



УКРАЇНА

(19) UA (11) 57035 (13) C2

(51) 7 A61K38/05, A61K31/12,
A61K31/445, A61K31/95

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

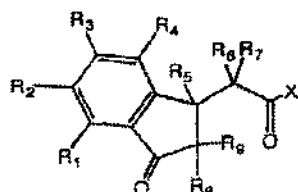
ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОХІДНІ ІНДАНОНУ (ВАРІАНТИ), ПРИДАТНІ ДЛЯ ІНГІБУВАННЯ ПРОЛІФЕРАЦІЇ КЛІТИН

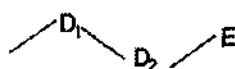
1

2

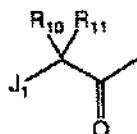
- (21) 99031659
(22) 23 09 1997
(24) 16 06 2003
(86) PCT/US97/17013, 23 09 1997
(31) 08/719,042
(32) 24 09 1996
(33) US
(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р
(72) Лам Роберт Т., US, Скоу Стивен Р., US, Джоел Елісон, US, Кервар Суреш, US, Нелсон Марек Г., US, Уїк Майкл М., US
(73) CIBI СЕРАПЬЮТИКС, ІНК, US
(56) WO, A, 9200961, 23 01 1992
US, A, 5 409 944, 25 04 1995
US, A, 5 457 237, 10 10 1995
Wo, A, 9524914, 21 09 1995
(57) 1 Похідні інданону формули



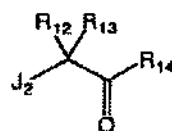
де кожен з R_1 - R_4 незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, галогід, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітрогрупа і ціаногрупа,
кожен з R_5 - R_9 незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, галогід, гідроксил, тиол, оксогрупа, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітрогрупа і ціаногрупа,
X вибрано з групи сполук, до якої входять водень, $-D_1$, $-D_2$, $-E$, $-D_1-D_2$, $-D_1-E_1$, $-D_2-E$ і сполука формули



де кожен з D_1 та D_2 незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять



водень, галогід, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, або він є відсутнім,
де E — сполука, яку вибрано з групи, до якої входять



водень, галогід, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, де
кожен з R_{10} - R_{14} незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, галогід, гідроксил, тиол, оксогрупа, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітрогрупа і ціаногрупа,
 J_1 та J_2 - $N-R_{15}$, $CR_{16}R_{17}$, O, $S-(O)_{0.2}$, $P-(O)_{0.3}$, та
кожен з R_{15} - R_{17} незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, галогід, гідроксил, оксогрупа, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл,

(13) C2

(11) 57035

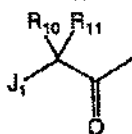
(19) UA

алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл і ціаногрупа

2 Похідні за п. 1, де кожен з R_1 - R_4 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, галоїд, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, арилоксигрупа, заміщений арил, аміногрупа, амідогрупа, алкоксигрупа, тіогрупа, алкілтіол, гідроксил, ціаногрупа, нітрогрупа, ацил, карбоксил та алкініл, і де кожен з R_5 - R_9 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, аміногрупа, амідогрупа, алкоксигрупа та алкініл

3 Похідні за п. 1, де X — $-D_1-E$ або $-D_2-E$

4 Похідні за п. 3, де кожен з $-D_1$ та $-D_2$ —



5 Похідні за п. 4, де J_1 — $N-R_{15}$, кожен з R_5 - R_{11} та R_{15} незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил та заміщений арил, і E вибрано з групи, до якої входять нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, алкоксигрупа та аміногрупа

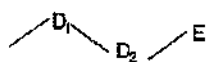
6 Похідні за п. 5, де кожен з R_5 - R_{11} та R_{15} незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл та заміщений нижчий алкіл, і E вибрано з групи, до якої входять нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, алкоксигрупа та аміногрупа

7 Похідні за п. 6, де E вибрано з групи, до якої входять алкоксигрупа та аміногрупа, а R_1 - R_4 вибрано з групи, до якої входять водень, галоїд, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкоксигрупа, аміногрупа, нітрогрупа, гідроксил, ціаногрупа, алкініл, тіогрупа та алкілтіогрупа

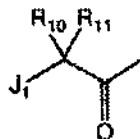
8 Похідні за п. 7, де E — $NR'R''$, де кожен з R' та R'' незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил та циклоалкіл, і кожен з R_1 - R_4 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, галоїд, нітрогрупа, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, аміногрупа, алкілтіогрупа, тіогрупа, гідроксигрупа та алкоксигрупа

9 Похідні за п. 8, де кожен з R_1 - R_4 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, алкоксигрупа та нижчий алкіл, кожен з R_5 - R_{11} та R_{15} незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл та заміщений нижчий алкіл, та кожен з R' та R'' незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл та циклоалкіл

10 Похідні за п. 2, де X —

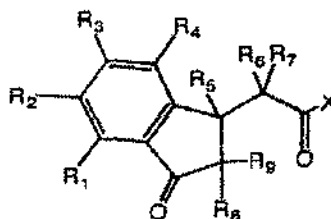


11 Похідні за п. 10, де кожен з $-D_1$ та $-D_2$ —



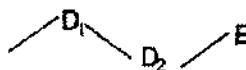
12 Похідні за п. 11, де E — сполука, яку вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, аміногрупа, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкоксигрупа або алкілциклоалкіл

13 Похідні інданону формули

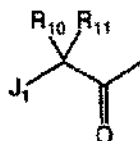


де кожен з R_1 - R_9 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, галоїд, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкоксигрупа, аміногрупа, нітрогрупа, гідроксил, ціаногрупа, алкініл, тіогрупа та алкілтіогрупа,

X — сполука формули

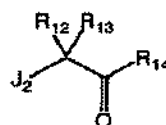


де кожен з D_1 та D_2 , незалежно,



де J_1 — $N-R_{15}$, де кожен з R_{10} , R_{11} незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил та заміщений арил,

та E вибрано з групи, до якої входять нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, алкоксигрупа, аміногрупа, амінокислота,



та $NR'R''$, де J_2 вибрано з групи сполук, до якої входять $N-R_{15}$, $-CR_{16}R_{17}$, O , $S-(O)_{0-2}$, $P-(O)_{0-3}$, де кожен з R_{12} - R_{17} може незалежно бути вибрано з групи сполук, до якої входять водень, галоїд, гідроксил, оксогрупа, тіол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкоксигрупа, алкілтіогрупа, ацил, арилоксигрупа, аміногрупа, амідогрупа, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, та де кожен з R' та R'' незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил та циклоалкіл

14 Похідні за п. 13, де кожен з R_1 - R_9 незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, галоїд,

нїтрогрупа, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, аміногрупа, алкілїтрогрупа, ітрогрупа, ідрокси та алкоксигрупа

15 Похідні за п. 13, де кожен з R_1 - R_2 та R_4 - R_9 є воднем

16 Похідні за п. 13, де R_3 — $-O-CH_3$

17 Похідні за п. 13, де кожен з R_{10} - R_{11} та R_{15} незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл та заміщений нижчий алкіл, а E вибрано з групи, до якої входять нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, алкоксигрупа та амінокислота

18 Похідні за п. 13, де J_1 — $NR'R''$, де кожен з R' та R'' незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл та циклоалкіл

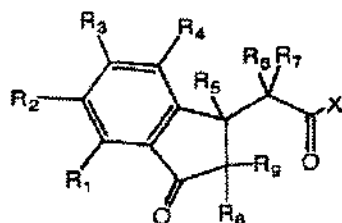
19 Похідні за п. 13, де E — сполука, яку вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, аміногрупа, амінокислота, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкоксигрупа або алкілциклоалкіл

20 Похідні за п. 13, де E — амінокислота або $NR'R''$, де кожен з R' та R'' незалежно вибрано з групи сполук, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил та циклоалкіл

21 Похідні за п. 13, де кожен з J_1 та J_2 — $-N-R_{15}$, де кожен з R_{10} - R_{13} та R_{15} незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил та заміщений арил, а R_{14} вибрано з групи, до якої входять нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил, аміногрупа та алкоксигрупа

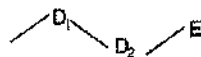
22 Похідні за п. 13, де кожен з R_5 - R_{13} незалежно вибрано з групи, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил та заміщений арил, а R_{14} вибрано з групи сполук, до якої входять алкоксигрупа та аміногрупа, а R_{15} вибрано з групи сполук, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил та заміщений арил

23 Похідні інданону формули



де

кожен з R_1 - R_2 та R_4 - R_9 — водень, R_3 — $-OCH_3$, X —



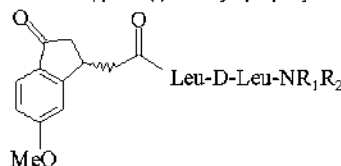
де кожен з D_1 та D_2 є амінокислотою, та

E — амінокислота або $-N-R_{15}$, де R_{15} вибрано з групи сполук, до якої входять водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил та аралкіл

