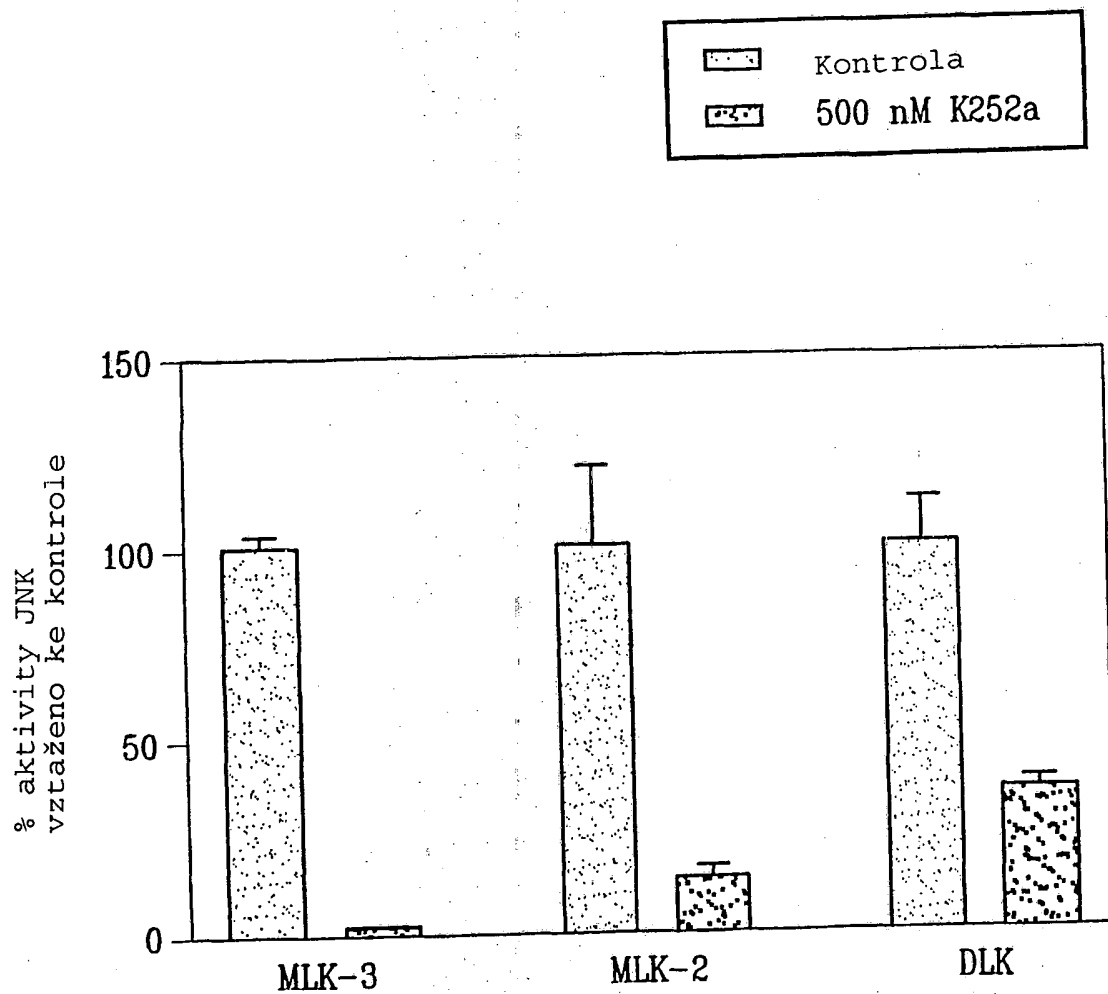
Obrázek 14



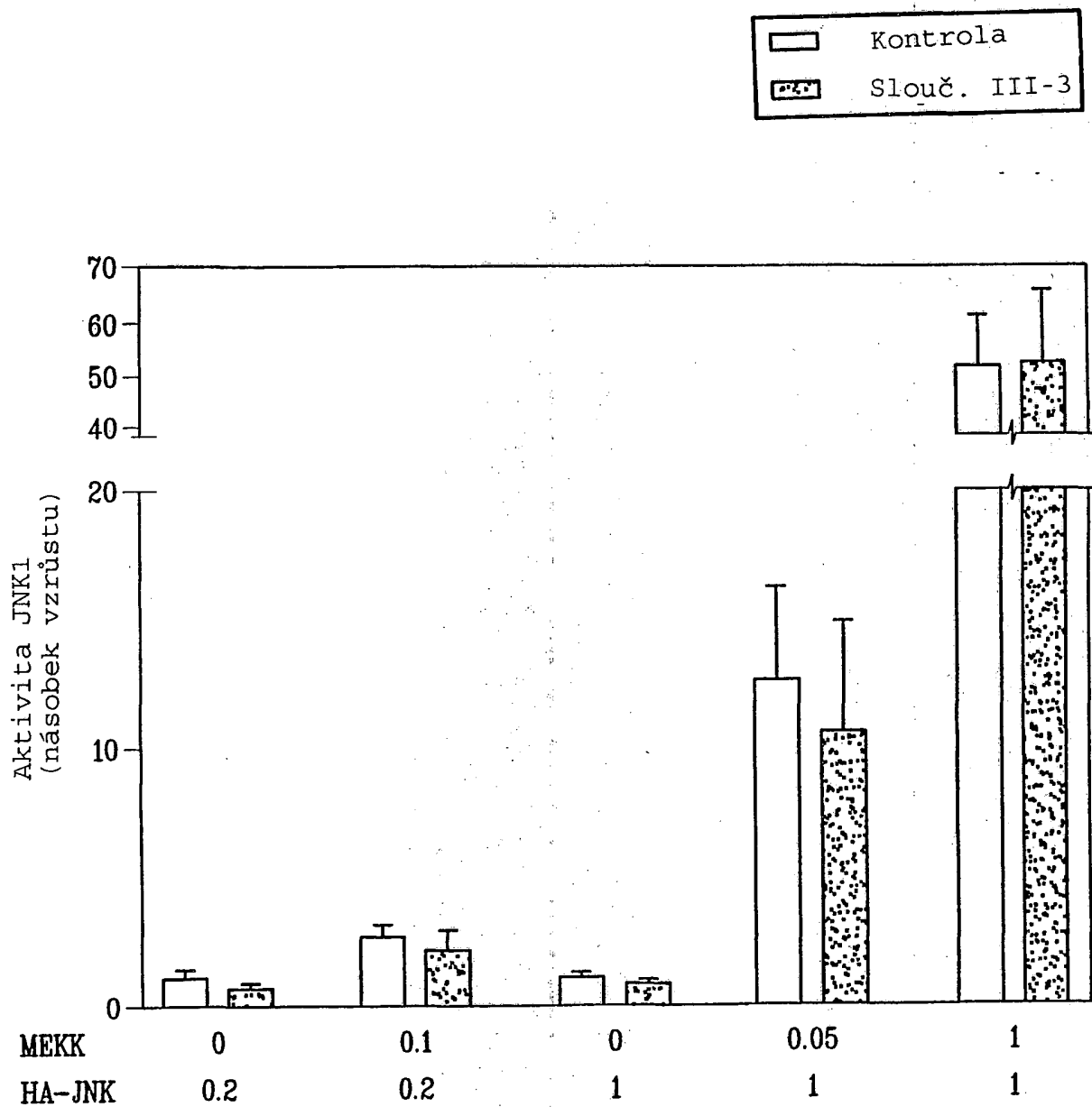
Obrázek 15A



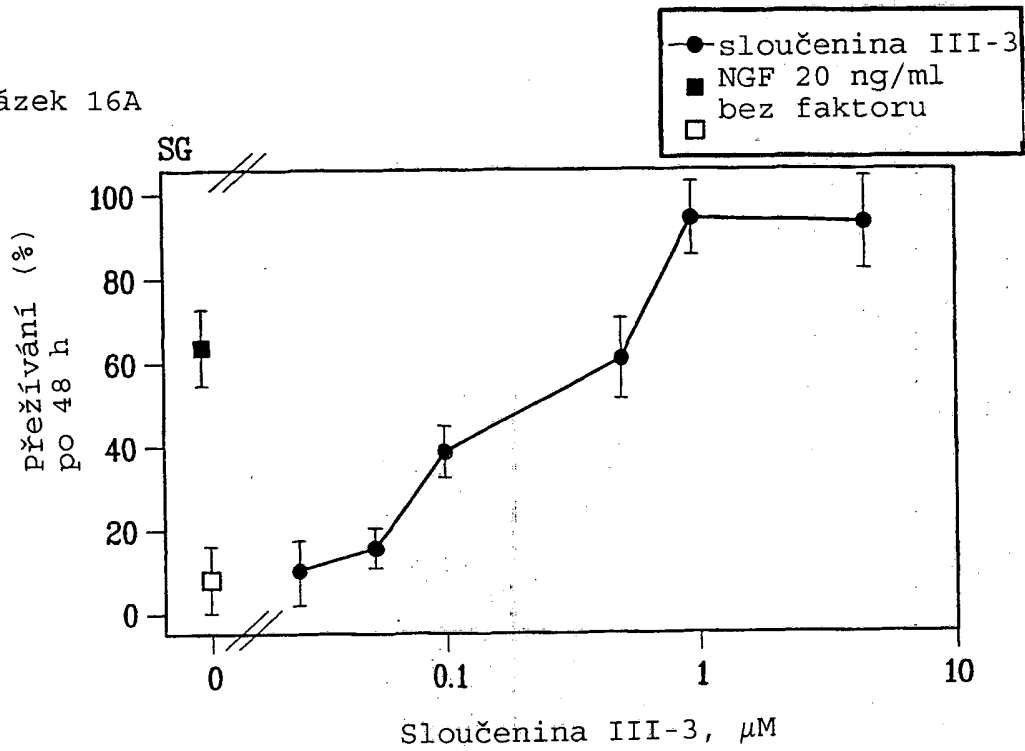
Obrázek 15B



