

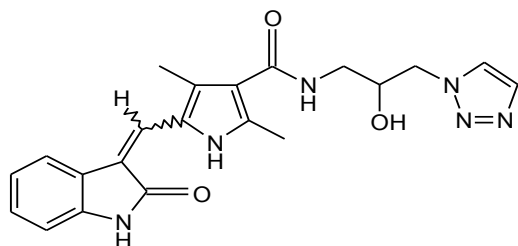


$\text{NR}^9\text{R}^{10}$ ,  $-\text{NR}^9\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^9\text{R}^{10}$  і  $-\text{SO}_2\text{R}^{14}$  (де  $\text{R}^{14}$  є алкілом, арилом, аралкілом, гетероарилом і гетероаралкілом);  
 $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$  і  $\text{R}^5$  є, незалежно, воднем або алкілом;  
 $\text{Z}$  є арилом, гетероарилом, гетероциклом або  $-\text{NR}^{15}\text{R}^{16}$ , де  $\text{R}^{15}$  і  $\text{R}^{16}$  є, незалежно, воднем або алкілом; або  $\text{R}^{15}$  і  $\text{R}^{16}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;  
 $\text{R}^6$  вибирають з групи, що містить водень або алкіл;  
 $\text{R}^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ , як визначено нижче;  
 $\text{R}^8$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси і арилокси;

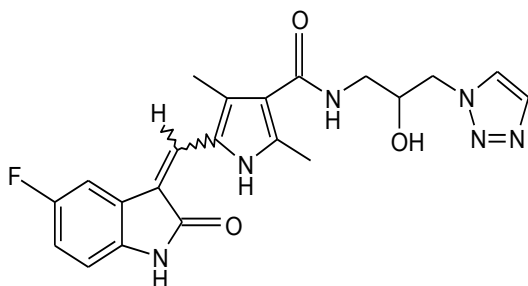
$\text{R}^9$  і  $\text{R}^{10}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, ціаноалкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил; або  $\text{R}^9$  і  $\text{R}^{10}$  об'єднані і утворюють гетероциклоаміногрупу;  
 $\text{R}^{12}$  і  $\text{R}^{13}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл і арил, або  $\text{R}^{12}$  і  $\text{R}^{13}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероцикл;  
 $\text{R}^{17}$  вибирають з групи, що містить алкіл, циклоалкіл, арил, гідрокси і гетероарил;  
 або її фармацевтично прийнятна сіль.  
 3. Сполука або сіль згідно з пунктом 1, де сполуку вибирають з групи, що містить:

№	Структура	Назва
1N		5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід
2N		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
3N		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
4N		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
5N		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндоліліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід

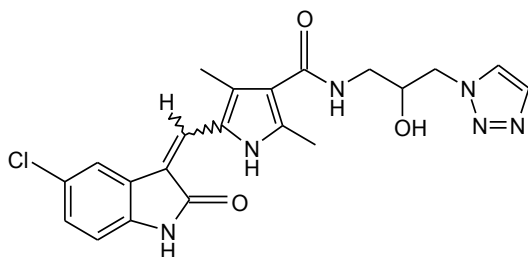
6N 5 75635



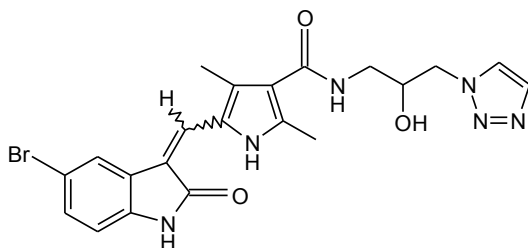
7N



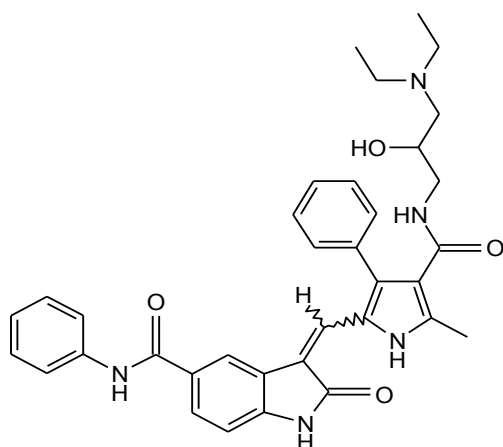
8N



9N



11N



6

2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндоліліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндоліліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндоліліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

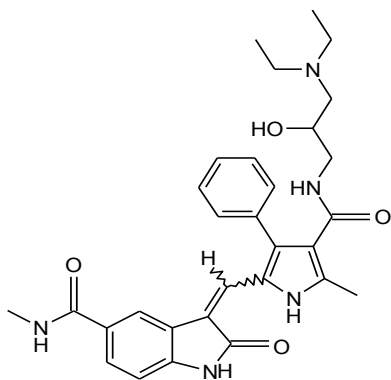
5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндоліліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

3-{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1Н-пірол-2-іл]метиле́н}-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід

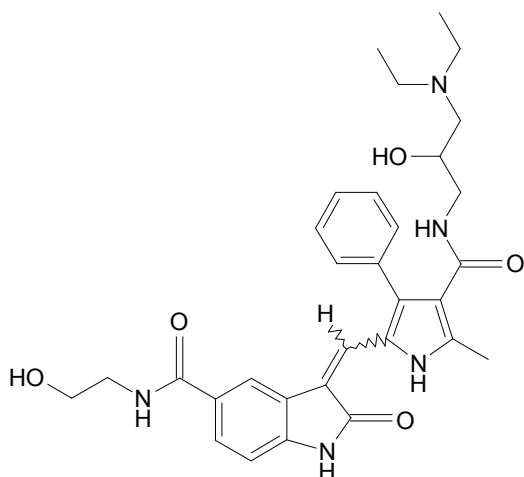
7

75635

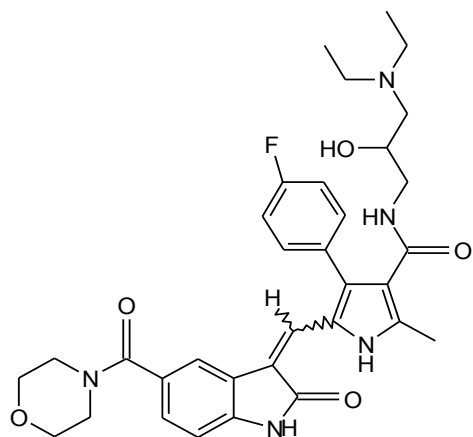
12N



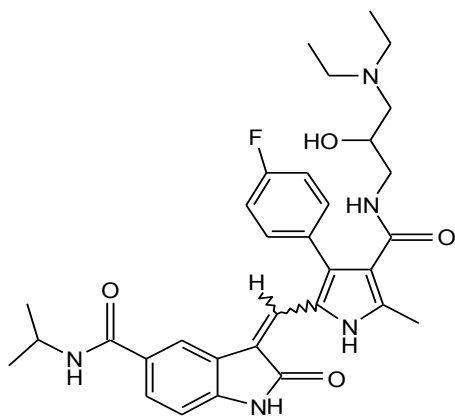
13N



14N



15N



8

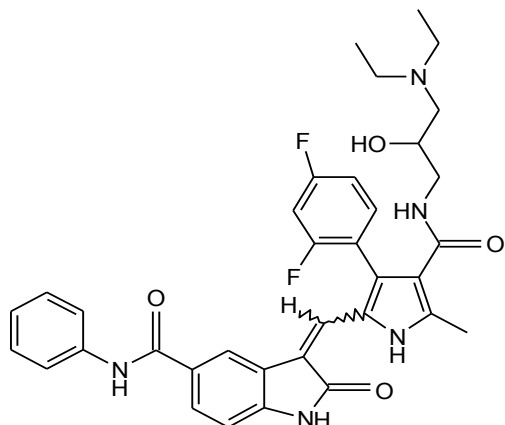
(3-{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен}-N-метил-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

(3Z)-3-{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен}-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

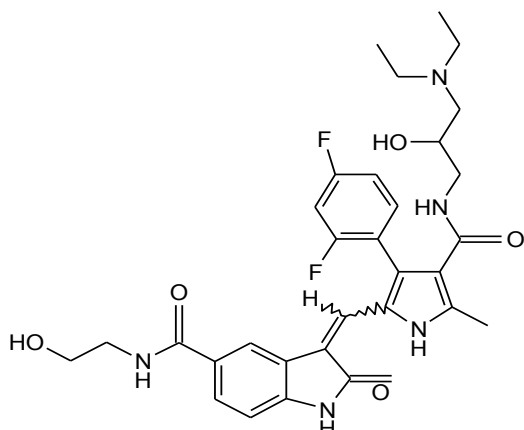
N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-4-(4-фторфеніл)-2-метил-5-{[5-(морфолін-4-ілкарбоніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил}-1H-пірол-3-карбоксамід

3-{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-3-(4-фторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен}-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

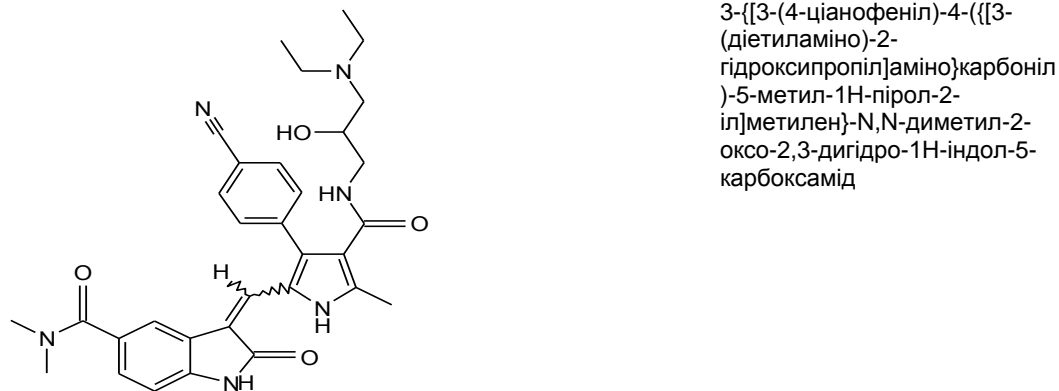
16N



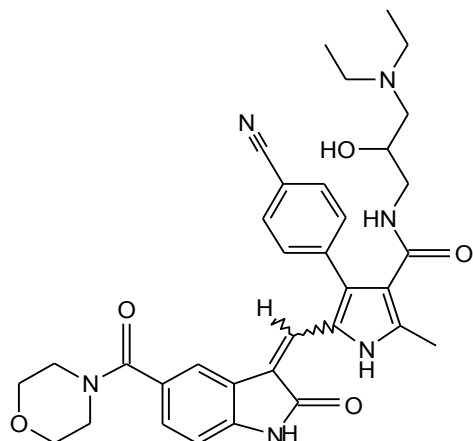
17N



18N



19N



3-{[4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен}-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід

3-{[4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен}-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід

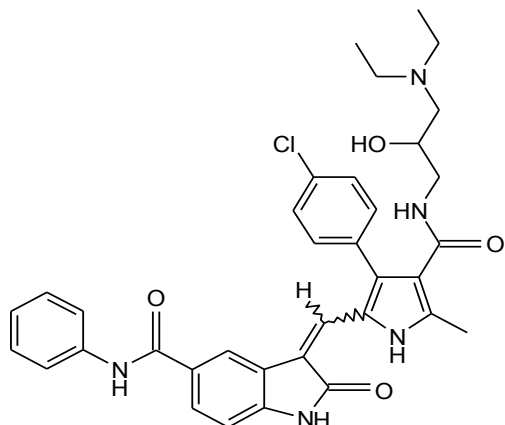
3-{[3-(4-ціанофеніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен}-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід

4-(4-ціанофеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-{[5-(морфолін-4-ілкарбоніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил}-1Н-пірол-3-карбоксамід

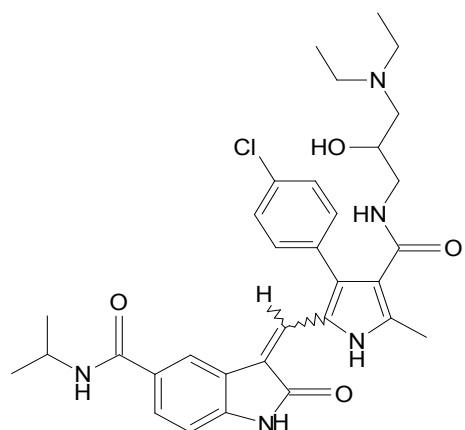
11

75635

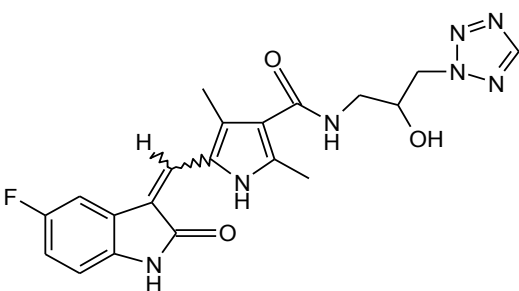
20N



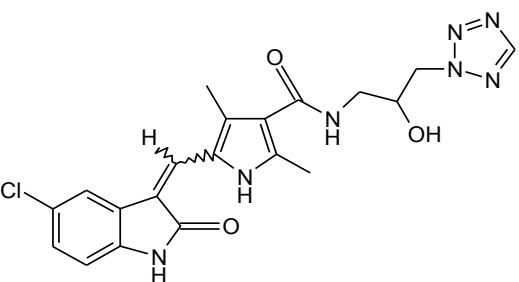
21N



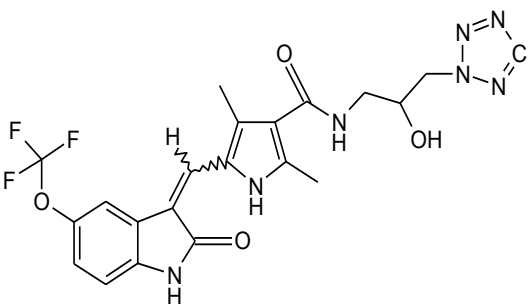
22N



23N



24N



12

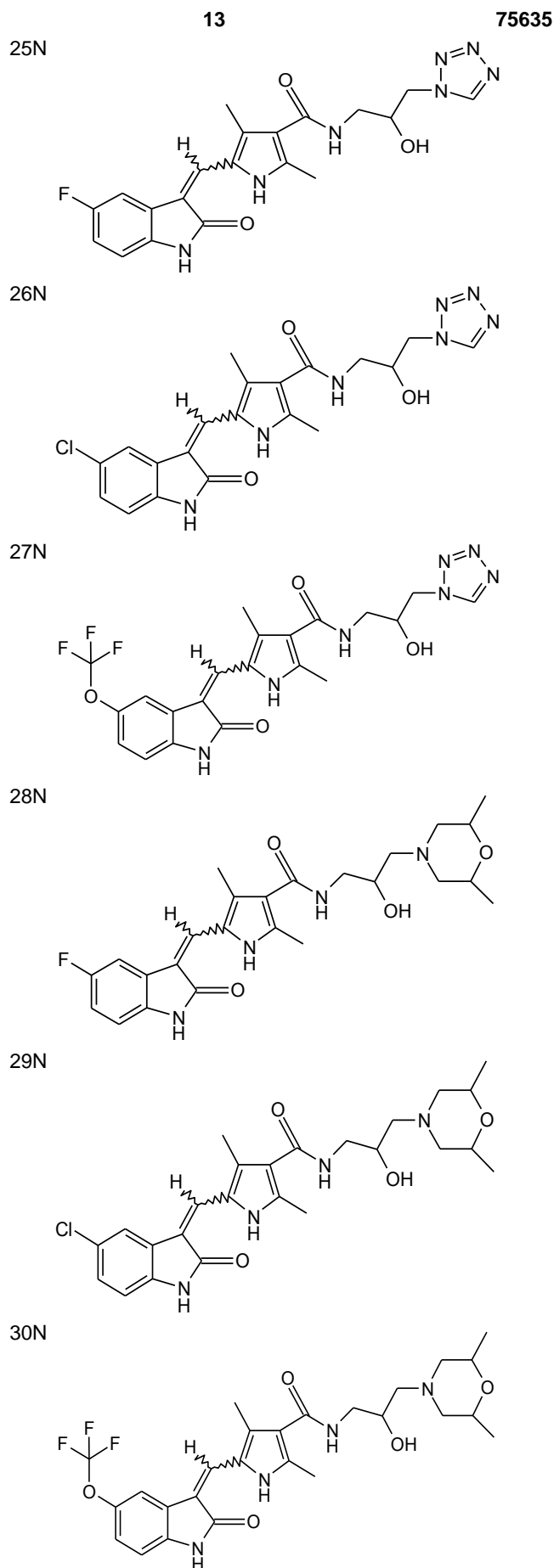
3-([3-(4-хлорфеніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл)метиле-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід

3-([3-(4-хлорфеніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл)метиле-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1 Н-індол-5-карбоксамід

5-([5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-([2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід



**14**  
 5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(2-оксо-5-трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід

N-{3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл}-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

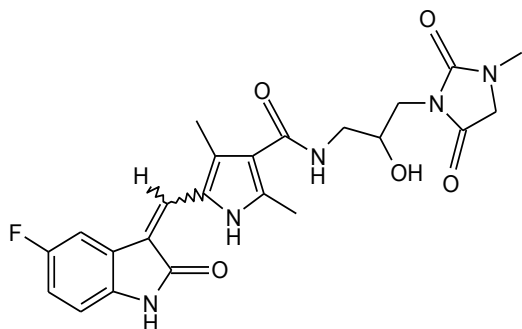
5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-{3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл}-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

N-{3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл}-2,4-диметил-5-[(2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід

