



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 77159

(13) C2

(51) МПК

A61K 31/407 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/08 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ
ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПРОТИЗАПАЛЬНІ КОНДЕНСОВАНІ ПІРОЛОКАРБАЗОЛИ, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ЇХ ОСНОВІ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ (ВАРІАНТИ)

1

2

(21) 2003032531

(22) 23.08.2001

(24) 15.11.2006

(86) PCT/US01/26266, 23.08.2001

(31) 60/227,803

(32) 25.08.2000

(33) US

(31) 60/278,455

(32) 23.03.2001

(33) US

(31) 09/935,285

(32) 22.08.2001

(33) US

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Джингріч Дайан Е., US, Хадкінс Роберт Л., US

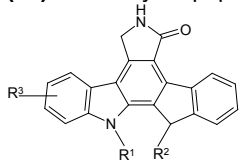
(73) СЕФАЛОН, ІНК., US

(56) US 5705511 A, 06.01.1998

WO 0047583 A, 17.08.2000

WO 0018407 A, 06.04.2000

(57) 1. Сполуки формули I:



Формула I

де R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє

собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і

y дорівнює 1 або 2;

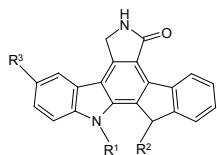
за умови, що коли R^1 являє собою $(CH_2)_3OH$ і R^2 являє собою H, то R^3 не може бути $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_2CH_3$ або $-CH_2SCH_2CH_3$.

2. Сполуки за п.1, представлені формулою II:

(13) C2

(11) 77159

(19) UA



Формула II

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і

y дорівнює 1 або 2;

за умови, що коли R^1 являє собою $(CH_2)_3OH$ і R^2 являє собою H, то R^3 не може бути $-CH_2OH$, $-CH_2OCH_2CH_3$ або $-CH_2SCH_2CH_3$.

3. Сполуки за п.1 або 2, де:

R^1 являє собою алкіл, що містить 1-4 атомів вуглецю (включно), заміщений OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

R^2 являє собою H; і

R^3 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи.

4. Сполуки за п.1 або 2, де:

R^1 являє собою $-CH_2CH_2CH_2OH$ або $-CH_2CH_2CH_2OCOCH_2N(CH_3)_2$;

R^2 являє собою H; і

R^3 являє собою $-CH_2OR^7$, де R^7 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно).

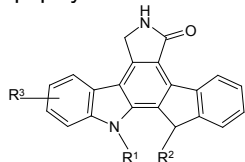
5. Сполуки за п.1 або 2, представлені у таблиці I:

Таблица I

Спол.	R^1	R^2	R^3
2	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	CH_2OCH_3
3	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
4	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
5	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(S)- $CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
6	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(R)- $CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
7	$CH_2CHONCH_3$	H	$CH_2OCH_2CH_3$
8	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH_2CH_2CH_3$
9	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_3$
10	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(CH_3)OCH_2CH_3$
11	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(хіральн.) $CH(CH_3)OCH_2CH_3$
12	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(хіральн.) $CH(CH_3)OCH_2CH_3$
13	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(CH_3)OCH_3$
14	H	$CH_2CHONCH_3$	$CH_2OCH_2CH_3$
15	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(CH_3)OCH_2CH_2CH_2CH_3$
16	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(CH_3)OCH(CH_3)_2$
17	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OC(CH_3)_3$
18	$CH_2CH_2CH_2OCOCH_2NH_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
19	$CH_2CH_2CH_2OCOCH(NH_2)CH_2CH_2CH_2NH_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
20	$CH_2CH_2CH_2OCOCH_2CH_2NH_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
21	$CH_2CH_2CH_2OCOCH_2CH_2CH_2N(CH_3)_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
22	$CH_2CH_2CH_2OCOCH_2N(CH_3)_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
23	$CH_2CH_2CH_2OCOCH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
24	CH_2CH_2OH	H	$CH_2SCH_2CH_3$
26	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2S(O)CH(CH_3)_2$
27	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2SCH(CH_3)_2$
28	CH_2CH_2OH	H	CH_2OH
30	H	H	CH_2OH
31	H	H	$CH_2OCH_2CH_3$
32	H	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
33	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(OH)CH_3$
34	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH(OH)CH_2CH_3$
35	H	H	$CH(OH)CH_3$
36	H	H	(+/-)- $CH(OCH_3)CH_3$
40	$CH_2CH_2CH_2OH$	CH_2OH	$CH_2OCH(CH_3)_2$

6. Фармацевтична композиція, що містить сполуку за п.1 і фармацевтично прийнятний ексципієнт або носій.

7. Спосіб лікування або профілактики порушень простати, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I:



Формула I

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

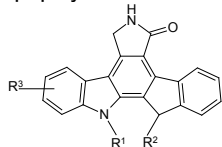
R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і

y дорівнює 1 або 2.

8. Спосіб за п.7, де порушенням простати є ракове захворювання або доброякісна гіперплазія простати.

9. Спосіб лікування або профілактики ангіогенних порушень, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I:



Формула I

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

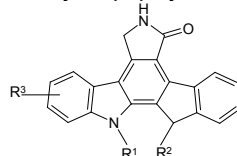
R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і

y дорівнює 1 або 2.

10. Спосіб за п.9, де ангіогенними порушеннями є рак солідних пухлин, захворювання очей, дегенеративні зміни рогівки, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз або гемангіобластома.

11. Спосіб лікування або профілактики патологічних порушень, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I:



Формула I

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

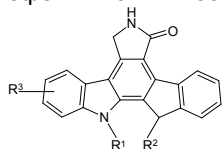
n являє собою ціле число 1-4 (включно); і

y дорівнює 1 або 2.

12. Спосіб за п.11, де патологічним порушенням є неоплазія, ревматоїдний артрит, хронічний артрит, фіброз легень, мієлофіброз, ненормальне загоєння ран, атеросклероз або рестеноз.

13. Спосіб лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань і порушень, хвороби Альцгеймера, аміотрофічного латерального склерозу, хвороби Паркінсона, удару, ішемії, хвороби Хантінгтона, деменції, пов'язаної зі СНІД, розсіяного склерозу, периферичної невропатії, периферичної невропатії, викликані хіміотерапією, периферичної невропатії, пов'язаної зі СНІД, або

уражень головного або спинного мозку, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I:



Формула I

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

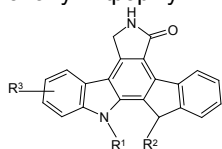
R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і у дорівнює 1 або 2.

14. Спосіб лікування або профілактики множинної мієломи та лейкемії, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I:



Формула I

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), заміщений $-OH$, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або $-SR^6$; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил;

R^6 являє собою H, алкіл, що містить від 1 до 4 атомів вуглецю (включно), або арил, що містить 6-10 атомів вуглецю;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і у дорівнює 1 або 2.

15. Спосіб за п.14, де лейкемією є гостра мієлогенна лейкемія, хронічна мієлогенна лейкемія, гостра лімфоцитна лейкемія або хронічна лімфоцитна лейкемія.

16. Сполука за п.2, де R^1 являє собою $(CH_2)_3OH$, R^2 являє собою H, і R^3 являє собою $CH_2OCH(CH_3)_2$.

17. Сполука за п.2, де R^1 являє собою $(CH_2)_3OCOCH_2N(CH_3)_2$, R^2 являє собою H, і R^3 являє собою $CH_2OCH(CH_3)_2$.

18. Фармацевтична композиція за п.6, що містить сполуку за п.16.

19. Фармацевтична композиція за п.6, що містить сполуку за п.17.

20. Спосіб за п.7, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.16.

21. Спосіб за п.7, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.17.

22. Спосіб за п.20, де порушенням простати є ракове захворювання або доброякісна гіперплазія простати.

23. Спосіб за п.21, де порушенням простати є ракове захворювання або доброякісна гіперплазія простати.

24. Спосіб за п.9, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.16.

25. Спосіб за п.9, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.17.

26. Спосіб за п.24, де ангіогенними порушеннями є рак солідних пухлин, очні захворювання, дегенеративні зміни рогівки, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз або гемангіобластома.

27. Спосіб за п.25, де ангіогенними порушеннями є рак солідних пухлин, очні захворювання, дегенеративні зміни рогівки, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз або гемангіобластома.

28. Спосіб за п.11, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.16.

29. Спосіб за п.11, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.17.

30. Спосіб за п.28, де патологічним порушенням є неоплазія, ревматоїдний артрит, хронічний артрит, фіброз легень, мієлофіброз, ненормальне загоєння ран, атеросклероз або рестеноз.

31. Спосіб за п.29, де патологічним порушенням є неоплазія, ревматоїдний артрит, хронічний артрит, фіброз легень, мієлофіброз, ненормальне

загоєння ран, атеросклероз або рестеноз.

32. Спосіб за п.13, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.16.

33. Спосіб за п.13, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.17.

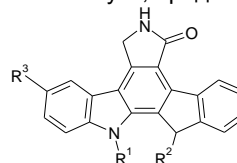
34. Спосіб за п.14, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.16.

35. Спосіб за п.14, що включає введення потребуючому такого лікування або профілактики пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки за п.17.

36. Спосіб за п.34, де лейкемією є гостра мієлогенна лейкемія, хронічна мієлогенна лейкемія, гостра лімфоцитна лейкемія або хронічна лімфоцитна лейкемія.

37. Спосіб за п.35, де лейкемією є гостра мієлогенна лейкемія, хронічна мієлогенна лейкемія, гостра лімфоцитна лейкемія або хронічна лімфоцитна лейкемія.

38. Сполуки, представлені в наступній таблиці:



Таблиця

Спол.	R ¹	R ²	R ³
37	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OCOCF ₃	H	CH ₂ SCH ₂ CH ₂ CH ₃
39	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	H	CH ₂ S(2-піримідил)

Даний винахід відноситься загалом до селективних конденсованих піролокарбазолів, включаючи фармацевтичні композиції, що їх містять, і способи лікування захворювань з їх використанням. Даний винахід відноситься також до проміжних сполук і способів одержання цих конденсованих піролокарбазолів.

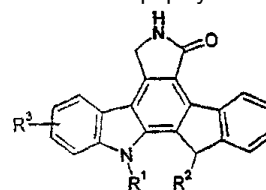
Цитовані публікації включені у даний опис за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Раніше були одержані різні синтетичні невеликі органічні молекули, які володіють біологічною активністю, і звичайно відомі фахівцям як «конденсовані піролокарбазоли» [див. патенти США 5475110; 5591855; 5594009 і 5616724]. Крім того, [у патенті США 5705511] розкриті сполуки конденсованих піролокарбазолів, які володіють різними функціональними фармакологічними активностями. Розкрито, що конденсовані піролокарбазоли можна використовувати для різних цілей, включаючи: посилення функцій і/або виживаності клітин нейронного походження, або окремо, або у поєднанні з нейротрофічним фактором (факторами) і/або індокарбазолами; посилення активності, що індукується трофічним фактором; інгібування активності протеїнкінази C ("PKC"); інгібування активності trk тирозинкінази; інгібування проліферації клітинної лінії раку простати; інгібування клітинних шляхів, що беруть участь у запальних процесах; і підвищення виживаності нейрональних клітин при ризику їх загибелі.

Автори даного винаходу виявили, що деякі селективні конденсовані піролокарбазоли, вибрані зі сполук загальної формули [патенту США 5705511], але конкретно там не розкриті, володіють надзвичайною і несподіваною біологічною активністю у порівнянні зі сполуками, розкритими [у патенті США 5705511].

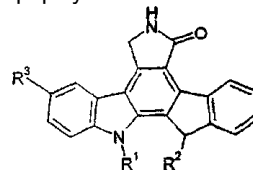
Відповідно, метою даного винаходу є

створення нових конденсованих піролокарбазольних сполук, представлених загальною формулою I:



Формула I

Значення радикалів формули I детально розкриті нижче. Переважні конденсовані піролокарбазоли представлені наступною формулою II:



Формула II

Значення радикалів формули II детально розкриті нижче.

Конденсовані піролокарбазоли даного винаходу можна використовувати для різних цілей, включаючи: інгібування ангиогенезу; як протипухлинні агенти; для посилення функцій і/або підвищення виживаності клітин нейронного походження, або окремо, або у комбінації з нейротрофічним фактором (факторами), і/або індокарбазолами; для посилення активності, що індукується трофічним фактором; для інгібування кіназ; для інгібування кінази рецепторів фактора росту судинного ендотелію (VEGFR), переважно VEGFR2; для інгібування кінази змішаного походження (MLK); trk кінази; для інгібування кінази рецептора фактора росту, одержаного з

тромбоцитів (PDGFR); для інгібування trk фосфорилювання, що стимулюється NGF; для інгібування активності протеїнкінази С ("PKC"); для інгібування активності trk тирозинкінази; для інгібування проліферації клітинних ліній раку простати; для інгібування клітинних шляхів, залучених до запальних процесів; для підвищення виживаності нейрональних клітин при ризику їх загибелі. Крім того, конденсовані піролокарбазоли можна використовувати для інгібування c-met, c-kit і мутованих Flt-3, що містять внутрішній тандем дуплікацій в юкстамембранному домені. Завдяки такому широкому колу активностей розкриті сполуки знаходять застосування у різних ситуаціях, включаючи дослідницькі цілі і терапевтичні застосування.

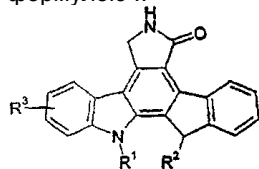
Іншою метою даного винаходу є створення фармацевтичних композицій, що містять конденсовані піролокарбазоли даного винаходу, де композиція містить фармацевтично прийнятний ексципієнт або носій і терапевтично ефективну кількість, принаймні, однієї зі сполук даного винаходу або її фармацевтично прийнятних солей або складних ефірів.

Наступною метою даного винаходу є створення способів лікування або профілактики захворювань або порушень, що включають введення суб'єкту, який потребує цього, терапевтично або профілактично ефективної кількості, принаймні, однієї зі сполук даного винаходу.

Ці та інші цілі, ознаки і переваги конденсованих піролокарбазолів будуть розкриті далі у докладному описі винаходу.