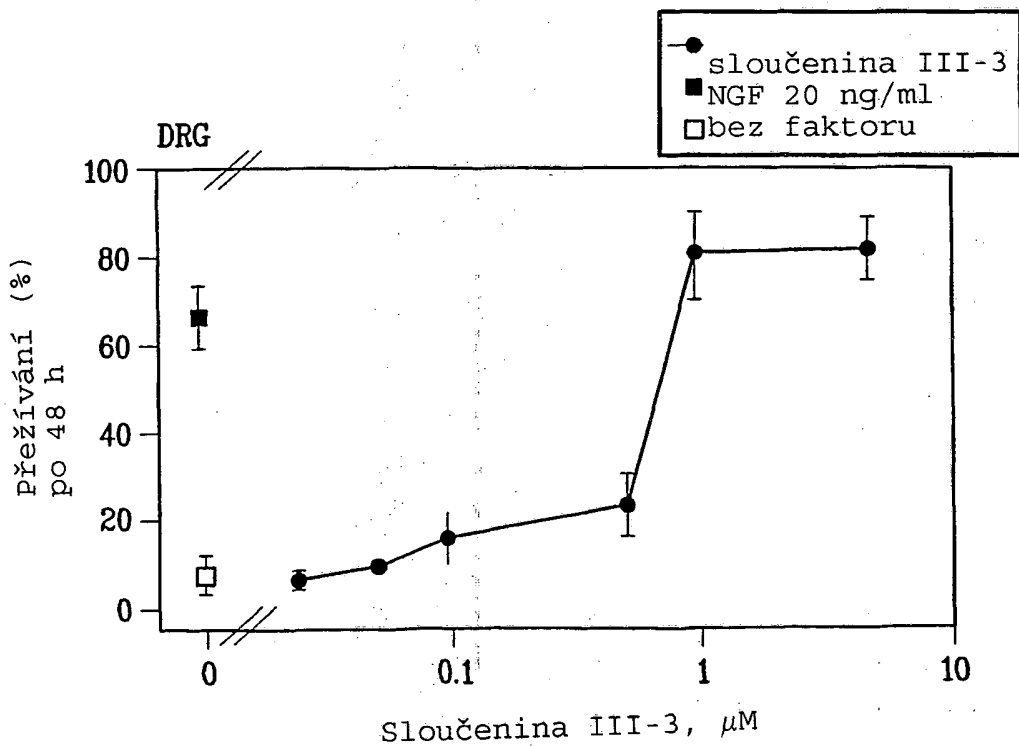
Obrázek 15C



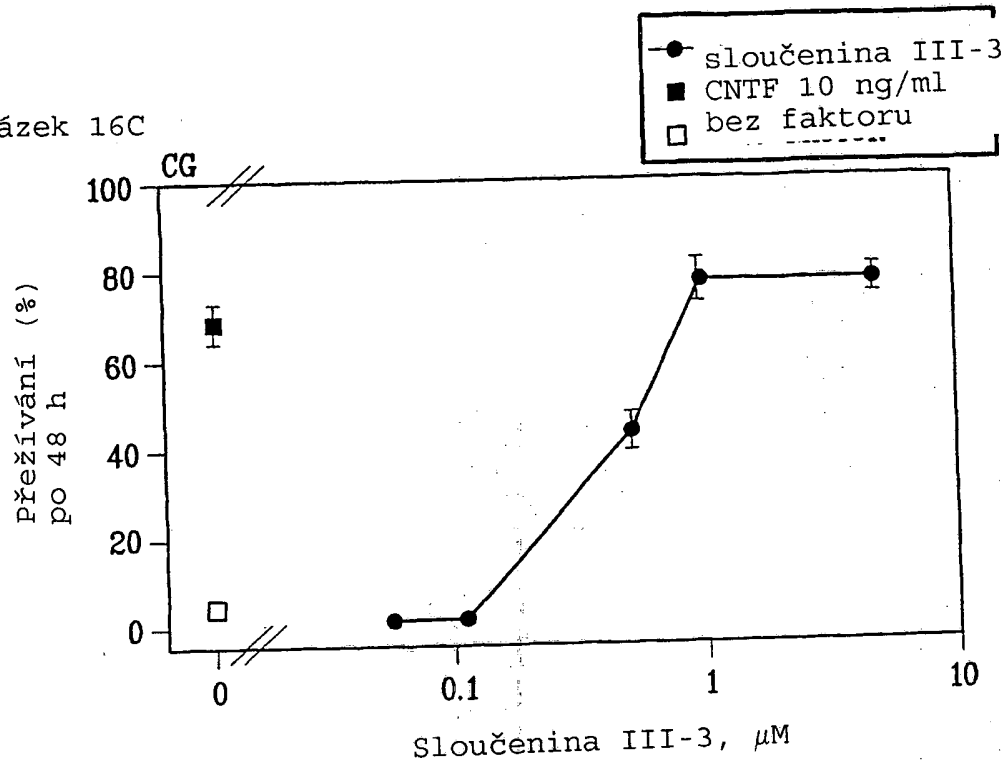
Obrázek 16A



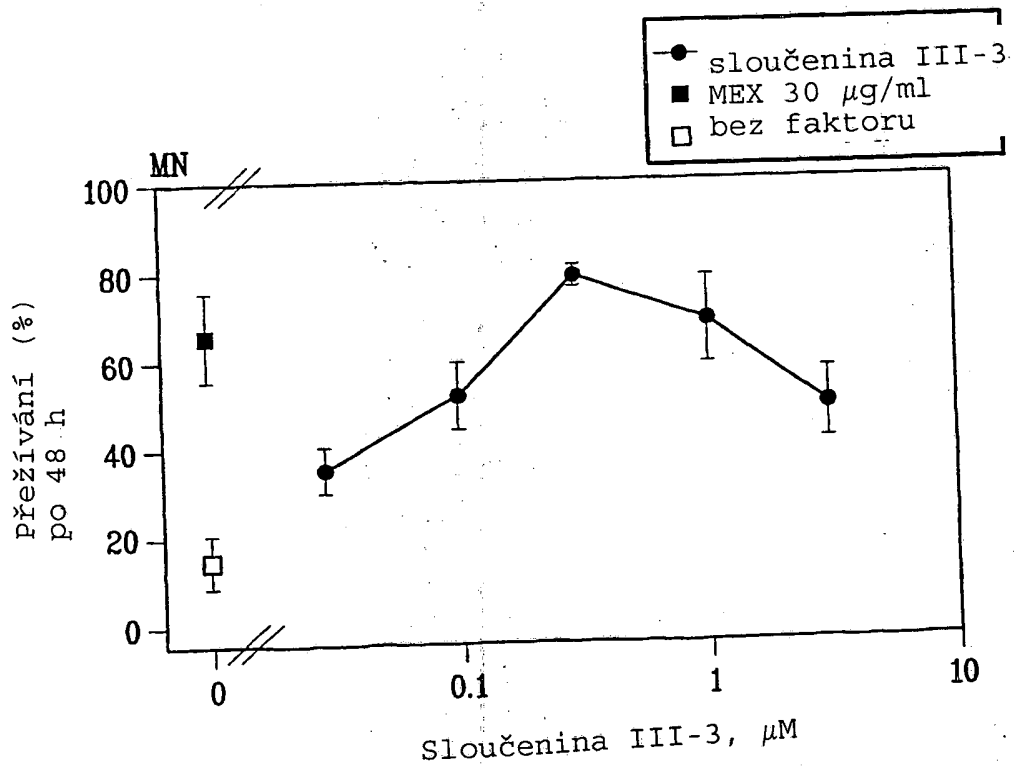
Obrázek 16B



Obrázek 16C