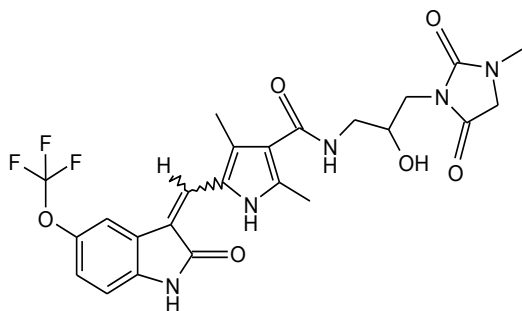
15

75635

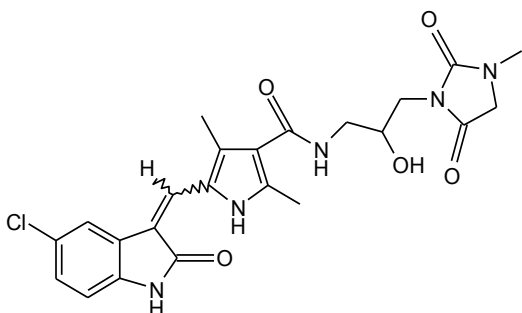
34N



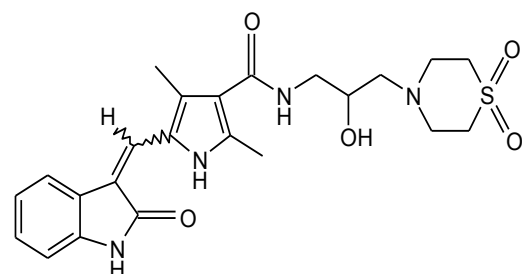
35N



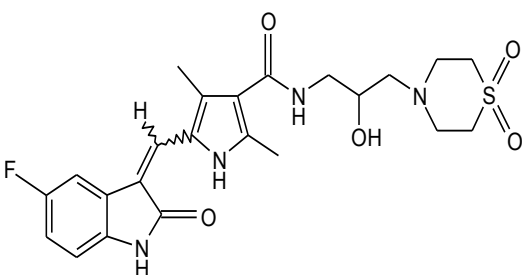
36N



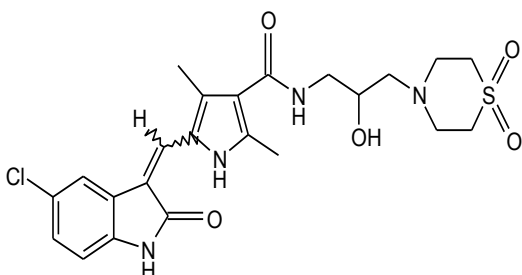
37N



38N



39N



16

5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил)-1H-пірол-3-карбоксамід

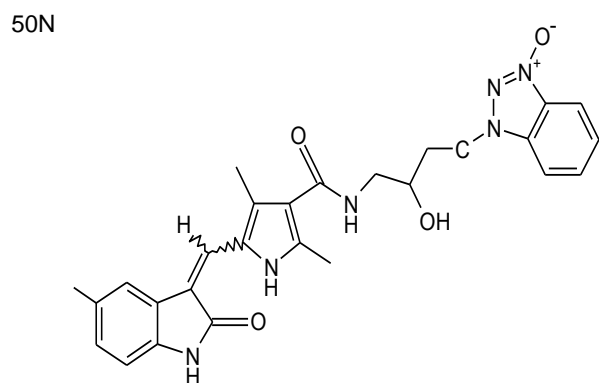
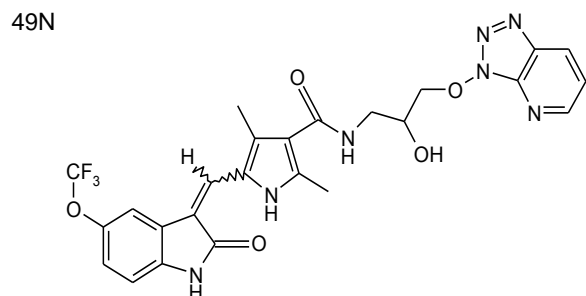
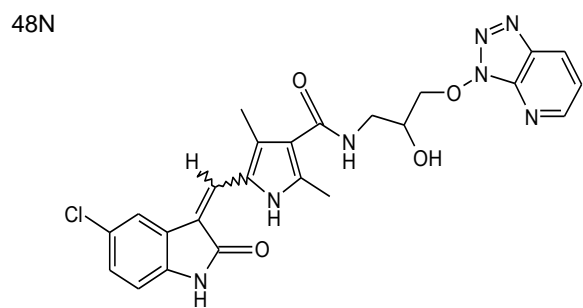
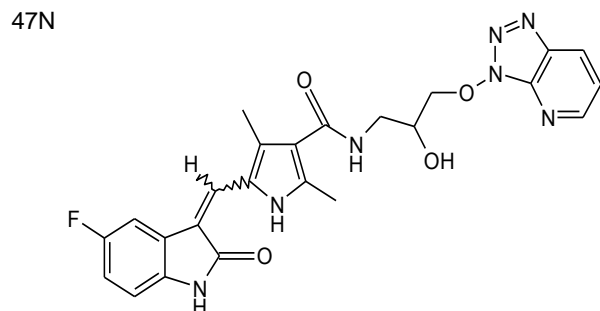
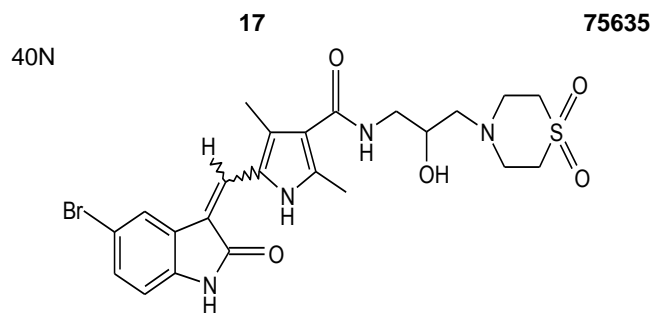
5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[3-(1,1-діоксидотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-[(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[3-(1,1-діоксидотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-5-[(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

5-[(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[3-(1,1-діоксидотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід





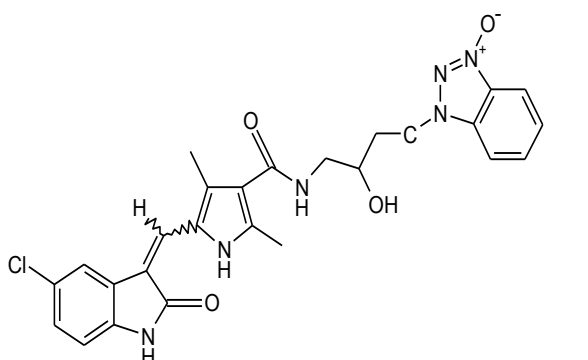
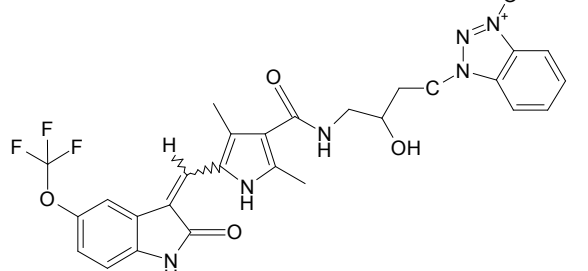
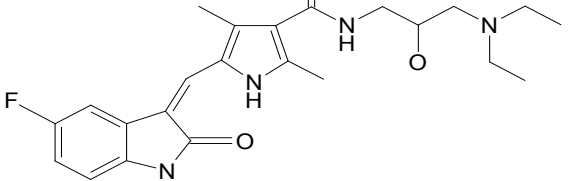
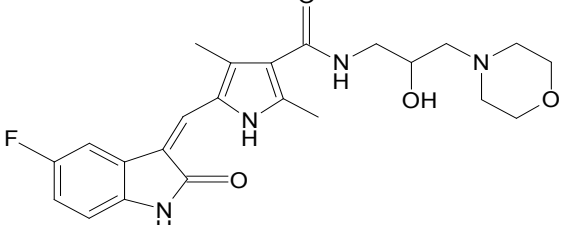
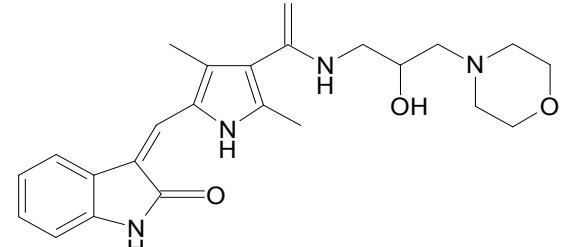
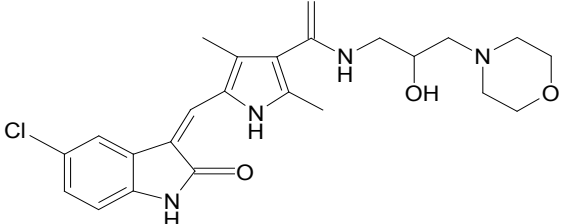
**18**  
5-[(5-бром-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[3-(1,1-діоксидіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

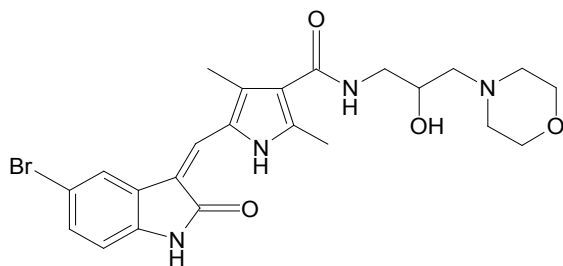
2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід

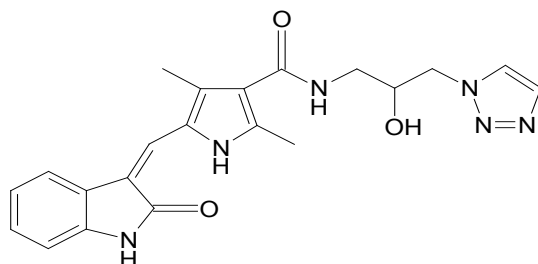
51N	<div>19</div> <div>75635</div> 	<div>20</div> <p>5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід</p>
52N		<p>2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід</p>
4. Сполука або сіль згідно з пунктом 3, в якій сполуку вибирають з групи, що містить:		
№	Структура	Назва
1S		<p>5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід</p>
2S		<p>5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід</p>
3S		<p>2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід</p>
4S		<p>5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід</p>

21 75635

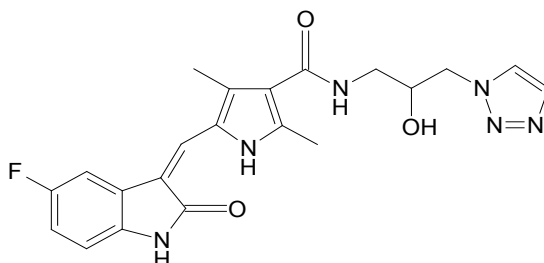
5S



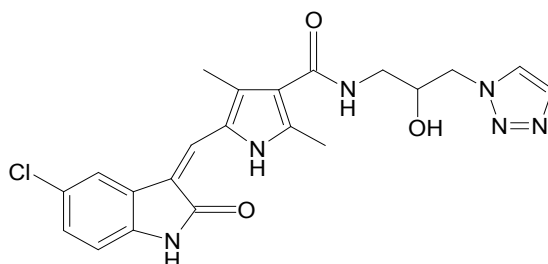
6S



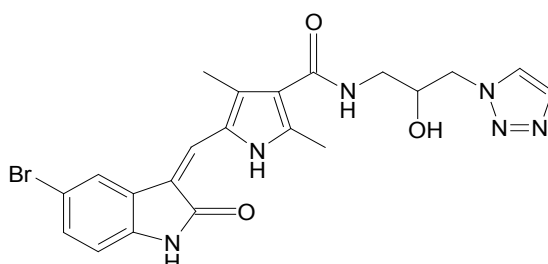
7S



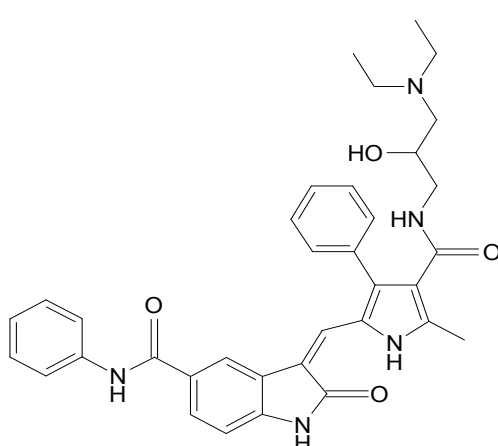
8S



9S



11S



22

5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід

2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1H-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

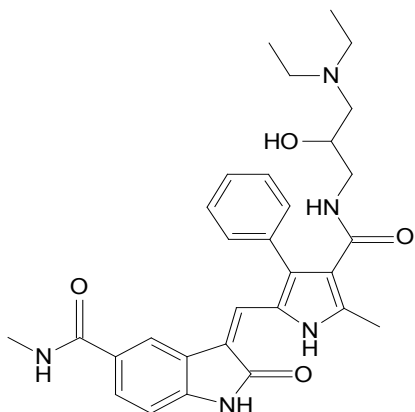
5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоної кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід

(3Z)-3-{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метиле}-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

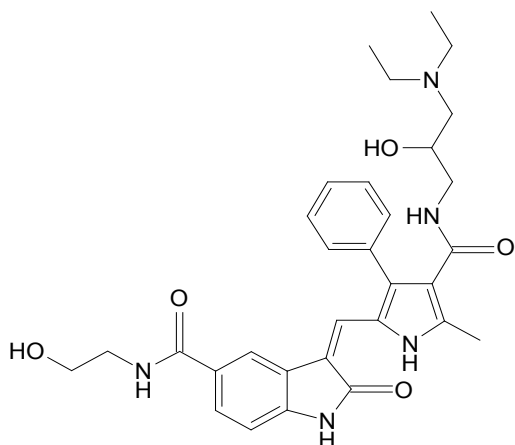
12S

23

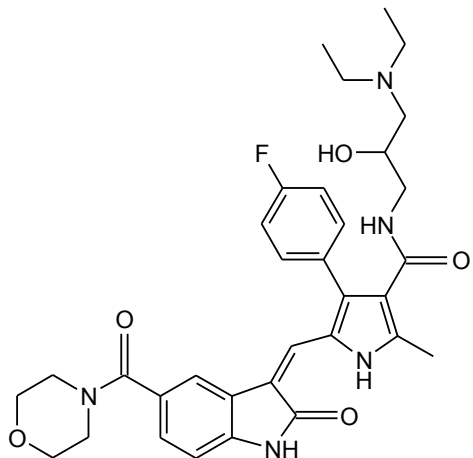
75635



13S



14S



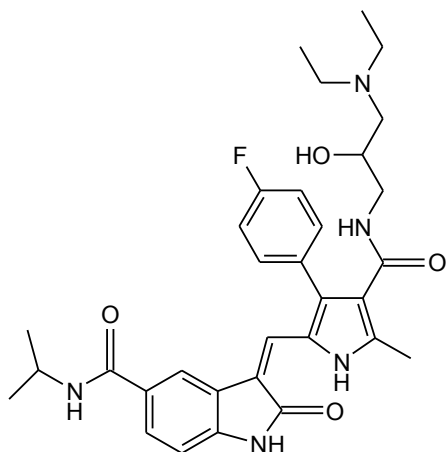
24

(3Z)-3-{{4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен}-N-метил-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

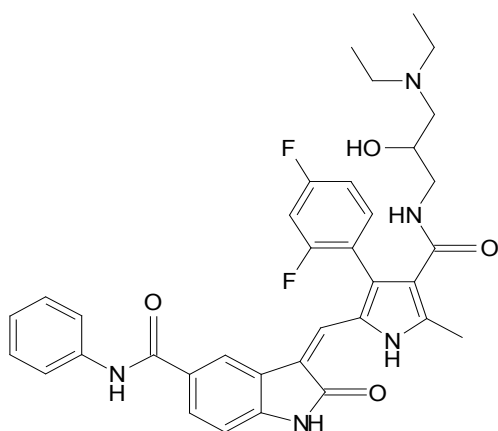
(3Z)-3-{{4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен}-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-4-(4-фторфеніл)-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолін-4-ілкарбоніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил)-1H-пірол-3-карбоксамід

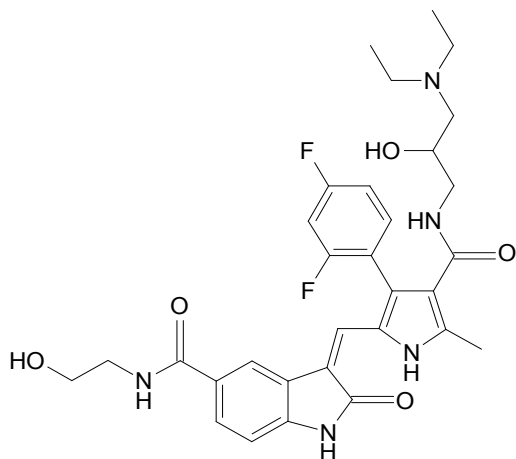
15S 25 75635



16S



17S

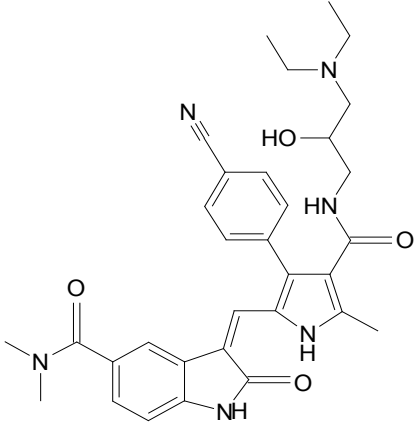
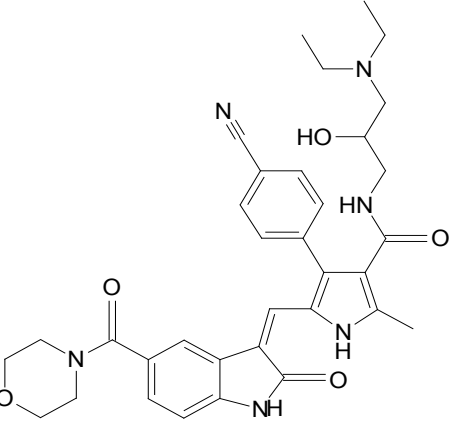
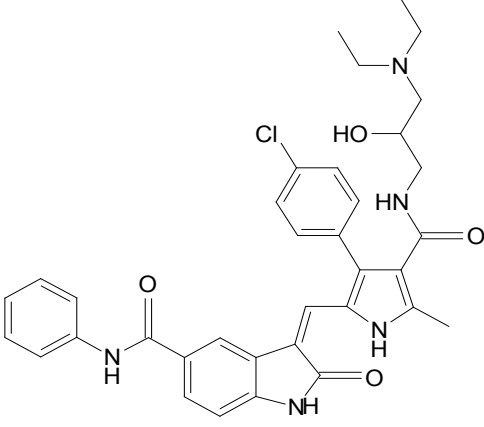
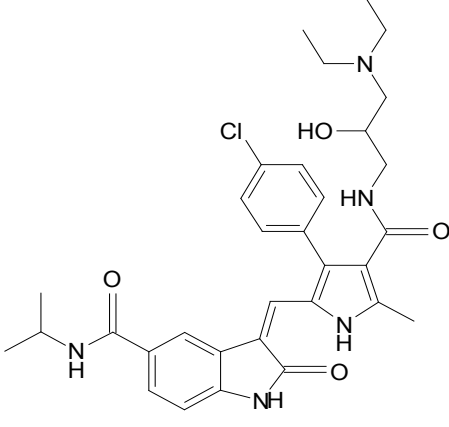