Докладний опис переважних варіантів винаходу

Одним з втілень даного винаходу є конденсовані піролокарбазоли представлені формулою I:



Формула I,

де:

R^1 і R^2 однакові або різні і незалежно вибрані з H або алкілу, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), переважно алкілу, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), заміщеного OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил, переважно феніл або нафтил, або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи; і

R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), переважно алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), заміщений -OH, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або SR^6 ; і де

R^5 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), або арил, переважно феніл або нафтил;

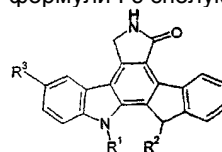
R^6 являє собою H, алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил, що містить 6-10 атомів вуглецю, переважно феніл або нафтил, або гетероарил;

R^7 являє собою H або алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно);

R^8 являє собою залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

n являє собою ціле число 1-4 (включно); і у дорівнює 1 або 2.

У деяких переважних втіленнях сполуки формули I є сполуками формули II:



Формула II

де R^1 , R^2 і R^3 мають значення, вказані вище для формули I.

У деяких переважних втіленнях R^1 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), заміщений OH або $-OR^4$, де R^4 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), арил, переважно феніл або нафтил, або залишок амінокислоти після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи;

R^2 являє собою H; і R^3 являє собою $-CH_2OH$; $-CH_2OR^7$; $-(CH_2)_nSR^5$; $-(CH_2)_nS(O)_yR^5$; $-CH_2SR^5$ або алкіл, що містить 1-8 атомів вуглецю (включно), переважно алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно), заміщений -OH, $-OR^5$, $-OR^8$, $-CH_2OR^7$, $-S(O)_yR^6$ або SR^6 ;

де R^5 , R^6 , R^7 і R^8 мають значення, вказані вище для формули I.

У деяких інших переважних варіантах R^1 являє собою $-CH_2CH_2CH_2OH$ або $-CH_2CH_2CH_2OCOCH_2N(CH_3)_2$, R^2 являє собою H і R^3 являє собою $-CH_2OR^7$; де R^7 являє собою алкіл, що містить 1-4 атоми вуглецю (включно).

У ще деяких інших переважних варіантах конденсовані піролокарбазоли формули I і формули II мають значення, представлені у таблиці I.

Таблиця I

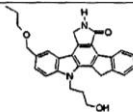
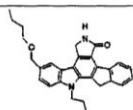
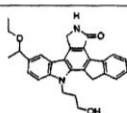
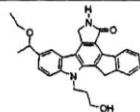
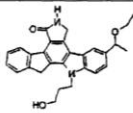
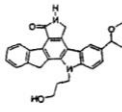
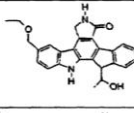
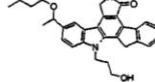
Спол.	R^1	R^2	R^3
1	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH_2CH_3$
2	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	CH_2OCH_3
3	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH(CH_3)_2$
4	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
5	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(S)- $CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
6	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	(R)- $CH_2OCH(CH_3)CH_2CH_3$
7	$CH_2CHOHCH_3$	H	$CH_2OCH_2CH_3$
8	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH_2CH_2CH_3$
9	$CH_2CH_2CH_2OH$	H	$CH_2OCH_2CH_2CH_2CH_3$

10	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_2\text{CH}_3$
11	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	(хіральн.) $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_2\text{CH}_3$
12	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	(хіральн.) $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_2\text{CH}_3$
13	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_3$
14	H	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$
15	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
16	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
17	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_3$
18	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{NH}_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
19	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
20	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
21	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
22	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
23	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOSi}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
24	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$
25	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$
26	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
27	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{SCH}(\text{CH}_3)_2$
28	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	CH_2OH
29	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	CH_2OH
30	H	H	CH_2OH
31	H	H	$\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$
32	H	H	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$
33	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
34	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$
35	H	H	$\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
36	H	H	(+/-) $\text{CH}(\text{OCH}_3)\text{CH}_3$
37	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCF}_3$	H	$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
38	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{S}(2\text{-піридил})$
39	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	H	$\text{CH}_2\text{S}(2\text{-піримідил})$
40	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	CH_2OH	$\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$

Структури переважних конденсованих піролокарбазолів формули II представлені у таблиці II:

Таблиця II

Сполука	Структура
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8		
9		
10	\pm/\pm 	
11	хіральн. 	
	належить	ΣI
	\pm/\pm	ΣI
14		
15	\pm/\pm 	

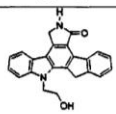
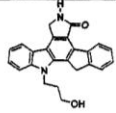
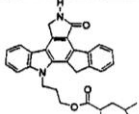
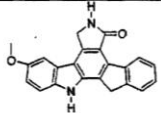
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	

29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

Найбільш переважні сполуки таблиці II включають сполуки 1, 3, 4, 5, 6, 7 і 22, причому найбільш переважні сполуки 3 і 22.

Сполуки, представлені формулами I і II і представлені у таблицях I і II, можуть також називатися тут як «сполуки», «сполука (сполуки) даного винаходу», «конденсований піролокарбазол», «конденсований піролокарбазол даного винаходу» і т.п.

Деякі сполуки [патенту США 5705511] представлені у таблиці IIa.

Сполука	Структура
A	
B	
C	
D	

У тому значенні, як використано у даному описі з посиланням на визначення R^1 і R^2 , термін «амінокислота» означає молекулу, що містить як аміногрупу, так і карбоксильну групу. Він включає « α -амінокислоту», яка має звичайне значення як карбонова кислота, що містить амінофункціональність біля атома вуглецю, сусіднього з карбоксильною групою, α -Амінокислота може бути природного або неприродного походження. Амінокислоти включають також «дипептиди», які визначені у даному описі як дві амінокислоти, з'єднані пептидним зв'язком. Так, складові дипептидів не обмежені α -амінокислотами і можуть бути будь-якими молекулами, що містять як аміногрупу, так і карбоксильну групу. Переважні α -амінокислоти, дипептиди, такі як лізил- β -аланін, та аміноалканові кислоти, що містять 2-8 атомів вуглецю, наприклад, 3-диметиламіномасляна кислота.

Фармацевтично прийнятні солі конденсованих піролокарбазолів даного винаходу також підпадають під об'єм сполук, що розкриваються. Термін «фармацевтично прийнятні солі» у тому значенні, як використано у даному описі, відноситься до солей приєднання неорганічних кислот, таких як гідрохлорид, сульфат і фосфат, або до солей приєднання органічних кислот, таких як ацетат, малеат, фумарат, тартрат і цитрат. Прикладами фармацевтично прийнятних солей металів є солі лужних металів, такі як солі натрію і солі калію, солі лужноземельних металів, такі як солі магнію і солі кальцію, солі алюмінію і солі цинку. Прикладами фармацевтично прийнятних амонієвих солей є солі амонію і солі тетраметиламонію. Прикладами фармацевтично прийнятних солей приєднання органічних амінів є солі морфоліну і піперидину. Прикладами фармацевтично прийнятних солей приєднання амінокислот є солі лізіну, гліцину і фенілаланіну.

Представлені у даному описі сполуки можна скласти у фармацевтичні композиції шляхом змішування з фармацевтично прийнятними нетоксичними ексципієнтами або носіями. Як було вказано вище, такі композиції можна приготувати

для парентерального введення, зокрема, у формі рідких розчинів або суспензій; або для перорального введення, зокрема, у формі таблеток або капсул; або інтраназального введення, зокрема, у вигляді порошків, крапель для носа або аерозолів; або для дермального використання, наприклад у вигляді черезшкірних пластирів.

Відповідно, наступним аспектом даного винаходу є фармацевтичні композиції, що містять сполуку даного винаходу необов'язково у суміші з одним або більше фармацевтично прийнятних ексципієнтів або носіїв. Переважно, щоб фармацевтичні композиції включали сполуку формули II. Більш переважно, щоб фармацевтичні композиції включали сполуки, представлені у таблиці I або у таблиці II.

У деяких переважних фармацевтичних композиціях композиції призначені для інгібування однієї або більше з активностей trk кінази, активностей VEGFR кінази, активностей PKC або PDGFR, причому композиція включає сполуку формули I, формули II, таблиці T або таблиці II і необов'язково один або більше фармацевтично прийнятних носіїв. У випадку інших переважних фармацевтичних композицій, дані композиції призначені для посилення активності трофічного фактора або активності ChAT спинного мозку, причому композиція включає сполуку формули I, формули II, таблиці I або таблиці II і фармацевтично прийнятний носій.

У випадку інших переважних фармацевтичних композицій, композиція призначена для лікування або профілактики ангіогенезу та ангіогенних захворювань, таких як рак солідних пухлин, ендометріоз, ретинопатія, діабетична ретинопатія, псоріаз, гемангіобластома, порушення зору або дегенеративні ушкодження рогівки. У випадку інших переважних фармацевтичних композицій, дані композиції призначені для лікування або профілактики неоплазії, ревматоїдних артритів, фіброзу легень, мієлофіброзу, ненормального загоєння ран, атеросклерозу або рестенозу. У випадку інших переважних фармацевтичних композицій, дані композиції призначені для лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань або порушень, хвороби Альцгеймера, аміотрофічного латерального склерозу, хвороби Паркінсона, удару, ішемії, хвороби Хантінгтона, слабоумства, пов'язаного зі СНІД, епілепсії, розсіяного склерозу, периферичної невропатії, периферичної невропатії, викликаной хіміотерапією, периферичної невропатії, пов'язаної зі СНІД, або уражень мозку або спинного мозку. У випадку іншої переважної композиції, вона призначена для лікування або профілактики захворювань простати, таких як рак простати або доброякісна гіперплазія простати. У випадку однієї переважної фармацевтичної композиції, вона призначена для використання для лікування або профілактики множинних мієлом або лейкомії, включаючи (але, не обмежуючись цим) гостру мієлогенну лейкомію, хронічну мієлогенну лейкомію, гостру лімфоцитну лейкомію і хронічну лімфоцитну лейкомію.

Композиції можна звичайно вводити в

одиночній дозованій формі і їх можна приготувати будь-якими, добре відомими у фармацевтичній області способами, наприклад, [як описано у Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980)]. Композиції для парентерального введення можуть містити як звичайні ексципієнти стерильну воду або фізіологічний розчин, поліалкіленгліколи, такі як поліетиленгліколь, олії та рослинні олії, гідровані нафталіни і т.п. Зокрема, біосумісні, біорозкладані лактидні полімери, співполімери лактиду-гліколіду або співполімери поліоксіетилену-поліоксіпропілену можуть бути корисними ексципієнтами для контролювання виділення активних сполук. Інші потенційно корисні системи парентеральної доставки таких активних сполук включають частинки співполімеру етилену-вінілацетату, осмотичні насоси, інфузійні системи, що імплантуються, та ліпосоми. Композиції для введення за допомогою інгаляцій містять як ексципієнти, наприклад, лактозу, або можуть бути водними розчинами, що містять, наприклад, поліоксіетилен-9-лауриловий простий ефір, глікохолат і дезоксигхолат, або масляні розчини для введення у формі крапель для носа, або у вигляді гелів для інтраназального введення. Композиції для парентерального введення можуть також включати глікохолат для введення за щок, саліцилат для ректального введення або лимонну кислоту для вагінального введення. Композиції для трансдермальних пластирів переважно є ліофільними емульсіями.

Сполуки даного винаходу можна використовувати як один активний агент у фармацевтичному препараті або можна використовувати у комбінації з іншими активними інгредієнтами, наприклад, з іншою групою факторів росту, які можуть полегшити виживання нейронів або забезпечити регенерацію аксонів при захворюваннях або порушеннях, або іншими ангіогенезними або протипухлинними агентами.

Концентрації розкритих у даному описі сполук у терапевтичних або фармацевтичних композиціях будуть змінюватися в залежності від ряду факторів, включаючи дози ліків, що вводяться, хімічні характеристики (наприклад, гідрофобність) сполук, що використовуються, і спосіб введення. Загалом, сполуки даного винаходу можна представити у водному забуференому фізіологічному розчині, що містить близько 0,1-10% мас/об., сполуки для парентерального введення. Типові інтервали доз складають від близько 1мкг/кг до близько 1г/кг маси тіла на день; переважний інтервал доз складає від близько 0,01мг/кг до 100мг/кг маси тіла на день. Переважні дози ліків, які потрібно вводити, очевидно залежать від таких змінних як тип і ступінь розвитку захворювання або стану, загального стану здоров'я конкретного пацієнта, відносної біологічної ефективності вибраної сполуки і композиції сполуки з ексципієнтом і способу введення.

В інших варіантах у даному винаході запропонований спосіб інгібування активності trk кінази, що включає введення сполуки даного винаходу у кількості, достатній для ефективного

інгібування. У переважному варіанті сполуки даного винаходу запропоновані для лікування запалень, наприклад, неврологічного запалення і хронічних запалень при артриті. В іншому переважному варіанті рецептором trk кінази є trk A.

В інших варіантах у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики порушень простати, що включає введення пацієнту, який потребує цього лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки даного винаходу. У переважному варіанті порушенням простати є рак простати або доброякісна гіперплазія простати.

В інших варіантах у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики ангіогенних порушень, при яких у патологічні стани привносить свій внесок активність VEGFR кінази, причому спосіб включає забезпечення сполуки даного винаходу у кількості, достатній для контактування рецептора фактора росту судинного ендотелію з ефективною кількістю, що інгібує, сполуки.

В іншому варіанті у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики ангіогенних порушень, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки даного винаходу. У переважному варіанті ангіогенними порушеннями є рак солідних пухлин, захворювання очей, дегенеративні захворювання рогівки, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз або гемангіобластома.

В іншому варіанті у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики порушень, при яких у патологічні стани привносить свій внесок активність PDGFR, причому спосіб включає забезпечення сполуки даного винаходу у кількості, достатній для контактування рецептора фактора росту, одержаного з тромбоцитів, з ефективною кількістю, що інгібує, сполуки. В іншому варіанті у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики патологічних порушень, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки даного винаходу. У переважних варіантах патологічними порушеннями є неоплазія, ревматоїдний артрит, хронічний артрит, фіброз легень, мієлофіброз, ненормальне загоєння ран, атеросклероз або рестеноз.