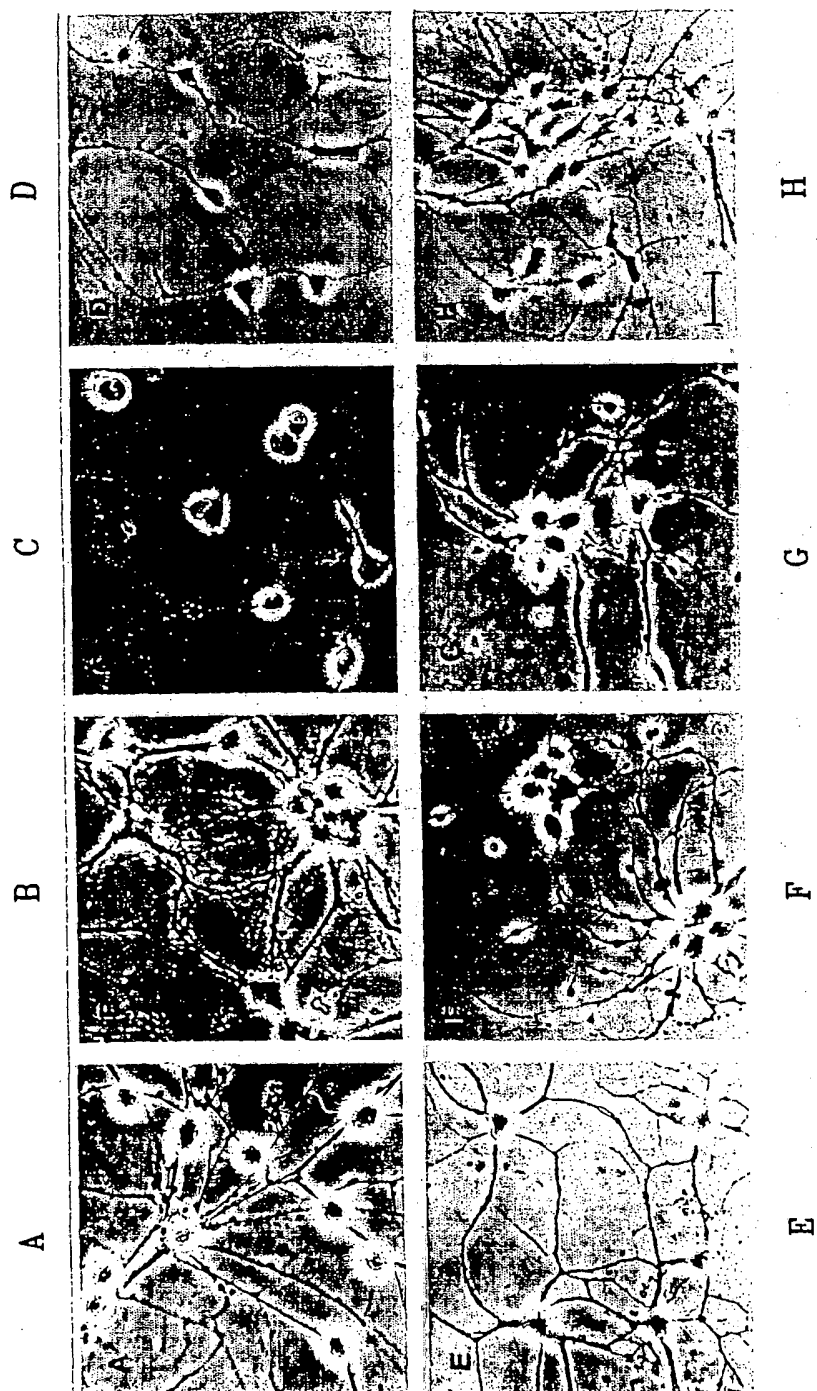
Obrázek 16 D



07.05.03

P02005-680

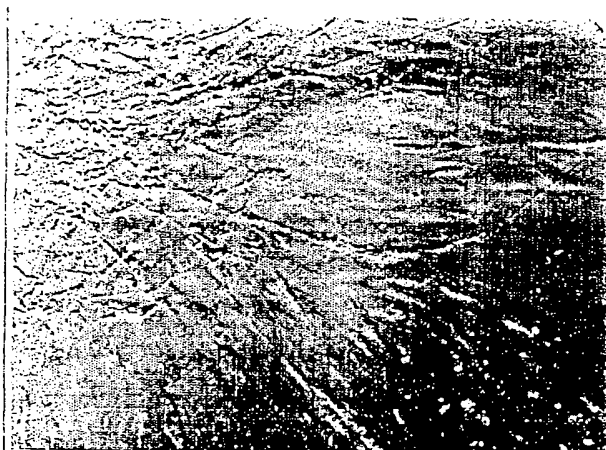
Obrázek 17



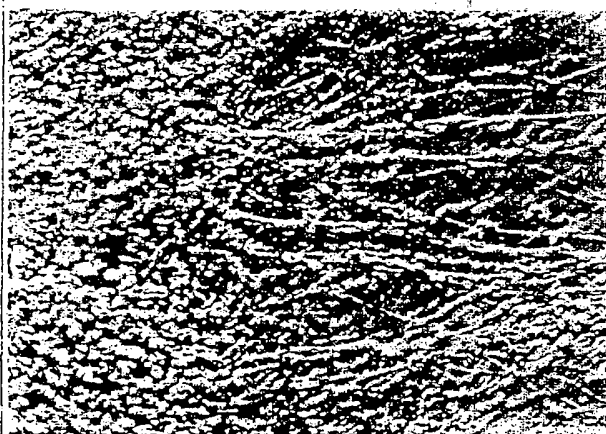
07.05.03