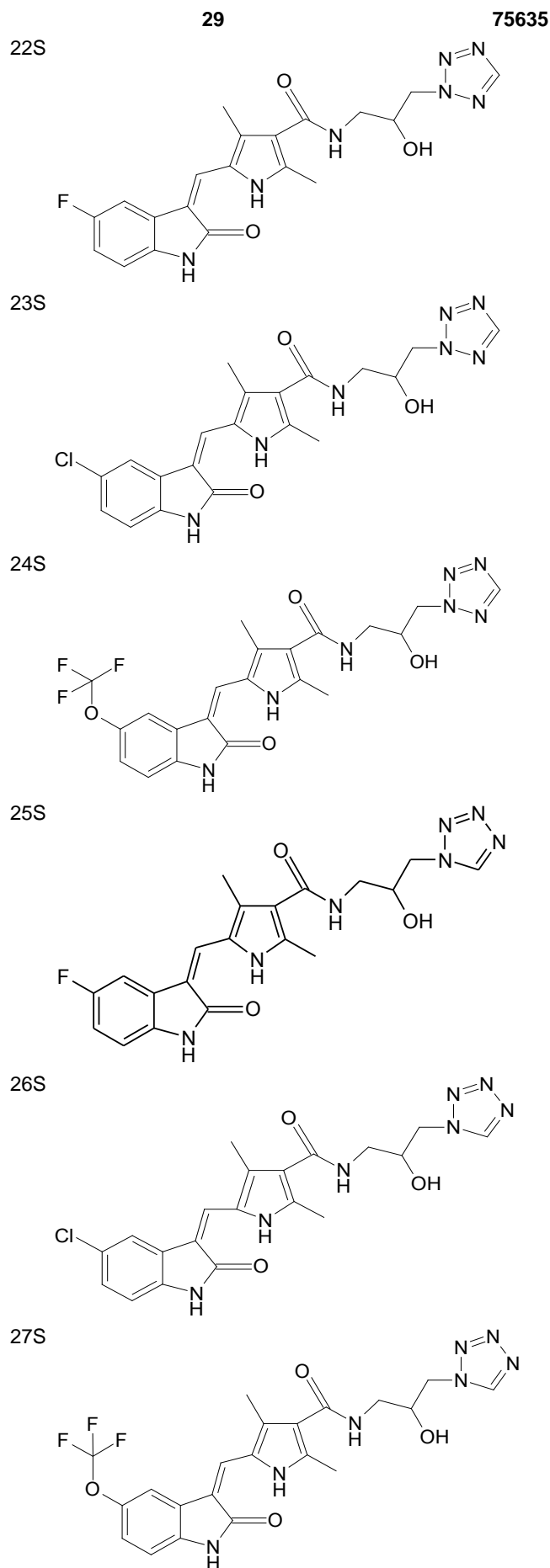
26

(3Z)-3-{{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-3-(4-фторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн}-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

(3Z)-3-{{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн}-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

(3Z)-3-{{[4-({[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно}карбоніл)-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн}-N-(2-гідроксиєтил)-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

18S	27	75635	28
			(3Z)-3-([3-(4-ціанофеніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн)-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід
19S			4-(4-ціанофеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-({(Z)-[5-(морфолін-4-іл)карбоніл]-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілідєн]метил}-1H-пірол-3-карбоксамід
20S			(3Z)-3-([3-(4-хлорфєніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн)-2-оксо-N-фєніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід
21S			(3Z)-3-([3-(4-хлорфєніл)-4-([3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно)карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилєн)-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід



**30**  
5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

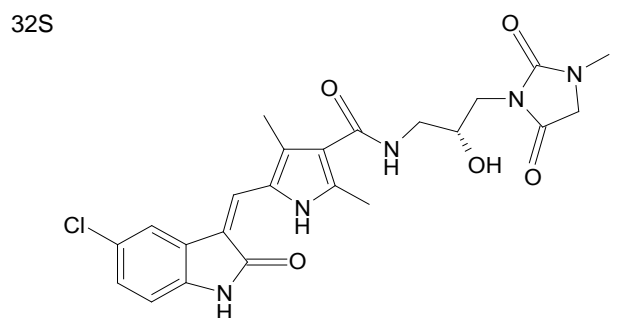
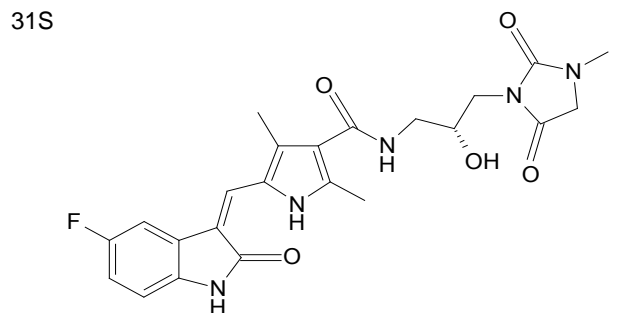
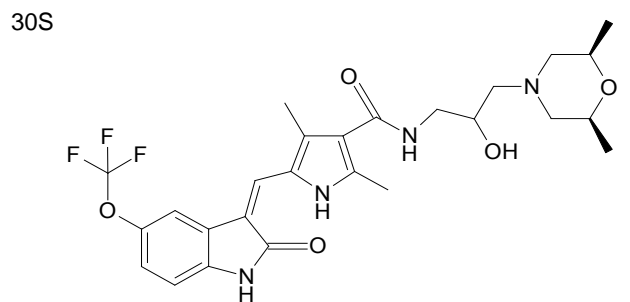
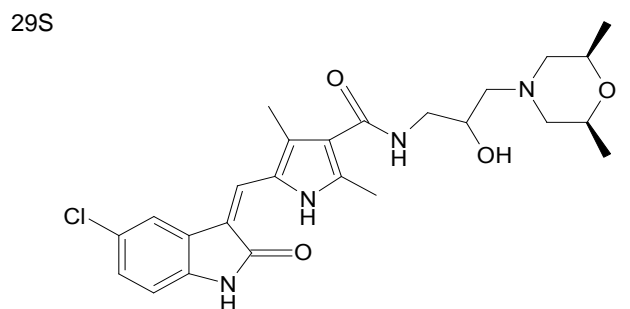
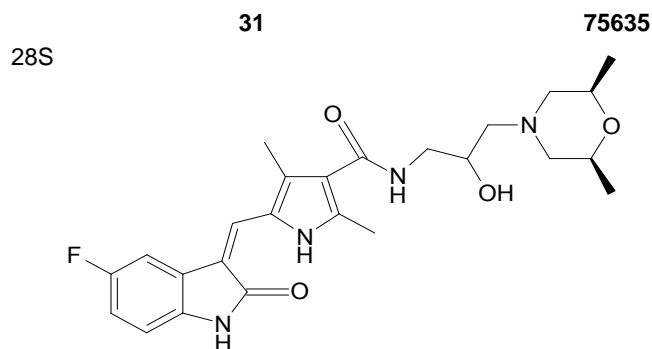
5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід



**32**  
N-{3-[(2R,6S)-2,6-  
диметилморфолін-4-іл]-2-  
гідроксипропіл}-5-[(Z)-(-5-  
фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-  
індол-3-іліден)метил]-2,4-  
диметил-1H-пірол-3-  
карбоксамід

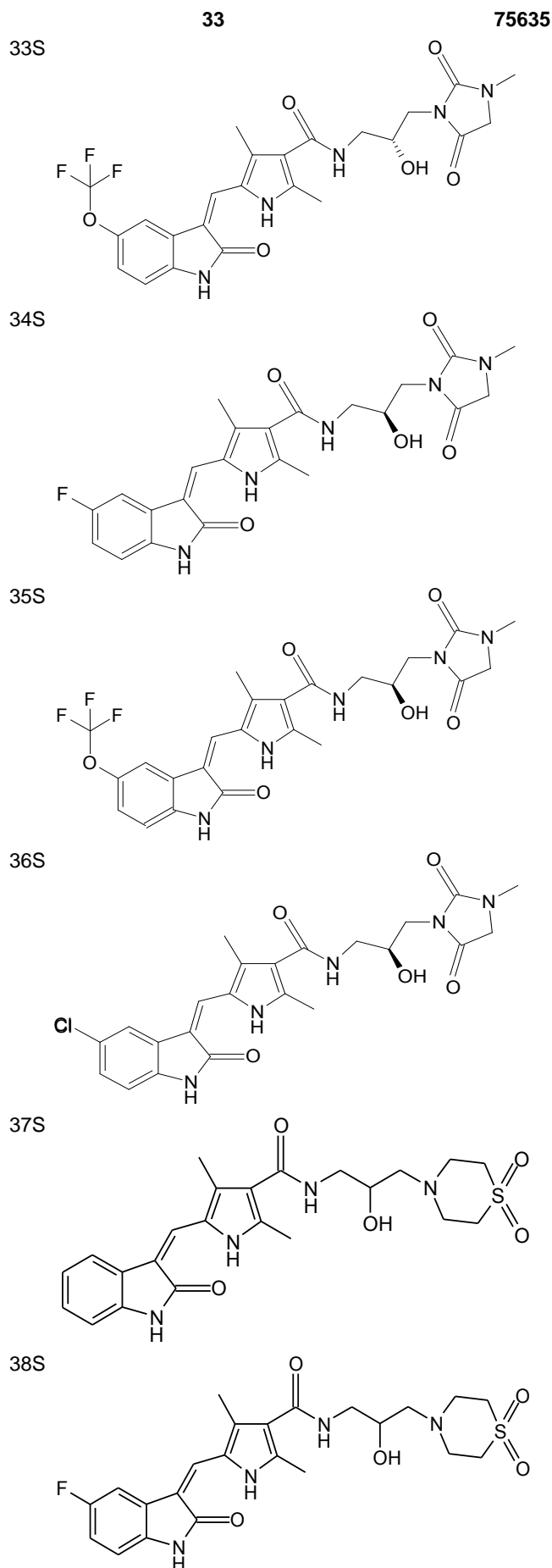
5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-  
дигідро-3H-індол-3-  
іліден)метил]-N-{3-[(2R,6S)-  
2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-  
гідроксипропіл}-2,4-диметил-  
1H-пірол-3-карбоксамід

N-{3-[(2R,6S)-2,6-  
диметилморфолін-4-іл]-2-  
гідроксипропіл}-2,4-диметил-5-  
{(Z)-[2-оксо-5-  
(трифторметокси)-1,2-дигідро-  
3H-індол-3-іліден]метил}-1H-  
пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-  
дигідро-3H-індол-3-  
іліден)метил]-N-[(2R)-2-  
гідрокси-3-(3-метил-2,5-  
діоксоімідазолідин-1-  
іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-  
пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-  
дигідро-3H-індол-3-  
іліден)метил]-N-[(2R)-2-  
гідрокси-3-(3-метил-2,5-  
діоксоімідазолідин-1-  
іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-  
пірол-3-карбоксамід





34  
N-[(2R)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-{(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил}-1H-пірол-3-карбоксамід

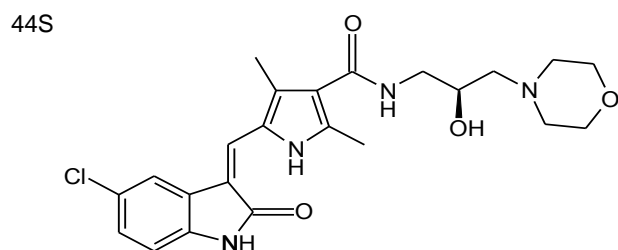
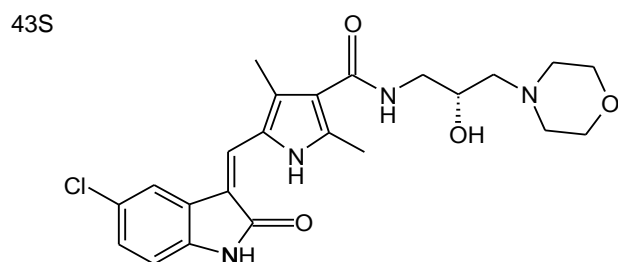
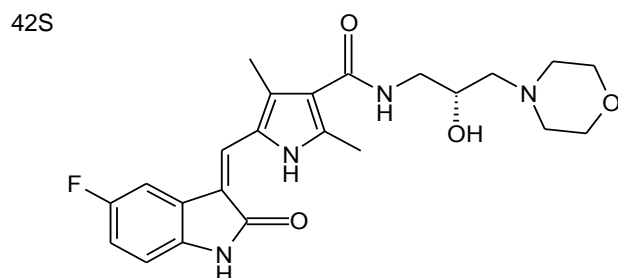
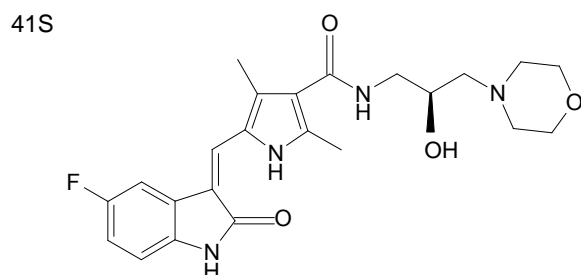
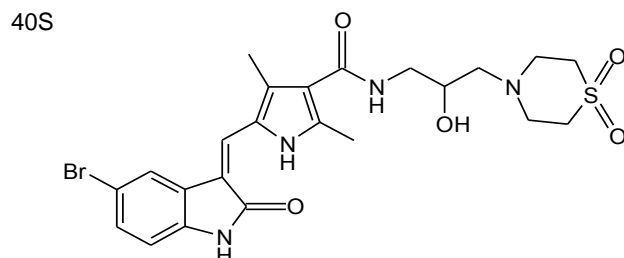
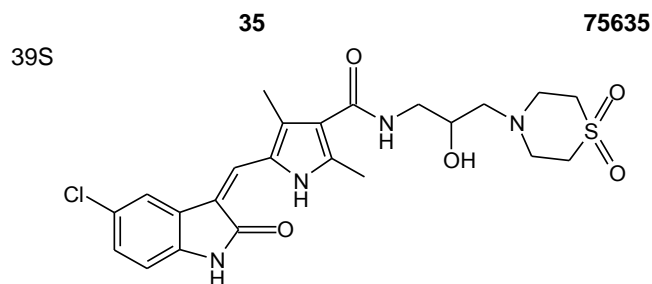
5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[(2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-{(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден]метил}-1H-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[3-(1,1-діоксидотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

N-[3-(1,1-діоксидотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід



**36**  
5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[3-(1,1-діоксидіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

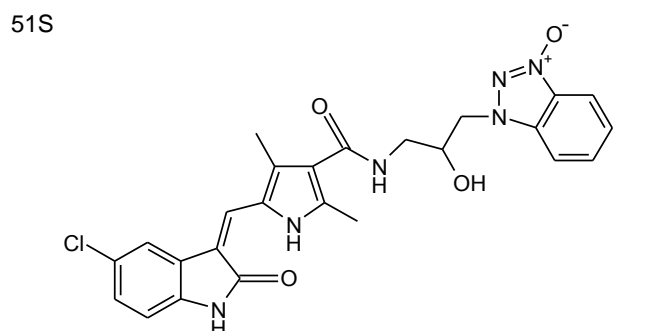
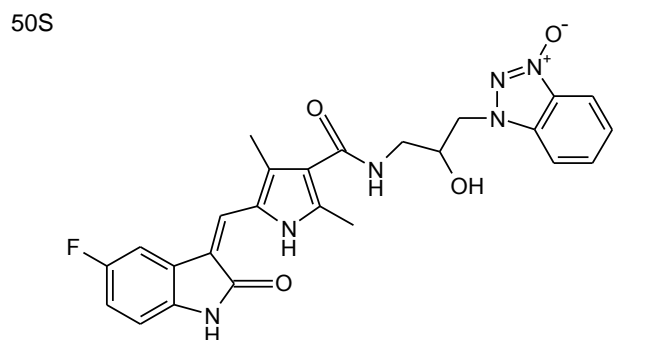
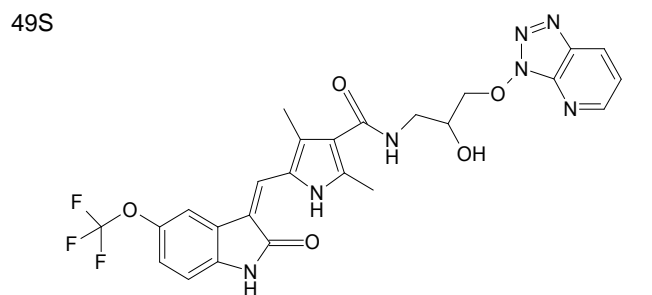
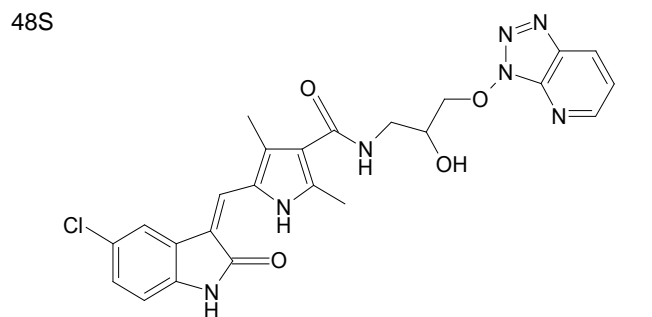
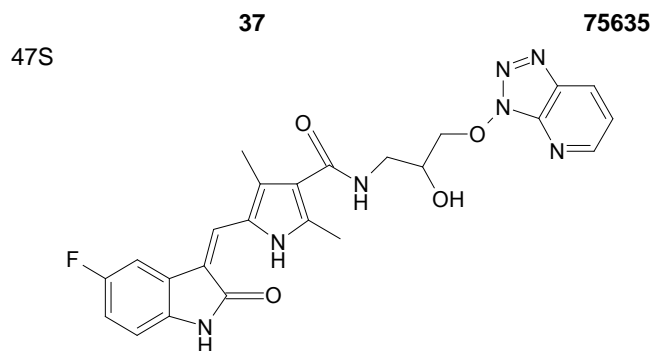
5-[(Z)-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[3-(1,1-діоксидіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід



**38**  
5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-([1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[1,2,3]триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід

5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід

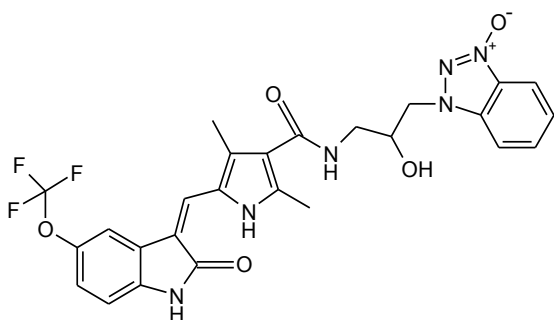
5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід

52S

39

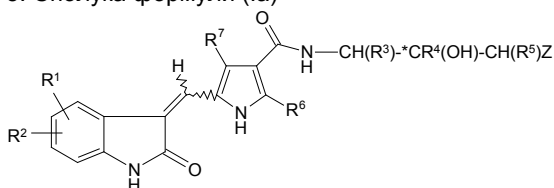
75635

40



2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід

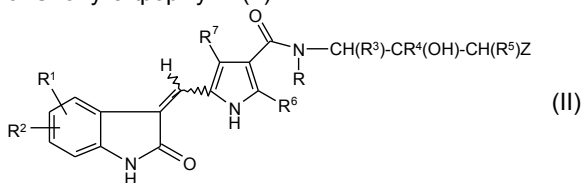
#### 5. Сполука формули (Ia)



в якій:

$R^1, R^3, R^4, R^5$  є воднем;  
 $R^2$  є фтором і є розташованим в 5-положенні індо-  
 лінонового кільця; і  
 $Z$  є морфолін-4-ілом;  
 $R^6$  і  $R^7$  є метилом; і \*C має (S) стереохімію.

#### 6. Сполука формули (II):



в якій:

$R$  є воднем або алкілом;  
 $R^1$  вибирають з групи, що містить водень, галоген,  
 алкіл, галогеналкокси, циклоалкіл, гетероаліцикл-  
 ліл, гідрокси, алкокси,  $-C(O)R^8$ ,  $-NR^9R^{10}$  і  $-C(O)NR^{12}R^{13}$ ;  
 $R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген,  
 алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано, -

$NR^9R^{10}$ ,  $-NR^9C(O)R^{10}$ ,  $-C(O)R^8$ ,  $-S(O)_2NR^9R^{10}$  і  $-SO_2R^{14}$  (де  $R^{14}$  є алкілом, арилом, аралкілом, гете-  
 роарилом і гетероаралкілом);

$R^3, R^4$  і  $R^5$  є, незалежно, воднем або алкілом;

$Z$  є арилом, гетероарилом, гетероциклом або  $-NR^{15}R^{16}$ , де  $R^{15}$  і  $R^{16}$  є, незалежно, воднем або алкілом; або  $R^{15}$  і  $R^{16}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміно-  
 нугрупу;

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень або алкіл;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , як зазначено нижче;

$R^8$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^9$  і  $R^{10}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, ціаноалкіл, циклоалкіл, арил і гете-  
 роарил; або  $R^9$  і  $R^{10}$  об'єднані утворюють гетеро-  
 циклоаміногруппу;

$R^{12}$  і  $R^{13}$ , незалежно, вибирають з групи, що мі-  
 стить водень, алкіл, гідроксиалкіл і арил; або  $R^{12}$  і  $R^{13}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміно;

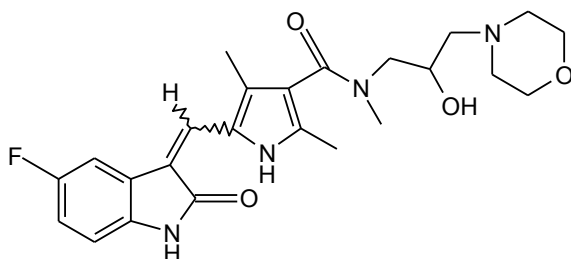
$R^{17}$  вибирають з групи, що містить алкіл, циклоалкіл, арил, гідрокси і гетероарил;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

7. Сполука або сіль згідно з пунктом 6, де сполуку вибирають з групи, що містить:

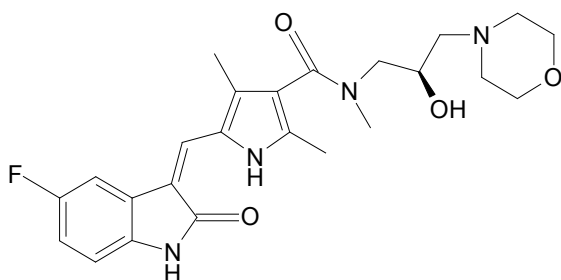
№  
45N

Структура

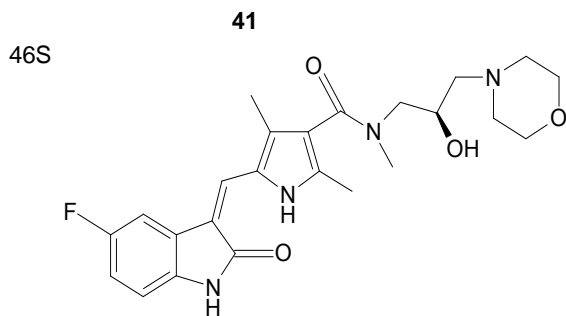


Назва  
 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід

45S



5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти ((S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід



42

5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти ((R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід

8. Фармацевтична композиція, що містить сполуку або сіль згідно з пунктом 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7 і фармацевтично прийнятний носій або екціпієнт.

9. Фармацевтична композиція, що містить сполуку або сіль згідно з пунктом 5 і фармацевтично прийнятний носій або екціпієнт.

10. Спосіб модулювання каталітичної активності протеїнкінази, що включає взаємодію згаданої протеїнкінази з сполукою або сіллю згідно з будь-яким з пунктів 1, 3 або 6.

11. Спосіб згідно з пунктом 10, в якому згадану протеїнкіназу вибирають з групи, що містить рецепторну тирозинкіназу, нерецепторну тирозинкіназу і серинтреонінкіназу.

12. Спосіб лікування або попередження в організмі розладу залежного від протеїнкінази, що включає введення в згаданий організм терапевтичне ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка містить сполуку або сіль згідно з будь-яким з пунктів 1, 3 або 6 і фармацевтично прийнятний носій або екціпієнт.

13. Спосіб згідно з пунктом 12, в якому згаданий розлад, що залежить від протеїнкінази вибирають з групи, яка містить розлад, що залежить від рецепторної тирозинкінази, розлад, що залежить від

нерецепторної тирозинкінази і розлад, що залежить від серинтреонінкінази.

14. Спосіб згідно з пунктом 12, в якому згаданий розлад, що залежить від протеїнкінази, вибирають з групи, яка містить EGFR-залежний розлад, PDGFR-залежний розлад, IGFR-залежний розлад і f1k-залежний розлад.

15. Спосіб згідно з пунктом 12, в якому згаданим розладом обумовленим протеїнкіназою є рак, що вибирають з групи, яка містить пласкоклітинну карциному, астроцитому, саркому Капоші, гліобластому, рак легенів, рак жовчного міхура, рак голови і шиї, меланому, рак яєчників, рак простати, рак грудей, мілкоклітинний рак легенів, гліому, проктологічний рак, рак сечополового тракту і гастроінтестинальний рак.

16. Спосіб згідно з пунктом 12, в якому згаданий розлад обумовлений протеїнкіназою вибирають з групи, що містить діабет, аутоімунний розлад, гіперпроліферативний розлад, рестеноз, фіброз, псоріаз, хворобу вон Хеппель-Ліндау, остеоартрит, ревматоїдний артрит, ангіогенез, запалення, імунологічний розлад і кардіоваскулярний розлад.

17. Спосіб згідно з пунктом 12, в якому згаданим організмом є людина.

Ця заявка заявляє пріоритет попередніх заявок 60/312,361, що подана 15 серпня 2001 року, та 60/268,683, що подана 15 лютого 2001 року. Зміст обох цих заявок введений у дану заявку як посилення.

Даний винахід відноситься до певних похідних 3-(4-амідопірол-2-ілметиліден)-2-індолінону, які модулюють активність протеїнкіназ ("РК"). Сполуки за даним винаходом, таким чином, є корисними при лікуванні розладів, пов'язаних з ненормальною активністю РК. У даній заявці розкриті фармацевтичні композиції, які включають ці сполуки, способи лікування захворювань, що передбачають використання фармацевтичних композицій, які включають такі сполуки, а також розкриті способи приготування таких фармацевтичних композицій.

РК представляють собою ферменти, які каталізують фосфорилування гідроксигруп у тирозинових, серинових та треонінових залишках білків. Наслідки такої оманливо простої активності є приголомшувачими, тобто, ріст клітин, диференціація та проліферація, тобто практично усі аспекти життя клітин, в тій чи іншій мірі залежать від РК актив-

ності. Крім того, ненормальна активність РК пов'язана з сукупністю розладів, що коливаються від тих захворювань, що відносно не загрожують життю, таких, як псоріаз, до надзвичайно небезпечних, таких, як гліобластома (пухлина мозку).

РК можна умовно розділити на два класи, протеїн-тирозин-кінази (РТК) та серин-треонін-кінази (СТК).

Одним з основних аспектів активності РТК є її зв'язок з рецепторами фактора росту. Рецептори фактора росту представляють собою білки поверхні клітин. При зв'язуванні їх з лігандом ростового фактора рецептори фактора росту перетворюються в активну форму, яка взаємодіє з білками на внутрішній поверхні мембрани клітин. Це приводить до фосфорилування залишків тирозину рецептора та інших білків та до утворення всередині клітини комплексів з різноманітними цитоплазматичними сигнальними молекулами, які, у свою чергу, впливають на багаточисленні клітинні відповіді, такі, як ділення клітин (проліферація), клітинна диференціація, ріст клітин, експресія метаболічних ефектів в екстрацелюлярному мікрооточуючому

просторі, тощо. Для більш повного обговорення, дивись Schlessinger та Ullrich, *Neuron*, 9: 303-391 (1992), що введене в дану заявку як посилання, включаючи будь-які малюнки у тому вигляді, як вони там представлені.

Рецептори фактора росту з активністю РТК відомі як рецепторні тирозин-кінази ("RTK"). Вони включають велику родину трансмембранних рецепторів із шкідливою біологічною активністю. В даний момент було ідентифіковано, принаймні, 19 окремих підродин РТК. Прикладом таких підродин може бути підродина позначена як "HER" РТК, яка включає EGFR (рецептор епітеліального фактора росту), HER2, HER3 та HER4. Ці РТК складаються з екстрацелюлярного глікозильованого домена, що зв'язує ліганд, трансмембранного домена та інтрацелюлярного цитоплазматичного каталітичного домена, що може фосфорилувати залишки тирозину у білку.

Інша підродина РТК складається з рецептора інсуліну (IR), рецептора інсулін-подібного фактора росту I (IGF-1R) та рецептора, спорідненого з рецептором інсуліну (IRR). IR та IGF-1R взаємодіють з інсуліном, IGF-I та IGF-II з утворенням гетеротетрамеру, що складається з повністю екстрацелюлярних глікозильованих  $\alpha$ -субодиниць та двох  $\beta$ -субодиниць, що перетинають клітинну мембрану та які містять тирозин-кіназний домен.

Третя підродина РТК відноситься до групи рецепторів фактора росту тромбоцитів ("PDGFR"), що включає PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , CSFIR, c-kit та c-fms. Ці рецептори складаються з глікозильованих екстрацелюлярних доменів, що складаються з варіабельної кількості імуноглобулін-подібних петель та з інтрацелюлярного домена, в якому тирозинкіназний домен переривається за допомогою неспоріднених амінокислотних послідовностей.

Інша група, яку з причини її подібності до підродини PDGFR іноді відносять до подальшої групи, представляє собою підродину рецепторів фетальної печінкової кінази ("flk"). Ця група, як передбачається, складається з вбудованої в кіназу домен-рецепторної фетальної печінкової кінази-1 (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 та fms-подібної тирозинкінази 1 (flt-1).

Ще одним членом родини рецепторів тирозинкінази фактора росту є підродина рецептора фактора росту фібробластів ("FGF"). Ця група складається з чотирьох рецепторів, FGFR1-4 та семи лігандів FGF1-7. Хоча це ще не досить добре визначено, вважається, що рецептори складаються з глікозильованого екстрацелюлярного домена, що містить варіабельну кількість імуноглобулін-подібних петель, та інтрацелюлярний домен, в якому послідовність тирозинкінази переривається ділянками неспоріднених амінокислотних послідовностей.

Ще один член родини рецепторів тирозинкіназних ростових факторів представляє собою підгрупу рецепторів фактора росту судинного ендотелію ("VEGF"). VEGF є димерним глікопротеїном, подібним до PDGF, але таким, що має відмінні біологічні функції та *in vivo* специфічність до цільових клітин. Зокрема, VEGF, як вважається, грає важливу роль у васкулогенезі та ангиогенезі.

Більш повний список відомих підродин РТК

описаний [Plowman та ін., *DN&P*, 7(6):334-339 (1994)], посилання на дане джерело введене в дану заявку як посилання, включаючи малюнки, як вони повністю представлені.

У доповнення до РТК, існує також родина повністю інтрацелюлярних РТК, що називаються "нерецепторними тирозинкіназами" або "клітинними тирозинкіназами". Це останнє визначення, скорочено "СТК", використовується у даній заявці. СТК не містять екстрацелюлярного та трансмембранного доменів. Зараз було ідентифіковано понад 24 СТК в 11 підродинах (Src, Frk, Btk, Csk, Ab1, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak та Ack). Підродина Src, як вважається, є найбільшою групою та включає Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr та Yrk. Для більш детального обговорення СТК дивись [Bolen, *Oncogene*, 8:2025-2031 (1993)], що введене в дану заявку як посилання, включаючи малюнки, у своїй цілісності.

Серин/треонін кінази, СТК, подібні до СТК, є переважно інтрацелюлярними, незважаючи на те, що вони мають декілька рецепторних кіназ СТК-типу. СТК є найбільш типовими кіназами цитозолу; тобто кіназами, що виконують свою функцію у частині цитоплазми іншій, ніж цитоплазматичні органели та цитоскелет. Цитозоль представляє собою ділянку всередині клітини, де проходить більша частина проміжних метаболічних та біосинтетичних процесів; наприклад, саме в цитозолі білки синтезуються на рибосомах.

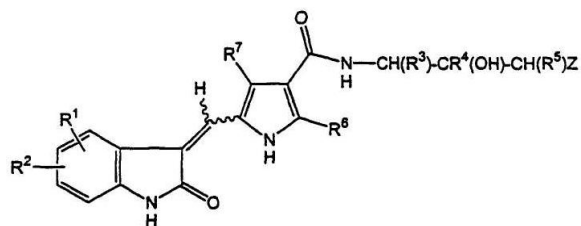
РТК, СТК та СТК усі втягуються у патогенні стани хазяїна, включаючи переважно пухлини. Інші патогенні стани, що були асоційовані з РТК, включають, без обмеження, псоріаз, цироз печінки, діабет, ангиогенез, рестеноз, очні хвороби, ревматоїдний артрит та інші запальні захворювання, такі, як аутоімунні захворювання, кардіоваскулярні захворювання, такі, як атеросклероз, та різноманітність ниркових розладів.

У відношенні пухлини було висунуто дві важливі гіпотези для пояснення надмірної клітинної проліферації, що приводить розвиток пухлини близько до функцій, які відомі, як такі, що є РК-регульованими. Тобто, було запропоновано, що причиною злоякісного клітинного росту є розлад в механізмах, що контролюють ділення клітин та/або диференціацію. Було показано, що білкові продукти ряду прото-онкогенів втягнені у шляхи сигнальної трансдукції, що регулює ріст клітин та диференціацію. Ці білкові продукти прото-онкогенів включають екстрацелюлярні фактори росту, трансмембранні рецептори фактора росту РТК (RTK), цитоплазматичні РТК та СТК цитозолу, що обговорюються вище.