24 Похідні за п. 23, де кожен з D_1 та D_2 — $-leu$ або $D-leu$

25 Похідні за п. 23, де E вибрано з-посеред $gly-NH_2$, водню, бензилу, дибензилу, індану, n -бензилідроксаміну, 2,6-діфторбензилу та піперонілу

26 Похідні інданону формули

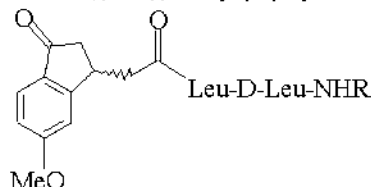


де R_1 — ізопропіл, бензил, гідроксіетил, адамантил, феніл, фенетил або циклогексилметил та R_2 — водень або метил

27 Похідні за п. 26, де R_1 — бензил та R_2 — водень

28 Похідні за п. 26, де кожен з R_1 та R_2 вибрано з групи, до якої входять водень, 1-інданіл, піпероніл, 2,6-діфторбензил, індан, бензил, дибензил, 4-метоксибензил, 4-нітробензил, пентафторбензил, фурфуріл, дифенілметил, 4-фенілбензил, 2-фенілбензил, 4-бензилоксибензил та бензофурфуріл

29 Похідні інданону формули



де R — 1-інданіл, піпероніл, 2,6-діфторбензил, індан, бензил, дибензил, 4-метоксибензил, 4-нітробензил, пентафторбензил, фурфуріл, дифенілметил, 4-фенілбензил, 2-фенілбензил, 4-бензилоксибензил або бензофурфуріл

30 Похідні за п. 29, де R є 2,6-діфторбензил

Цей винахід є способом інгібування проліферації клітин за допомогою класу інданонових композицій, застосування яких з цією метою ніколи доти не розглядалось. Як інгібітори проліферації клітин, згадані композиції є придатними для лікування раку, серцево-судинних хвороб, наприклад, рестенозу, реакції відторгнення трансплантату, подагри та інших проліферативних захворювань, а також є потенційними лікарськими засобами для

лікування аутоімунних захворювань, наприклад, ревматоїдного артрити, вовчака, діабету типу I, розсіяного склерозу і тому подібних розладів та захворювань

Мультикаталітична протеїназа або протеосома представляє собою висококонсервативну клітинну структуру, яка несе відповідальність за АТФ-залежний протеоліз більшості клітинних білків. Згадана 20S (700KDa) протеосома включає, як

мінімум, п'ять різних протеолітичних активностей, які мають механізм нового типу, що залучає треоніновий залишок на активній ділянці (Кукс О (Coux O), Танака К (Tanaka K) та Гольдберг А (Goldberg A), 1996 Ann Rev Biochem 65 801-47)

Згадану 20S протеосому було кристалізовано з археобактерії *Thermoplasma acidophilum* (Лоув Дж (Lowe J), Сток Д (Stock D), Джен Б (Jap B), Цвікл П (Zwickl P), Баумінстер В (Bauminster W) та Губер Р (Huber R) 1995 Science 268 533-539). Археобактеріальна 20S протеосома включає сорок копій субодиниць двох різних типів, α та β , які утворюють циліндричну структуру, яка складається з чотирьох штабельованих кілець. До складу кожного з верхнього та нижнього кілець входить сім ос субодиниць, у той час, як внутрішні кільця включають сім β субодиниць. Середня частина згаданої структури має отвір у формі каналу, який вміщує протеолітичні активні ділянки та білки, призначені для розщеплювального проходження через згаданий канал. Еукаріотична 20S протеосома є більш складною, ніж протеосома згаданих археобактерій, оскільки кількість різних субодиниць зросла під час еволюційного розвитку, однак, згадані субодиниці все ще можна класифікувати за номенклатурою α та β археобактерій відповідно до їх гомології. Таким чином, четвертинна структура згаданого еукаріотичного комплексу є подібною до четвертинної структури згаданої археобактерії, яка складається з двох α та двох β кілець. Однак на відміну від археобактеріальної протеосоми, яка демонструє, головним чином, хімотрипсиноподібну протеолітичну активність (Дальманн Б (Dahlmann B), Копп Ф (Kopp P), Кун Л (Kuehn L), Нідель Б (Niedel B), Пфайфер Г (Pfeifer G) 1989 FEBS Lett, 251 125-131, Сіммлер Е (Seemuller E), Лапас А (Lupas A), Цаль Ф (Zuhl R), Цвікл П (Zwickl P) та Баумайстер В (Baumeister W) FEBS Lett 359 173, та Лоув Дж (Lowe J), Сток Д (Stock D), Джен Б (Jap B), Цвікл П (Zwickl P), Баумайстер В (Baumeister W) та Губер Р (Huber R) 1995 Science 268 533-539). Згадана еукаріотична протеосома включає, як мінімум, п'ять протеазних активностей, які піддаються ідентифікуванню. Вони називаються хімотрипсиноподібною, трипсиноподібною та пептидгліутамілпептидогідролізувальною. Було описано також дві інші активності, одна з яких віддає перевагу розщепленню пептидних зв'язків на карбоксильній стороні розгалуженого ланцюгу амінокислот, у той час як інша віддає перевагу зв'язкам між невеликими нейтральними амінокислотами (Орловські М (Orlowski M) 1990 Biochemistry 29 10289-10297).

Незважаючи на те, що згадана 20S протеосома включає протеолітичну центральну частину, вона може розщеплювати білки *in vivo* тільки у комплексі з 19S "шапочкою" на будь-якому кінці цієї структури, яка, сама по собі, включає численні АТФ-азні активності. Згадана більша структура є відомою як 26S протеосома, і вона швидко розщеплює білки, які було визначено як мішені для розщеплення, шляхом додання численних молекул 8,5kDa поліпептиду, убіквітину.

Перший етап у напрямку убіквітинування білку відбувається шляхом активації молекули убіквітину на її карбоксильному кінцевому гліциновому

залишку шляхом додання АТФ, завдяки чому утворюється високоенергетична тіоефірна проміжна сполука. Цей етап каталізується ферментом активації убіквітину, E1. Після цього убіквітин переноситься до активного цистеїнового залишку убіквітин-зв'язувального ферменту, E2. Фермент E2 зв'язує убіквітин з Е-аміногрупами лізинових залишків на субстратному білку, який призначено до розщеплення. Цей процес, у деяких випадках, потребує також убіквітинлігази, E3. Наслідком повторного зв'язування убіквітину з лізиновими залишками попередньо зв'язаних убіквітинових складових є утворення мультиубіквітинових ланцюгів та утворення убіквітинового каркасу довкола згаданого субстратного білку. Мультиубіквітиновані субстратні білки розпізнаються 26S протеосомою та розщеплюються, згадані мультиубіквітинові ланцюги відокремлюються від згаданого комплексу та убіквітин поновно включається до метаболічного циклу.

Механізм процесу, який спричинює убіквітинування білку і, внаслідок цього, його розщеплення, все ще досліджується. Зрозуміло, що це повинна бути високорегульована серія явищ, оскільки точна часова схема розщеплення певних білків є критичною для багатьох функцій клітинного циклу. Було запропоновано декілька сигналів, які зосереджуються головним чином на внутрішніх структурних послідовностях у межах самого субстрату. Однією з таких пропозицій є "правило N-кінцевої ділянки", за яким амінокінцевий залишок білку визначає період його напіврозпаду. До складу інших білків, наприклад, циклінів, входить коротка послідовність висококонсервативних амінокислот, яку називають "блоком знищення", яка, безсумнівно, є необхідною для розщеплення. Крім того, послідовності "PEST", які складаються з ділянок, багатих на пролін, аспартат, глутамат, серин та треонін, також, здається, діють, як сигнали розщеплення. Гадають, що такі внутрішні послідовності діють, як елементи розпізнавання між білковим субстратом та його специфічним комплексом убіквітинування.