В інших варіантах у даному винаході запропонований спосіб лікування порушень, що характеризуються порушеною активністю клітин, які реагують на трофічний фактор, причому спосіб включає введення сполуки формули I, формули II, таблиці I або таблиці II у кількості, достатній для контактування рецептора клітин трофічного фактора з ефективною, такою що індукуює активність, кількістю такої сполуки. У переважних варіантах активністю клітин, які реагують на трофічний фактор, є ChAT активність. В іншому варіанті у даному винаході запропонований спосіб лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань і порушень, хвороби Альцгеймера, аміотрофічного латерального склерозу, хвороби

Паркінсона. удару, ішемії, хвороби Хантінгтона, деменції, пов'язаної зі СНІД, епілепсії, розсіяного склерозу, периферичної невропатії, периферичної невропатії, індукованої хіміотерапією, периферичної невропатії, пов'язаної зі СНІД, або уражень мозку або спинного мозку, що включає введення пацієнту, який потребує такого лікування або профілактики, терапевтично ефективної кількості сполуки формули I, формули II, таблиці I і таблиці II.

У тому значенні, як використано у даному описі, термін «вплив», коли його використовують для модифікації термінів «функція» або «виживання», означає позитивну або негативну перемену або зміну. Позитивний ефект можна трактувати у даному описі як «посилення» або «той, що посилює», а негативний ефект можна трактувати у даному описі як «інгібування» або «той, що інгібує».

У тому значенні, як використано у даному описі, терміни «посилення» або «той, що посилює», коли їх використовують для модифікації термінів «функція» або «виживання», означають, що присутність конденсованого піролокарбазолу здійснює позитивний ефект на функцію і/або виживаність клітин, які реагують на трофічний фактор, у порівнянні з клітинами за відсутності конденсованого піролокарбазолу. Наприклад, але, не будучи обмеженням, у відношенні виживаності, наприклад, холінергічного нейрона, конденсований піролокарбазол свідчить про продовження терміну виживаності холінергічної нейрональної популяції у випадку ризику їх загибелі (викликаного, наприклад, ураженням, умовами хвороби, дегенеративними умовами або природним розвитком) при порівнянні з холінергічною нейрональною популяцією, з якою не взаємодіють такі конденсовані піролокарбазоли, якщо оброблена популяція буде володіти порівняно довшим періодом функціонування у порівнянні з необробленою популяцією. Як інший приклад (і знову не будучи обмежуючим) відносно функцій, наприклад, сенсорних нейронів, конденсовані піролокарбазоли свідчать про посилення функцій (наприклад, подовження нейриту) сенсорної нейрональної популяції у порівнянні з сенсорною нейрональною популяцією, яка не взаємодіє з такими конденсованими піролокарбазолами, якщо подовження нейриту обробленої популяції порівняно більше, ніж подовження нейриту необробленої популяції.

У тому значенні, як використано у даному описі, терміни «інгібувати» та «інгібування» означають, що специфічна реакція позначеного матеріалу (наприклад, ферментативна активність) порівняно знижується за присутності конденсованих піролокарбазолів даного винаходу.

У тому значенні, як використано у даному описі, терміни «нейрон», «клітина нейронального походження» та «нейрональні клітини» включають (але не обмежуються цим) гетерогенну популяцію нейрональних типів, що містять окремі або множинні трансмітери і/або володіють окремими або множинними функціями; переважно, щоб це були холінергічні або сенсорні нейрони. У тому значенні, як використано у даному описі, фраза

«холінергічний нейрон» означає нейрони центральної нервової системи (CNS) і периферичної нервової системи (PNS), нейротрансмітером яких є ацетилхолін; прикладами служать нейрони базального переднього мозку і нейрони спинного мозку. У тому значенні, як використано у даному описі, фраза «сенсорний нейрон» включає нейрони, які реагують на сигнали зовнішнього середовища (наприклад, температуру), рух, наприклад, шкіри м'язів і суглобів; прикладами служать нейрони DRG.

У тому значенні, як використано у даному описі, термін «трофічний фактор» відноситься до молекули, яка прямо або непрямо впливає на виживання або функції клітин, що реагують на трофічний фактор. Приклади трофічних факторів включають війковий нейротрофічний фактор (CNTF), основний фактор росту фібробластів (bFGF), інсулінові та інсуліноподібні фактори росту (наприклад, IGF-I, IGF-II, IGF-III), інтерферони, інтерлейкіни, цитокіни та нейротрофіни, включаючи, фактор росту нервів (NGF), нейротрофін-3 (NT-3), нейротрофін-4/5 (NT-4/5), нейротрофічний фактор, одержаний з мозку (BDNF).

Вираз «клітини, які реагують на трофічний фактор», у тому значенні, як використано у даному описі, відноситься до клітин, що містять рецептор, з яким може специфічно зв'язуватися трофічний фактор; приклади включають нейрони (наприклад, холінергічні та сенсорні нейрони) і ненейрональні клітини (наприклад, моноцити і неопластичні клітини).

У тому значенні, як використано у даному описі, вирази «активність трофічного фактора» і «активність, що індукується трофічним фактором», визначені як будь-яка реакція, яка безпосередньо або опосередковано виникає внаслідок зв'язування трофічного фактора (наприклад, NGF) з клітиною, що містить рецептор трофічного фактора (наприклад, нейрон, що включає trk). У випадку, наприклад, зв'язування NGF з trk, приклад реакцій включає аутофосфорилування тирозинових залишків trk, що приводить до посилення ChAT активності, яке приводить до підвищення виживаності нейронів і/або до посилення їх функцій.

У тому значенні, як використано у даному описі, у виразах «активність трофічного фактора» і «активність, що індукується трофічним фактором», термін «трофічний фактор» включає як ендогенні, так і екзогенні трофічні фактори, де «ендогенний» відноситься до звичайно присутніх трофічних факторів, а «екзогенний» відноситься до трофічних факторів, привнесених у систему. Як визначено, «активність, що індукується трофічним фактором», включає активність, що індукується (1) ендогенними трофічними факторами; (2) екзогенними трофічними факторами; і (3) комбінацією ендогенних та екзогенних трофічних факторів.

У тому значенні, як використано у даному описі, термін «trk» відноситься до сімейства нейротрофінових рецепторів з високої афінністю, що включають у наш час trk A, trk B і trk C та інші

зв'язані з мембранами білки, з якими може зв'язуватися нейротрофін.

У тому значенні, як використано у даному описі, фраза «стан гіперпроліферації» відносно терміну «клітини» відноситься до клітин, розрегульованість і/або ненормальний ріст яких може привести до виникнення небажаних станів, наприклад, до стану ракового захворювання або стану псоріазу.

У тому значенні, як використано у даному описі, терміни «рак» і «раковий» відносяться до будь-якої злоякісної проліферації клітин у ссавців. Приклади включають рак простати, доброякісну гіперплазію простати, рак яєчників, рак молочної залози та інші відомі ракові захворювання. У тому значенні, як використано у даному описі, терміни «псоріаз» і «стан псоріазу» відносяться до порушень, що включають гіперпроліферацію кератиноцитів, інфільтрацію запальних клітин і зміну цитокінів.

У тому значенні, як використано у даному описі, фраза «при ризику загибелі» відносно біологічного матеріалу, наприклад, таких клітин, як нейрони, означає стан або умову, що негативно впливає на біологічний матеріал таким чином, що даний матеріал володіє підвищеною ймовірністю загибелі у зв'язку з таким станом або умовою. Наприклад, сполуки, що розкриваються у даному описі, можуть «врятувати» або підвищити виживаність мотонейронів, які звичайно знаходяться у стані ризику загибелі в *in ovo* моделі загибелі клітин, що програмується. Аналогічно, наприклад, нейрони можуть знаходитися у стані ризику загибелі внаслідок природного процесу старіння, що є причиною загибелі нейронів, внаслідок уражень, таких як травма голови, яка може бути такою, що нейрони і/або глія, наприклад, ушкоджені при такій травмі, можуть зазнавати ризику загибелі. Іншим прикладом можуть служити нейрони, що знаходяться у стані ризику загибелі у зв'язку з хворобливим станом або у зв'язку з умовами, такими, при яких нейрони знаходяться у стані ризику загибелі, що відбувається при захворюванні ALS. Таким чином, під підвищенням виживаності клітин, які знаходяться у стані ризику загибелі, при застосуванні сполук, що заявляються у даному винаході, мають на увазі, що такі сполуки знижують або запобігають ризику загибелі клітин.

У тому значенні, як використано у даному описі, термін «контактування» означає безпосереднє або непряме поєднання фрагментів, таке, коли фрагменти безпосередньо або непрямо вступають у фізичну асоціацію один з одним, внаслідок чого досягається потрібний результат. Так, у тому значенні, як використано у даному описі, може існувати «контакт» клітини-мішені зі сполукою, що розкривається у даному винаході, хоча дана сполука і клітина не обов'язково фізично зв'язані одна з одною (наприклад, у випадку, коли ліганд і рецептор фізично зв'язані один з одним) доти, доки досягається потрібний результат (наприклад, підвищення виживаності клітин). Контактування, таким чином, викликає такі дії, як поміщення фрагментів разом у контейнер (наприклад, додавання сполуки, що

розкривається, у контейнер, який містить клітини для *in vitro* досліджень), так само як і введення сполуки в об'єкт-мішень (наприклад, ін'єкція сполуки, що розкривається, лабораторній тварині для тестування *in vivo* або людині з метою лікування або профілактичної обробки).

У тому значенні, як використано у даному описі, термін «проліки» включає будь-які ковалентно зв'язані носії, які вивільняють активну частину ліків у вигляді сполуки даного винаходу *in vivo*, коли такі проліки вводять ссавцеві. Оскільки проліки, як відомо, поліпшують різні корисні властивості ліків (наприклад, розчинність, біодоступність, виробництво і т.п.), сполуки даного винаходу можна доставляти у формі проліків. Таким чином, даний винахід включає проліки сполук даного винаходу, які містять їх композиції та способи лікування захворювань і порушень за допомогою таких проліків.

Проліки сполук даного винаходу, наприклад, сполук формули I, можна одержати, модифікуючи присутні у сполуці функціональні групи таким чином, щоб такі модифіковані групи розщеплювалися або внаслідок звичайних процедур, або *in vivo*, з утворенням вихідної сполуки. Відповідно, проліки включають, наприклад, сполуки даного винаходу, в яких гідроксильна група, аміногрупа або карбоксигрупа зв'язана з якою-небудь групою таким чином, що коли проліки вводять ссавцеві, вони розщеплюється з утворенням вільного гідроксилу, вільної аміногрупи або карбонової кислоти, відповідно. Приклади включають (але не обмежуються цим) залишки амінокислот після видалення гідроксильної групи з карбоксильної групи, ацетат, форміат і бензоат похідні спиртових і амінофункціональних груп: і складні алкілові, карбоциклічні, арилові та алкіларілові ефіри, такі як метиловий, етиловий, пропіловий, ізопропіловий, бутиловий, ізобутиловий, втор-бутиловий, трет-бутиловий, циклопропіловий, феніловий, бензиловий та фенетиловий складні ефіри і т.п.

Конденсовані піролокарбазолі даного винаходу володіють важливими фармакологічними активностями, які знаходять застосування у різних областях, включаючи як дослідницькі, так і терапевтичну області застосування. Для простоти уявлення і щоб не обмежувати область застосувань, для яких сполуки даного винаходу можуть бути охарактеризовані, автори звичайно описують активності конденсованих піролокарбазолів наступним чином:

Інгібування ферментативної активності.

Вплив на функції і/або виживаність клітин, які реагують на трофічний фактор.

Інгібування запальних реакцій у відповідь.

Інгібування росту клітин, пов'язаного з гіперпроліферативними станами.

Інгібування еволюційно запрограмованої загибелі мотонейронів.

Інгібування ферментативної активності можна визначити, використовуючи, наприклад, аналізи VEGFR інгібування (наприклад, VEGFR2 інгібування), MLK інгібування (наприклад, MLK1,

MLK2 або MLK3 інгібування), інгібування PDGFR кінази, trk фосфорилування, стимульованого NGF, PKC інгібування або аналіз інгібування trk тирозинкінази. Вплив на функції і/або виживаність клітин, які реагують на трофічний фактор, наприклад, клітин нейронального походження, можна встановити, використовуючи будь-який з наступних методів аналізу: (1) аналіз з використанням культивування холинацетилтрансферази спинного мозку ("ChAT"); (2) аналіз з використанням нейритного подовження задньокорінцевого ганглія, що культивується ("DRG"); (3) аналіз з використанням ChAT активності нейронів, що культивуються, базального переднього мозку ("BFN"). Інгібування запальних реакцій у відповідь можна встановити, використовуючи аналіз мРНК індоламін-2,3-діоксигенази ("IDO"). Інгібування росту клітин, пов'язане зі станами гіперпроліферації, можна визначити, вимірюючи ріст клітинних ліній, які представляють інтерес, таких як лінія AT2 у випадку раку простати. Інгібування еволюційно запрограмованої загибелі мотонейронів можна оцінити *in ovo*, використовуючи соматичні мотонейрони ембріонів курчат, оскільки такі клітини зазнають природної загибелі між 6 і 10 днями ембріонального розвитку, і аналізуючи інгібування такої природної загибелі клітин, як опосередковане сполуками, що розкриваються у даному описі.

Інгібування ферментативної активності сполуками конденсованих піролокарбазолів даного винаходу можна визначити, використовуючи, наприклад, наступні аналізи:

Аналіз інгібування VEGFR.

Аналіз інгібування MLK.

Аналіз інгібування активності PKC.

Аналіз інгібування активності пості trkA тирозинкінази.

Аналіз інгібування trk фосфорилування, що стимулюється NGF, у препаратах цілих клітин.

Аналіз інгібування реиспторів фактора росту, одержаних з тромбоцитів (PDGFR).

Зокрема, інгібування рецептора фактора росту судинного ендотелію (VEGFR) знаходить застосування, наприклад, у випадках захворювань, при яких грає важливу роль ангіогенез, таких як рак солідних пухлин, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз, гемангіобластома, а також при інших захворюваннях очей та ракових захворюваннях. Інгібування MLK знаходить застосування, наприклад, при неврологічних захворюваннях. Інгібування trk знаходить застосування, наприклад, при захворюваннях простати, таких як рак простати і доброякісна гіперплазія простати, і при лікуванні болю, пов'язаного із запаленнями. Інгібування рецептора фактора росту, одержаного з тромбоцитів (PDGFR), знаходить застосування, наприклад при різних формах неоплазії, при ревматоїдних артритях, фіброзі легень, мієлофіброзі, ненормальному загосненні ран, при серцево-судинних захворюваннях, таких як атеросклероз, рестеноз, рестеноз після ангіопластики і т.п.