Poras - 680

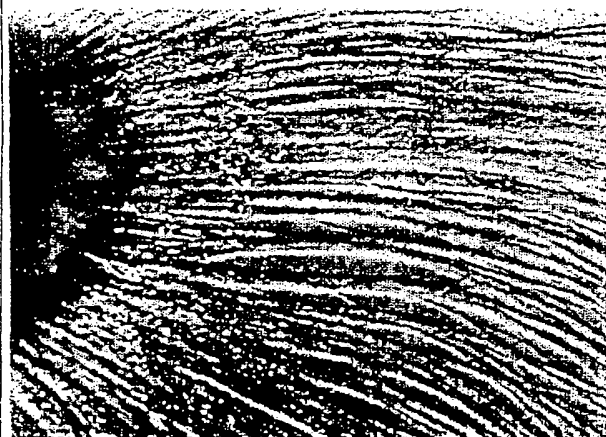
Obrázek 18



Kontrola



NGF

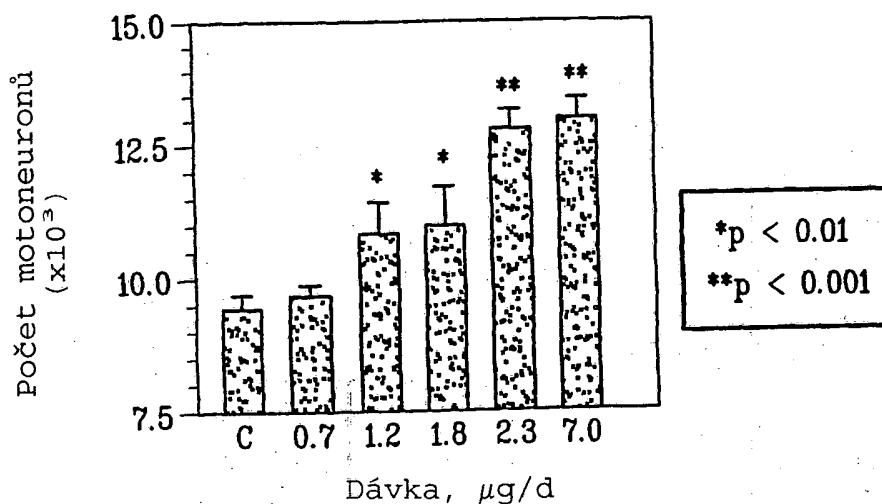


Sloučenina III-3

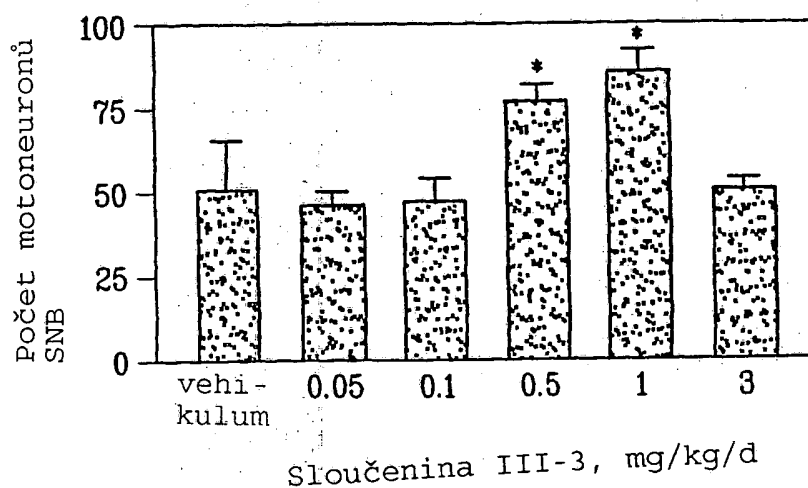