Було описано інгібітори двох типів, які інгібують протеолітичну активність протеосоми. Повідомлялось, що певні альдегди пептидів інгібують хімотрипсиноподібну активність, пов'язану з протеосомою (Вініцкі А (Vinitsky A), Міход К (Michaud C), Пауерс Дж (Powers J) та Орловські М (Orlowski M) 1992 Biochemistry 31 9421-9428, Цубуки С (Tsubuki S), Хіроші К (Hiroshi K), Сайто І (Saito Y), Міяшита Н (Miyashita N), Іномата М (Inomata M) та Кавашіма С (Kawashima S) 1993 Biochem Biophys Res Commun 196 1195-1201, Рок КЛ (Rock K L), Грамм К (Gramm C), Ротстайн Л (Rothstein L), Кларк К (Clark K), Стайн Р (Stein R), Дік Л (Dick L), Хванг Д (Hwang D) та Гольдберг АЛ (Goldberg A L) 1994 Cell 78 761-771). Це N-ацетил-L-лейцинил-L-лейцинал-L-норлейцинал (ALLN) та тісно споріднена сполука, N-ацетил-L-лейцинил-L-лейцинил-метіонал (LLM) з K_i, що дорівнює 0,14мкМ. Найбільш активним інгібітором цього типу є структурно споріднена сполука, N-карбобензоксил-L-лейцинил-L-лейцинал-L-норвалінал (MG 115), яка має K_i, що дорівнює 0,021мкМ. Незважаючи на те, що ці альдегди пептидів є найефективнішими проти хімотрипсиноподібно

дібної протеолітичної активності протеосом, результати докладних досліджень показали, що вони є неспецифічними інгібіторами протеаз. У більш свіжих повідомленнях наведено опис ряду активних інгібіторів дипептидів, значення IC_{50} яких знаходиться у межах 10-100 нМ діапазону *in vitro* (Ікбал М. (Iqbal M.), Чаттерджи С. (Chatterjee S.), Кауер Дж. К. (Kauer J. C.), Дас М. (Das M.), Мессіна П. (Messina P.), Фрід Б. (Freed B.), Біаццо В. (Biazzo W.), Зімен Р. (Siman R.) 1995 J. Med. Chem. 38 2276-2277) та ряду інгібіторів з числа дипептидів, які є похідними α -кетокрбонільного та борного ефірів, які мають подібну ж активність *in vitro* (Ікбал М. (Iqbal M.), Чаттерджи С. (Chatterjee S.), Кауер Дж. К. (Kauer J. C.), Малламо Дж. П. (Mallamo J. P.), Мессіна П. А. (Messina P. A.), Рейболдт А. (Reiboldt A.) та Зімен Р. (Siman R.) 1996 Bioorg. Med. Chem. Lett. 6 287-290).

У іншому повідомленні наведено опис класу сполук, які демонструють специфічність відносно інгібування активності протеосом (Фентені Г. (Fenteany G.), Стандерт Р. Ф. (Standaert R. F.), Лейн В. С. (Lane W. S.), Чі С. (Choi S.), Корі Е. Дж. (Corey E. J.) та Шрайбер С. Л. (Schreiber S. L.) 1995 Science 268 726-731). Лактацистин є метаболітом *Streptomyces* який, зокрема, пригнічує протеолітичну активність протеосомного комплексу. Цю молекулу, початково, було відкрито завдяки її здатності до індукування розростання невритів у лінії нейробластомних клітин (Омура (Omura) та інші, 1991 J. Antibiot. 44 113), пізніше була показана її здатність до інгібування проліферації клітин декількох типів (Фентені (Fenteany) та інші, 1994 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91 3358). Шляхом проведення досліджень зв'язування з застосуванням лактацистину з радіоактивною міткою (Фентені (Fenteany) та інші, 1995 Science 268 726-731) було встановлено ділянку зв'язування та механізм дії. Результати цих досліджень показали, що лактацистин необоротно зв'язується з тріоніновим залишком, який знаходиться на амінокінцевій ділянці β -субодиниці згаданих протеосом. Було досліджено також ряд аналогів, які базуються на структурі лактацистину (Фентені (Fenteany) та інші, 1995 Science 268 726-731). Результати згаданих досліджень вказують на те, що β -лактонова структура була обов'язковою для їх інгібіторної активності.

Зараз точно встановлено, що протеосома є головною позалізосомальною протеолітичною системою, яку залучено до розщеплювальних шляхів, наслідком чого є численні та різноманітні клітинні функції, наприклад, поділ клітин, обробка антигену та розщеплення регуляторних білків скороченого строку існування, наприклад, транскрипційних факторів, онкогенних продуктів та циклінів (див огляд Січановера А. (Sicchanover A.) 1994 Cell 79 13-21). Головною функцією протеосоми є каталіз протеолізу білків до невеликих пептидів. Однак було продемонстровано також, що згаданий убівктин-протеосомний шлях може каталізувати регульоване протеолітичне перетворення великого неактивного попередника на активний білок. Найкраще задокументованим подібним випадком є активація транскрипційного фактору NF- κ B (Паломбелла В. Дж.

(Palombella V. J.), Рандо О. Дж. (Rando O. J.),

Гольдберг А. Л. (Goldberg A. L.) та Маніатіс Т. (Maniatis T.) 1994 Cell 78 773-785). Активною формою NF- κ B є гетеродимер, який складається з p65 та p50 субодиниць. Останні є присутніми у цитозолі клітини у вигляді неактивного попередника, зокрема, p105, який представляє собою 105 кДа поліпептидний попередник p50. Протеолітичне перетворення p105 з утворенням p50 відбувається убівктин-протеосомним шляхом. На додаток до цього, перетворені p50 та p65 зберігаються у цитозолі у вигляді неактивного комплексу з інгібувальним білком I κ B. Сигнали запалення активують NF- κ B ініціюванням сигнального шляху для повного розщеплення I κ B, а також стимулюють перетворення p105 на p50. Таким чином, для індукованої активації NF- κ B необхідними є два протеолітичних явища, причому обидва з них регулюються убівктин-протеосомним шляхом. Невідомо, чим викликається закінчення протеолізу p105 з подальшим утворенням p50, однак було запропоновано, що конформація p50 робить його стійким до подальшого перетворення і викликає його відокремлення від 26S комплексу. Той факт, що протеосома відіграє критичну роль у активації NF- κ B, може знайти клінічне застосування шляхом використання інгібіторів, спрямованих на протеосомний протеоліз. Під час деяких захворювань нормальне функціонування активного NF- κ B може бути шкідливим для здоров'я людини, що спостерігається під час запальних реакцій після бактеріальної, грибкової або вірусної інфекції. Таким чином, інгібітори активації NF- κ B, внаслідок своєї здатності до запобігання секретуванню цитокінів, можуть мати потенційну придатність при лікуванні гострого респіраторного дистрес-синдрому (ARDS) та СНІДу. Оскільки активація NF- κ B є також необхідною умовою ангиогенезу, протеосомні інгібітори можуть бути придатними для лікування хвороб, які пов'язані з аномальною неоваскуляризацією.

p53 вперше було описано, як онкобілок, однак, з того часу було показано, що він є залученим до багатьох клітинних процесів (див огляд Ко Л. Дж. (Ko L. J.) та Провза К. (Proves C.) 1996 Genes Dev. 10, 1054-1072). Було показано, що p53 індукуює апоптоз у декількох ліній гематопоетичних клітин (Орен М. (Oren M.) 1994 Semin. Cancer Biol. 5, 221-227) за посередництва двох багатьох різних стимулів, у тому числі, пошкодження ДНК, вірусної інфекції та видалення факторів росту. Важливо, однак, прийняти до уваги те, що апоптоз може бути індуковано незалежним від p53 шляхом, наприклад, дією глюкокортикоїдів. Наслідком індукування p53 є припинення росту клітини на етапі G1 клітинного циклу, а також загибель клітини внаслідок апоптозу. Обидві згадані функції дозволяють p53 контролювати пошкодження ДНК, внаслідок чого зменшується поширення мутацій ДНК під час поділу клітин. p53 затримує клітини на етапі G1 шляхом індукування циклін-залежного інгібітору кінрази, p21, що, у свою чергу, викликає накопичення гіпофосфорильованої форми продукту ретинобластомного гену. Гадають, що p53 виконує роль фактору перевірки у клітині після пошкодження ДНК. Він першим викликає припинення поділу клітини та апоптоз. Відомо, що розщеплення p53 відбувається убівктин-протеосомним шляхом, і припинення

розщеплення р53 є можливим способом індукції апоптозу. Іншу потенційну придатність протеосомних інгібіторів може становити їх використання для лікування хвороб, які є наслідком аномальної проліферації клітин.

Добре задокументованим є той факт, що убіквітин-протеосомний шлях є критичним для регульованого руйнування циклінів, які керують виходом з митозу та забезпечують перехід клітини до наступної фази клітинного циклу. Таким чином, інгібувальне розщеплення циклінів шляхом застосування протеосомних інгібіторів викликає припинення росту. Іншу потенційну придатність протеосомних інгібіторів, таким чином, може становити їх придатність для лікування хвороб, які є наслідком прискореного поділу клітин. До таких хвороб належить рак, серцевосудинні хвороби, наприклад, міокардит, рестеноз, який є наслідком пластичної операції на судинах, хвороби нирок, наприклад, вовчак, полікістозна хвороба нирок, грибові інфекції, дерматологічні хвороби, наприклад, псоріаз, аномальне загоєння ран, келоїди, імунологічні хвороби, наприклад, аутоімунітет, астма та алергія, гостра алергічна реакція та алергічна реакція уповільненого типу, реакції "трансплантат проти хазяїна", реакції відторгнення трансплантату та нейроімунологічні хвороби, наприклад, розсіяний склероз та гострий розсіяний енцефаломієліт.

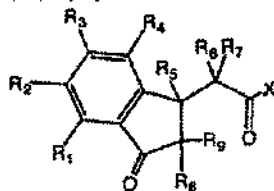
Ціллю цього винаходу є надання способу інгібування проліферації клітин у ссавців, який включає використання терапевтичної ефективної кількості композиції, властивості якої щодо інгібування проліферації клітин раніше були невідомими.