Було також показано, що конденсовані

піролокарбазоли мають позитивну дію на функції та виживаність клітин, які реагують на трофічний фактор, внаслідок підвищення виживаності нейронів. Що стосується, наприклад, виживаності холінергічних нейронів, дані сполуки можуть запобігти виживаності популяції холінергічних нейронів при ризику їх загибелі (наприклад, пов'язаної з ураженням, хворобливим станом, дегенеративними умовами або при природній прогресії), при порівнянні з холінергічною нейрональною популяцією, в якій відсутня така сполука, якщо оброблена популяція має порівняно більш тривалий період функціонування, ніж необроблена популяція.

Різні неврологічні порушення характеризуються нейрональними клітинами, які гинуть, ушкоджуються, функціонально знаходяться під загрозою, зазнають дегенерації аксонів, зазнають ризику загибелі і т.п. Такі порушення включають (але не обмежуються цим) неврологічні захворювання і порушення, хворобу Альцгеймера, порушення мотонейронів (наприклад, аміотрофічний латеральний склероз), хворобу Паркінсона, серцево-судинні захворювання (наприклад, удар, ішемія), хворобу Хантінгтона, СНІД деменцію, епілепсію, розсіяний склероз, периферичні невротатії (наприклад, ті, які впливають на DRG нейрони при пов'язаній з хіміотерапією периферичній невротатії), включаючи діабетичну невротатію і периферичну невротатію, пов'язану зі СНІД, порушення, викликані збуджувальними амінокислотами, і порушення, пов'язані з контузією або проникаючими ураженнями головного або спинного мозку.

Дані сполуки корисні не тільки для підвищення активностей, що індукуються трофічним фактором, у клітинах, які реагують на трофічний фактор, наприклад, у холінергічних нейронах, але також можуть використовуватися як агенти, що промотують виживаність для інших типів нейронних клітин, наприклад, допамінергічних або глутаматергічних. Фактор росту може регулювати виживаність нейронів за допомогою сигнальних каскадів, розміщених у прямому напрямі від малих, що зв'язують GTP, білків ras, rac і cdc42 (Denhardt, D.T., Biochem. J., 1996, 318, 729). Більш конкретно, активація ras приводить до фосфорилування та активації кінази, що активується позаклітинним рецептором (ERK), яка пов'язана з процесами біологічного росту і диференціації.

Стимулювання rac/cdc42 приводить до посилення активації JNK і p38, реакціям у відповідь, які пов'язані зі стресом, апоптозом і запаленнями. Хоча реакції у відповідь фактора росту відбуваються, головним чином, по шляху ERK, вплив на ці останні процеси може привести до альтернативних механізмів нейронального виживання, які можуть імітувати властивості посилення виживання фактора росту (Xia et al, Science, 1995, 270, 1326). Сполуки даного винаходу можуть також функціонувати як агенти, що промотують виживаність для нейрональних і не нейрональних клітин за рахунок механізмів, пов'язаних з виживаністю, опосередкованою

фактором росту, (але також відмінних від них), наприклад, інгібування JNK і p38 MAPK шляхів, які можуть привести до виживання за рахунок інгібування процесів загибелі апоптотичних клітин. Сполуки даного винаходу можна також використовувати для лікування порушень, пов'язаних зі зниженою активністю або загибеллю, з ураженням мотонейронів спинного мозку, а також можна використовувати, наприклад, при захворюваннях, пов'язаних із загибеллю апоптозних клітин центральної і периферичної нервової системи, імунної системи і при запальних захворюваннях. ChAT каталізує синтез нейротрансмітерного ацетилхоліну і розглядається як ферментний маркер для функціонального холінергічного нейрона. Функціональний нейрон також здатний до виживання. Виживаність нейронів аналізують, використовуючи кількісне визначення специфічного захоплення і ферментативного перетворення барвника (наприклад, кальцеїну АМ) живими нейронами. Сполуки, що розкриваються, можуть також знайти застосування при лікуванні хворобливих станів, що включають проліферацію злоякісних клітин, таких, які відповідають багатьом раковим захворюванням.

Завдяки їх різноманітним властивостям, ізомерні конденсовані піролокарбазоли та ізоіндолони можна використовувати й в інших застосуваннях, таких як наукові дослідження. Так наприклад, сполуки можна використовувати при створенні *in vitro* моделей виживаності нейрональних клітин, їх функціонування, ідентифікації або для скрінінгу інших синтетичних сполук, які володіють активністю, аналогічною активності ізомерних конденсованих піролокарбазольних та ізоіндолонівих сполук. Таким чином, сполуки, представлені у даному винаході, є корисними як стандарти або порівняльні сполуки для використання у тестах або аналізах для визначення активності агента у фармацевтичних дослідницьких програмах.

Сполуки можна також використовувати для дослідження, характеристики і визначення молекулярних мішеней, пов'язаних з функціональними реакціями у відповідь. Наприклад, шляхом введення радіомічення ізомерні конденсовані піролокарбазольні або ізоіндолоніві сполуки, пов'язані зі специфічною клітинною функцією (наприклад, мітогенезом), можна визначити, виділити і очистити для характеристики об'єкта-мішені, з яким зв'язується похідне. Як додаткову ілюстрацію сполуки можна використовувати для розробки аналізів і моделей для подальшого розуміння ролі, яку інгібування серин/треонін або тирозинпротеїнкінази (наприклад, PKC, trk тирозинкінази) грає в аспектах механізмів, пов'язаних з порушеннями і захворюваннями. Так, сполуки даного винаходу корисні як діагностичні реагенти у діагностичних аналізах, таких як описані у даному описі аналізи.

Результати, одержані у VEGFR і MLK аналізах, представлені нижче. Інші аналізи також описуються більш детально. Але їх жодним чином не треба розглядати як такі, що обмежують об'єм даного винаходу. Деякі скорочення, використані

для простоти, визначені наступним чином: «мкг» означає мікрограм, «мг» означає міліграм, «г» означає грам, «мкл» означає мікролітр, «мл» означає мілілітр, «л» означає літр. «нМ» означає наномольярний, «мкМ» означає мікромольярний, «мМ» означає мілімольярний, «М» означає мольярний і «нм» означає нанометр.

Синтез

У даному винаході запропонований також спосіб одержання конденсованих піролокарбазолів даного винаходу. Сполуки даного винаходу можна одержати рядом способів, добре відомих фахівцям у даній області. Сполуки можна синтезувати, наприклад, способами, представленими нижче на схемах, або їх варіантами, очевидними для фахівців у даній області. Відповідні модифікації та заміщення очевидні і добре відомі або можуть бути легко з'ясовані фахівцями у даній області з наукової літератури. Всі способи, розкриті у зв'язку з даним винаходом, можна здійснити на практиці у будь-якому масштабі, включаючи міліграми, грами, кілограми, десятки кілограмів, або у промисловому масштабі.

Потрібно розуміти, що сполуки даного винаходу можуть містити один або більше асиметрично заміщених атомів вуглецю, і їх можна розділити на оптично активні або рацемічні форми. Тому всі хіральні, діастереомерні, рацемічні форми і всі форми геометричних ізомерів структури включені в об'єм даного винаходу, якщо тільки не вказані конкретні стереохімічні або ізомерні форми. Фахівцям у даній області добре відомо як одержати такі оптично активні форми. Наприклад, суміші стереоізомерів можна розділити, використовуючи стандартні методики поділу рацемічних форм, включаючи (але, не обмежуючись ними) звичайну хроматографію, хроматографію з оберненою фазою та хіральну хроматографію, вибірно селектування, перекристалізацію і т.п., або хіральний синтез з активних вихідних речовин, або методичний хіральний синтез центрів-мішеней.

Як можна легко зрозуміти, функціональні групи, які присутні у сполуках даного винаходу, можуть містити захисні групи. Наприклад, замісники бокових ланцюгів аміногруп можна захистити захисними групами, такими як бензилоксикарбонільна або трет-бутоксикарбонільна групи. Захисні групи відомі самі по собі як хімічні функціональні групи, які можна селективно додати або видалити з функціональних груп, таких як гідроксильні групи і карбоксильні групи. Такі групи присутні у хімічних сполуках для додання таким функціональностям інертності відносно хімічних реакцій, яким піддаються дані сполуки. У рамках даного винаходу можна використовувати будь-які з різноманітних захисних груп. Переважні захисні групи включають бензилоксикарбонільну (Cbz: Z) групу і трет-бутоксикарбонільну (Boc) групу. Інші переважні захисні групи відповідно до даного винаходу можна знайти [у Greene. T.W. and Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" 2d. Ed., Wiley & Sons, 1991].

Схема 1

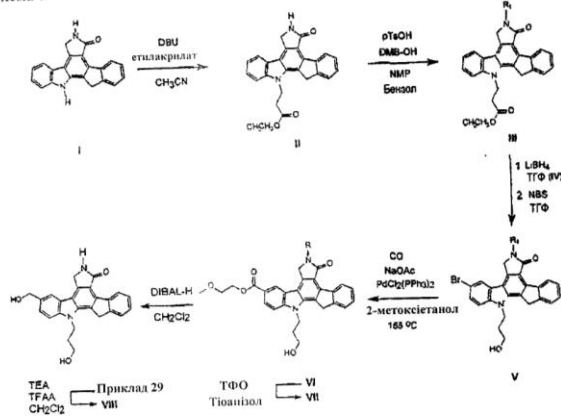


Схема 2

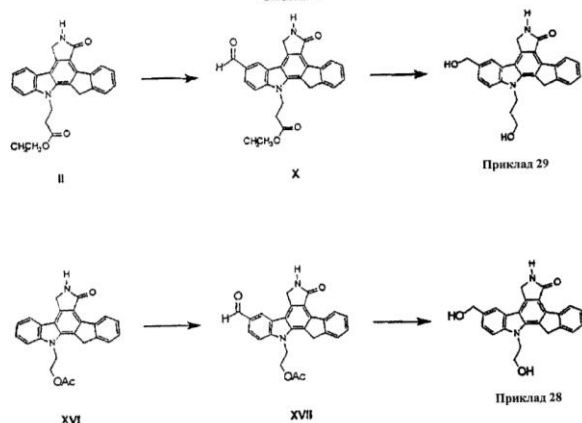


Схема 3

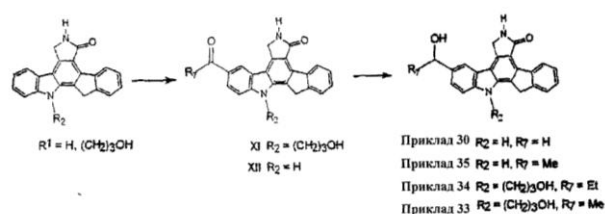
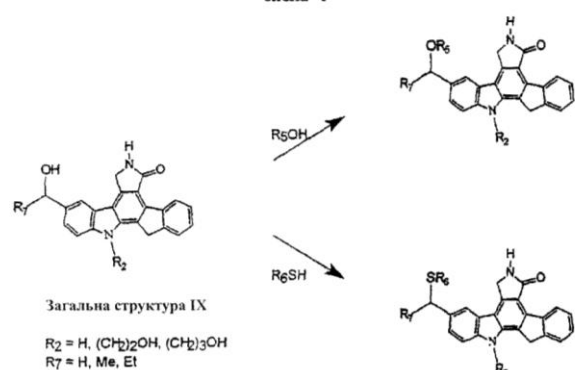


Схема 4



Загальна структура IX

 $\text{R}_2 = \text{H}, (\text{CH}_2)_2\text{OH}, (\text{CH}_2)_3\text{OH}$
 $\text{R}_7 = \text{H}, \text{Me}, \text{Et}$

Схема 5

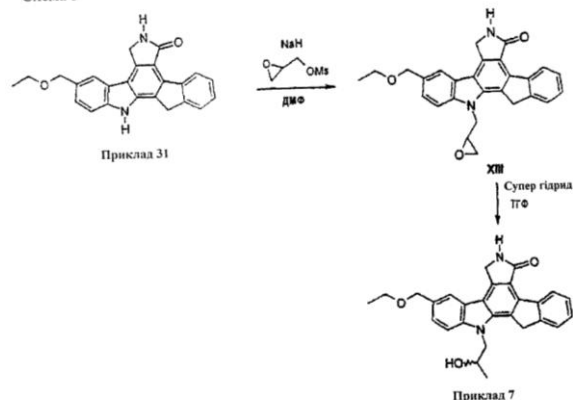


Схема 6

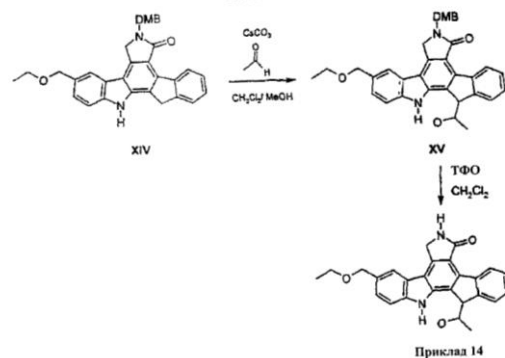


Схема 7

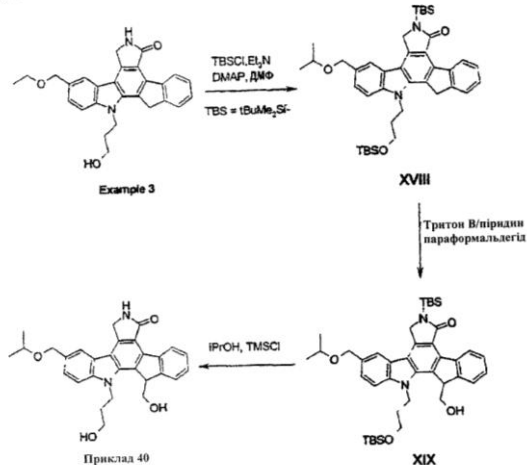
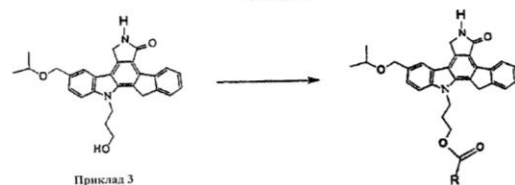