З огляду на очевидний зв'язок між РК-зв'язаними клітинними активностями та широкою різноманітністю розладів людини, не дивно, що велика кількість спроб було направлено на ідентифікацію шляху модулювання РК-активності. Деякі з цих спроб втягують біоміметичні підходи при використанні великих молекул, змодельованих як такі, що втягнені в реальні клітинні процеси [наприклад, мутантні ліганди (Патентна заявка США №4,966,849); розчинні рецептори та антитіла (Патентна заявка WO 94/10202, Kendall та Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:10705-09 (1994), Kim та

ін., Nature, 362:841-844 (1993)); РНК-ліганди (Jelinek та ін., Biochemistry, 33:10450-56); Takano та ін., Mol. Bio. Cell 4:358A (1993); Kinsella та ін., Exp. Cell Res. 199:56-62 (1992); Wright та ін., J. Cellular Phys., 152:448-57) та інгібітори тирозинкінази (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808; Патент США 5,330,992; Mariani та ін., Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 35:2268 (1994)).

У доповнення до вказаного вище, були зроблені спроби для ідентифікації невеликих молекул, які діють як інгібітори РК. Наприклад, біс- моноциклічні, біциклічні та гетероциклічні арилові сполуки [PCT WO 92/20642], вініленазаіндолові похідні [PCT WO94/14808] та 1-циклопропіл-4-піридилхіноліни [Патент США №5,330,992] були описані як інгібітори тирозинкінази. Стирилові спо-



(I)

в якій:

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, галогеналкокси, циклоалкіл, гетероаліцикліл, гідрокси, алкокси,  $-C(O)R^8$ ,  $-NR^9R^{10}$  і  $-C(O)NR^{12}R^{13}$ ;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано,  $-NR^9R^{10}$ ,  $-NR^9C(O)R^{10}$ ,  $-C(O)R^8$ ,  $-S(O)_2NR^9R^{10}$  і  $-SO_2R^{14}$  (де  $R^{14}$  є алкілом, арилом, аралкілом, гетероариллом і гетероаралкілом);

$R^3$ ,  $R^4$  і  $R^5$  є, незалежно, воднем або алкілом;

$Z$  є арилом, гетероариллом, гетероциклом або  $-NR^{15}R^{16}$ , де  $R^{15}$  і  $R^{16}$  є, незалежно, воднем або алкілом; або  $R^{15}$  і  $R^{16}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень або алкіл;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ ;

$R^8$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^9$  і  $R^{10}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, ціаноалкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил; або

$R^9$  і  $R^{10}$  об'єднані утворюють гетероциклоаміногрупу;

$R^{12}$  і  $R^{13}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, гідроксиалкіл і арил; або  $R^{12}$  і  $R^{13}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;

$R^{17}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Іншим втіленням є сполука Формули I, в якій

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, циклоалкіл, гетероаліцикліл, гідрокси, алкокси,  $-C(O)R^8$ ,  $-NR^9R^{10}$  і  $-C(O)NR^{12}R^{13}$ ;

луки [Патент США №5,302,606], стирил-заміщені піридиллові сполуки [Патент США №5,302,606], хінозолінові похідні [Заявка EP №0566 266 A1], селеніндоли та селеніди [PCT WO 94/03427], полігідроксильні сполуки [PCT WO 92/21660] та сполуки бензилфосфонової кислоти [PCT WO 91/15495] усі були описані як інгібітори РТК, корисні для лікування пухлини.

Представлений винахід стосується деяких похідних 3-(4-амідопірол-2-ілметиліден)-2-індолінону, які проявляють РК моделюючи здатність і є таким чином корисними при лікуванні розладів обумовлених аномальною активністю РК.

Одним з втілень цього винаходу є сполука Формули (I):

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано,  $-NR^9R^{10}$ ,  $-NR^9C(O)R^{10}$ ,  $-C(O)R^8$ ,  $-S(O)_2NR^9R^{10}$  і  $-SO_2R^{14}$  (де  $R^{14}$  є алкілом, арилом, аралкілом, гетероариллом і гетероаралкілом);

$R^3$ ,  $R^4$  і  $R^5$  є, незалежно, воднем або алкілом;

$Z$  є арилом, гетероариллом, гетероциклом або  $-NR^{15}R^{16}$ , де  $R^{15}$  і  $R^{16}$  є, незалежно, воднем або алкілом; або  $R^{15}$  і  $R^{16}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень або алкіл;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ ;

$R^8$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^9$  і  $R^{10}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, ціаноалкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил; або

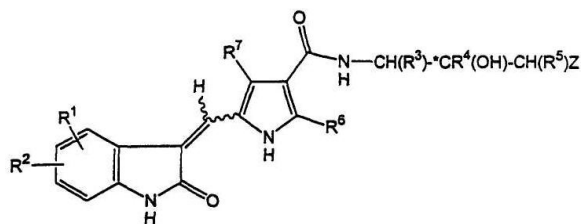
$R^9$  і  $R^{10}$  об'єднані утворюють гетероциклоаміногрупу;

$R^{12}$  і  $R^{13}$ , незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл і арил, або  $R^{12}$  і  $R^{13}$  разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероцикл;

$R^{17}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

Іншим втіленням є сполука Формули (Ia):



в якій:

$R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  і  $R^5$  є воднем;

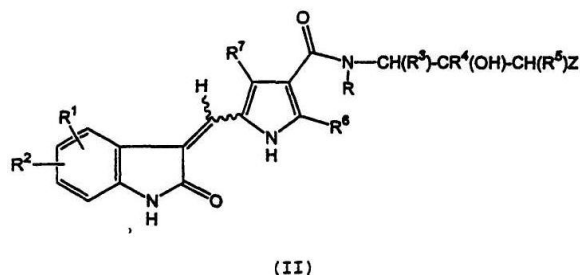
$R^2$  є фтором і є розташованим в 5-положенні індолінонового кільця;

$Z$  є морфолін-4-ілом;

$R^6$  і  $R^7$  є метилом.

Переважно, стереохімія на \*C є (S).

Іншим втіленням є сполука Формули (II):



в якій:

R є воднем або алкілом;

R<sup>1</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, галогеналкокси, циклоалкіл, гетероаліцикліл, гідрокси, алкокси, -C(O)R<sup>8</sup>, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> і -C(O)NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>;

R<sup>2</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано, -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -NR<sup>9</sup>C(O)R<sup>10</sup>, -C(O)R<sup>8</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> і -SO<sub>2</sub>R<sup>14</sup> (де R<sup>14</sup> є алкілом, арилом, аралкілом, гетероариллом і гетероаралкілом);

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> і R<sup>5</sup> є, незалежно, воднем або алкілом;

Z є арилом, гетероариллом, гетероциклом або -NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>, де R<sup>15</sup> і R<sup>16</sup> є, незалежно, воднем або алкілом; або R<sup>15</sup> і R<sup>16</sup> разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;

R<sup>6</sup> вибирають з групи, що містить водень або алкіл;

R<sup>7</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і -C(O)R<sup>17</sup>;

R<sup>8</sup> вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси і арилокси;

R<sup>9</sup> і R<sup>10</sup>, незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, ціаноалкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил; або

R<sup>9</sup> і R<sup>10</sup> об'єднані утворюють гетероциклоаміногрупу;

R<sup>12</sup> і R<sup>13</sup>, незалежно, вибирають з групи, що містить водень, алкіл, гідроксиалкіл і арил; або R<sup>12</sup> і R<sup>13</sup> разом з атомом азоту, до якого вони приєднані, утворюють гетероциклоаміногрупу;

R<sup>17</sup> вибирають з групи, що містить гідрокси, алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил; або її фармацевтично прийнятна сіль.

Іншим втіленням є фармацевтична композиція, що містить сполуку або сіль Формул I, Ia або II і фармацевтично прийнятний носій або ексціпієнт.

Іншим втіленням є спосіб модулювання каталітичної активності протеїнкінази, що полягає у взаємодії протеїнкінази з сполукою або сіллю Формул I, Ia або II. Протеїнкіназою для цього способу може бути рецептор тірозинкінази, нерцептор тірозинкінази і серинтреонінкіназа.

Іншим втіленням є спосіб лікування або попередження залежного від протеїнкінази розладу в організмі, що полягає у введенні терапевтично ефективної кількості фармацевтичної композиції, що містить сполуку або сіль Формул I, Ia або II і фармацевтично прийнятний носій або ексціпієнт в організм. Протеїнкіназою для цього способу може бути рецептор тірозинкінази, нерцептор тірозинкінази і серинтреонінкіназа. Розладом викликаним протеїнкіназою може бути EGFR-залежний розлад, PDGFR-залежний розлад, IGFR-залежний розлад і

flk-залежний розлад. Розладом викликаним протеїнкіназою також може бути пласкоклітинна карцинома, астроцитоме, саркома Капоці, гліобластома, рак легені, рак міхури, рак голови і шиї, меланома, кар яєчників, рак простати, рак грудей, мілкоклітинний рак легені, гліома, проктологічний рак, рак сечополового тракту і гастроінтестинальний рак. Крім того, розладом обумовленим протеїнкіназою також може бути діабет, аутоімунний розлад, гіперпроліферативний розлад, рестеноз, фіброз, псоріаз, хвороба вон Хеппель-Ліндау, остеоартрит, ревматоїдний артрит, ангіогенез, запалення, імунологічний розлад і кардіоваскулярний розлад. Ці способи можуть бути використані при лікуванні людей.

В іншому втіленні, цей винахід стосується способів одержання сполук Формули (I).

В кінці кінців, цей винахід також стосується ідентифікування хімічних сполук, що модулюють каталітичну активність протеїнкінази завдяки взаємодії клітин, що експресують протеїнкіназу, з сполукою або сіллю представленого винаходу і подальшого моніторингу клітин, що зазнали впливу.

#### Визначення

Якщо не вказано інше, наступні терміни, що використовуються в описі і пунктах формули, мають значення розкриті нижче:

"Алкіл" стосується насиченого аліфатичного вуглеводневого радикалу, що включає розгалужені і нерозгалужені групи з 1-20 атомами вуглецю (коли б не зустрічалась область числових значень; наприклад "1-20", є встановленою тут, і це означає, що група, в цьому випадку алкільна група, може містити 1 атом вуглецю, 2 атомами вуглецю, 3 атомами вуглецю, і так далі, до і включаючи 20 атомів вуглецю). Більш переважно, це є алкіл з середнім розміром, що має 1-10 атомів вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, 2-пропіл, н-бутил, ізо-бутил, трет-бутил, пентил і їм подібні. Найбільш переважно, це є нижчий алкіл, що має 1-4 атомів вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, 2-пропіл, н-бутил, ізо-бутил, або трет-бутил, і їм подібні. Алкіл може бути заміщений або незаміщений, і коли заміщений групою(ами), що заміщує, є, переважно, галоген, гідрокси, нижчий алкокси, арил, арилокси, гетероарил, гетероаліцикліл, C(O)R<sup>8</sup>, NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> і C(O)NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>.

"Циклоалкіл" стосується 3-8 членного повністю вуглецевого моноциклічного кільця, повністю вуглецевого 5-членного/6-членного або 6-членного/6-членного конденсованого біциклічного кільця або мультициклічного конденсованого кільця ("конденсована" циклічна система означає, що кожне кільце в системі ділить пару атомів вуглецю з іншим кільцем системи), в якому один або більша кількість кілець може містити один або більшу кількість подвійних зв'язків, але відсутні кільця, що мають повністю кон'юговану пі-електронну систему. Прикладами, без обмеження, циклоалкільних груп є циклопропан, циклобутан, циклопентан, циклопентен, циклогексан, циклогексадієн, адамантан, циклогептан, циклогептатрієн і їм подібні. Циклоалкільна група може бути заміщеною або незаміщеною. Коли заміщена, групою(ами), що заміщує, є, переважно, один або більшу кількість,





капто, ціано, N-амідо, моно або діалкіламіно, карбокси або N-сульфонамідо.

"Гетероцикл" означає насичений циклічний радикал з 3-8 кільцевими атомами, в якому один або два атоми кільця є гетероатомами, які вибирають з N, O або S(O)<sub>n</sub> (де n є цілим числом від 0 до 2), атоми кільця, що залишились, є C, де один або два C атоми можуть, необов'язково, бути заміщені карбонільною групою. Гетероциклічне кільце може бути, необов'язково, заміщеним, незалежно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з нижчого алкілу, необов'язково, заміщеного одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з карбокси або естерних груп, галогеналкілу, ціаноалкілу, галогену, нітро, ціано, гідрокси, алкокси, аміно, моноалкіламіно, діалкіламіно, аралкілу, гетероаралкілу і -COR (де R є алкілом). Більш особливо термін гетероцикліл включає, але не обмежується, тетрагідропіраніл, 2,2-диметил-1,3-діоксалан, піперидино, N-метилпіперидин-3-іл, піперазино, N-метилпіролідин-3-іл, піролідино, морфоліно, тіоморфоліно, тіоморфоліно-1-оксид, тіоморфоліно-1,1-діоксид, 4-етил оксикарбонілпіперазино, 3-оксопіперазино, 2-імідазолідон, 2-піролідинон, 2-оксогомопіперазино, тетрагідропіримідин-2-он і їх похідні. Переважно, гетероциклічна група є, необов'язково, зміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, нижчого алкілу заміщеного карбокси, естеру, гідрокси, або моно або діалкіламіно.

"Гетероциклоаміно" означає насичений циклічний радикал з 3-8 кільцевими атомами, в якому, принаймні, одним атомом кільця є азот і, необов'язково, де один або два інших атомів кільця є гетероатомами, що вибирають з N, O, або S(O)<sub>n</sub> (де n є цілим числом від 0 до 2), атоми кільця, що залишились, є C, де один або два C атоми можуть, необов'язково, бути заміщені карбонільною групою. Гетероциклоаміно кільце може бути, необов'язково, заміщеним, незалежно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з нижчого алкілу, необов'язково, заміщеного одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з карбокси або естерної групи, галогеналкілу, ціаноалкілу, галогену, нітро, ціано, гідрокси, алкокси, аміно, моноалкіламіно, діалкіламіно, аралкілу, гетероаралкілу і -COR (де R є алкілом). Більш специфічно термін гетероциклоаміно включає, але не обмежується, піперидин-1-іл, піперазин-1-іл, піролідин-1-іл, морфолін-4-іл, тіоморфолін-4-іл, тіоморфоліно-1-оксид, тіоморфоліно-1,1-діоксид, 4-етил оксикарбонілпіперазин-1-іл, 3-оксопіперазин-1-іл, 2-імідазолідон-1-іл, 2-піролідинон-1-іл, 2-оксогомопіперазино, тетрагідропіримідин-2-он і їх похідні. Переважно, гетероциклічна група є, необов'язково, заміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, нижчого алкілу заміщеного карбокси або естером, гідрокси, або моно або діалкіламіно. Гетероциклоаміногрупа є підгрупою гетероциклічної групи визначеної вище. "Гідрокси" стосується -ОН групи.

"Алкокси" стосується і -O-(алкіл), і -O-(незаміщений циклоалкіл) групи. Типовими прикладами є, але необмежується, наприклад, меток-

си, етокси, пропокси, бутокси, циклопропілокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси і їм подібні.

"Галогеналкокси" стосується -O-(галогеналкіл) групи. Типовими прикладами є, але необмежується, трифторметокси, трибромметокси і їм подібні.

"Арилокси" стосується і -O-арильних, і -O-гетероарильних груп, як тут визначено. Типовими прикладами є, але необмежується, фенокси, піридинілокси, фуранілокси, тієнілокси, піримідинілокси, піразинілокси і їм подібні і їх похідні. "Меркапто" стосується -SH групи.

"Алкілтіо" стосується і -S-(алкіл), і -S-(незаміщений циклоалкіл) групи. Типовими прикладами є, але необмежується, наприклад, метилтіо, етилтіо, пропілтіо, бутилтіо, циклопропілтіо, циклобутилтіо, циклопентилтіо, циклогексилтіо і їм подібні.

"Арилтіо" стосується і -S-арильної, і -S-гетероарильної групи, як тут визначено. Типовими прикладами є, але необмежується, фенілтіо, піридинілтіо, фуранілтіо, тієнілтіо, піримідинілтіо і їм подібні і їх похідні.

"Ацил" стосується -C(O)-R" групи, де R" вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл, тригалогенметил, незаміщений циклоалкіл, арил, необов'язково, заміщений одним або більшою кількістю, переважно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогенметил, нижчий алкокси, галоген і -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> групи, гетероарил (зв'язаний через вуглець кільця), необов'язково, заміщений одним або більшою кількістю, переважно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, нижчий алкокси, галоген і -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> групи і гетероаліцикліл (зв'язаний через вуглець кільця), необов'язково, заміщений одним або більшою кількістю, переважно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, нижчий алкокси, галоген і -NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> групи. Прикладами ацильних груп є, але необмежується, ацетил, трифторацетил, бензоїл і їм подібні.

"Альдегід" стосується ацильної групи, в якій R" є воднем.

"Тіоацил" стосується -C(S)-R" групи, з R" як тут визначено.

"Естер" стосується -C(O)O-R" групи, з R" як тут визначено, при умові, що R" не може бути воднем.

"Ацетил" стосується -C(O)CH<sub>3</sub> групи.

"Галоген" стосується фтору, хлору, бромов або йоду, переважно фтору або хлору.

"Тригалогенметил" стосується -CX<sub>3</sub> групи, в якій X є галогеном, як визначено вище.

"Тригалогенметансульфоніл" стосується X<sub>3</sub>CS(=O)<sub>2</sub>- групи, з X як визначено вище.

"Ціано" стосується -C≡N групи.

"S-сульфонамідо" стосується -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> групи, з R<sup>9</sup> і R<sup>10</sup> як тут визначено.

"N-сульфонамідо" стосується -NR<sup>9</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>10</sup> групи, з R<sup>9</sup> і R<sup>10</sup> як тут визначено.

"O-карбаміл" стосується -OC(O)NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup> групи, з R<sup>12</sup> і R<sup>13</sup> як тут визначено.

"N-карбаміл" стосується R<sup>9</sup>OC(O)NR<sup>10</sup>- групи, з

$R^9$  і  $R^{10}$  як тут визначено.

"О-тіокарбаміл" стосується  $-OC(S)NR^{12}R^{13}$  групи, з  $R^{12}$  і  $R^{13}$  як тут визначено.