Ціллю цього винаходу є надання способу ефективного лікування хвороб, які є наслідком прискореного поділу клітин.

Іншою ціллю цього винаходу є надання способу лікування проліферативних хвороб, суть якого становить інгібування розщеплення протеосомних інгібіторів.

Іншою ціллю цього винаходу є застосування терапевтичної ефективної кількості згаданої композиції для інгібування розладів проліферації клітин у людей.

За одним з варіантів втілення цей винахід є способом інгібування проліферації клітин у ссавців, який включає введення згаданому ссавцю терапевтичної ефективної кількості сполуки, яка має формулу

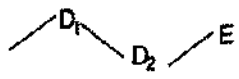


У згаданій сполуці кожен з R_1 - R_4 індивідуально вибирають з групи, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл,

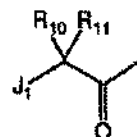
алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано.

Кожен з R_5 - R_8 індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, оксо, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкіл алкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано.

X вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, $-D_1$, $-D_2$, $-E$, $-D_1-E$, $-D_2-E$, $-D_1-D_2$ або сполука, яка має формулу

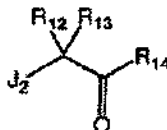


де кожен з D_1 та D_2 індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить сполука, яка має формулу



або водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл або алкілциклогетероалкіл,

де E вибирають з групи сполук, до складу якої входить



або водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл або алкілциклогетероалкіл.

У разі, якщо D_1 , D_2 та/або E вибирають з посеред сполук, які включають замісників R_{10} , R_{14} , J_1 та J_2 , тоді кожен з R_{10} - R_{14} індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, оксо, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано та кожен з J_1 та J_2 індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить N- R_{15} , CR_{16} , R_{17} , O, S-(O) $_{0-2}$, P-(O) $_{0-3}$, де кожен з R_{15} - R_{17} може індивідуально вибиратись з групи, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, оксо, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений

ний гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл або ціано

Згадані композиції є придатними, у разі введення у терапевтичних кількостях, для лікування ссавців, і, переважно, для лікування людей, які страждають на клітинні проліферативні розлади, інфекційні хвороби та імунологічні захворювання

Опис фігур

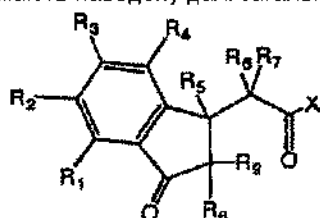
На фігурах, які додаються

Фіг 1 - аналіз імунореактивності за допомогою вестерн-блотингу з застосуванням анти-IkBa анти-тіл екстракту клітин лінії RAW, які було піддано обробці сполуками 173 та 187, опис яких наведено у Таблицях 1 та 2,

Фіг 2 - аналіз імунореактивності за допомогою вестерн-блотингу з застосуванням анти-P50 анти-тіл екстрактів клітин лінії RAW, які, перед обробкою ліпополісахаридами, було піддано обробці сполукою 187, опис якої наведено у Таблицях 1 та 2,

Фіг 3 - аналіз зсуву рухливості у гелі з використанням ядерного екстракту, який було одержано з клітин лінії RAW, які, перед обробкою ліпополісахаридами, було піддано обробці сполукою 187, опис якої наведено у Таблицях 1 та 2,

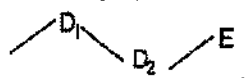
Цей винахід є способом інгібування клітинних проліферативних розладів, інфекційних хвороб та імунологічних захворювань у ссавців і, зокрема, у людей, з застосуванням композицій, які мають наведену далі загальну формулу



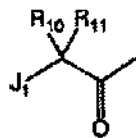
У згаданій сполуці кожен з R₁-R₄ індивідуально вибирають з групи, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, оксо, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано

У згаданій композиції кожен з R₅-R₉ індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, оксо, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано

X вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, -D₁, -D₂, -E, -D₁-D₂, -D₁-E₁, -D₂-E або сполука, яка має формулу

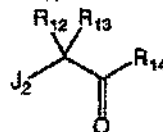


де кожен з D₁ та D₂ індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить



водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл або алкілциклогетероалкіл, та

де E вибирають з групи сполук, до складу якої входить



водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл або алкілциклогетероалкіл

У сполук, які було визначено перед тим, кожен з R₅-R₉ індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано

У разі, якщо D₁, D₂ та/або E вибирають з посеред сполук, які включають замісників R₁₀-R₁₄, J₁ та J₂, тоді кожен з R₁₀-R₁₄ індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, тиол, оксо, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкеніл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, нітро або ціано, та кожен з J₁ та J₂ індивідуально вибирають з групи сполук, до складу якої входить N-R₁₅, CR₁₆R₁₇, O, S-(O)₀₋₂, P-(O)₀₋₃ де кожен з R₁₅-R₁₇ індивідуально заміщується компонентом, який вибирають з групи, до складу якої входить водень, галоген, гідроксил, оксо, тиол, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкініл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкокси, алкілтіо, ацил, арилокси, аміно, амід, карбоксил, арил, заміщений арил, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероцикл, гетероалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл або ціано

Наведені далі терміни використовують для опису різних складових згадані хімічної композиції, придатної у способі за цим винаходом. Згадані терміни визначаються таким чином

Згаданий термін "галоген" означає атоми фтору, бром, хлору або йоду

Згаданий термін "гідроксил" означає групу -OH

Згаданий термін "оксо" означає групу =O

Згаданий термін "тіол" або "меркапто" означає групу -SH та -S(O)0-2

Згаданий термін "нижчий алкіл" означає циклічну алкілну групу з розгалуженим або прямим ланцюгом, який складається з одного-десяти атомів вуглецю. Як додаткові приклади до пояснення цього терміну, наводяться такі групи, як метил, етил, n-пропіл, i-пропіл, n-бутил, t-бутил, i-бутил (або 2-метилпропіл), циклопропілметил, i-аміл, n-аміл, гексил і т.ін.

Згаданий термін "заміщений нижчий алкіл" означає нижчий алкіл, опис якого було наведено щойно перед тим, який включає одну або декілька таких груп, як гідроксил, тіол, алкілтіол, галоген, алкокси, аміно, амід, карбоксил, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, гетероцикл, циклогетероалкіл, заміщений циклогетероалкіл, ацил, карбоксил, арил, заміщений арил, арилокси, гетарил, заміщений гетарил, аралкіл, гетероаралкіл, алкілалкеніл, алкілалкініл, алкілциклоалкіл, алкілциклогетероалкіл, ціано. Ці групи можуть приєднуватись до будь-якого атому вуглецю нижчої алкільної складової.

Згаданий термін "алкеніл" означає групу -CR'=CR''R''', де кожен з R', R'', R''' вибирають з-посеред водню, галогену, нижчого алкілу, заміщеного нижчого алкілу, ацилу, арилу, заміщеного арилу, гетероарилу, заміщеного гетероарилу або т.п., як визначено.

Згаданий термін "алкініл" означає групу -C≡C-R', де R' вибирають з-посеред водню, галогену, нижчого алкілу, заміщеного нижчого алкілу, ацилу, арилу, заміщеного арилу, гетероарилу, заміщеного гетероарилу або т.п., як визначено.

Згаданий термін "алкілалкеніл" означає групу -R-CR'=CR''R''', де R - нижчий алкіл або заміщений нижчий алкіл, кожен з R', R'', R''' може незалежно обиратись з-посеред водню, галогену, нижчого алкілу, заміщеного нижчого алкілу, ацилу, арилу, заміщеного арилу, гетарилу або заміщеного гетарилу, як визначено далі.

Згаданий термін "алкілалкініл" означає групу -RC≡CR', де R - нижчий алкіл або заміщений нижчий алкіл, R' - водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, ацил, арил, заміщений арил, гетероарил або заміщений гетероарил, як визначено далі.

Згаданий термін "алкокси" означає групу -OR, де R - нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, ацил, арил, заміщений арил, аралкіл, заміщений аралкіл, гетероалкіл, гетероарилалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, циклогетероалкіл або заміщений циклогетероалкіл, як визначається далі.

Згаданий термін "алкілтіо" означає групу -SR, -S(O)_{n=1-2}-R, де R - нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арилалкіл або заміщений аралкіл, як визначено далі.

Згаданий термін "ацил" означає групи -C(O)R, де R - водень, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, арил, заміщений арил і т.ін., як визначається далі.

Згаданий термін "арилокси" означає групи -OAr, де Ar - арил, заміщений арил, гетероарил або заміщена гетероарильна група, як визначається далі.

Згаданий термін "аміно" означає групу -NRR', де R та R' незалежно можуть бути воднем, нижчим алкілом, заміщеним нижчим алкілом, арилом, заміщеним арилом, гетероарилом, циклоалкіл ом або заміщеним гетероарилом, як визначається далі, або ацилом.