Схема 8



Приклад 18 $\text{R} = \text{CH}_2\text{NH}_2$
 Приклад 19 $\text{R} = \text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
 Приклад 20 $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$
 Приклад 21 $\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$
 Приклад 22 $\text{R} = \text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
 Приклад 23 $\text{R} = (\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$

Опис синтезу

Сполуки А і В одержують шляхом алкілювання індолу І 2-брометилбензиловим простим ефіром (А) або 3-бромпропілбензиловим простим ефіром (В), використовуючи NaH у ДМФ, з подальшим дебензилюванням ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{H}_2$) [за способом патенту США 5705511]. Порівняльну сполуку С одержують у результаті реакції сполучення В з Вос-лейцином з подальшим видаленням захисної ВОС-групи, використовуючи стандартні методики, відомі фахівцям в області органічного синтезу. Сполуку В можна також одержати внаслідок відновлення складного ефіру IV відновлювальним агентом, таким як LiBH_4 , з подальшим видаленням бензгидрольної захисної групи. Способи одержання бензилових простих ефірів і простих ефірів тіолу представлені на схемах. Для одержання 33-гідроксиметильних проміжних сполук 28-30, 33-35 використовують два способи. На схемі 1 (Спосіб А) представлений спосіб карбонілювання, тоді як на схемі 2 (спосіб В) представлений спосіб формілювання. На схемі 1 внаслідок реакції Міхаеля сполуки І з етилакрилатом і такою основою, як DBU одержують II з подальшим захистом азоту лактаму диметоксибензгідролем, одержуючи сполуку III. Відновлення складного етилового ефіру з використанням таких відновлювальних агентів як боргідрид літію з подальшим бромуванням N-бромсукцинімідом забезпечує одержання проміжної сполуки V з хорошим повним виходом. Процес карбонілювання сполуки V з використанням паладієвого каталізатора у метоксіетанолі приводить до одержання метоксіетокси складного ефіру VI. Після видалення захисних груп з утворенням VII, складний ефір можна відновити за допомогою відновлювальних агентів, наприклад, діізобутілалюмінійгідриду (DIBAL-H) з одержанням діолу 29. У способі формілювання до гідроксиметильних сполук (спосіб В, схема 2) використовують, наприклад, HMTA у ТФО або α , α -дихлорметилметиловому простому ефірі і кислоту Льюїса. Альдегіди можна відновити до гідроксиметильних сполук, використовуючи відновлювальні агенти, такі як боргідрид натрію або діізобутілалюмінійгідрид. Метиловий простий ефір або тіоефір можна одержати, використовуючи загальну методику, представлену на схемі 4. В одному з варіантів, наприклад, діол 29 можна перетворити у три-трифторацетатну проміжну сполуку, використовуючи ангідрид трифтороцтової кислоти і основу, таку як триетиламін, з подальшою обробкою даної проміжної сполуки відповідним алкіловим спиртом або алкілтіолом, з одержанням бензилового простого ефіру (1-25, 27, 31, 32, 36-40) безпосередньо. У деяких випадках можна виділити три фтор ацетатний складний ефір первинного спирту. У даних прикладах спирт можна виділити внаслідок обробки трифторацетату основою, такою як гідроксид літію. В іншому варіанті прості ефіри та тіоефіри можна одержати, здійснюючи взаємодію діолу, наприклад, 28 або 29, зі спиртом і кислотним каталізатором, таким як паратолуолсульфонова кислота або камфорсульфонова кислота, у розчиннику,

наприклад, метиленхлориді, толуолі або 1,2-дихлоретані.

Спирти 33-35 використовували для одержання простого ефіру прикладів 10-13, 15, 16 і 36. Сполуки прикладів 33-35 одержують з кетонів XI і XII, як представлено на схемі 3. Прості ефіри та тіоефіри одержують, використовуючи методики, представлені вище на схемі 4.

Сполуку прикладу 7 одержують за способом, представленим на схемі 7. Сполуку прикладу 31 алкілюють мезилгліцидом, одержуючи сполуку XIII. Відновлення триетилборгідридом у ТГФ приводить до одержання, наприклад, вторинного спирту 7. Сполуку прикладу 14 одержують (схема 6), обробляючи сполуку XIV карбонатом цезію і ацетальдегідом у суміші метиленхлорид/метанол. Сполуку прикладу 40 одержують способом, представленим на схемі 7. Захищену Di-TBS сполуку XVIII алкілюють параформальдегідом, використовуючи тритон В/піридин, з подальшим видаленням захисних груп, використовуючи TMSCl, одержуючи сполуку прикладу 40. Ефіри амінокислот прикладів 18-23 одержують зі сполук прикладу 3 і відповідних карбонових кислот, використовуючи стандартні реакції сполучення, відомі фахівцям в області органічного синтезу.

Інші відмітні ознаки винаходу стануть очевидні на основі подальшого опису прикладів втілення. Дані приклади представлені для ілюстрації винаходу, і жодним чином його не обмежують.

Приклади

Деякі скорочення, що використовуються, визначені таким чином: "°C" градуси Цельсія, "д" дублет, "дд" дублет дублетів, "т" триплет, "м" мультиплет, "екв" еквівалент, "г" грам або грами, "мг" міліграм або міліграми, "мл" мілілітр або мілілітри, "Н" водень або водні, "год." година або години, "М" молярний, "хв." хвилина або хвилини, "МГц" мегагерц, "МС" мас-спектрометрія, "ямр" або "ЯМР" спектроскопія ядерного магнітного резонансу.

Одержання сполуки II:

До суспензії І (8,0г, 0,258моль) в ацетонітрилі (300мл) при кімнатній температурі в атмосфері азоту додають етилакрилат (4,19мл, 0,387моль), а потім 1,8-діазабіцикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU) (1,93мл, 0,013моль). Після додавання DBU колір реакційного розчину змінюється від оранжевого до зеленого. Реакційну суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом ночі. Суміш залишається гетерогенною протягом реакції і стає темного кольору. Невелику аліквоту відбирають після 18 годин і тверду частину відфільтровують. Спектр ^1H ЯМР зразка свідчить про відсутність вихідної речовини. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і тверду частину відфільтровують. Тверду частину декілька разів промивають холодним ацетонітрилом і сушать у вакуумі при 55°C, одержуючи тверду речовину світло-оранжевого кольору (5,4г, 78% вихід). ^1H ЯМР ($\text{DMSO}-d_6$, 300МГц): δ 9,72 (т, 3H, J=6,8), 2,87 (м, 2H), 3,89 (кв, 2H, J=6,8), 4,49 (с, 2H), 4,88 (с, 2H), 4,92 (м, 2H), 7,29-7,48 (м, 3H), 7,50-7,73 (м, 3H), 7,96 (д, 1H, J=7,33), 8,56 (с, 1H), 9,47 (д, 1H, J=7,33).

Одержання сполуки III:

До суспензії сполуки II (5,62г, 0,0137моль) у бензолі (300мл) і N-метилпіролідіні (NMP) (60мл) при кімнатній температурі в атмосфері азоту додають моногідрат п-толуолсульфонової кислоти (2,48г, 0,013моль) і 4,4'-диметоксибензгідрол (3,19г, 0,013моль). Вміст колби кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 8 годин. Через 45 хвилин вихідна гетерогенна реакційна суміш стає гомогенною. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, розбавляють етилацетатом (300мл) і промивають насиченим розчином бікарбонату натрію, водою і розсоллом. Органічний шар сушать над сульфатом магнію і концентрують у вакуумі, одержуючи тверду речовину оранжевого кольору (8,31г, вихід 95%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 300МГц): δ 1,18 (т, 3H, J=7,1), 2,84 (м, 2H), 3,80 (6H, с), 4,12 (кв, 2H, J=7,1), 4,38 (с, 2H), 4,72 (2H, с), 4,94 (м, 2H), 6,90 (д, 4H, J=8,5), 6,955 (с, 1H), 7,26 (д, 4H, J=8,5), 7,34-7,49 (м, 5H), 7,61 (д, 1H, 1=7,4), 7,69 (д, 1H, J=7,7), 9,65 (д, 1H, 1=7,8).

Одержання сполуки IV:

До розчину III, що перемішується, (7,8г, 0,0122моль) у ТГФ (480мл) і метанолі (93мл) по краплях додають боргідрид літію (18,9мл 2,0М розчин, 0,0379моль). Реакційна суміш спочатку гомогенна, однак, по мірі протікання реакції суміш перетворюється у гетерогенну. Після того як витрачена вся вихідна речовина, реакційну суміш охолоджують на крижаній бані і обережно гасять 2N HCl (60мл). Реакційна суміш перетворюється у гомогенну і забарвлюється у світло-оранжевий колір. До суміші додають воду (750мл), і при цьому утворюється молочно-білий осад. Осад відфільтровують і сушать у вакуумі, одержуючи пухнасту тверду речовину білого кольору (7,2г, вихід 99%). ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 300МГц): δ 1,93 (м, 2H), 3,66 (м, 2H), 3,71 (с, 6H), 4,55 (с, 2H), 4,73 (м, 2H), 4,79 (с, 2H), 6,70 (с, 1H), 6,93 (д, 4H, J=8,44), 7,22 (д, 4H, J=8,4), 7,26 (м, 1H), 7,34-7,46 (м, 2H), 7,49 (м, 1H), 7,65 (д, 1H, 1=7,01), 7,70 (д, 1H, J=8,26), 7,86 (д, 1H, J=7,82), 9,49 (д, 1H, 1=7,49).

Одержання сполуки V:

До суспензії сполуки IV (2,02г, 0,0034моль) у ТГФ (131мл) при кімнатній температурі в атмосфері азоту додають N-бромсукцинімід (0,63г, 0,0036моль) однією порцією. Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник видаляють з реакційної суміші у вакуумі, одержуючи у залишку тверду речовину блідо-жовтого кольору. Тверду речовину ретельно розтирають з холодним метанолом і відфільтровують. Тверду частину сушать у вакуумі, одержуючи тверду речовину блідо-жовтого кольору (1,98г, вихід 87%). ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 300МГц): δ 1,91 (м, 2H), 3,44 (м, 2H), 3,72 (с, 6H), 4,53 (с, 2H), 4,74 (м, 2H), 4,87 (с, 2H), 6,71 (с, 1H), 6,93 (д, 4H, J=8,14), 7,25 (д, 4H, J=8,1), 7,37 (м, 2H), 7,59-7,69 (м, 3H), 8,08 (с, 1H), 9,50 (д, 1H, J=7,01).

Одержання сполуки VI:

В ампулу Шленка вміщують сполуку V (0,79г, 0,0017моль) у метоксіетанолі (25мл), а потім ацетат натрію (0,57г, 0,00702моль) і дихлорбіс(трифеніл-фосфін)паладій(II) (0,082г, 0,000117моль). Ампулу відкачують і заповнюють

окисом вуглецю. Реакційну суміш нагрівають у запаяній ампулі при 155°C на масляній бані протягом 3 годин. Реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури і додають додатково окис вуглецю. Суміш знову нагрівають при 150°C протягом 3 годин. Додають додатково CO і $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ і суміш нагрівають протягом 4 годин. Реакційну суміш розбавляють метиленхлоридом і швидко пропускають через шар целіту. Одержаний фільтрат концентрують у вакуумі до одержання залишку, який розчиняють в етилацетаті і промивають водою. Органічний шар сушать над сульфатом магнію, фільтрують і концентрують у вакуумі, одержуючи тверду речовину, яку ретельно розтирають з етиловим ефіром і відфільтровують, одержуючи тверду речовину світло-оранжевого кольору (0,7г, вихід 85%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 300МГц): δ 2,14 (м, 2H), 3,44 (с, 3H), 3,67-3,78 (м, 4H), 3,81 (с, 6H), 4,44 (с, 2H), 4,51 (м, 2H), 4,81 (м, 4H), 6,91 (д, 4H, J=8,53), 6,98 (с, 1H), 7,28 (д, 4H, 8,6), 7,34-7,61 (м, 4H), 8,21 (д, 1H, J=8,32), 8,42 (с, 1H), 9,67 (д, 1H, J=7,61).

Одержання сполуки VII:

До розчину сполуки VI (0,96 г, 0,00138моль) у CH_2Cl_2 (30мл) при 0°C в атмосфері азоту додають тіоанізол (3,2мл, 0,110моль), а потім трифтороцтову кислоту (ТФО) (8,5мл 0,0276моль). Після додавання ТФО колір реакційної суміші стає червоним. Суміш перемішують при 0°C протягом 1 години, а потім нагрівають до кімнатної температури протягом ночі. Реакційний розчинник видаляють у вакуумі, залишається масло темно-червоного кольору. До масла додають етиловий ефір, і реакційна суміш набуває жовтого кольору, причому з розчину випадає осад жовто-коричневого кольору. Тверду речовину відфільтровують (0,6г, вихід 92%). ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 300МГц): δ 2,29 (м, 2H), 3,3 (м, 2H), 3,73 (м, 2H), 4,45 (м, 2H), 4,54 (м, 3H), 4,82 (м, 2H), 4,99 (с, 2H), 7,40 (м, 2H), 7,58 (д, 1H), 7,85 (д, 1H), 8,13 (д, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,6 (с, 1H), 9,49 (д, 1H).

Приклад 29 (спосіб А):

До суспензії сполуки VII, що перемішується, (4,4г, 0,00935моль) в CH_2Cl_2 (220мл) при 0°C в атмосфері азоту повільно по краплях додають DIBAL-H. Реакційна суміш поступово стає гомогенною. Забарвлену в оранжевий колір реакційну суміш перемішують при 0°C протягом 1 години, потім нагрівають до кімнатної температури і перемішують 6 годин. Суміш охолоджують до 0°C на крижаній бані і дуже повільно додають воду (50мл). На початковій стадії відбувається інтенсивне виділення газу. Додають водний розчин NaOH (1M 300мл) і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години. Утворюється осад, який відфільтровують, одержуючи тверду речовину жовто-коричневого кольору (3,6г, 96%). ^1H ЯМР (DMCO-d_6 , 300МГц): δ 1,92 (м, 2H), 3,46 (м, 2H), 4,50 (с, 2H), 4,65 (с, 2H), 4,71 (м, 2H), 4,88 (с, 2H), 7,32-7,39 (м, 2H), 7,47 (д, 1H, J=8,34), 7,65 (м, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,53 (с, 1H), 9,46 (д, 1H, J=7,44).