"N-тіокарбаміл" стосується  $R^9OC(S)NR^{10}$  групи, з  $R^9$  і  $R^{10}$  як тут визначено.

"Аміно" стосується  $-NR^9R^{10}$  групи, в якій  $R^9$  і  $R^{10}$  є обидва воднями.

"С-амідо" стосується  $-C(O)NR^9R^{10}$  групи, з  $R^9$  і  $R^{10}$  як тут визначено.

"N-амідо" стосується  $R^9C(O)NR^{10}$  групи, з  $R^9$  і  $R^{10}$  як тут визначено.

"Нітро" стосується  $-NO_2$  групи.

"Галогеналкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, що є заміщеним одним або більшою кількістю однакових або різних атомів галогену, наприклад,  $-CH_2Cl$ ,  $-CF_3$ ,  $-CH_2CF_3$ ,  $-CH_2CCl_3$  і їм подібні.

"Гідроксиалкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, що є заміщеним однією, двома або трьома гідроксигрупами, наприклад, гідроксиметил, 1 або 2-гідроксиетил, 1,2-, 1,3-, або 2,3-дигідроксипропіл і їм подібні.

"Аралкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, який є заміщеним арильною групою, як визначено вище, наприклад,  $-CH_2$ феніл,  $-(CH_2)_2$ феніл,  $-(CH_2)_3$ феніл,  $CH_3CH(CH_3)CH_2$  феніл і їм подібні і їх похідні.

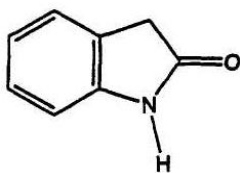
"Гетероаралкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, який є заміщеним гетероарильною групою, наприклад,  $-CH_2$ піридиніл,  $-(CH_2)_2$ піримідиніл,  $-(CH_2)_3$ імідазоліл і їм подібні і їх похідні.

"Моноалкіламіно" означає радикал  $-NHR$ , де  $R$  є алкілом або незаміщеним циклоалкілом, як визначено вище, наприклад, метиламіно, (1-метилетил)аміно, циклогексиламіно і їм подібні.

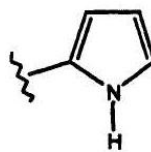
"Діалкіламіно" означає радикал  $-NRR$ , де кожен  $R$  є, незалежно, алкілом або незаміщеним циклоалкілом, як визначено вище, наприклад, диметиламіно, діетиламіно, (1-метилетил)етиламіно, циклогексилметиламіно, циклопентилметиламіно і їм подібні.

"Необов'язковий" або "необов'язково" означає, що надалі описаний випадок або умова може але не завжди мати місце, і що опис включає окремі приклади, де випадок або умова зустрічається і окремі випадки, в яких вона відсутня. Наприклад, "гетероциклільна група, необов'язково, заміщена алкільною групою" означає, що алкіл може але не завжди бути присутнім, і опис включає ситуації, коли гетероциклільна група є заміщеною алкільною групою і ситуації, коли гетероциклільна група є незаміщеною алкільною групою.

Терміни "2-індолінон", "індолін-2-он" і "2-оксиіндол", що тут використовується по черзі стосується молекули, що має хімічну структуру:



Термін "пірол" стосується молекули, що має хімічну структуру:



Сполук, що мають ту ж саму молекулярну формулу, але різну природу або послідовність зв'язків між атомами або розташування їх атомів у просторі називаються "ізомерами". Ізомери, що відрізняються розташуванням атомів у просторі називаються "стереоізомерами". Стереоізомери, що не є дзеркальними відображеннями один одного називаються "діастереомерами" і стереоізомери, що дзеркальними відбитками один одного є "енантіомерами". Коли сполука має асиметричний центр, наприклад, до нього приєднані чотири різні групи, можливо існування пари енантіомерів. Енантіомер можна охарактеризувати за допомогою абсолютної конфігурації його асиметричного центру і описується за допомогою правил становлення  $R$ - і  $S$ -конфігурації Кана і Прелога, або за допомогою способу, в якому молекула обертає площину поляризованого світла і позначають як такий що обертає вправо або вліво (тобто, як (+) або (-)-ізомери, відповідно). Хіральна сполука може існувати як індивідуальний енантіомер або як її суміш. Суміш містить, що містить еквівалентні співвідношення енантіомерів, називається "рацемічною сумішшю".

Сполуки цього винаходу можуть мати один або більшу кількість асиметричних центрів; такі сполуки можна одержати як індивідуальні ( $R$ )- або ( $S$ )-стереоізомери або як їх суміш. Наприклад, атом вуглецю, що несе гідроксигрупу в  $-CONHCH(R^3)CR^4(OH)CR^5Z$  в сполуці формули (I) є асиметричним центром і тому сполука формули (I) може існувати як ( $R$ )- або ( $S$ )-стереоізомер. Якщо не вказано інше, опис або назви особливих сполук в описі і пунктах формули означає включення обох індивідуальних енантіомерів і сумішей, рацемічних або інших. Способи визначення стереохімії і розділення стереоізомерів добре відомі в цій галузі [дивіться Розділ 4 "Advanced Organic Chemistry", 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992].

Сполуки формули (I) можуть мати явище таутомерії і структурної ізомерії. Наприклад, сполуки описані тут можуть приймати  $E$  або  $Z$  конфігурацію навколо подвійного зв'язка, що з'єднує 2-індоліноновий замісник і пірольний замісник або вони можуть бути сумішшю  $E$  і  $Z$ . Цей винахід охоплює будь-які таутомерні або структурні ізомерні форми і їх суміші, які мають здатність модулювати RTK, CTK і/або STK активність і не обмежуються будь-якою однією таутомерною або структурною ізомерною формою.

Термін "фармацевтична композиція" стосується суміші однієї або більшої кількості сполук описаних тут, або їх фізіологічно/фармацевтично прийнятних солей або пролікарських форм, з іншими хімічними компонентами, такими як фізіологічно/фармацевтично прийнятні носії і екціпієнти. Призначенням фармацевтичної композиції є поле-

гшення введення сполуки в організм.

Сполука формули (I) також може діяти як пролікарська форма. Термін "пролікарська форма" стосується агенту, який перетворюється у вихідну лікарську форму *in vivo*. Проліки часто є корисними оскільки, в деяких випадках, вони можуть легше вводиться ніж вихідна лікарська форма. Наприклад, вони можуть бути біодоступними при пероральному введенні не дивлячись на те, що вихідна лікарська форма не є такою. Про лікарська форма також може мати кращу розчинність в фармацевтичних композиціях порівняно з вихідним лікарським засобом. Наприклад, без обмеження, пролікарська форма буде сполукою представленого винаходу, яка вводиться як естер ("про лікарська форма"), що сприяє рух через мембрану клітини, де розчинність у воді несприятливо впливає на рухливість, але потім метаболітично гідролізує до карбонової кислоти, і активний початок попадає у клітину, де водорозчинність є корисною.

Крім того, прикладом про лікарської форми може бути невеликий поліпептид, наприклад, без обмеження, поліпептид з 2-10 амінокислот, приєднаний через термінальну аміногрупу до карбоксильної групи сполуки цього винаходу, де поліпептид гідролізує або метаболізує *in vivo* вивільнюючи активну молекулу. Проліки сполуки Формули (I) охоплюються межами цього винаходу.

Крім того, зрозуміло, що сполука Формули (I) може бути метаболізована під дією ферментів в організмі, такому як людина генеруючи метаболіт, що може модулювати активність протеїнкінази. Такі метаболіти охоплюються межами цього винаходу.

Як тут використовується, термін "фізіологічно/фармацевтично прийнятний носій" стосується носія або розріджувача, що не спричиняє значного подразнення на організм і не зменшує біологічну активність і негативно не впливає на властивості сполуки, що вводиться.

Термін "фармацевтично прийнятний екціпієнт" стосується інертної речовини, що додається до фармацевтичної композиції для сприяння введенню сполуки. Прикладами, без обмеження, екціпієнтів є карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні види і типи цукрів і крохмалів, похідні целюлози, желатин, рослинні олії і поліетиленгліколі.

Як тут використовується, термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується таких солей, що зберігають біологічну ефективність і властивості вихідної сполуки. Такими солями є:

(1) кислотно адитивна сіль, яку одержують за допомогою реакції основної вихідної сполуки з неорганічними кислотами, такими як хлорводнева кислота, бром воднева кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, сірчана кислота і пер хлорна кислота і їм подібні, або з органічними кислотами, такими як оцтова кислота, щавлева кислота, (D) або (L) яблучна кислота, малеїнова кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, саліцилова кислота, винна кислота, лимонна кислота, бурштинова кислота або малінова кислота і їм подібні, переважно хлорводнева кислота або (L)-яблучна; або

(2) солі утворюються, коли кислотний протон присутній вихідній молекулі замінити на іон мета-

лу, наприклад, іон лужного металу, іон лужноземельного металу або іон алюмінію; або конденсація з органічними основами, такими як етаноламін, діетаноламін, триетаноламін, трометамін, N-метилглуксамін та подібні до них.

"PK" стосується рецептору протеїнтірозинкінази (RTKs), нерецептору або "клітинної" тірозинкінази (CTK) і серинтреонінкінази (STKs).

Термін "спосіб" стосується методів, способів, технік і процедур для виконання даної задачі, включаючи, але не обмежується, такими методами, способами, техніками і процедурами, що відомі або легко виводяться з відомих методів, способів, технік і процедур лікарем, фармацевтом, біологом, біохіміком і медиком.

"Модуляція" або "модулювання" стосується зміни каталітичної активності RTK, CTK і STK, зокрема, модулювання стосується активування каталітичної активності RTK, CTK і STK, переважно активування або інгібування каталітичної активності RTK, CTK і STK, що залежить від концентрації сполуки або солі, до якої RTK, CTK або STK є чутливою або, більш переважно, інгібування каталітичної активності RTK, CTK і STK.

Термін "каталітична активність" стосується швидкості фосфорилування тирозину під дією, прямо або опосередковано, RTK і/або CTK або фосфорилування серину і треоніну під дією, прямо або опосередковано, STK.

Термін "взаємодія" стосується сполучення сполуки цього винаходу і цільової РК разом в такий спосіб, що сполука може впливати на каталітичну активність РК, або безпосередньо, тобто, шляхом взаємодії з самою кіназою, або опосередковано, тобто, шляхом взаємодії з іншою молекулою від якої залежить каталітична активність кінази. Така "взаємодія" може відбуватись "in vitro", тобто, в колбі для дослідження, чашці петрі або їм подібному. В колбі для дослідження, взаємодія може втягувати тільки сполуку і РК, як представляє інтерес, або вона може втягувати всі клітини. Клітини також можна витримувати або вирощувати в чашках з культурою клітин і взаємодіяти з сполукою в цьому середовищі. В цьому контексті, здатність окремих сполук впливати на РК залежний розлад, тобто, IC<sub>50</sub> сполуки, приведений нижче, можна визначати перед використанням сполук *in vivo* в досліді з більшим комплексом живих організмів. Для клітин за межами організму, існує велика кількість способів і вони є добре відомими для середнього спеціаліста в цій галузі, по визначенню РК, що контактують з сполуками включаючи, але не обмежується, безпосередню мікроін'єкцію і ряд трансмембранних транспортних методик.

Термін "in vitro" відноситься до процедур, які виконують у штучному навколишньому середовищі, такому як, без обмеження, тестові пробірки або культуральне середовище.

Термін "in vivo" відноситься до процедур, які виконують усередині живого організму, такого як, без обмеження, миша, пацюк або кролі.

"Розлади, пов'язані з РК", "розлади, що управляються РК" та "ненормальна активність РК" усі відносяться до стану, що характеризується непринятною активністю РК, тобто зниженням або більш часто підвищенням РК-каталітичної актив-

ності, де індивідуальна РК може бути RTK, STK або STK. Неприйнятна каталітична активність може виникати в результаті одного з наступних факторів: (1) експресія РК у клітинах, що в нормі не експресують РК, (2) підвищення РК експресії, що веде до небажаної клітинної проліферації, диференціації та/або росту, або (3) зменшення експресії РК, що веде до небажаного зменшення клітинної проліферації, диференціації та/або росту. Понад-активність РК відноситься або до ампліфікації гена, що кодує індивідуальну РК, або до виникнення такого рівня активності РК, що може корелювати з розладом клітинної проліферації, диференціації та росту (тобто, якщо рівень РК підвищується, то збільшується тяжкість одного або більше симптомів клітинного розладу). Недостатня активність відноситься до того випадку, коли тяжкість одного або більше симптомів клітинного розладу збільшується, коли рівень РК активності зменшується.

"Лікувати" та "лікування" відноситься до способу пом'якшення або знищення РК-медійованого клітинного розладу та/або симптомів, що супроводжують його. Зокрема стосовно раку, ці терміни просто означають, що ймовірність життя особи, яка страждає на рак буде збільшуватися, або що один або більше симптомів захворювання будуть зменшуватися.

"Організм" відноситься до живої сутності, що включає, принаймні, одну клітину. Живий організм може бути таким простим, як наприклад, єдина еукаріотична клітина, або таким складним, як ссавець, включаючи людину.

"Терапевтично ефективна кількість" відноситься до такої кількості сполуки, що вводиться, яка буде полегшувати в деякій мірі один або більше симптомів розладу, що піддається лікуванню. У відношенні лікування раку терапевтично ефективна кількість відноситься до такої кількості, що має ефект:

- (1) зменшення розміру пухлини;
- (2) інгібування (тобто, уповільнення у деякій мірі, бажано, зупинка) метастазів пухлини;
- (3) інгібування у деякій мірі (тобто уповільнення у деякій мірі, бажано зупинка) росту пухлини та/або
- (4) послаблення у деякій мірі (або, бажано, знищення) одного або більше симптомів, асоційованих з пухлиною.

"Моніторинг" означає спостереження або виявлення ефекту контакту сполуки з клітиною, що експресує індивідуальну РК. Ефект, що спостерігається або виявляється, може бути зміною у клітинному фенотипі, у каталітичній активності РК, або зміною у взаємодії РК з природним партнером зв'язування. Способи для спостереження або виявлення таких ефектів добре відомі з рівня техніки.

Вказаний вище ефект вибирають із зміни або відсутності змін у клітинному фенотипі, із зміни або відсутності зміни у каталітичній активності вказаної протеїнази або із зміни або відсутності зміни у взаємодії вказаної протеїнази з природним партнером зв'язування у заключному аспекті даного винаходу.

"Клітинний фенотип" відноситься до появи зовнішніх ознак клітини або тканини або біологічної

функції клітини або тканини. Прикладами клітинних фенотипів, без обмеження, є розмір клітини, ріст клітини, клітинна проліферація, клітинна диференціація, виживання клітин, апоптоз, споживання та використання поживних речовин. Такі фенотипічні характеристики вимірюються за допомогою способів, що добре відомі у даній галузі техніки.

"Природний партнер зв'язування" відноситься до поліпептиду, що зв'язується з індивідуальною РК у клітині. Природні партнери зв'язування можуть відігравати роль у поширенні сигналу у РК-медійованому процесі трансдукції. Зміни у взаємодії природних партнерів зв'язування з РК можуть проявлятися самі по собі як збільшена або зменшена концентрація комплексу РК/партнер зв'язування та, в результаті цього, до здатних до виявлення змін у здатності РК опосередковувати сигнальну трансдукцію.

Характерні сполуки за даним винаходом представлені у Таблиці 1 а, що приведена нижче.

ТАБЛИЦЯ 1а

№	Структура	Назва	MC m/z
1		5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід	427 [M+1]
2		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід	441 [M+1]
3		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід	423 [M+1]
4		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід	457 [M+1]
5		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід	501 [M+1] 503 [M-1]
6		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід	405 [M+1]
7		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід	423 [M+1]
8		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід	439 [M+1]
9		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід	483 [M+1] 485 [M-1]

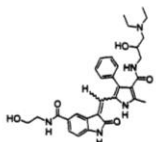
10		5-((Z)-[3-(4-хлорфеніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-(2-гідрокси-3-піролідін-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід	24		N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
11		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-3-феніл-1Н-пірол-2-іл]метилен]-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	25		5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
12		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-3-феніл-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-метил-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	26		5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
13		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-3-феніл-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	27		N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
14		N-(3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)-4-(4-фторфеніл)-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолін-4-іл)карбоніл]-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід	28		N-[3-((2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
15		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-3-(4-фторфеніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	29		5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[3-((2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
16		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	30		5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-((2R)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолін-1-іл)пропіл)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід																	
17		(3Z)-3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	31	<td>(3Z)-3-[[3-(4-ціанфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>32</td> <td> <td>4-(4-ціанфеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолін-4-іл)карбоніл]-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>33</td> <td> <td>(3Z)-3-([3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен)-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>34</td> <td> <td>(3Z)-3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>35</td> <td> <td>5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>36</td> <td> <td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td></td></td></td></td></td>	(3Z)-3-[[3-(4-ціанфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	32	<td>4-(4-ціанфеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолін-4-іл)карбоніл]-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>33</td> <td> <td>(3Z)-3-([3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен)-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>34</td> <td> <td>(3Z)-3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>35</td> <td> <td>5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>36</td> <td> <td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td></td></td></td></td>	4-(4-ціанфеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-((Z)-[5-(морфолін-4-іл)карбоніл]-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-1Н-пірол-3-карбоксамід	33	<td>(3Z)-3-([3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен)-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>34</td> <td> <td>(3Z)-3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>35</td> <td> <td>5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>36</td> <td> <td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td></td></td></td>	(3Z)-3-([3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен)-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	34	<td>(3Z)-3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід</td> <td>35</td> <td> <td>5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>36</td> <td> <td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td></td></td>	(3Z)-3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл]-5-метил-1Н-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбоксамід	35	<td>5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>36</td> <td> <td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td></td>	5-((Z)-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід	36	<td>5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід</td> <td>37</td> <td></td>	5-((Z)-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил)-N-[2-гідрокси-3-(2Н-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід	37	

41		442,49 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
42		442,49 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
43		458,95 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
44		458,95 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
47		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[(1,2,3)триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси]пропіл]амід
48		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-[(1,2,3)триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси]пропіл]амід
49		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-{1,2,3}триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси]пропіл]амід
50		5-(5-(Z)-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід
51		5-(5-(Z)-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід
52		2,4-(Z)-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксибензотриазол-1-іл)пропіл]амід

Інші характерні сполуки представленого винаходу показані в Таблиці 16 нижче.