Згаданий термін "амід" означає групу -C(O)NRR', де R та R' незалежно можуть бути воднем, нижчим алкілом, заміщеним нижчим алкілом, арилом, заміщеним арилом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, як визначається далі.

Згаданий термін "карбоксил" означає групу -C(O)OR, де R може бути, незалежно, воднем, нижчим алкілом, заміщеним нижчим алкілом, арилом, заміщеним арилом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом і т.ін., як визначено.

Згаданий термін "арил" або "Ar" означає ароматичну карбоциклічну групу, яка має як мінімум одне ароматичне кільце (наприклад, феніл або дифеніл), або численні сконденсовані кільця, з-посеред яких як мінімум одне кільце є ароматичним (наприклад, 1,2,3,4-тетрагідронафтил, нафтил, антрил або фенантрил).

Згаданий термін "заміщений арил" означає арил, факультативно заміщений однією або декількома функціональними групами, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, нижчим алкокси, нижчим алкілтіо, трифторметилом, аміно, амід, карбоксил, гідроксидом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "гетероцикл" означає насичену, ненасичену або ароматичну карбоциклічну групу, яка має одне кільце (наприклад, морфоліно, піридил або фурил) або численні сконденсовані кільця (наприклад, нафтопіридил, хіноксаліл, хінолініл, індопізініл або бензо[b]тієніл) та як мінімум один гетероатом, наприклад, N, O або S у згаданому кільці, який може, факультативно, бути заміщеним або заміщеним, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, нижчим алкокси, нижчим алкілтіо, трифторметилом, аміно, амід, карбоксил, гідроксидом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згадані терміни "гетероарил" або "гетар" означають гетероцикл, у якому як мінімум одне гетероциклічне кільце є ароматичним.

Згаданий термін "заміщений гетероарил" означає гетероцикл, факультативно, моно або полізаміщений однією або декількома функціональними групами, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, нижчим алкокси, нижчим алкілтіо, трифторметилом, аміно, амід, карбоксил, гідроксидом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетеролом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "аралкіл" означає групу -R-Ar, де Ar - арильна група та R - нижчий алкіл або заміщена нижча алкільна група. Арильна група може, факультативно, бути незаміщеною або замі-

щеною, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, алкокси, алкілтіо, трифторметилом, аміно, амідом, карбоксилом, гідроксилом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщений гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "гетероалкіл" означає групу -R-Het, де Het -гетероциклічна група та R - нижча алкільна група. Гетероалкільні групи можуть, факультативно, бути незаміщеними або заміщеними, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, нижчим алкокси, нижчим алкілтіо, трифторметилом, аміно, амідом, карбоксилом, гідроксилом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіол, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "гетероарилалкіл" означає групу -R-HetAr, де HetAr -гетероарильна група та R - нижчий алкіл або заміщений нижчий алкіл. Гетероарилалкільні групи можуть, факультативно, бути незаміщеними або заміщеними, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, заміщеним нижчим алкілом, алкокси, алкілтіо, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "циклоалкіл" означає двовалентну циклічну або поліциклічну алкільну групу, до складу якої входить від 3 до 15 атомів вуглецю. У разі поліциклічних груп, це можуть бути численні сконденсовані кільця, у яких одне зі згаданих дистальних кілець може бути ароматичним (наприклад, інданіл, тетрагідронафталін і т.ін.).

Згаданий термін "заміщений циклоалкіл" означає циклоалкільну групу, яка включає один або декілька замісників, наприклад, галоген, нижчий алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкокси, алкілтіо, арил, арилокси, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероарил, нітро, ціано, алкілтіо, тіол, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "циклогетероалкіл" означає циклоалкільну групу, де один або декілька атомів вуглецю кільця заміщено гетероатомом (наприклад, N, O, S або P).

Згаданий термін "заміщений циклогетероалкіл" означає циклогетероалкільну групу, визначення якої наведено у цьому описі, до складу якої входить один або декілька замісників, наприклад, галоген, нижчий алкіл, нижчий алкокси, нижчий алкілтіо, трифторметил, аміно, амідом, карбоксил, гідроксил, арил, арилокси, гетероцикл, гетероарил, заміщений гетероарил, нітро, ціано, алкілтіо, тіол,

сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "алкілциклоалкіл" означає групу -R-циклоалкіл, де циклоалкіл є циклоалкільною групою, а R - нижчий алкіл або заміщений нижчий алкіл. Циклоалкільні групи можуть бути, факультативно, незаміщеними або заміщеними, наприклад, галогеном, нижчим алкілом, нижчим алкокси, нижчим алкілтіо, трифторметилом, аміно, амідом, карбоксилом, гідроксилом, арилом, арилокси, гетероциклом, гетероарилом, заміщеним гетероарилом, нітро, ціано, алкілтіо, тіолом, сульфамідом і т.ін.

Згаданий термін "амінокислота" означає D- або L- ізомер природних або синтетичних альфа-амінокислот, у переважному варіанті, згаданими амінокислотами є природні амінокислоти аланін, аргінін, аспарагін, аспарагінова кислота, цистеїн, глутамін, глутамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, тирозин або валін.

У типовому випадку D₁, D₂ та E, у разі їх присутності у згаданій композиції, можуть бути амінокислотами Перевага, як правило, надається ліпофільним амінокислотам. Взагалі, скорочення амінокислот відповідають визначенням.

Об'єднаної Комісії по Біохімічній Номенклатурі ІЮПАК-ІЮБ, як описано у Eur. J. Biochem., 158, 9 (1984).

У переважному варіанті R₃ - метокси, -D₁ - лейцин, -D₂ - лейцин, E - NR'R". У найпереважнішому варіанті, -D₁ - 1-лейцин, -D₂ - d-лейцин, E вибирають з групи сполук, до складу якої входить бензиламін, 1-інданіламін, N,N'-добензиламін, 2,6-дифторбензиламін, 4-метоксибензиламін, піпероніламін, NH₂ та гліцинамід.

У одній з переважних композицій R₃ - метокси, D₁ - лейцин, D₂ - лейцин, E - бензиламін. У іншій переважній композиції R₃ - метокси, D₁ - лейцин, D₂ - лейцин, E - 1-інданіламін. У ще іншій переважній композиції R₃ - метокси, D₁ - лейцин, D₂ - лейцин, E - N,N'-добензиламін. У іншій переважній композиції, R₃ - метокси, D₁ - лейцин, D₂ - лейцин та E - 2,6-дифторбензиламін.

У цих переважних композиціях додаткова перевага надається тому, що D₁ - L-лейцин, D₂ - D-лейцин. Відомі сполуки, які можуть бути придатними у згаданому терапевтичному способі за цим винаходом, розкриваються у Таблиці 1, яка наводиться безпосередньо після цього.

Таблиця 1

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	D1
	Cl			Me					OH
		OMe	OMe				=N-OH		OMe
				Ph					Me
	Cl			Me			=N-OH		OEt
	OMe								OH
							Me		OMe
F		F							NH2
									NHEt
					Ph		=CHPh		OH
		F							OH
									OH
		OMe		Me					OH
	Me			Me					OH
				Ph			=N-OH		OMe

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	D1
		OMe					=CH-(4- диметил- амінофеніл		OH
	OMe						=N-OH		OMe
				Ph			COOEt		Me
				Me			=N-OH		OEt
					Me				OMe
	Cl			Me			NHCOCOOEt		OH
		OMe	OMe						OEt
				Me					OH
F		F							Me
									OH
				Ph					NHMe
		OMe		Me			=N-OH		OH
		OMe							OMe
				Me			NHAc		OH
				Ph	Ph		Ph		OMe
									OH
				Ph					NHn-пропіл
	OMe	OMe							OH
				Ph					OH
				COO Me					OMe
	OMe	OMe					=N-OH		OMe
				Ph					OMe
	Cl			Me					OEt
		OMe	OMe						OMe
							Me		OH
				Me			NHCOCOOEt		OEt
									NH-n-пропіл
OMe			NO2						OH
		F							Cl
		OMe							OMe
		OMe		Me			=N-OH		OMe
		OMe		Me					OMe
	Me			Me					OMe
		F					Me		OH
					4- метокси- феніл				OH
				Ph	CN		=N-OH		OMe
				Me			COOEt		OEt
									OH
	OMe								OMe
		OMe							4[[4-(1- метилетил)-1- піперазиніл]ка р-боніл] фенокси
	Cl			Me			NH2		OEt

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	D1
		Me							OH
							Me		OH
F		F							Cl
				Ph					OMe
		OMe					=N-OH		OH
				2-нафтил					OMe
		OMe		Me					OMe
				Ph	Ph		Ph		OMe
				Ph					NH-n-пропіл
		Me			Ph		=N-OH		OMe
		OMe			Ph				OH
				Ph	SH		=N-OH		OMe
				Ph	SH		COOEt		OH
	Cl			Me					OH
	OMe	OMe			Me				OMe
				Me	Me				OH
				Me			NH2		OEt
									NH-n-бутил
	NO2	OMe							OH
		F							NH2
				Ph			Me		OH
		OMe							OH
	Me			Me			3-пропанова кислота	3-пропанова кислота	OMe
				Me					OH
	OMe			Me	Ph				OMe
		OMe		Ph					OH
				Me					NHMe
				Ph			=N-OH		OMe
				Ph	COOEt		COOEt		OEt
		OMe		COO Me					OMe

Фахівцю у цій галузі відомо, що стереоізомери згаданих композицій, опис яких наведено тут, а також ізомери та стереоізомери компонентів, які складають згадані композиції, які визначено у цьому описі, входять до об'єму композицій, які є придатними у згаданому терапевтичному способі за цим винаходом.