07.05.03

TV 2003-680

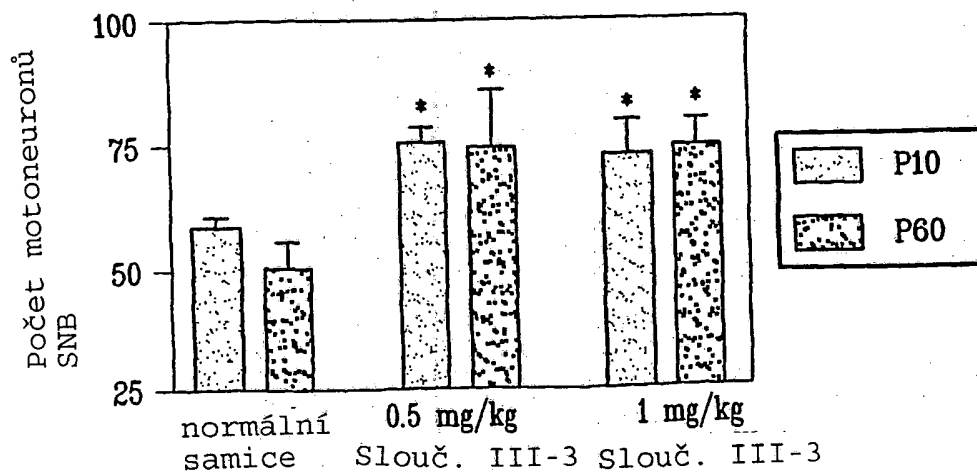
Obrázek 19



Obrázek 20A



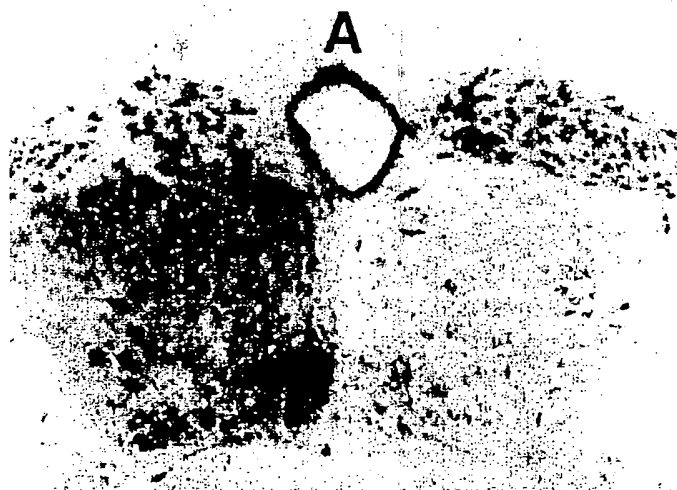
Obrázek 20B



07.05.03