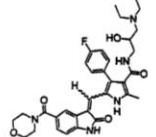
№	Структура	Назва
1N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід
2N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
3N		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілденметил]-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
4N		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(Z)-ілденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
5N		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндолілденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід
6N		2,4-Диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндолілденметил]-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-{1,2,3}триазол-1-ілпропіл)амід
7N		5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндолілденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-{1,2,3}триазол-1-ілпропіл)амід
8N		5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндолілденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-{1,2,3}триазол-1-ілпропіл)амід
9N		5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндолілденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-{1,2,3}триазол-1-ілпропіл)амід
11N		3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен]-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід
12N		3-[[4-((3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл)аміно)карбоніл)-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен]-N-метил-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

13N



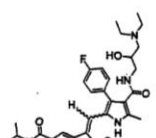
(3Z)-3-[[4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-5-метил-3-феніл-1H-пірол-2-іл]метилен]-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

14N



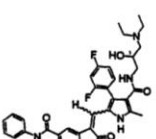
N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-4-(4-фторфеніл)-2-метил-5-[[5-(морфолін-4-ілкарбоніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

15N



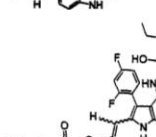
3-[[4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-3-(4-фторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

16N



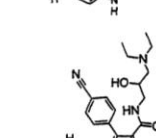
3-[[4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

17N



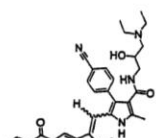
3-[[4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-3-(2,4-дифторфеніл)-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-N-(2-гідроксиетил)-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

18N



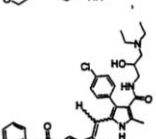
3-[[3-(4-ціанофеніл)-4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-N,N-диметил-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

19N



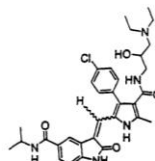
4-(4-ціанофеніл)-N-[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]-2-метил-5-[[5-(морфолін-4-ілкарбоніл)-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

20N



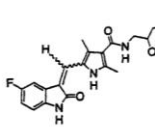
3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-2-оксо-N-феніл-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

21N



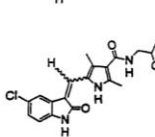
3-[[3-(4-хлорфеніл)-4-[[[3-(діетиламіно)-2-гідроксипропіл]аміно]карбоніл]-5-метил-1H-пірол-2-іл]метилен]-N-ізопропіл-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-5-карбоксамід

22N



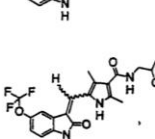
5-[[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

23N



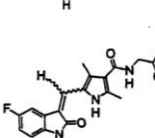
5-[[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

24N



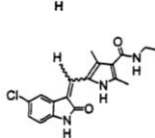
N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси]-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

25N



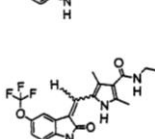
5-[[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

26N



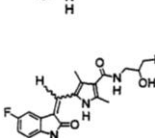
5-[[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

27N



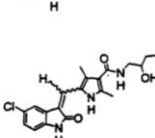
N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-трифторметокси]-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід

28N



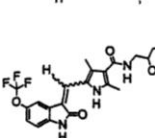
N-[3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-5-[[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

29N



5-[[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-N-[3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід

30N



N-[3-[2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-[[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил]-1H-пірол-3-карбоксамід



34N		5-((5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
35N		N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-((Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден]метил)-1H-пірол-3-карбоксамід
36N		5-((5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-N-[2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
37N		N-[3-(1,1-діоксидіотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-((2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-1H-пірол-3-карбоксамід
38N		N-[3-(1,1-діоксидіотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-5-((5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
39N		5-((5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-N-[3-(1,1-діоксидіотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
40N		5-((5-бром-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)метил)-N-[3-(1,1-діоксидіотіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід
47N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(1,2,3)триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси]пропіл]амід
48N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-((1,2,3)триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси)пропіл]амід
49N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(1,2,3)триазоло[4,5-b]піридин-3-ілокси]пропіл]амід
50N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксисбензотриазол-1-іл)пропіл]амід
51N		5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксисбензотриазол-1-іл)пропіл]амід
52N		2,4-диметил-5-(2-оксо-5-трифторметокси-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-гідрокси-3-(3-оксисбензотриазол-1-іл)пропіл]амід

Інші характерні сполуки представленого винаходу показані в Таблиці 1в, нижче.

№	Структура	Назва
45N		5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід
45S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти ((S)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід
46S		5-((Z)-5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-ілден)метил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти ((R)-2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід

Сполуки приведені в Таблицях 1а-1в є тільки прикладами і не призначені для обмеження границь цього винаходу будь-яким чином.

В той час як найширші визначення є приведеними вище, деякі сполуки Формули (I), що приведені нижче, є переважними.

1. Переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно, водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил або н-бутил, більш переважно, водень або метил; і

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом, циклоалкілом, арилом або гетероарилом, і, більш переважно,  $R^7$  є воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбоксі, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом.

2. Іншою переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно, водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил або н-бутил, більш переважно, водень або метил, найбільш переважно, метил;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, і  $R^7$  є, більш переважно, воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбоксі, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом; і  $R^3$ ,  $R^4$ , і  $R^5$  є воднем; і

$Z$  є арилом.

3. Іншою переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно, водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил, або н-бутил, більш переважно, водень або метил, найбільш переважно, метил;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, і  $R^7$  є, більш переважно, воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбоксі, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом, найбільш переважно, метилом; і  $R^3$ ,  $R^4$ , і  $R^5$  є воднем; і

$Z$  є гетероарилом, переважно, триазінілом, тетразолілом, імідазолілом, піридинілом, піриміди-

нілом або піразинілом.

4. Іншою переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил або н-бутил, більш переважно, водень або метил, найбільш переважно, метил;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, і  $R^7$  є, більш переважно, воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом; і

$R^3$ ,  $R^4$ , і  $R^5$  є воднем; і

Z є гетероциклом.

5. Іншою переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил або н-бутил, більш переважно, водень або метил, найбільш переважно, метил;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, і  $R^7$  є, більш переважно, воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом, найбільш переважно, метилом; і

$R^3$ ,  $R^4$ , і  $R^5$  є воднем; і

Z є  $-NR^{15}R^{16}$ , де  $R^{15}$  і  $R^{16}$  об'єднані утворюють гетероциклоаміно, переважно піперидин-1-іл, N-метилпіперидин-1-іл, піперазин-1-іл, N-метилпіролідин-1-іл, піролідин-1-іл, морфолін-4-іл, тіоморфолін-4-іл, тіоморфоліно-1-оксид, тіоморфоліно-1,1-діоксид, 4-етиліоксикарбонілметилпіперазин-1-іл, 3-оксопіперазин-1-іл, імідазолідин-1-іл-2-он, піролідин-1-іл-2-он, 2-оксогомопіперазин-1-іл, або тетрагідропіримідин-1-іл-2-он, більш переважно, морфолін-4-іл.

6. Іншою переважною групою сполук Формули (I) є сполуки, в яких:

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл, переважно водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, ізобутил, або н-бутил, більш переважно, водень або метил;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, і  $R^7$  є, більш переважно, воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно, метилом, воднем або фенілом; і

$R^3$ ,  $R^4$ , і  $R^5$  є воднем; і

Z є  $-NR^{15}R^{16}$ , де  $R^{15}$  і  $R^{16}$  є алкілами, переважно діетиламіно, диметиламіно або етиламіно.

7. В межах згаданих вище переважних і більш переважних груп (1)-(6), навіть більш переважної групи сполук є сполуки, в яких:

$R^1$  є воднем, алкілом,  $-C(O)NR^{12}R^{13}$ , незаміщеним циклоалкілом, переважно, воднем, 3,4-диметоксифеніламінокарбонілом, 4-метокси-3-хлорфеніламінокарбонілом, навіть більш переважно,

воднем або метилом, найбільш переважно, воднем; і

$R^2$  є воднем, ціано, галогеном, нижчим алкокси або  $-S(O)_2NR^9R^{10}$ , де  $R^9$  є воднем і  $R^{10}$  є воднем, арилом або алкілом і є 5-положенні оксиіндольним кільцем, переважно,  $R^2$  є воднем, хлором, бромом, фтором, метокси, етокси, фенілом, диметиламіносульфонілом, 3-хлорфеніламіносульфонілом, карбокси, метокси, аміносульфонілом, метиламіносульфонілом, феніламіносульфонілом, піридин-3-іламіносульфонілом, диметиламіносульфонілом, ізопропіламіносульфонілом, більш переважно, воднем, фтором або бромом. Найбільш переважно,  $R^2$  є фтором і є розташованим в 5-положенні індолінонового кільця.

В згаданих вище переважних, більш переважних і навіть більш переважних сполуках стереохімія на атомі вуглецю, що несе гідроксигрупу в  $CONHCH(R^3)CR^4(OH)CR^SZ$  ланцюзі і позначеному \* є або RS, R або S, більш переважно, S.

Використання

РК, каталітична активність яких модулюється за допомогою сполук згідно з даним винаходом, включають протеїн-тирозин-кінази, які є двох типів: рецепторні тирозинкінази (RTK) та клітинні тирозинкінази (CTK), та серин-треонін-кінази (STK). Опосередкована RTK сигнальна трансдукція ініціюється екстрацелюлярною взаємодією із специфічним фактором росту (лігандом), після чого настає димеризація, короткочасна стимуляція значної протеїнкіназної активності та фосфорилування. Таким чином створюються сайти зв'язування для інтрацелюлярної сигнальної трансдукції молекул, і це веде до утворення комплексів зі спектром цитоплазматичних сигнальних молекул, що покращують прийнятну клітинну відповідь (наприклад, клітинний поділ, метаболічні впливи на екстрацелюлярне мікро-навколишнє середовище, тощо). ив. Schlessinger та Ullrich, 1992, Neuron 9: 303-391].

Було показано, що сайти фосфорилування тирозину на рецепторах фактора росту функціонують як високо афінні зв'язувальні сайти для SH2 (scr гомологія) доменів або сигнальних молекул. [Fantl та ін., 1992, Cell 69:413-423, Songyang та ін., 1994, Mol. Cell. Biol. 14:2777-2785, Songyang та ін., 1993, Cell 72:767-778, та Koch та ін., 1991, Science 252:668-678].

Було ідентифіковано декілька інтрацелюлярних субстратних білків, що асоційовані з RTK. Їх можна розділити на дві основні групи: (1) субстрати, що мають каталітичний домен, та (2) субстрати, що не мають такого домену, але які служать як адаптори та асоційовані з каталітично активними молекулами. [Songyang та ін., 1993, Cell 72:767-778]. Специфічність взаємодії між рецепторами та доменами SH2 визначається амінокислотними залишками, що безпосередньо оточують фосфорильований залишок тирозину. Відмінності у зв'язувальній афінності між SH2 доменами та амінокислотними послідовностями, що оточують фосфорильовані залишки тирозину на індивідуальних рецепторах, є послідовними із відмінностями, що спостерігаються в їх профілях фосфорилування субстратів. [Songyang та ін., 1993, Cell 72:767-778]. Ці спостереження дають можливість

запропонувати, що функція кожної RTK визначається не тільки моделями її експресії та доступністю субстрату, але також сукупністю шляхів сигнальної трансдукції, що активуються індивідуальним рецептором. Таким чином, фосфорилювання забезпечує важливий регуляторний етап, який визначає селективність сигнальних шляхів, які посилюються специфічними рецепторами фактора росту, а також рецепторами фактора диференціації.

STK, що в основному є цитозольними, впливають на внутрішню біохімію клітини, часто шляхом зв'язаної відповіді на РТК-подію. STK втягнені у сигнальний процес, який ініціює синтез ДНК та подальший мітоз, що веде до проліферації клітин.

Таким чином, РК-сигнальна трансдукція приводить, серед інших відповідей, до клітинної проліферації, росту та метаболізму. Ненормальна проліферація клітин може приводити до широкої різноманітності розладів та захворювань, включаючи розвиток неоплазії, такої, як карцинома, саркома, гліобластома та гемангіома, розладів, таких як лейкемія, псоріаз, артеріосклероз, артрит та діабетична ретинопатія, та інших розладів, пов'язаних з неконтрольованим ангиогенезом та/або васкулогенезом.

Точне розуміння механізму, за допомогою якого сполуки за даним винаходом інгібують РК не вимагається для того, щоб здійснювати на практиці даний винахід. Проте, якщо немає потреби зв'язуватися з будь-яким механізмом або теорією, можна вважати, що сполуки взаємодіють з амінокислотами у каталітичній ділянці РК. РК типово володіють двополатевою структурою, при цьому АТФ зв'язується у жолобі між двома лопатями на ділянці, де амінокислоти є консервативними для РК. Інгібітори РК, як очікується, зв'язуються за допомогою нековалентних взаємодій, таких, як водневі зв'язки, сили Ван дер Ваальса та іонні взаємодії, на тій самій загальній ділянці, де вказана вище АТФ зв'язується з РК. Більш конкретно, передбачається, що 2-індоліноновий компонент сполуки за винаходом зв'язується в загальному просторі, який у нормі займає аденинове кільце АТФ. Специфічність індивідуальної молекули для індивідуальної РК може потім виникати як результат додаткових взаємодій між різноманітними замісниками у 2-індоліноновому ядрі та амінокислотними доменами, специфічними для індивідуальних РК. Таким чином, різні індолінонові замісники можуть робити свій внесок у переважне зв'язування індивідуальних РК. Здатність до вибору сполук, активних у різних зв'язувальних сайтах АТФ (або інших нуклеотидах), робить сполуки за даним винаходом корисними для націлювання будь-якого білка за допомогою такого сайту. Сполуки, розкриті у даній заявці, таким чином, знаходять своє застосування в аналізах *in vitro* для таких білків, а також демонструють *in vivo* терапевтичні ефекти при взаємодії з такими білками.

Крім того, сполуки за даним винаходом забезпечують терапевтичний підхід до лікування багатьох видів солідних пухлин, включаючи, але не обмежуючись, карциному, саркому, включаючи саркому Капоші, еритробластому, гліобластому, менингіому, астроцитому, меланому та міобласто-

му. Лікування та запобігання несолідним раковим пухлинам, таким, як лейкемія, також охоплюється даним винаходом. Показання можуть включати, але не обмежені, рак мозку, рак сечового або жовчного міхура, рак яєчника, рак шлунку, рак підшлункової залози, рак кишечника, рак крові, рак легень та рак кісток.

Подальші приклади типів розладів, пов'язаних з неприйнятною активністю РК, для запобігання, лікування та вивчення яких можуть бути корисними сполуки, описані в даній заявці, без обмеження включають розлади клітинної проліферації, фіброзні розлади та метаболічні розлади.

Розлади клітинної проліферації, які можна лікувати, яким можна запобігати та далі вивчати за допомогою даного винаходу, включають рак, проліферативні розлади кровоносних судин та проліферативні розлади мезангіальних клітин.

Проліферативні захворювання кровоносних судин відносяться до розладів, пов'язаних з ненормальним васкулогенезом (формуванням кровоносних судин) та ангиогенезом (поширенням кровоносних судин). Оскільки васкулогенез та ангиогенез відіграють важливу роль у різноманітності нормальних фізіологічних процесів, таких як, ембріональний розвиток, утворення жовтого тіла, лікування ран та регенерація органів, вони також відіграють центральну роль у розвитку пухлин, оскільки приводять до утворення нових капілярів, необхідних для підтримання життєдіяльності пухлини. Інші приклади розладів проліферації кровоносних судин включають артрит, при якому нові капілярні кровоносні судини порушують з'єднання та руйнують хрящі, очні хвороби, подібні до діабетичної ретинопатії, оскільки нові капіляри сітківки порушують скловидне тіло, можуть спричинювати кровотечу та викликати сліпоту.

Було ідентифіковано дві структурно подібні RTK, що зв'язують VEGF з високою афінністю: *fms*-подібний рецептор тирозина-1 (*flt-1*) [Shibua та ін., 1990, *Oncogene*, 5:519-524; De Vries та ін., 1992, *Science*, 255: 989-991] та рецептор KDR/FLK-1, що відомий також як VEGF-R2. Ростовий фактор судинного ендотелію (VEGF), як було показано, представляє собою специфічний мітоген з активністю посилення росту клітин ендотелію. [Ferrara та Henzel, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161:851-858; Vaisman та ін., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:19461-19566]. Інформація, представлена в патентних заявках США №08/193,829, 08/038,596 та 07/975,750, підтверджує, що VEGF не тільки відповідає за проліферацію ендотеліальних клітин, але також є первинним регулятором нормального та патологічного ангиогенезу. [Див., взагалі, Klagsbrum та Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10):699-702; Houck, та ін., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:26031-26037].

Нормальний васкулогенез та ангиогенез грають важливу роль у різноманітності фізіологічних процесів, таких, як ембріональний розвиток, заживлення ран, регенерація органів та жіночі репродуктивні процеси, такі, як розвиток фолікулів, розвиток жовтого тіла під час овуляції та плацентарний ріст після запліднення. [Folkman та Shing, 1992, *J. Biological Chem.*, 267(16):10931-34]. Неконтрольований васкулогенез та/або ангиогенез асоціюються

з захворюваннями, такими, як діабет, а також зі злоякісними солідними пухлинами, що пов'язані з васкуляризацією під час росту. [Klagsbom та Soker, 1993, *Current Biology*, 3 (10): 699-702; Folkham, 1991, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:4-6; Weidner, та ін., 1991, *New Engl. J. Med.*, 324:1-5].