У разі, якщо до складу сполуки, придатної для згаданого способу за цим винаходом, входить основна група, може бути одержана сіль згаданої сполуки, яку одержують шляхом додання кислоти. Солі згаданих сполук за цим винаходом, які одержують доданням кислоти, одержують стандартним шляхом у відповідному розчиннику з вихідної сполуки та надлишку кислоти, наприклад, хлористоводневої, бромистоводневої, сірчаної, фосфорної, оцтової, малеїнової, бурштинової або метансульфонової. У разі, якщо до складу згаданої кінцевої сполуки входить кислотна група, можуть бути одержані катіонні солі згаданої сполуки. У типовому випадку вихідну сполуку обробляють надлишком лужного реактиву, наприклад, гідроксиду, карбонату або алкоксиду, до складу якого входить відповідний катіон. Прикладами катіонів, присутніх у фармацевтичних прийнятних солях, є такі катіони, як Na^+ , K^+ , Ca^{+2} та NH_4^+ . Певні зі згаданих сполук утворюють внутрішньокмплесні солі або цвтеріони, які також можуть бути прийнятними.

Згадані сполуки, опис яких наведено перед тим, є придатними для лікування клітинних проліферативних розладів, інфекційних хвороб та імунологічних захворювань у ссавців, зокрема, у людей, які потребують такого лікування. До клітинних проліферативних розладів, які можуть лікуватись за допомогою композиції, опис якої наведено пе-

ред тим, належать рак, серцевосудинні захворювання, наприклад, міокардит та рестеноз, який є наслідком пластичної операції на судинах, хвороби нирок, наприклад, вовчак та полікістозна хвороба нирок, реакція відторгнення трансплантату, подагра та інші проліферативні розлади. До аутоімунних захворювань, які можуть лікуватись за допомогою композиції, опис якої було наведено перед тим, належить ревматоїдний артрит, вовчак, діабет типу I, розсіяний склероз та тому подібні розлади та захворювання. До інфекційних хвороб, які можуть лікуватись за допомогою композиції, опис якої було наведено перед тим, належить запальна хвороба прямої кишки, хвороба Крона, СНІД, гострий респіраторний дистрес-синдром і тому подібні розлади. Згадані композиції, опис яких наведено перед тим, можуть також бути використані для лікування грибкових інфекцій, дерматологічних захворювань, наприклад, псоріазу, аномального загоювання ран, келодів, імунологічних захворювань, наприклад, аутоімунітету, астми, алергії, гострої алергічної реакції, алергічної реакції уповільненого типу, реакції "трансплантат проти хазяїна", відторгнення трансплантату та нейроімунологічної хвороби, наприклад, розсіяного склерозу та гострого розсіяного енцефаломієліту.

Згаданий спосіб лікування цих хвороб та розладів включає парентеральне або пероральне введення ефективною кількістю обраної сполуки або їх комбінації, у переважному варіанті, диспергованої у фармацевтичному носії. Стандартні дозовані форми згаданого активного інгредієнту взагалі вибирають у діапазоні від 0,01мг/кг до 100мг/кг, однак вони будуть легко визначатись фахівцем у цій галузі у залежності від шляху вве-

дення, віку та стану пацієнта. Згадані стандартні дози можуть вводитись від одного до десяти разів на день у разі гострого або хронічного захворювання. Ніякі неприйнятні токсикологічні ефекти не очікуються у разі, якщо сполуки за цим винаходом вводяться у відповідності до цього винаходу.

Фармацевтичні композиції, до складу яких входять згадані сполуки за цим винаходом або їх похідні, можуть виготовлятися у вигляді розчинів або ліофілізованих порошків для парентерального введення. Порошки можуть відновлюватися шляхом додання придатного розчинника або іншого фармацевтичного прийнятного носія перед використанням. Рідка лікарська форма, взагалі, представляє собою забуферений ізотонічний водний розчин. Прикладами придатних розріджувачів є нормальний ізотонічний фізіологічний розчин, стандартний 5% розчин декстрози у воді або забуферений розчин ацетату натрію або амонію. Така лікарська форма є особливою придатною для парентерального введення, однак її можна використовувати також для перорального введення. Може виникнути необхідність додання наповнювачів, наприклад, полівінілпіролідону, желатини, гідроксицелюлози, аравійської камеді, поліетиленгліколю, маніту, хлориду натрію або цитрату натрію. У альтернативному варіанті згадані сполуки можуть інкапсулюватися, таблетуватися або виготовлятися у формі емульсії або сиропу для перорального введення. Фармацевтичне прийнятні тверді або рідкі носії можуть додаватися для підсилення або стабілізування згаданої композиції або для покращення виготовлення згаданої композиції. До рідких носіїв належать сироп, арахісова олія, оливкова олія, гліцерин, фізрозчин, спирти та вода. До твердих носіїв належать крохмаль, лактоза, сульфат кальцію, дигідрат, сульфат кальцію (гіпс), стеарат магнію або стеаринова кислота, тальк, пектин, аравійська камедь, агар або желатина. Згадані носії можуть включати також матеріал уповільненого виділення, наприклад, моностеарат гліцерилу або дистеарат гліцерилу, самотійно або у суміші з воском. Кількість твердого носія змінюється але у переважному варіанті становить від приблизно 20 мг до приблизно 1 граму на стандартну дозу. Фармацевтичні дозовані форми виготовляють за допомогою традиційних способів, які застосовують у фармації, до яких належать помел, змішування, гранулювання та пресування, за потребою, до таблетованих форм, або помел, змішування та заповнення до твердих желатинових капсульованих форм. У разі використання рідкого носія згадана лікарська форма буде мати вигляд сиропу, еліксиру, емульсії або водної або неводної суспензії. Така рідка лікарська форма може вводитись безпосередньо *per os* або заливатися до м'якої желатинової капсули.

Приклад 1

Згадані сполуки, придатні для використання у згаданому терапевтичному способі за цим винаходом, одержують традиційними методами органічної хімії. Реактиви сполучення є добре відомими у цій галузі техніки, наприклад, DCC (дициклогексилкарбодімід) та інші карбодіміди, EDC (етилдиметиламінопропілкарбодіміду гідрохлорид), BOP (бензілоктилфталат) та PPA (поліпарабанова ки-

слота), і вони можуть, факультативно, бути застосованими з іншими реактивами, наприклад, HOBT (гідроксибензотриазиду дигідрат), NMM (нітрометилметакрилат), DMAP (диметиламінопіридин), які можуть полегшити проходження згаданої реакції. Одержання сполук згаданої формули (1), де D₁, D₂ та E є амінокислотами, є добре відомим у цій галузі і здійснюється за допомогою традиційних розчинних або твердофазних методів, як описано у Боданскі (Bodanszky), "The Practice of Peptide Synthesis", видавництво Springer-Verlag, перше видання, 1984. Придатними захисними групами для згаданої аміногрупи є групи, розкриті Грінном (Greene) та іншими, "Protective Group in Organic Synthesis", друге видання, видавництво John Wiley and Sons, Нью-Йорк, 1991. Особливо придатними амінозахисними групами є бензілоксикарбоніл, t-бутоксикарбоніл та фторенілметоксикарбонільні групи.

Твердофазний синтез пептидів здійснюється таким чином. Амідну смолу (компанія Rink) вміщують до шприца, спорядженого фритовим фільтром. Згадану смолу позбавляють захисту за допомогою 20% розчину піперидину у DMF. Через 20 хвилин згадану смолу промивають п'ять разів DMF, п'ять разів метанолом, потім п'ять разів DMF. Розчин амінокислоти (E), карбодіміду та HOBT у DMF втягують до згаданого шприца і згадана реакційна суміш перемішується впродовж 4-20 годин. Після цього реакційний розчин випускають зі згаданого шприца і одержану суміш промивають п'ять разів DMF, п'ять разів метанолом, потім п'ять разів DMF. Згаданий цикл повторювали доти, доки не було приєднано необхідну послідовність. Як кінцевий реактив сполучення було використано суміш 5-метокси-1-інданон-3-оцтової кислоти, карбодіміду та HOBT. Після кінцевих промивань згаданої смоли пептидний фрагмент було відщеплено від згаданої смоли за допомогою суміші 95% TFA/5% води. Концентрація згаданої відщеплювальної суміші забезпечила одержання твердої речовини білого кольору.