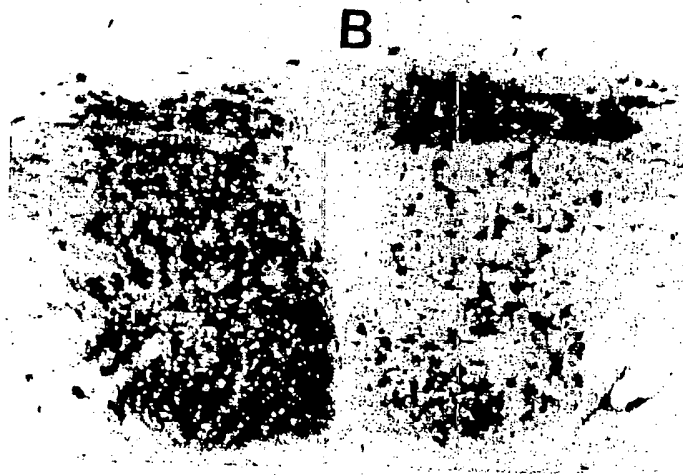
P2003-680

Obrázek 21A

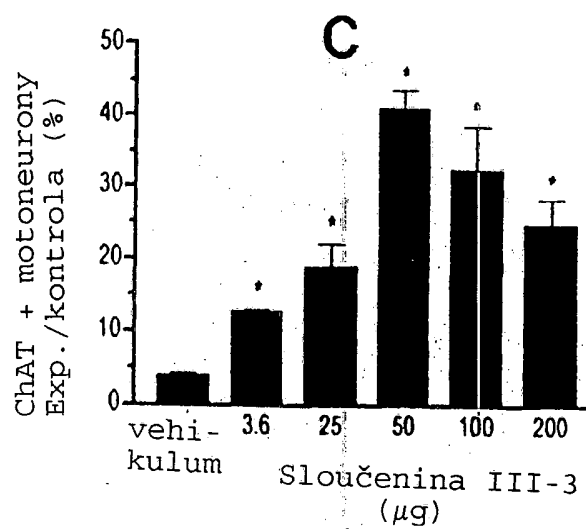


07.05.03 707003-680

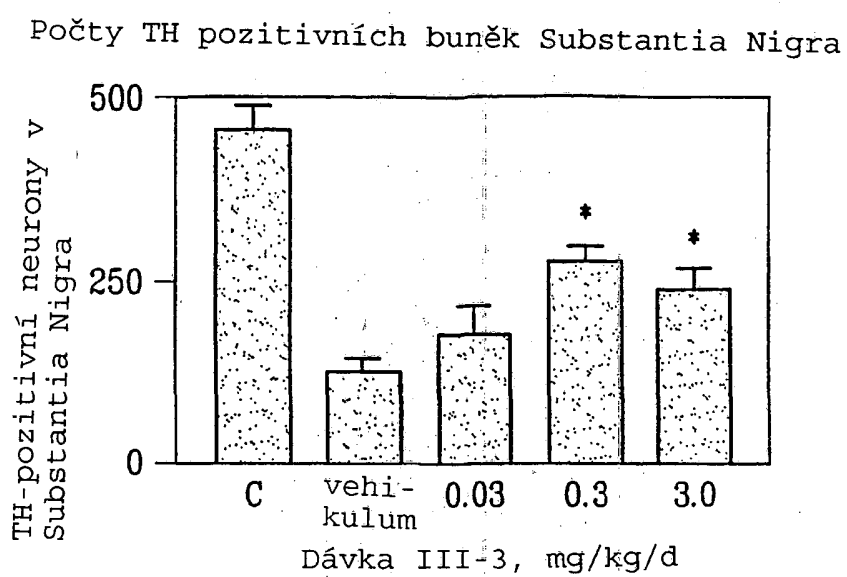
Obrázek 21B



Obrázek 21C