Одержання сполуки X:

До розчину сполуки II, що перемішується, (2,77г, 6,75моль) у суміші метиленхлорид/толуол (3:1. 30/10мл) додають хлорид олова (15екв.) і α -

дихлорметилметиловий простий ефір (20екв.). Колір суміші змінюється від оранжевого до темно-зеленого. За зникненням вихідної речовини у реакційній суміші стежать за даними ВЕРХ. Суміш охолоджують до 0°C і гасять водним HCl. Суміш переносять у круглодонну колбу і концентрують у вакуумі, одержуючи масло зелено-коричневого кольору. Додають додатково HCl та етилацетат і суміш знову концентрують у вакуумі. З розчину осаджується тверда речовина коричнюватого рожевого кольору. Твердий продукт ретельно розтирають з гексаном і розчинник декантують. Цю процедуру повторюють 5 разів. Твердий продукт відфільтровують і сушать, одержуючи тверду речовину світлого розувато-коричневого кольору, 2,65г (90% вихід). МС (ESI): m/e 439 ($M+H$)+, 1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 300МГц): δ 1,00 (т, 3H), 2,94 (м, 2H), 3,93 (кв, 2H), 4,50 (с, 2H), 4,97 (м, 4H), 7,37 (м, 2H), 7,65 (д, 1H), 7,96 (д, 1H), 8,03 (д, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,67 (с, 1H), 9,48 (д, 1H), 10,49 (с, 1H).

Приклад 29 (спосіб В):

До суспензії сполуки X (2,37г, 0,005моль) у ТГФ (50мл) при 0°C в атмосфері азоту додають боргидрид літію (10екв.). Світло-коричневу суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3,5 годин, після чого за даними ВЕРХ не залишається вихідної речовини. Суміш охолоджують до 0°C і дуже повільно додають метанол доти, доки не спостерігається виділення газу. Суміш стає гомогенною, а потім починає утворюватися осад. Суміш концентрують у вакуумі, одержуючи тверду речовину блідо-жовтого кольору, яку ретельно розтирають з водою і відфільтровують, одержуючи 2,0г продукту (вихід 96%).

Одержання сполуки VIII:

До суспензії сполуки 29 (1,13моль, 1екв.) у метиленхлориді (30мл) при 0°C в атмосфері азоту додають трифтороцтовий ангідрид (Зекв.), а потім триетиламін (Зекв.). Реакційна суміш поступово стає гомогенною, і її перемішують при 0°C протягом 1 години, а потім при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш розбавляють метиленхлоридом і промивають водою та розсоллом. Органічну фазу сушать над сульфатом магнію, фільтрують і концентрують у вакуумі, одержуючи тверду речовину. Дану речовину використовують без додаткового очищення.

Загальна методика одержання простого ефіру (Загальна структура IX):

Продукт VIII розчиняють у відповідному спирті (0,025M) і нагрівають до 80°C на масляній бані. Спостерігають за зникненням вихідної речовини у реакційній суміші. Суміш охолоджують до кімнатної температури і розчинник видаляють у вакуумі, одержуючи тверду речовину. Одержану тверду речовину ретельно розтирають з ефіром і відфільтровують. У деяких випадках продукт піддають додатковому очищенню, використовуючи хроматографічні методи.

За допомогою описаної вище загальної методики одержують наступні сполуки:

Приклад 1: $R^5=OEt$, 18% чистий вихід; МС (m/z): 427 ($M^+ + 1$). 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,148 (т, 3H), 1,94 (м, 2H), 3,46-3,52 (м, 4H), 4,53 (с, 2H), 4,60 (с, 2H), 4,73 (м, 2H), 4,91 (с, 2H),

7,36 (м, 3H), 7,48 (д, 1H), 7,64 (м, 2H), 7,90 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 2: $R^5=OMe$, 95% вихід; МС (m/z): 413 ($M^+ + 1$), 435 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,99 (м, 2H), 3,36 (с, 3H), 3,54 (м, 2H), 4,58 (с, 2H), 4,66 (с, 2H), 4,79 (м, 2H), 4,96 (с, 2H), 7,40-7,49 (м, 2H), 7,52 (д, 1H), 7,65-7,84 (м, 2H), 7,98 (с, 1H), 8,60 (с, 1H), 9,51 (д, 1H).

Приклад 3: $R^5=OiPr$, 31% вихід; МС (m/z): 441 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,15 (д, 6H), 1,92 (м, 2H), 3,45 (м, 2H), 3,67 (м, 1H), 4,52 (с, 2H), 4,61 (с, 2H), 4,73 (м, 2H), 4,89 (с, 2H), 7,3-7,39 (м, 2H), 7,47 (д, 1H), 7,62-7,69 (м, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 4: $R^5=OCH(CH_3)CH_2CH_3$, 25% вихід; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ (м.д.): 0,98 (т, 3H), 1,26 (д, 3H), 1,65 (м, 2H), 2,03 (м, 2H), 3,56 (м, 2H), 4,095 (м, 1H), 4,24 (с, 2H), 4,57 (м, 2H), 4,70 (м, 2H), 4,71 (с, 2H), 6,12 (с, 1H), 7,33 (т, 1H), 7,42-7,58 (м, 4H), 7,75 (с, 1H), 9,48 (д, 1H).

Приклад 5: $R^5=(R)-OCH(CH_3)CH_2CH_3$, 61% вихід; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ (м.д.): 0,98 (т, 3H), 1,26 (д, 3H), 1,65 (м, 2H), 2,03 (м, 2H), 3,56 (м, 2H), 4,095 (м, 1H), 4,24 (с, 2H), 4,57 (м, 2H), 4,70 (м, 2H), 4,71 (с, 2H), 6,12 (с, 1H), 7,33 (т, 1H), 7,42-7,58 (м, 4H), 7,75 (с, 1H), 9,48 (д, 1H).

Приклад 6: $R^5=(S)-OCH(CH_3)CH_2CH_3$, 93% вихід; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ (м.д.): 0,98 (т, 3H), 1,26 (д, 3H), 1,65 (м, 2H), 2,03 (м, 2H), 3,56 (м, 2H), 4,095 (м, 1H), 4,24 (с, 2H), 4,57 (м, 2H), 4,70 (м, 3H), 4,71 (с, 2H), 6,12 (с, 1H), 7,33 (т, 1H), 7,42-7,58 (м, 4H), 7,75 (с, 1H), 9,48 (д, 1H).

Приклад 8: $R^5=O-nPr$, 62% вихід; МС (m/z): 441 ($M^+ + 1$), 462 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 0,88 (т, 3H), 1,55 (м, 2H), 1,933 (м, 2H), 3,36-3,58 (м, 4H), 4,53 (с, 2H), 4,61 (с, 2H), 4,73 (м, 3H), 4,90 (с, 2H), 7,33-7,39 (м, 2H), 7,47 (д, 1H), 7,62-7,70 (м, 2H), 8,54 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 9: $R^5=O-nBu$, 92% вихід; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 0,854 (т, 3H), 1,34 (м, 2H), 1,52 (м, 2H), 1,93 (м, 2H), 3,48 (м, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,60 (с, 2H), 4,73 (м, 3H), 4,89 (с, 2H), 7,30-7,42 (м, 2H), 7,47 (д, 1H), 7,62-7,70 (м, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 17: $R^5=O-tBu$, 35% вихід; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$), 477 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,28 (с, 9H), 1,97 (м, 2H), 3,62 (м, 2H), 4,56 (с, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,77 (м, 3H), 4,94 (с, 2H), 7,35-7,72 (3м, 3H), 7,72 (м, 2H), 7,90 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 9,50 (д, 1H).

Приклад 25: $R^6=SEt$, 96% вихід; МС (m/z): 443 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,17 (т, 3H), 1,93 (м, 2H), 2,42 (кв, 2H), 3,48 (м, 2H), 3,93 (с, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,72 (м, 3H), 4,89 (с, 2H), 7,33-7,49 (м, 3H), 7,65 (м, 2H), 7,88 (с, 1H), 8,56 (с, 1H), 9,46 (д, 1H).

Приклад 26: $R^6=SOCH(CH_3)_2$, МС (m/z): 494 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, ДМСО- d_6) δ (м.д.): 1,21 (дд, 6H), 1,93 (м, 2H), 2,82 (м, 1H), 3,49 (м, 2H), 4,12 (д, 1H), 4,23 (д, 1H), 2,52 (с, 2H), 4,75 (м, 3H), 4,88 (с, 2H), 7,33-7,45 (м, 2H), 7,55 (д, 1H), 7,65 (д, 1H), 7,71 (д, 1H), 7,94 (с, 1H), 8,58 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 27: $R^6 = SCH(CH_3)_2$, МС (m/z): 457 ($M^+ + 1$), 479 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, $CDCl_3$) δ (м.д.): 1,31 (д, 6H), 2,34 (м, 2H), 2,86 (м, 1H), 3,98 (с, 2H), 4,29 (с, 2H), 4,45 (м, 1H), 4,74 (м, 2H), 4,92 (с, 2H), 6,07 (с, 1H), 7,39 (м, 2H), 7,51 (м, 2H), 7,57 (м, 1H), 7,80 (с, 1H), 9,53 (д, 1H).

Приклад 37: $R^6 = nPrS$ (три фтор ацетат), вихід 66%; 1H ЯМР ($DMCO-d_6$, 300МГц): δ 0,92 (т, 3H), 1,58 (кв, 2H), 2,29 (м, 2H), 2,44 (т, 2H), 3,95 (с, 2H), 4,53 (м, 4H), 4,82 (м, 2H), 4,93 (с, 2H), 7,41 (м, 2H), 7,52 (д, 1H), 7,60 (д, 1H), 7,72 (д, 1H), 7,93 (с, 1H), 8,62 (с, 1H), 9,51 (д, 1H).

Приклад 38: $R^6 = S(C_5H_4N)$, вихід 51%; МС (ESI): m/e 514 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР ($DMCO-d_6$, 300МГц): δ 1,014 (м, 2H), 3,45 (м, 2H), 4,51 (с, 2H), 4,60 (с, 2H), 4,72 (м, 3H), 4,85 (с, 2H), 7,11 (м, 1H), 7,30-7,41 (м, 3H), 7,54-7,67 (м, 4H), 8,02 (с, 1H), 8,48 (д, 1H), J=3,97, 8,55 (с, 1H). 9,46 (д, 1H, J=7,36).

Приклад 39: $R^6 = S(C_4H_3N_2)$, вихід 52%; МС (m/z): 493 ($M^+ + H$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,93 (м, 2H), 3,45 (м, 2H), 4,51 (с, 3H), 4,60 (с, 2H), 4,72 (м, 2H), 4,88 (с, 2H), 7,22 (т, 1H), 7,32-7,68 (м, 6H), 8,05 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 8,66 (д, 1H), 9,46 (д, 1H).

Приклад 30: $R^5 = H$, вихід 44%; 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 4,13 (с, 2H), 4,64 (с, 2H), 4,89 (с, 2H), 7,28-7,42 (м, 3H), 7,53 (д, 1H), 7,64 (д, 1H), 7,89 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 9,34 (д, 1H), 11,83 (с, 1H).

Приклад 31: $R^5 = OEt$, вихід 83%; 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,18 (т, 3H), 3,55 (кв, 2H), 4,62 (с, 2H), 4,93 (с, 2H), 7,34-7,46 (м, 3H), 7,58 (д, 1H), 7,68 (д, 1H), 7,92 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 9,39 (д, 1H), 11,91 (с, 1H).

Приклад 32: $R^5 = OiPr$, чистий вихід 41%; 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,15 (д, 6H), 3,68 (м, 1H), 4,13 (с, 2H), 4,59 (с, 2H), 4,89 (с, 2H), 7,28-7,42 (м, 3H), 7,54 (д, 1H), 7,64 (д, 1H), 7,88 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 9,35 (д, 1H), 11,87 (с, 1H).

Одержання сполуки XI:

До суспензії алюмінійхлориду (Зекв.) у суміші 1,2-дихлоретан/метилен-хлорид (1:1, 8мл) додають ацетилхлорид (Зекв.) в атмосфері азоту. Реакційна суміш стає гомогенною і її охолоджують до 0°C на крижаній бані. Суспензію В (0,84моль, 1екв.) у метиленхлориді (3мл) додають по краплях, і одержана суміш набуває коричневого кольору. Крижану баню видаляють і реакційну суміш нагрівають до кімнатної температури. Суміш кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 2 годин, потім охолоджують до кімнатної температури. За даними ВЕРХ вихідна речовина відсутня. Суміш виливають у крижану воду і додають концентровану HCl (5мл). Осад, що утворився, відфільтровують і сушать. 340мг (89% вихід), МС (m/z): 453 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 2,02 (с, 3H), 2,18 (м, 2H), 2,74 (с, 3H), 4,12 (м, 2H), 4,56 (с, 2H), 4,83 (м, 2H), 5,05 (с, 2H), 7,43 (м, 2H), 7,68 (д, 1H), 7,86 (д, 1H), 8,17 (д, 1H), 8,56 (с, 1H), 8,72 (1H), 9,53 (д, 1H).

Приклад 33:

До суспензії сполуки XI (0,18моль, 1екв.) у ТГФ (6мл) в атмосфері азоту додають боргидрид літію (10екв.) при 0°C. Реакційну суміш перемішують при 0°C протягом 1 години, потім нагрівають при кімнатній температурі протягом 4 годин. Суміш

охолоджують до 0°C і обережно по краплях додають метанол. Під час гасіння надлишку боргидриду спостерігається інтенсивне виділення газу. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Реакційну суміш розбавляють етилацетатом і промивають водою та розсоллом. Органічний шар сушать над сульфатом магнію, фільтрують і концентрують у вакуумі, одержуючи тверду речовину, 69мг (90% вихід). МС (m/z): 413 ($M^+ + 1$), 435 ($M^+ + Na$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,41 (д, 3H), 1,92 (м, 2H), 3,46 (м, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,71 (м, 3H), 4,89 (с, 3H), 5,18 (с, 1H), 7,32-7,39 (м, 2H), 7,50 (д, 1H), 7,64 (м, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 9,46 (д, 1H).