Приклад 2

Сполуки за цим винаходом, які було одержано за способом Прикладу 1, було піддано випробуванню таким чином. 20S каталітичну субодиночку згаданого протеосоми (відому також, як мультікаталітичний протеїназний комплекс) очисили до однорідного стану з головного мозку великої рогатої худоби за методами, наведеними у літературних джерелах (Вілк С. (Wilk S.) та Орловські М. (Orlowski M.), 40 842 J. Neurochem (1983)). Хімотриптична активність згаданого комплексу визначається підвищенням флуоресценції після відщеплення згаданого субстратного білку сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-аміно-4-метилкумарину. До складу стандартної суміші для аналізу *in vitro* входить 2 мкг 20S протеосоми, 0,1-100 мкг/мл інгібітору протеосоми у 200 мкл 50 мм ГЕПЕС-буферу, до складу якого входить 0,1% додецилсульфату натрію, pH 7,5. Згадану протеолітичну реакцію започатковують додаванням 50 мм флюорогенного пептидного субстрату з подальшим проходженням впродовж 15 хвилин при температурі 37°C. Згадану реакцію припиняли доданням 100 мкл 100 мм ацетатного буферу, pH 4,0.

Швидкість протеолізу є прямо пропорційною до кількості вивільненого амінометилкумарину, яка визначається засобами флуоресцентної спектро-

скопії (EX 370 нм, EM 430 нм) Структуру перевірених сполук, а також результати іспитів наведено у Таблиці 2, яку представлено далі

Таблиця 2

Сполука	R3	D1	D2	E	IC ₅₀ мкг/ мл
1	MeO	d-leu-NH ₂			5
2	MeO	d-leu	d-leu-NH ₂		1
3	MeO	leu-NH ₂			>10
4	MeO	d-leu	his-NH ₂		>10
5	MeO	leu	leu-NH ₂		>10
6	MeO	d-leu	leu-NH ₂		>10
7	MeO	leu	d-leu-NH ₂		>10
8	MeO	Nle-NH ₂			>10
9	MeO	d-Nle-NH ₂			>10
10	MeO	Nva-NH ₂			>10
11	MeO	d-leu	Aib-NH ₂		>10
12	MeO	d-phe-NH ₂			>10
13	MeO	CHA	Leu-NH ₂		>10
14	MeO	phe	leu-NH ₂		>10
15	MeO	Nle	d-Leu-NH ₂		>10
16	MeO	Nle	leu-NH ₂		>10
17	MeO	leu	leu	gly-NH ₂	>10
18	MeO	d-leu	leu	gly-NH ₂	5
19	MeO	d-leu	d-leu	gly-NH ₂	>10
20					
21	MeO	leu	d-leu	gly-NH ₂	0,1
22	MeO	d-Nle	d-leu-NH ₂		>10
23	MeO	d-Nle	leu-NH ₂		>10
24	MeO	phe-NH ₂			>10
25	MeO	Tic-NH ₂			>10
26	MeO	Tic	d-leu-NH ₂		>10
27	MeO	d-phe	d-leu-NH ₂		10
28	MeO	leu	Aib-NH ₂		>10
29	MeO	CHA-NH ₂			>10
30	MeO	d-val	d-leu-NH ₂		>10
31	MeO	d-pro	d-leu-NH ₂		10
32	MeO	d-cha	d-leu-NH ₂		>10
33	MeO	d-leu	d-val-NH ₂		>10
34	MeO	d-val	d-val-NH ₂		>10
35	MeO	d-cha	d-cha-NH ₂		>10
36	MeO	d-phg-NH ₂			>10
37	MeO	d-phg	d-leu-NH ₂		>10
38	MeO	бензил			>10
39	MeO	дибензиламін			>10
40	MeO	gly	gly	gly-NH ₂	>10
41	MeO	leu	gly	gly-NH ₂	>10
42	MeO	gly	d-leu	gly-NH ₂	>10
43	MeO	nle	d-leu	gly-NH ₂	>10
44	MeO	nva	d-leu	gly-NH ₂	>10
45	MeO	phe	d-leu	gly-NH ₂	>10
46	MeO	cha	d-leu	gly-NH ₂	>10
47	MeO	val	d-leu	gly-NH ₂	>10

Сполука	R3	D1	D2	E	IC ₅₀ мкг/ мл
48	MeO	phg	d-leu	gly-NH2	>10
49	MeO	pro	d-leu	gly-NH2	>10
50	MeO	leu	d-leu	gly-NH2	0,5
51	MeO	leu	d-leu	gly-NH2	0,5
52	MeO	d-leu	ala-NH2		>10
53	MeO	d-leu	d-ala-NH2		>10
54	MeO	d-leu	d-pro-NH2		>10
55	MeO	d-pro-NH2			>10
56	MeO	d-leu	d-phe-NH2		>10
57	MeO	d-nva	d-leu-NH2		>10
58	MeO	nva	d-leu-NH2		>10
59	MeO	d-ala	d-leu-NH2		>10
60	MeO	d-tic	d-leu-NH2		>10
61	MeO	d-ser	d-leu-NH2		>10
62	MeO	днэопротил			>10
63	MeO	морфолін			>10
64	MeO	піролідін			>10
65	MeO	фенетиламін			>10
66	MeO	феніпропіламін			>10
67	MeO	піперидин			>10
68	MeO	метиламін			>10
69	MeO	циклобутиламін			>10
70	MeO	гептиламін			>10
71	MeO	3-метоксипропіламін			>10
72	MeO	3,4-диметоксифенілетил-амін			>10
73	MeO	N-метилбензиламін			>10
74	MeO	циклопентиламін			>10
75	MeO	диметилпіперидин			>10
76	MeO	N-бензилетаноламін			>10
77	MeO	індолін			>10
78	MeO	диметиламін			>10
79	MeO	бис(2-метоксипропіл)амін			>10
80	MeO	гіпероксіламін			>10
81	MeO	4-гідроксипіперидин			>10
82	MeO	3-іодоанілін			>10
83	MeO	1-аміноцикля			>10
84	MeO	етаноламін			>10
85	MeO	4-метоксibenзиламін			>10
86	MeO	leu	d-nle	gly-NH2	>10
87	MeO	leu	d-nva	gly-NH2	>10
88	MeO	leu	d-phe	gly-NH2	>10
89	MeO	leu	d-cha	gly-NH2	>10
90	MeO	leu	d-val	gly-NH2	>10
91	MeO	leu	d-phg	gly-NH2	>10
92	MeO	leu	d-pro	gly-NH2	>10
93	MeO	d-arg	d-leu-NH2		>10
94	MeO	d-asn	d-leu-NH2		>10
95	MeO	d-asn	d-leu-NH2		10

Сполука	R3	D1	D2	E	IC ₅₀ мкг/ мл
96	MeO	d-asn	d-leu-NH2		>10
97	MeO	d-glu	d-leu-NH2		>10
98	MeO	d-glu	d-leu-NH2		>10
99	MeO	d-his	d-leu-NH2		>10
100	MeO	d-lys	d-leu-NH2		>10
101	MeO	d-thi	d-leu-NH2		>10
102	MeO	d-tyr	d-leu-NH2		>10
103	MeO	d-trp	d-leu-NH2		>10
104	MeO	4(аминометил) пиридин			>10
105	MeO	1,2-диамінопропан			>10
106	MeO	поморфолін			>10
107	MeO	2-метоксибензиламин			>10
108	MeO	4-метилпиридин			>10
109	MeO	3-пролидинол			>10
110	MeO	4-аміно-1-бензилпиридин			>10
111	MeO	3-аміно-1,2-пропандіол			>10
112	MeO	1-(2-амінометил) пролидин			>10
113	MeO	2-аміно-2-метил-1-пропанол			>10
114	MeO	2-(амінометил) пиридин			>10
115	MeO	2-(метиламіно)етанол			>10
116	MeO	3-(3-пиридилметиламіно) пропіонітрил			>10
117	MeO	2-метоксиетиламин			>10
118	MeO	2-аміно-1-феніл-1,3- пропандіол			>10
119	MeO	2-пролидиностанол			>10
120	MeO	3-феніл-1-пропіламин			>10
121	MeO	p-анізидин			>10
122	MeO	анілін			>10
123	MeO	leu	d-leu	d-val-NH2	>10
124	MeO	leu	d-leu	val-NH2	>10
125	MeO	leu	d-leu	d-ala-NH2	>10
126	MeO	leu	d-leu	ala-NH2	>10
127	MeO	leu	d-leu	d-phe-NH2	>10
128	MeO	leu	d-leu		>10
129	MeO	d-leu	d-arg-NH2		>10
130	MeO	d-leu	d-asp-NH2		>10
131	MeO	d-leu	d-asn-NH2		>10
132	MeO	d-leu	d-cha-NH2		>10
133	MeO	d-leu	d-glu-NH2		>10
134	MeO	d-leu	d-nle-NH2		>10
135	MeO	d-leu	d-tyr-NH2		>10
136	MeO	d-leu	d-trp-NH2		>10
137	MeO	d-leu	d-gln-NH2		>10
138	MeO	d-leu	d-lys-NH2		>10
139	MeO	d-leu	d-nva-NH2		>10