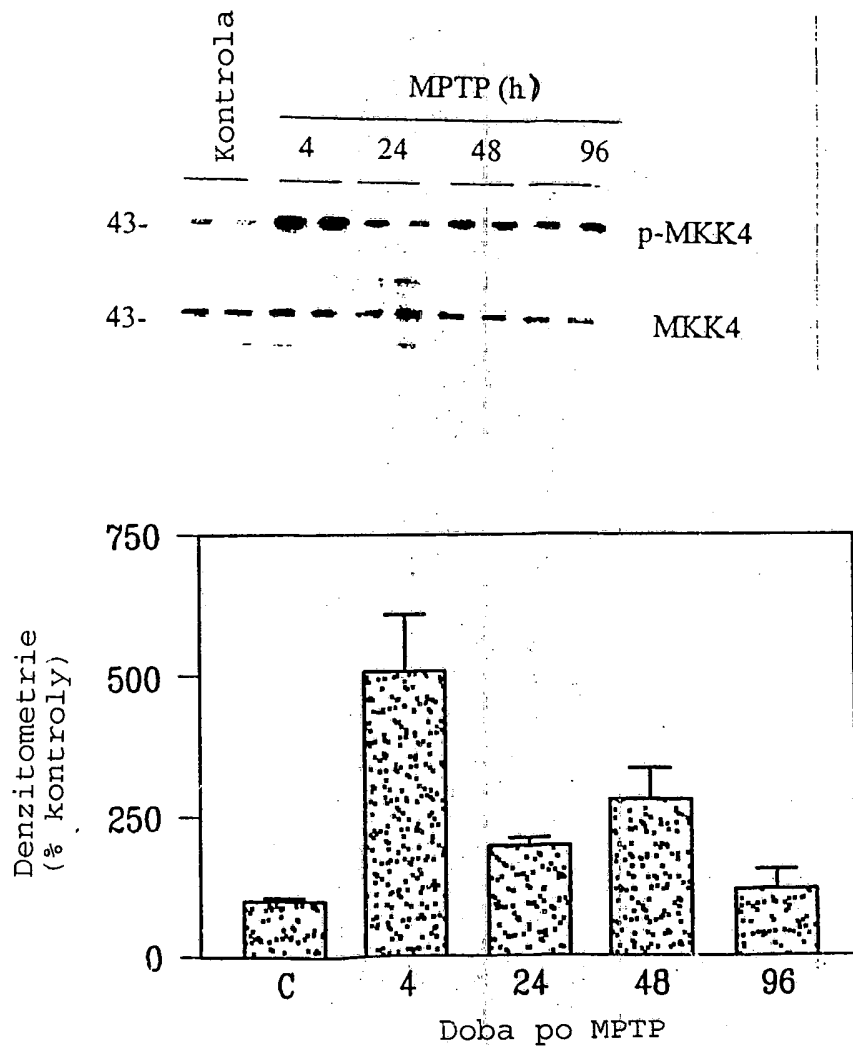


Obrázek 22A

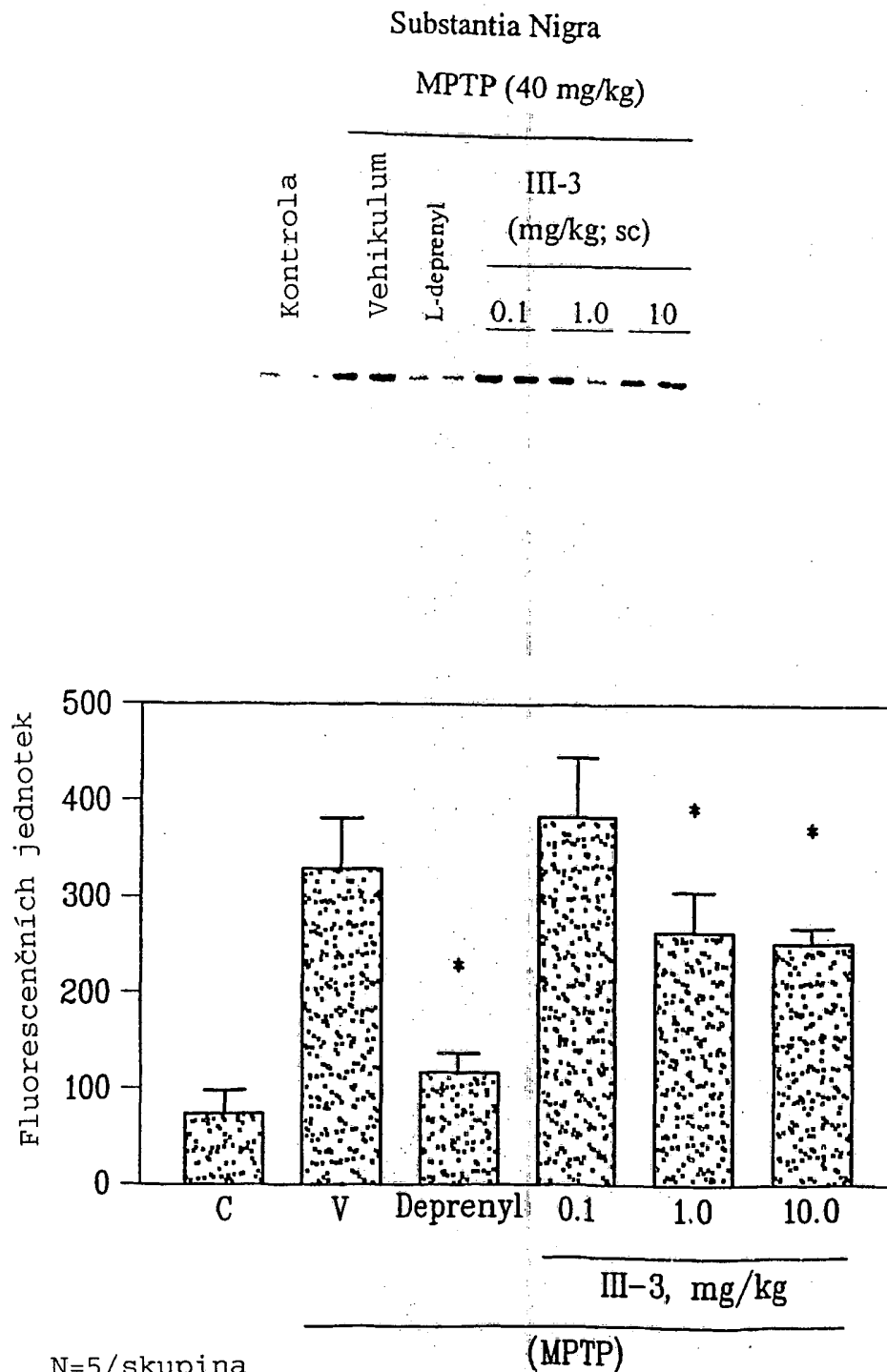


*Ukazuje statistické rozdíly ($p < 0,05$) oproti kontrolám vehikula ošetřeným MPTP