Відповідно до загальної методики одержання простих ефірів одержують наступні сполуки, використовуючи три-трифторацетатні проміжні сполуки:

Приклад 10: $R^5 = OEt$, вихід 68%; МС (m/z): 441 ($M^+ + 1$), 395 ($M^+ - OCH_2CH_3$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,08 (т, 3H), 1,41 (д, 3H), 1,93 (м, 2H), 3,47 (м, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,60 (м, 1H), 4,73 (м, 2H), 4,90 (м, 2H), 7,33-7,39 (м, 2H), 7,47 (д, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,69 (д, 1H), 7,86 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Поділ сполуки 10 за допомогою ВЕРХ з оберненою фазою дає ізомери 11 і 12.

Приклад 11: (хіральний): $R^5 = OEt$, МС (m/z): 441 ($M^+ + 1$), 395 ($M^+ - OCH_2CH_3$).

Приклад 12: (хіральний): $R^5 = OEt$, МС (m/z): 441 ($M^+ + 1$), 395 ($M^+ - OCH_2CH_3$).

Приклад 13: $R^5 = OMe$, вихід 76%; МС (m/z): 427 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,45 (д, 3H), 1,98 (м, 2H), 3,14 (с, 3H), 3,50 (м, 2H), 4,58 (м, 3H), 7,75 (м, 2H), 4,93 (с, 2H), 7,33 (м, 2H), 7,48 (д, 1H), 7,67 (д, 1H), 7,72 (д, 1H), 7,88 (с, 1H), 8,58 (с, 1H), 9,49 (д, 1H).

Приклад 15: $R^5 = OBu$, вихід 73%; 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 0,81 (т, 3H), 1,27-1,43 (м, 7H), 1,93 (м, 2H), 3,48 (м, 2H), 4,53 (с, 2H), 4,58 (м, 1H), 4,73 (м, 4H), 4,92 (м, 2H), 7,33-7,39 (м, 2H), 7,46 (д, 1H), 7,63 (д, 1H), 7,69 (д, 1H), 7,86 (с, 1H), 8,55 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 16: $R^5 = OiPr$, вихід 63%; 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,01 (д, 3H), 1,10 (д, 3H), 1,38 (д, 3H), 1,95 (м, 2H), 3,47 (м, 2H), 3,98 (кв, 1H), 4,26 (м, 1H), 4,52 (с, 2H), 4,74 (м, 3H), 4,90 (м, 2H), 7,33-7,39 (м, 2H), 7,48 (д, 1H), 7,62-7,69 (м, 2H), 7,87 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 9,47 (д, 1H).

Приклад 35: $R^5 = H$, вихід 98%; МС (m/z): 455 ($M^+ + 1$), 337 ($M^+ - H_2O$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,45 (д, 3H), 4,25 (м, 3H), 4,86 (с, 2H), 5,16 (д, 1H), 7,28-7,39 (м, 2H), 7,43 (д, 1H), 7,56 (д, 1H), 7,66 (д, 1H), 7,92 (с, 1H), 8,49 (с, 1H), 9,35 (д, 1H), 11,78 (с, 1H).

Приклад 36: $R^5 = OMe$, вихід 50%; МС (m/z): 369 ($M^+ + 1$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 1,43 (д, 3H), 3,16 (с, 3H), 4,15 (м, 2H), 4,49 (м, 1H), 4,93 (с, 2H), 7,32-7,40 (м, 3H), 7,58 (д, 1H), 7,67 (д, 1H), 7,84 (с, 1H), 8,50 (с, 1H), 9,44 (д, 1H), 11,87 (с, 1H).

Приклад 34: $R^5 = H$, (вихід 77% після 2 стадій); МС (m/z): 427 ($M^+ + 1$), 409 ($M^+ - H_2O$); 1H ЯМР (300МГц, $DMCO-d_6$) δ (м.д.): 0,848 (т, 3H), 1,70 (м, 2H), 1,93 (м, 2H), 3,47 (м, 2H), 4,52 (с, 2H), 4,61 (м, 1H), 4,72 (м, 3H), 4,89 (с, 2H), 5,14 (с, 1H), 7,29-7,39

(м, 2H), 7,44 (д, 1H), 7,64 (м, 2H), 7,87 (с, 1H), 8,54 (с, 1H), 9,46 (д, 1H).

Загальна методика одержання складного ефіру прикладу 3:

У висушену у термостаті трилітрову, тригорлу круглодонну колбу, оснащену механічною мішалкою, триходовим краном, з'єднаним з балоном з аргонем та імерсійним термометром, завантажують сполуку 3 (148,6моль), потім послідовно додають безводний N,N-диметилацетамід (654мл), 4-(диметиламіно)піридин (DMAP) (0,5екв.), амінокислоту (2,5екв.) і гідрохлорид 1-[3-(диметил-аміно)пропіл]-3-етилкарбодііміду (2,5екв.) при 35°C до прозорого розчину червоного кольору. Реакційну суспензію нагрівають при 42-45°C протягом 2 годин і додають послідовно додаткові кількості DMAP (0,08екв.), амінокислоти (0,5екв.) та гідрохлориду 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-3-етилкарбодііміду (0,5екв.). Через 1,5 години реакційну суміш охолоджують до 0-5°C і гасять водою. Охолоджуючу баню видаляють і одержат' суспензію блідо-жовтого кольору перемішують при кімнатній температурі протягом 1 години. Суспензію фільтрують, промивають водою до pH=8 і сушать протягом ночі, використовуючи звичайний вакуум. Тверда речовина блідо-жовтого кольору не висихає повністю, і її розчиняють у метиленхлориді і водний шар відділяють. Органічну фазу промивають розсолем, сушать над MgSO₄, фільтрують через целіт і концентрують, використовуючи роторний випарник і одержуючи неочищену тверду речовину. Неочищену речовину знову розчиняють у метиленхлориді та переносять у трилітрову тригорлу круглодонну колбу, оснащену механічною мішалкою. Обережно по краплях при кімнатній температурі додають етилацетат (1л) до прозорого розчину червоного кольору протягом 70 хвилин при безперервному перемішуванні. Після додавання етилацетату (15мл) утворюється осад. Суспензію перемішують протягом 2,5 годин, потім тверду речовину відфільтровують. Осад послідовно промивають етилацетатом, сумішшю етилацетат/метил-трет-бутиловий простий ефір (3:2) та метил-трет-бутиловим простим ефіром і сушать, одержуючи не зовсім білу тверду речовину з 78% виходом.

Приклад 18: MC (m/z) 498 (M⁺+1)

Приклад 19: MC (m/z) 566 (M⁺+1)

Приклад 20: MC (m/z) 569 (M⁺+1)

Приклад 21: MC (m/z) 512 (M⁺+1)

Приклад 22: MC (m/z) 554 (M⁺+1)

Приклад 23: MC (m/z) 526 (M⁺+1)

Приклад 24: MC (m/z) 554 (M⁺+1)

Одержання сполуки XIII:

Сполуку прикладу 31 (0,33моль) розчиняють у ДМФ (10мл) і об'єм зменшують до половини відгонкою. Колбу охолоджують до кімнатної температури, додають гідрид натрію (1екв.) і суміш перемішують протягом 1 години. Додають мезилгліцидол (1,5екв.) і одержану суміш нагрівають при 50°C протягом 24 годин, потім охолоджують до кімнатної температури. Суміш фільтрують і розчинник видаляють у вакуумі. Реакційну суміш очищають на хроматографічній колонці з силікагелем, одержуючи сполуку XIII з

виходом 73%. 1,19 (т, 311), 2,78 (т, 1H), 3,53 (т, 4H), 4,53 (с, 2H), 4,65 (с, 2H), 4,78 (дд, 1H), 4,96 (с, 2H), 5,20 (д, 1H), 7,35-7,47 (м, 2H), 7,51 (д, 1H), 7,68 (д, 1H), 7,75 (д, 1H), 7,95 (с, 1H), 8,62 (с, 1H), 9,55 (д, 1H).

Приклад 7:

Сполуку XIII (100мг) розчиняють у ТГФ (10мл) і обережно по краплях додають боргідрид натрію (2мл). Реакційну суміш нагрівають при 70°C протягом 4 годин. Суміш охолоджують до кімнатної температури і додають 1N HCl. Розчинник видаляють у вакуумі і матеріал вміщують у суміш метанолу та води. Одержаний осад відфільтровують і сушать. 1,19 (т, 3H), 1,25 (д, 3H), 3,55 (кв, 2H), 4,13 (м, 2H), 4,58 (с, 2H), 4,61 (с, 2H), 4,64 (с, 2H), 4,93 (с, 2H), 4,97 (т, 1H), 7,34-7,45 (м, 2H), 7,49 (д, 1H), 7,69 (т, 2H), 7,92 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 9,50 (д, 1H).

Приклад 14:

До суспензії сполуки XIV (0,75моль) у суміші метилен-хлорид/метанол/HMPA (4:2:1мл) додають карбонат цезію (4,0екв.). Реакційну суміш перемішують протягом 30 хвилин, а потім додають ацетальдегід. Додатково ацетальдегід додають при спостереженні за допомогою ТШХ невеликих змін. Суміш розбавляють метиленхлоридом і промивають водою та розсолем. Органічну фазу сушать над сульфатом натрію, фільтрують і концентрують у вакуумі. Неочищений продукт XV виділяють на хроматографічній колонці (33% вихід). Сполуку XV (0,3моль) розчиняють у метиленхлориді та охолоджують до 0°C. До розчину додають етантіол (2 краплі) і трифтороцтову кислоту (ТФО) (1 крапля) і суміш перемішують при 0°C протягом 1 години. Суміш нагрівають до кімнатної температури та перемішують 1 годину. Додають додатково ТФО (2 краплі), і через 30 хвилин реакція завершується. Продукт очищають на хроматографічній колонці з силікагелем, використовуючи суміш метиленхлорид/етилацетат. Виділяють один діастереомер, 65мг (53%). 0,52 (д, 3H), 1,21 (т, 3H), 2,47 (кв, 2H), 3,96 (с, 2H), 4,49 (с, 1H), 4,86 (м, 1H), 4,94 (с, 2H), 6,18 (с, 1H), 7,35-7,45 (м, 3H), 7,64 (д, 1H), 7,72 (д, 1H), 7,92 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 9,41 (д, 1H), 10,99 (с, 1H).

Одержання сполуки XVII:

До розчину гексаметплентетрааміну (1,6г, 11,4моль) у ТФО додають сполуку XVI (2,0г, 4,6моль) при 60-65°C. Після перемішування протягом 2 годин реакційну суміш охолоджують до кімнатної температури, потім обережно по краплях додають у 2N суміш H₂SO₄-ацетон (150мл) (2:1). Тверду речовину збирають, суспендують у діоксолані (150мл) і кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хвилин. Речовину, що не розчинилася, видаляють фільтруванням і розчинник концентрують до приблизно 25мл. Додають MeOH (50мл) для осадження продукту, який збирають і сушать, одержуючи 700мг жовтуватої твердої речовини. MC ES⁺ 467 (M+1).

Приклад 28:

До суспензії сполуки XVII (500мг, 1,1моль) у суміші CHCl₃/метанол (60мл, 5/1) додають твердий NaBH₄ (200мг). Розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 4 годин. CHCl₃

видаляють при зниженому тиску, потім додають 2N HCl. Розчин перемішують протягом 2 годин, зібрана і висушена частина дає 420мг не зовсім білої твердої речовини. МС (ES⁺) 469 (M+1). Неочищений спирт суспендують у CHCl₃-MeOH (25мл+10мл), потім додають 0,7мл 1M NaOMe з подальшим перемішуванням протягом 12 годин при кімнатній температурі. Розчинник концентрують, тверду речовину ретельно розтирають з MeOH і продукт збирають, одержуючи діол, 420мг (84%). ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 300МГц): δ 3,8 (м, 2H), 4,55 (с, 2H), 4,63 (д, 2H), 4,75 (м, 2H), 4,97 (с, 2H), 5,0 (м, 1H), 5,23 (м, 1H), 7,34-7,51 (м, 4H), 7,68 (м, 2H), 7,94 (с, 1H), 8,57 (с, 1H), 9,51 (д, 1H), МС (ES⁺) 385 (M+1).

Приклад 24:

До суспензії продукту прикладу 28 (50мг, 0,13моль) у CHCl₃ додають камфорсульфонову кислоту (30мг, 0,26моль) і етантіол (0,39моль), з подальшим перемішуванням протягом 12 годин в атмосфері азоту. Додають надлишок CHCl₃ і потім розчин промивають 2M розчином Na₂CO₃, водою, розсоллом і сушать (MgSO₄). Розчинник концентрують і продукт збирають після ретельного розтирання з MeOH. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 300МГц): δ 1,1, 2,3 (м, 2H), 3,85 (м, 2H), 4,0 (с, 2H), 5,5 (с, 2H), 4,8 (м, 2H), 4,9 (с, 2H), 5,0 (т, 1H), 7,35-7,5 (м, 4H), 7,7 (м, 2H), 8,6 (с, 1H), 9,5 (д, 1H), (м, 3H), МС (ES⁺) 429, 451 (M+1, +23).

Приклад 40:

До розчину сполуки прикладу 3 (210мг, 0,48моль) у ДМФ (10мл) додають DMAP (1мг), Et₃N (267мкл, 1,92моль) і tBDMSCl (220мг, 1,47моль). Після перемішування протягом 20 годин суміш поміщають в EtOAc і послідовно промивають водним NaHCO₃, водою та розсоллом. Органічний шар сушать над MgSO₄, фільтрують і випаровують, одержуючи залишок, який очищають на хроматографічній колонці (силікагель, 10% EtOAc/гексан), одержуючи 225,1мг проміжної сполуки XVIII (70%).