Сполука	R3	D1	D2	E	IC ₅₀ мкг/ мл
140	MeO	d-leu	d-phg-NH2		>10
141	MeO	d-leu	d-ser-NH2		>10
142	MeO	d-leu	d-thr-NH2		>10
143	MeO	d-leu	d-uc-NH2		>10
144	MeO	N-(4-гідроксифеніл)-2-нафтиламін			>10
145	MeO	2-аміно-4,6-дигідрокси-5-метилпіримидин			>10
146	MeO	5-(гідроксиметил)-2-пролінон			>10
147	MeO	3-гідроксифенламін			>10
148	MeO	2-аміно-4-фенілфенол			>10
149	MeO	2-(4-метоксибензиламіно)піридин			>10
150	MeO	гексаметилендіамін			>10
151	MeO	4-гідрокси-4-фенілпіперидин			>10
152	MeO	4-йолоаміні			>10
153	MeO	2-метил-6-нітроанілін			>10
154	MeO	(r)-(-)-5-(гідроксиметил)-2-пролінон			>10
155	MeO	2-аміно-4-хлор-6-метилпіримідин			>10
156	MeO	2-аміно-5-хлорпіридин			>10
157	MeO	3,4-дихлоранілін			>10
158	MeO	4-аміно-2-меркаптопіримідин			>10
159	H	leu	d-leu	gly-NH2	>10
160	MeO	індолін			>10
161	MeO	фенпропіл			>50
162	MeO	p-анізидин			>50
163	MeO	піпероніл			>50
164	MeO	2-проліндин-метанол			>50
165	MeO	2-аміно-1-феніл-1,3-пропандіол			>50
166	MeO	N-бензидетаноламін			>50
167	MeO	диметиламід			>50
168	MeO	анліні			>50
169	MeO	бис-2-метоксиетиламін			>50
170	MeO	leu	d-leu	alb-NH2	>10
171	MeO	leu	d-leu-OH		>10
172	MeO	leu	d-leu-OH		>10
173	MeO	leu	d-leu	бензил	0,5
174	MeO	leu	d-leu	морфолін	>10
175	MeO	leu	d-leu	пітеридинні	>10
176	MeO	leu	d-leu	піролін	>10
177	MeO	leu	d-leu	добензил	1
178	MeO	leu	d-leu	гідроксметил	>10
179	MeO	leu	d-leu	N-метилбензил	>10
180	MeO	leu	d-leu	N-метилбензил	>10
181	MeO	амінометилцихлогексанамін			>10

Сполука	R3	D1	D2	E	IC ₅₀ мкг/ мл
182	MeO	leu	амінометилциклогексанами		>10
183	MeO	leu	амінометилцикло- гексанами	gly-NH ₂	>10
184	MeO	leu	d-leu	феніл	>10
185	MeO	leu	d-leu	фенетил	>10
186	MeO	leu	d-leu	фентропіл	>10
187	MeO	leu	d-leu	індан	0,5
188	MeO	leu	d-leu	амінометил- циклогексан	>10
189	MeO	leu	d-leu	амінометил- піридин	>10
190	MeO	leu	d-leu	адамантил	>10
191	MeO	leu	d-leu	тетрагідроізо- хінолін	>10
192	MeO	leu	d-leu	4-піридилметил	10
193	MeO	leu	d-leu	N-бензил- гідроксамід	0,4
194	MeO	leu	d-leu	4-метокси-бензил	>10
195	MeO	leu	d-leu	4-нітробензил	10
196	MeO	leu	d-leu	2,6-дифтор-бензил	0,08
197	MeO	leu	d-leu	піпероніл	0,2
198	MeO	d-leu	бензил		>10
199	MeO	d-leu	дйбензил		>10
200	MeO	d-leu	ізоаміл		>10

Приклад 3

Сполуки, які було одержано за способом Прикладу 1, було піддано випробуванням проти декількох різних ліній клітин. Клітинні моношари було культивовано у присутності експериментальної сполуки впродовж 18 годин з метою визначення їх здатності до інгібування проліферації клітин. Проліферацію клітин визначали колориметричне за допомогою методу водного нерадіоактивного визначення проліферації клітин Celltiter 96 (компанія Promega), за яким проліферація клітин є прямо пропорційною поглинанню на 490нм. Результати представлені, як IC₅₀ у мкг/мл для інгібування проліферації клітин різного типу.

Сполука	RAW	MCF 7	OVCAR	CaCo	Ранс-1
173	20	10	8	17	17
187	10	6	5	8	7
194	1		3		6
196	7		2		6
197	12		2		8

Приклад 4

Сполуки, які було одержано за способом Прикладу 1, було піддано випробуванням на інгібування синтезу фактору некротизації пухлин, індукованого ліпополісахаридами. Клітини лінії RAW піддавали попередній обробці різними концентраціями експериментальної сполуки за 1 годину до введення ліпополісахариду (100нг/мл). Супернатанти клітинних культур збирали через 1 годину і аналізували на концентрацію фактору некротизації пухлин (TFA) за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA).

Сполука	IC ₅₀ (мкг/мл)
173	5
187	5
194	3
196	3
197	3

Приклад 5

У цьому Прикладі перевіряється здатність сполуки 173 і, зокрема, сполуки 187, опис яких наведено у Таблицях 1 та 2, які було наведено перед тим, до інгібування протеосомної активності, яка вказується, частково, присутністю IκB та/або p105 у пригнічених клітинах. Для переміщення NF-κB до ядра у відповідь на стимулювання ліпополісахаридом та активації транскрипції повинні відбутись два протеолітичні явища, зокрема, розщеплення інгібіторного білку IκB та перетворення попередника p105 на зрілий продукт p50. Ці протеолітичні явища служать для демаскування сигналу локалізації NF-κB у ядрі.

Інгібування індукованого ліпополісахаридами розщеплення IκB.

Клітини лінії RAW піддавали попередній обробці різними концентраціями експериментальної сполуки за 1 годину до введення ліпополісахариду (100нг/мл). Через 1 годину збирали суцільні клітинні лізати, 10мкг білку було відокремлено за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE), перенесено до нітроцелюлози та проаналізовано на імунореактивність за допомогою анти-IκB антитіл. Вестерн-блотам (див. Фіг 1) було надано видимої форми за допомогою набору Boehringer Mannheim Chemiluminescent detection kit. Результати блотинг-аналізу показують присутність IκB у клітинах, які було піддано обробці всього 5мкг/мл сполук 173 та 187.

Інгібування індукованого ліпополісахаридами перетворення попередника p105 на зрілий продукт p50.

Сполуку 187, опис якої наведено у Таблицях 1 та 2, які було наведено перед тим, було використано для попередньої обробки клітин лінії RAW, як описано перед тим, і суцільні клітинні лізати, які було одержано, як описано перед тим, аналізували на імунореактивність за допомогою анти-p50 антитіл. Результати, які наведено на Фіг 2, вказують на присутність як p50, так і p105 у клітинах, які

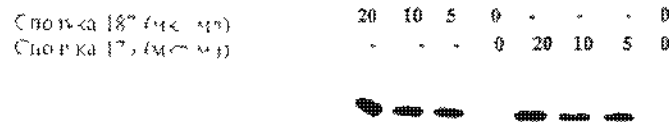
було оброблено всього 5мкг/мл сполуки 187, у той час, як у необроблених клітин більшу частину p105 було перетворено на p50

Інгібування індукованого ліпополісахаридами переміщення NF-κB до ядерної фракції клітин

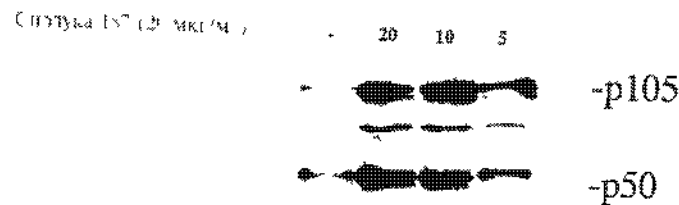
Клітини лінії RAW обробляли впродовж 1 години сполукою 187 (20мкг/мл), після чого інкубували з ліпополісахаридом (100нг/мл) впродовж додаткової години. Ядерні фракції було одержано за стандартними процедурами. Реакційні суміші

зв'язування для аналізу зсуву рухливості у гелі включали 5мкг ядерного екстрагованого білку, 50000 cpm (кількість імпульсів на хвилину) міченого ³²P NF-κB консенсусного зв'язувального олігонуклеотиду у присутності та відсутності п'ятидесятикратного надлишку неміченого олігонуклеотиду. Результати аналізу зсуву рухливості у гелі, які наведено на Фігурі 3, показують, що сполука 187 є ефективною щодо інгібування накопичення NF-κB у ядрі згаданих клітин.

ФІГ. 1



ФІГ. 2



ФІГ. 3