Obrázek 22B



Obrázek 22C

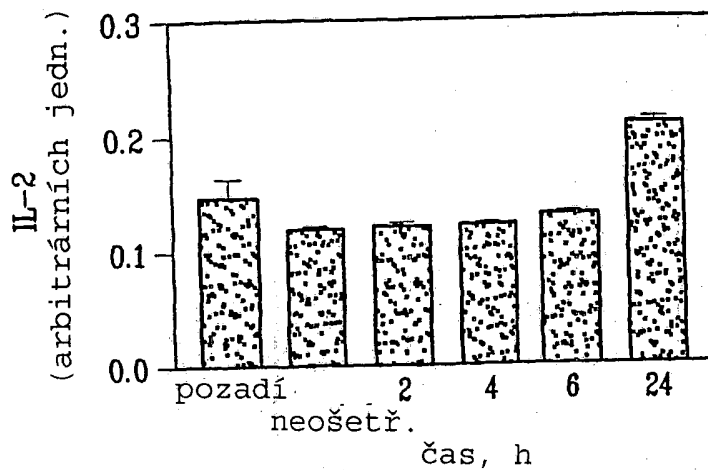


N=5/skupina

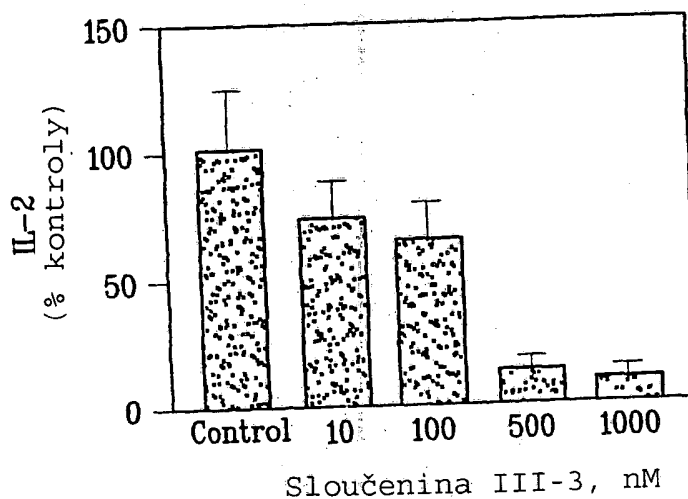
*P < 0,05

ANOVA post-hoc Dunnettova zkouška

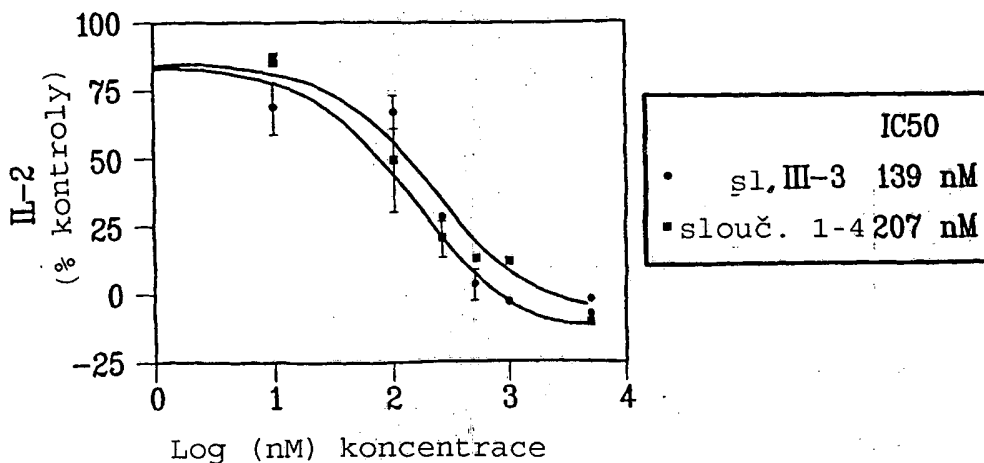
Obrázek 23A



Obrázek 23B



Obrázek 23C



07.05.03

RJ003-680

SEZNAM SEKVENCÍ

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

<120> Způsoby modulace kinasových proteinů s vícenásobnou vazbou
a vyhledávání sloučenin modulujících kinasové proteiny s
vícenásobnou vazbou

<130> CEHP1989

<150> 60/097,980
<151> 1998-08-26

<150> 09/376,894
<151> 1999-08-18

<150> 09/637,054
<151> 2000-08-11

<150> PCT/US01/24822
<151> 2001-08-08

<160> 18

<170> Verze patentu 3.2

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ala Ser Ala Cys Arg Thr Cys
20

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

<400> 3

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

07.05.03 707001-680

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

Ala

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

<400> 4

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

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

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

<400> 5

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

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

<400> 6
gtggctgtgc gggcagctcg ccag

24

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

<400> 7
gagaccctgg atctcgcgct t

21

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

<400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

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

<400> 9
cggatccgtg acaccagtcg gaacctt

27

07.05.00 107053-680

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

<400> 10
ggaattcacc agtaagctcc agcacatc 28

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

<400> 11
ataattcgtg ctagcgccag agtctagccg gtg 33

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

<400> 12
ataagcttcc tcagtgaag tggatcgccg agcccctga 39

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

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

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

<400> 14
ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa 60

accggaaca 69

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

<400> 15
gacagggcgg ccggctct 18

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

<400> 16
gaattcggca cgagaggact cgcaggtgtc cggcgacgag ggctgggtga ccgggcagct 60

gaaccagcgg gtgggcatct tccccagcaa ctacgtgacc ccgcgcagcg ccttctccag 120

ccgctgccag cccggcggcg aggaccccag ttgctaaccg cccattcagt tgttagaaat 180

07.05.03 072003-680

tgattttgcg gagctcacct tggaagagat tattggcatc gggggctttg ggaaggtcta 240
 tcgtgctttc tggatagggg atgaggttgc tgtgaaagca gctcgccacg accctgatga 300
 ggacatcagc cagaccatag agaattgtcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctgaa 360
 gcacccaac atcattgccc taagaggggt atgtctgaag gagcccaacc tctgcttggg 420
 catggagttt gctcgtggag gacctttgaa tagagtgtta tctgggaaaa ggattccccc 480
 agacatcctg gtgaattggg ctgtgcagat tgccagaggg atgaactact tacatgatga 540
 ggcaattggt cccatcatcc accgcgacct taagtccagc aac 583

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

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

07.05.03 P0202-680

Ser Asn

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

<400> 18 .

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