Суміш XVIII (68,1мг, 0,10моль) і параформальдегіду (63,1мг, 2,1моль) у піридині (4мл) обробляють 0,25M розчином Тритону В у піридині (100мкл, 0,025моль). Після перемішування протягом 2 годин додають додатково Тритон В у піридині (150мкл, 0,038моль). Через 1 годину суміш поміщають в EtOAc та інтенсивно промивають водним CuSO₄. Після промивання водою, водним NaHCO₃ та розсоллом органічний шар сушать над MgSO₄, фільтрують і випаровують, одержуючи залишок, який очищають на хроматографічній колонці (силікагель, 22% EtOAc/гексан), одержуючи 45,2мг сполуки XIX (64%) з наступними спектральними характеристиками: ¹H ЯМР (DMCO-d₆) δ 9,42 (д, 1H, J=7,7), 7,97 (с, 1H), 7,75-7,72 (м, 2H), 7,52 (д, 1H, J=8,5), 7,44 (дд, 1H, J=7,7, 7,5), 7,36 (дд, 1H, J=7,7, 7,5), 5,13 (м, 1H), 5,04 (с, 2H), 4,77 (м, 1H), 4,70 (с, 2H), 4,10 (м, 1H), 3,76 (сеп, 1H, J=6,1), 3,54 (м, 1H), 3,44 (м, 1H), 3,31 (м, 3H), 1,79 (м, 2H), 1,22 (м, 6H), 1,07 (с, 9H), 0,85 (с, 9H), 0,52 (с, 6H), 0,00 (с, 3H), -0,03 (с, 3H); МС m/z 699 (M+H).

До розчину сполуки XXI (22,5мг, 0,032моль) у iPrOH (10мл) додають TMSCl (100мкл) і одержану суміш перемішують протягом 2,5 годин. Після

випарювання розчинника залишок ретельно розтирають з ефіром (3×1мл) та сушать, одержуючи 10,8мг сполуки прикладу 40 (72%) з наступними спектральними характеристиками: ¹H ЯМР (DMCO-d₆) 9,49 (д, 1H, J=7,7), 8,59 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,80 (д, 1H, J=7,3), 7,77 (д, 1H, J=8,5), 7,55 (д, 1H, J=7,3), 7,45 (м, 1H), 7,37 (м, 1H), 4,98 (м, 3H), 4,78 (м, 2H), 4,70 (с, 2H), 4,20-4,16 (м, 2H), 3,76 (сеп, 1H, J=6,1), 3,38 (м, 1H), 3,36-3,25 (м, 2H), 1,80 (м, 2H), 1,23 (д, 6H, J=6,1); МС m/z 471 (M+H).

Інгібування активності кінази рецепторів фактора росту ендотеліальних клітин судин

Сполуки конденсованих піроларкарбазолів досліджують відносно їх дії, що інгібує, на кіназу активність кіназного домену рецепторів VEGF, що експресуються бакуловірусом (flk-1, KDR, VEGFR2 людини), використовуючи методику, описану для ELISA аналізу trkA кінази, приведену нижче. Реакційну суміш кінази, що містить 50мМ Hepes, pH7,4, 40мкМ ATP, 10мМ MnCl₂, 0,1% BSA, 2% DMCO та різні концентрації інгібітору, переносять на планшети, покриті PLC-γ/GST. Додають VEGFR кіназу і реакції дають можливість протікати протягом 15 хвилин при 37°C. Детектування фосфорильованого продукту здійснюють, додаючи анти-фосфотирозинове антитіло (UBI). Вводять антитіло, кон'юговане з вторинним ферментом для захоплення комплексу антитіло-фосфорильований PLC-γ/GST. Активність зв'язаного ферменту визначають за допомогою посиленої системи детектування (Gibco-BRL). Результати інгібування аналізують, використовуючи сигмоїдальне рівняння (з нахилом, що змінюється) доза-відповідь за програмою GraphPad Prism. Результати підсумовані у таблиці III.

Таблиця III

Інгібування VEGFR

Сполука	VEGFR2 (IC ₅₀ або % інгіб. при 300нМ)
A	107
B	48
C	17%
D	200
1	4
2	17
3	7
4	12
5	12
6	19
7	25
8	13
9	18
10	83
11	65
12	240
13	73
14	72
15	130
16	411
17	11
18	23
19	60%
20	31
21	48%
22	18
23	57%
24	31%
25	21
26	31%

27	57
28	34%
29	208
30	302
31	77
32	33%
33	111
34	7
35	37%
36	12%
37	37%
38	45%
39	13%
40	16

Інгібування активності кінрази-1 змішаного походження (MLK1)

Кіназу активність MLK1 оцінюють, використовуючи формат Millipore Multiscreen TC «у планшети» за способом, описаним для протеїнкінази-C (Pitt & Lee, J. Biomol. Screening, i: 47-51, 1996). Коротше кажучи, кожні 50-мкл аналітичної суміші містять 20мМ Hepes, pH7,2, 5мМ EGTA, 15мМ MgCl₂, 25мМ β-гліцерофосфату, 60мкМ АТР, 0,25мкМі [γ-³²P]АТР, 0,1% BSA, 500мкг/мл мієлінового основного білку (UBI #13-104), 2% ДМСО, 1мкМ сполуки, що тестується, та 1мкг/мл бакуловірусного GST-MLK_{1KD}. Зразки інкубують протягом 15 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняють, додаючи охолоджену льодом 50% ТСА, і білкам дають випасти в осад протягом 30 хвилин при 4°C. Потім планшети промивають охолодженою льодом 25% ТСА. Додають сцинтилятор Supermix scintillation cocktail і планшети залишають для досягнення рівноваги протягом 1-2 годин, до того як здійснюють підрахунок, використовуючи Wallac MicroBeta 1450 PLUS сцинтиляційний лічильник.

Інгібування активності кінрази-2 змішаного походження (MLK2) Аналіз здійснюють, використовуючи формат планшетів Millipore Multiscreen, як описано для MLK1. Кожні 50-мкл аналітичної суміші містять 20мМ Hepes, pH7,2, 5мМ EGTA, 15мМ MgCl₂, 25мМ β-гліцерофосфату, 100мкМ АТР, 0,25мкМі [γ-³²P]АТР, 0,1% BSA, 500мкг/мл мієлінового основного білку (UBI #13-104), 2% ДМСО, різні концентрації сполуки, що тестується, і 3мкг/мл бакуловірусного GST-MLK_{1KD}. Зразки інкубують протягом 15 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняють, додаючи охолоджену льодом 50% ТСА, і білкам дають випасти в осад протягом 30 хвилин при 4°C. Потім планшети промивають охолодженою льодом 25% ТСА. Додають сцинтилятор Supermix scintillation cocktail і планшети залишають для досягнення рівноваги протягом 1-2 годин, до того як здійснюють підрахунок.

Інгібування активності кінрази-3 змішаного походження (MLK3)

Аналіз здійснюють, використовуючи формат Millipore Multiscreen пластин, як описано для MLK1. Коротше кажучи, кожні 50-мкл аналітичної суміші містять 20мМ Hepes, pH7,2, 5мМ EGTA, 15мМ MgCl₂, 25мМ β-гліцерофосфату, 100мкМ АТР, 0,25мкМі [γ-³²P]АТР, 0,1% BSA, 500мкг/мл мієлінового основного білку (UBI #13-104), 2% ДМСО, різні концентрації сполуки, що тестується, і 2 мкг/мл бакуловірусного GST-MLK_{1KD}. Зразки

інкубують протягом 15 хвилин при 37°C. Реакцію зупиняють, додаючи охолоджену льодом 50% ТСА, і білкам дають випасти в осад протягом 30 хвилин при 4°C. Потім планшети промивають охолодженою льодом 25% ТСА. Додають сцинтилятор Supermix scintillation cocktail і планшети залишають для досягнення рівноваги протягом 1-2 годин, до того як здійснюють підрахунок.

Таблиця IV

Інгібування MLK-ІК₅₀ (нМ)
або % інгібування при 100нМ

Сполука	MLK1	MLK2	MLK3
A	22	39%	8
B	31	46%	17
C	8%	0%	30%
D	45		43%
1	21		4
2	15		8
3	17		9
4	15		4
5	27	45%	16
6	38	51%	19
7	85%		30
8	19	76%	13
9	26		15
10	37		15
11	78		20
12	28	131	16
13	20	62%	26
14	93%		9
15	41		27
16	66%		49%
17	35	50%	
18	47		23
19	44%	28%	
20	42	229	32
21	40%		
22	74	170	28
23	31%		
24	62%		55%
25	22		12
26	59		
27	22		
28	76		74
29	9	64%	5
30	30		
31	46		29
32	24		19
33	50		16
34	45%		32%
35	60%		62%
36	26		41%
37	17		
38	58%		30
39	55%		56%
40	21	86	

Інгібування активності trkA тирозинкінази

Вибрані ізомерні сполуки конденсованих піролокарбазолів та ізоіндолонів можна протестувати за їх здатністю інгібувати кіназну активність цитоплазматичного домену trkA людини, що експресується бакуловірусом, використовуючи аналіз на основі ELISA, як було розкрито раніше [Angeles et al, Anal. Biochem. 236: 49-55, 1996]. Коротше кажучи, 96-ямкові мікротитраційні планшети покривають розчином субстрату (білок злиття рекомбінантної фосфоліпази C-γ1/глутатіон S-трансферази людини [Rotin et al., EMBO J., 11: 559-567, 1992]). Дослідження інгібування здійснюють у 100мкл аналітичних сумішах, які

містять 50мМ Hepes, pH7,4, 40мкМ АТР, 10мМ $MnCl_2$, 0,1% BSA, 2% ДМСО та різні концентрації інгібітору. Реакцію ініціюють, додаючи trkA кінлазу, і залишають протікати реакцію протягом 15 хвилин при 37°C. Потім додають антитіло до фосфотирозину (UBI), а потім вторинне, мічене лужною фосфатазою, козяче антимишаче IgG антитіло, кон'юговане з ферментом (Bio Rad). Активність зв'язаного ферменту вимірюють за допомогою посиленої системи детектування (Gibco-BRL). Результати інгібування аналізують, використовуючи сигмоїдальне рівняння (з нахилом, що змінюється) залежності доза-реакція за програмою GraphPad Prism. Концентрація, яка забезпечує 50% інгібування активності кінлази, називається як IK_{50} .

Інгібування фосфорилування trk, що стимулюється NGF, у препаратах цілих клітин

Інгібування фосфорилування trk, що стимулюється NGF, сполуками даного винаходу можна здійснити, використовуючи модифіковану, як буде описано нижче, методику, описану раніше [див. патент США №5516771]. NIH3T3 клітини, трансфоровані trkA, вирощують у 100-мм чашках. Субконфлюентні клітини примушують відчувати нестачу сироватки шляхом заміни середовища на те, яке не містить сироватки 0,05% BSA-DMEM, що містить сполуку (100нМ і 1мкМ) або ДМСО (додають для контролю), протягом 1 години при 37°C. Потім до клітин додають NGF (Harlan/Bioproducts for Science) у концентрації 10нг/мл протягом 5 хвилин. Клітини піддають лізису у буфері, що містить детергент та інгібітор протеази. Очищені клітинні лізати нормалізують по білку, використовуючи метод BCA, та імуноосаджують анти-trk антитілом. Поліклональне анти-trk антитіло одержують проти пептиду, відповідного 14 амінокислотам біля карбоксильного кінця trk [Martin-Zarica et al., Mol. Cell. Biol. 9:24-33, 1989].

Імунні комплекси збирають на кульках Protein A Sepharose (Sigma Chem. Co., St. Lois, MO), розділяють за допомогою гелі-електрофорезу на SDS поліакрил-амідному гелі (SDS PAGE) та переносять на полівінілідендифторидну (PVDF) мембрану. Мембрану піддають імуноблотингу, використовуючи анти-фосфотирозинове антитіло (UBI), з подальшим інкубуванням з козячим антимишачим IgG, зв'язаним з пероксидазою хрому (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Фосфорильовані білки візуалізують, використовуючи ECL (Amersham Life Science, Inc.,

Arlington Heights, IL). Визначають площу смуги trk білка і порівнюють з NGF-стимульованим контролем. Система оцінок інгібування, яка базується на зменшенні процента смуги trk білка, може бути наступною: 0=немає зменшення; 1=1-25%; 2=26-49%; 3=50-75%; 4=76-100%.

Інгібування активності кінлази рецепторів фактора росту, одержаного з тромбоцитів

Сполуки ізомерних конденсованих піролокарбазолів та ізоіндолонів можна дослідити відносно їх дії, що інгібує, на кінлазу активність домену кінлази рецепторів PDGFR, що експресуються бакуловірусом, використовуючи описаний вище ELISA аналіз trkA кінлази. Аналізи здійснюють у 96-ямкових мікротитраційних планшетах з нанесеним субстратом (PLC- γ /GST). Кожна 100-мкл реакційна суміш містить 50мМ HEPES, pH7,4, 20мкМ АТР, 10мМ $MnCl_2$, 0,1% BSA, 2% ДМСО та різні концентрації інгібітору. Реакцію ініціюють, додаючи заздалегідь фосфорильований рекомбінантний фермент людини (10нг/мл PDGFRp), і залишають для протікання реакції на 15 хвилин при 37°C. Передфосфорильований фермент одержують перед використанням внаслідок інкубування кінлази у буфері, що містить 20мкМ АТР і 10мМ $MnCl_2$ протягом 1 години при 4°C. Детектування фосфорильованого продукту здійснюють, додаючи кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP) анти-фосфотирозинове антитіло CUBI). Пізніше додають розчин субстрату HRP, що містить 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин та перекис водню, і пластини інкубують протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію гасять кислотою і зчитують одержані значення поглинання при довжині хвилі 450нм, використовуючи Microplate Bio-kinetics Reader (Bio-Tek Instrument EL 312e). Результати інгібування аналізують, використовуючи сигмоїдальне рівняння (з нахилом, що змінюється) залежності доза-відповідь за програмою GraphPad Prism.

Хоча даний винахід був розкритий досить детально, фахівцям буде очевидно, що можливі зміни та модифікації у запропонованих втіленнях і у переважних втіленнях винаходу, і що такі зміни та модифікації можна здійснити, не відходячи від суті даного винаходу. Тому додана формула винаходу охоплює всі еквівалентні варіанти, які підпадають під об'єм даного винаходу.