Передбачувана роль VEGF в проліферації ендотеліальних клітин та міграції під час ангіогенезу та васкулогенезу показує важливу роль рецептора KDR/FLK-1 у цих процесах. Захворювання, такі як цукровий діабет [Folkman, 198, XI Конгрес з тромбозу та гомеостазу (Verstraete, та ін., ред.), стор.583-596, Leuven University Press, Leuven] та артрит, а також злоякісний пухлинний ріст, можуть приводити до неконтрольованого ангіогенезу. [Див., Folkman, 1971, *N. Engl. J. Med.*, 285:1182-1186]. Рецептори, з якими специфічно зв'язується VEGF, представляють собою важливу та сильну терапевтичну мішень для регуляції та моделювання васкулогенезу та/або ангіогенезу та різноманітності тяжких захворювань, які передбачають ненормальний клітинний ріст, спричинений цими процесами. [Plowman та ін., 1994, *DN&P*, 7(6):334-339]. Більш конкретно, високоспецифічна роль рецептора KDR/FLK-1 у неоваскулогенезі робить їх важливою мішенню для терапевтичних підходів при лікуванні раку та інших захворювань, які втягують неконтрольоване утворення кровоносних судин.

Таким чином, даний винахід забезпечує сполуки, здатні до регуляції та/або модулювання тирозинкіназної сигнальної трансдукції, включаючи сигнальну трансдукцію рецептора KDR/FLK-1 для того, щоб інгібувати або посилювати ангіогенез та/або васкулогенез, тобто, сполуки, що інгібують, запобігають або піддаються впливові сигнальної трансдукції за допомогою KDR/FLK-1 при активації лігандами, такими, як VEGF. Незважаючи на те, що очікується, що сполуки за даним винаходом впливають на рецепторні або інші компоненти на протязі шляху сигнальної трансдукції тирозинкінази, вони можуть також впливати безпосередньо на пухлинні клітини, що приводить до неконтрольованого ангіогенезу.

Незважаючи на те, що різноманітні людські та мишачі еквіваленти генеричних рецепторів „flk-1” відрізняються один від одного, вони у багатьох аспектах є взаємозамінними. Мишачий рецептор Flk-1 та його людський еквівалент, KDR, демонструють гомологічність послідовностей порядку 93,4% усередині інтрацелюлярного домену. Подібно до цього, мишачий FLK-1 зв'язує людський VEGF з тією самою афінністю, що й мишачий VEGF, і згідно з цим активується лігандом, що має походження від різних видів. [Millaue та ін., 1993, *Cell*, 72:835-846; Quinn та ін., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7533-7537]. FLK-1 також зв'язується, а потім тирозин фосфорилує людські субстрати RTK (наприклад, PLC-γ або p85), коли коекспресується в клітинах 293 (людські ембріональні ниркові фібробласти).

Моделі, які покладаються на рецептор FLK, таким чином, безпосередньо застосовуються для розуміння суті рецептора KDR. Наприклад, використання мишачого рецептора FLK-1 у способах, які ідентифікують сполуки, що регулюють шлях

сигнальної трансдукції миші, безпосередньо застосовуються для ідентифікації сполук, які можуть використовуватися для регуляції шляху сигнальної трансдукції людини, тобто, які регулюють активність, зв'язану з рецептором KDR. Таким чином, хімічні сполуки, ідентифіковані як інгібітори KDR/FLK-1 *in vitro*, можуть бути підтверджені у прийнятних моделях *in vivo*. Обидві моделі *in vivo* мишей та пацюків були показані як такі, що демонструють відмінне значення при перевірці клінічного потенціалу агентів, що впливають на шлях сигнальної трансдукції, індукований KDR/FLK-1.

Таким чином, даний винахід забезпечує сполуки, що регулюють, модулюють та/або інгібують ангіогенез шляхом впливу на ферментативну активність рецептора KDR/FLK-1 та взаємодії з трансдукованим за допомогою KDR/FLK-1 сигналом. Таким чином, даний винахід забезпечує терапевтичний підхід до лікування багатьох видів солідних пухлин, включаючи, але не обмежуючись, гліобластомою, меланомою та саркому Капоші, карциному яєчника, легенів, молочної залози, передміхурової залози, підшлункової залози, кишечника та епідермоїдної карциноми. Крім того, дані передбачають, що введення сполук, які інгібують шлях сигнальної трансдукції, опосередкований KDR/FLK-1, можуть також використовуватися при лікуванні гемангіоми, рестенозу та діабетичної ретинопатії.

Крім того, даний винахід відноситься до інгібування васкулогенезу та ангіогенезу іншими рецептор-опосередкованими шляхами, включаючи шлях, який включає рецептор flt-1.

Сигнальна трансдукція, опосередкована рецептором тирозинкінази, ініціюється екстрацелюлярною взаємодією зі специфічним фактором росту (лігандом), після чого проходить димеризація рецептора, короткочасна стимуляція суттєвої тирозинкіназної активності та автофосфорилування. Таким чином, створюються сайти зв'язування для молекул внутрішньоклітинної сигнальної трансдукції, що ведуть до утворення комплексів зі спектром цитоплазматичних сигнальних молекул, які поліпшують прийнятну клітинну відповідь, наприклад, ділення клітин та метаболічні впливи на екстрацелюлярне мікрооточуюче середовище. [Див. Schlessinger та Ullrich, 1992, *Neuron*, 9:1-20].

Тісна гомологія внутрішньоклітинних ділянок KDR/FLK-1 з такими для рецептора PDGF-β (гомологія 50,3%) та/або спорідненим з ним рецептором flt-1 показує індукцію шляхів сигнальної трансдукції, що перекриваються. Наприклад, для рецептор PDGF-β, члени родини src [Twamley та ін., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7696-7700], фосфатидилінозитол-3'-кіназа [Hu та ін., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12:981-990], фосфоліпаза cγ [Kashishian та Cooper, 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 4:49-51], ras-ГТФаза активувальний білок, [Kashishian та ін., 1992, *EMBO J.*, 11:1373-1382], PTP-ID/syp [Kazlauskas та ін., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10 90:6939-6943], Grb2 [Arvidsson та ін., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:6715-6726] та адапторні молекули Shc та Nek [Nishimura та ін., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13:6889-6896] були показані як такі, що зв'язуються з ділянками, що втягують різноманітні сайти автофосфорилування. [Див. в загальних рисах Claesson-Welsh, 1994, *Prog. Growth Factor Res.*, 5:37-54].

Таким чином, можливо, що шляхи сигнальної трансдукції, активовані KDR/FLK-1, включають шлях *ras* [Rozakis та ін., 1992, *Nature*, 360:689-692], PI-3'-кіназний, *src*-опосередкований та *plc*-опосередкований шляхи. Кожний з цих шляхів може відігравати вирішальну роль у впливі KDR/FLK-1 на ендотеліальні клітини. Згідно з цим ще один аспект даного винаходу пов'язаний з використанням органічних сполук, описаних у даній заявці, для модулювання ангиогенезу та васкулогенезу як процесів, що знаходяться під контролем цих шляхів.

На противагу цьому, розлади, пов'язані з скороченням, звуженням або закриттям кровоносних судин, такі, як рестеноз, також включаються, а також включаються ті, що можна лікувати та яким можна запобігати за допомогою способів за даним винаходом.

Фіброзні розлади відносяться до ненормального утворення екстрацелюлярних матриць. Приклади фіброзних розладів включають цироз печінки та проліферативні розлади мезангіальних клітин. Цироз печінки характеризується збільшенням кількості екстрацелюлярних матриксних складових, що приводить до утворення печінкового рубця. Збільшення кількості екстрацелюлярного матрикса, що викликає утворення печінкового рубця, може бути спричинене вірусною інфекцією, такою, як гепатит. Ліпоцити, як виявляється, грають основну роль у цирозі печінки. Інші фіброзні розлади також включають атеросклероз.

Проліферативні розлади, пов'язані з мезангіальними клітинами, відносяться до розладів, що викликаються ненормальною проліферацією мезангіальних клітин. Мезангіальні проліферативні захворювання включають різноманітні ниркові захворювання людини, такі, як гломерулонефрит, діабетична нефропатія та злоякісний нефросклероз, а також такі розлади, як тромботичний мікроангіопатичний синдром, відторгнення трансплантату, гломерулопатія. RTK PDGFR втягнений у підтримання проліферації мезангіальних клітин. [Floege та ін., 1993, *Kidney International* 43:47S-54S].

Багато пухлин представляють собою проліферативні захворювання клітин та, як зазначено вище, РК асоційовані з клітинними проліферативними захворюваннями. Таким чином, не дивно, що РК, такі, як, наприклад члени родини RTK були асоційовані з розвитком раку. Деякі з цих рецепторів, подібні до EGFR [Tuzi та ін., 1991, *Br. J. Cancer* 63:227-233, Torp та ін., 1992, *APMIS* 100:713-719], HER2/neu [Slamon та ін., 1989, *Science* 244:707-712] та PDGF-R [Kumabe та ін., 1992, *Oncogene*, 7:627-633], понадекспресуються у багатьох пухлинах та/або постійно активуються аутокринними гангліями. Фактично, при найбільш загальних та серйозних формах раку була показана понадекспресія цих рецепторів [Akbasak та Suner-Akbasak та ін., 1992, *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133, Dickson та ін., 1992, *Cancer Treatment Res.* 61:249-273, Kors та ін., 1992, *J. Clin. Invest.* 90:1352-1360] та активація аутокринними гангліями [Lee та Donoghue, 1992, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070, Kors та ін., вище, Akbasak та Suner-Akbasak та ін., вище]. Наприклад, EGRF був асоційований з карциномою лус-

катих клітин, астроцитомою, гліобластомою, раком шиї та голови, саркомою легенів та раком сечового та жовчного міхура. HER2 був асоційований з раком молочних залоз, яєчника, шлунка, легенів, підшлункової залози, жовчного та сечового міхура. PDGFR пов'язаний з гліобластомою та меланою, а також з раком легенів, яєчника та передміхурової залози. RTK *c-met* був пов'язаний з утворенням злоякісних пухлин. Наприклад, *c-met* був пов'язаний, зокрема, з колоректальними, тиреоїдними, підшлунковими, шлунковими та гепатоцелюлярними карциномами та лімфомами. Додатково *c-met* пов'язують з лейкемією. Понадекспресія гена *c-met* була виявлена у пацієнтів з хворобою Ходжкіна та хворобою Беркітта.

IGF-IR у доповнення до втягнення у підтримку живлення та діабету типу-II, також пов'язаний з декількома типами раку. Наприклад, IGF-I був втягнений як аутокринний стимулятор росту у декілька типів пухлин, наприклад, для пухлинних клітин карциноми молочної залози [Arteaga та ін., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1418-1423] та дрібних клітин пухлини легенів [Macauley та ін., 1990, *Cancer Res.*, 50:2511-2517]. Крім того, IGF-I поряд з тим, що є інтегрально втягненим у нормальний ріст та диференціацію нервової системи, також, як виявляється, є аутокринним стимулятором людської гліоми. [Sandberg-Nordqvist та ін., 1993, *Cancer Res.* 53:2475-2478]. Важливість IGF-IR та його лігандів у клітинній проліферації також підтримується тим фактом, що ріст багатьох типів клітин у культурі (фібробласти, епітеліальні клітини, клітини гладеньких м'язів, Т-лімфоцити, мієлоїдні клітини, хондрцити та остеобласти (стовбурові клітини кісткового мозку)) стимулюється IGF-I. [Goldring та Goldring, 1991, *Eukaryotic Gene Expression*, 1:301-326]. Baserga та Coppola предбачають, що IGF-IR відіграють центральну роль у механізмі трансформації та самі по собі можуть бути бажаною мішенню для терапевтичного втручання у широкий спектр злоякісних пухлин людини. [Baserga, 1995, *Cancer Res.*, 55:249-252, Baserga, 1994, *Cell* 79:927-930, Coppola та ін., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:4588-4595].

STK втягнені у багато типів раку, включаючи, зокрема, рак молочних залоз [Cance, та ін., *Int. J. Cancer*, 54:571-77 (1993)].

Зв'язок між ненормальною РК активністю та захворюванням не обмежується раком. Наприклад, RTK пов'язані з захворюваннями, такими, як псоріаз, цукровий діабет, ендометріоз, ангиогенез, розвиток атероматозних бляшок, хвороба Альцгеймера, рестеноз, хвороба Гіппеля-Ліндау, епідермальна гіперпроліферація, нейродегенеративні захворювання, макулярна дегенерація, пов'язана з віком, та гемангіоми. Наприклад, EGFR виявлявся при заживленні коливальних та дермальних ран. Дефекти для інсуліну-R та EGF-1R виявляли при типі-II цукрового діабету. Більш повна кореляція між специфічною RTK та їх терапевтичними показаннями представлена у [Plowman та ін., 1994, *DN&P* 7:334-339].

Як зазначено раніше, не тільки RTK, але й CTK, що включають, але не обмежуються, *src*, *abl*, *fps*, *yes*, *fyn*, *lyn*, *lck*, *blk*, *hck*, *fgr* and *yrk* [розглянуті Bolen та ін., 1992, *FASEB J.*, 6:3403-3409], втягнені

у шлях проліферативної та метаболічної сигнальної трансдукції, і, таким чином, як передбачається, і як було показано, втягнені у багато РТК-опосередкованих розладів, на які направлений даний винахід. Наприклад, мутований src (v-src) був показаний як онкобілок (pp60<sup>v-src</sup>) у курчат. Крім того, його клітинний гомолог, прото-онкоген pp60<sup>c-src</sup>, переносить онкогенні сигнали на багато рецепторів. Понадэкспресія EGFR або HER2/neu у пухлинах веде до конститутивної активації pp60<sup>c-src</sup>, що є характерним для злоякісних клітин, але відсутнє у нормальних клітинах. З іншого боку, миші, в яких відсутня експресія c-src, демонструють остеопетрозний фенотип, що свідчить про ключову участь c-src у функції остеокластів та у можливому їх втягненні у споріднені розлади.

Подібно до цього, Zap70 втягнений у Т-клітинну передачу сигналу, що можна пов'язувати з аутоімунними розладами.

STK пов'язані з запаленням, аутоімунним захворюванням, імунною відповіддю та гіперпроліферативними розладами, такими, як рестеноз, фіброз, псоріаз, остеоартрит та ревматоїдний артрит.

РК також втягнені в процес ембріоімплантації. Таким чином, сполуки за даним винаходом можуть забезпечувати ефективний спосіб запобігання такій ембріоімплантації і, таким чином, є корисними як агенти для контролю народжуваності. Додаткові розлади, які можуть лікуватися або яким можна запобігати при використанні сполук за даним винаходом, є імунологічні розлади, такі, як аутоімунні розлади, СНІД та кардіоваскулярні розлади, такі, як атеросклероз.

На завершення, обидва РТК та СТК, як зараз передбачається, є втягненими в гіперімунні захворювання.

Сполуки та представлені дані не призначені для обмеження об'єму даного винаходу будь-яким чином.

Введення та фармацевтична композиція

Сполука за даним винаходом або її фармацевтично прийнятні солі можуть вводитися як такі пацієнтові або можуть вводитися в складі фармацевтичних композицій, в яких згаданий вище матеріал перемішують з прийнятними носіями або наповнювачами. Способи створення та введення лікарських засобів можуть бути знайдені у ["Remington's Pharmacological Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., останнє видання].

Як такі, що використовуються у даній заявці, поняття "вводити" та "введення" відносяться до доставки сполуки Формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі або фармацевтичної композиції, що містить сполуку Формули (I) або її фармацевтично прийнятну форму солі за даним винаходом, в організм для запобігання або лікування пов'язаного з РК розладу.

Прийнятні способи введення можуть включати, без обмеження, пероральне, ректальне, трансмукозальне або інтестинальне застосування або внутрішньом'язове, підшкірне, інтрамедулярне, інтратекальне, безпосереднє інтравентрикулярне, внутрішньовенне, інтравітреальне, інтраперитоніальне, інтраназальне або інтраокулярне введення. Бажані способи введення включають пероральне

та парентеральне.

Альтернативно, краще вводити сполуки місцево, ніж системним чином, наприклад, шляхом ін'єкції сполуки безпосередньо у солідну пухлину, часто у вигляді композиції депо або у вигляді композиції відстроченого вивільнення.

Крім того, можна вводити лікарський засіб у вигляді цільової системи доставки, наприклад, у вигляді ліпосоми, вкритої антитілами, специфічними для пухлини. Ліпосоми будуть націлюватися та захоплюватися селективно пухлиною.

Фармацевтичні композиції за даним винаходом можуть бути приготовлені за допомогою способів, що добре відомі у даній галузі техніки, наприклад, шляхом традиційного перемішування, розчинення, гранулювання, дражування, відмучування, емульгування, інкапсуляції, процесів уловлювання або ліофілізації.

Фармацевтичні композиції для використання у відповідності з даним винаходом можуть бути створені прийнятним чином при використанні одного або більше фізіологічно прийнятних носіїв, включаючи наповнювачі та допоміжні речовини, які поліпшують обробку активних сполук у препаративні форми, що можуть використовуватися фармацевтично. Склад композиції залежить від вибраного шляху введення.

Для ін'єкції сполуки за винаходом можуть бути поєднані у водних розчинах, бажано фізіологічно сумісних буферах, таких, як розчин Хенкса, розчин Рінгера або буфері на основі фізіологічного розчину. Для трансмукозального введення у композиції використовуються пенетранти, що є прийнятними для бар'єра, який треба подолати. Такі пенетранти відомі у галузі техніки.

Для перорального введення сполуки можуть бути сформульовані шляхом поєднання активних сполук з фармацевтично прийнятними носіями, що добре відомі у даній галузі. Такі носії дозволяють сполукам за винаходом можуть бути сформульованими як таблетки, пілі, лозенги, драже, капсули, рідини, гелі, сиропи, суспензії, тощо, для перорального прийому пацієнтом. Фармацевтичні препарати для перорального введення можна використовувати при застосуванні твердого наповнювача, при необов'язковому подрібненні одержаної суміші, обробкою суміші гранул після додання інших прийнятних допоміжних речовин, при необхідності, для одержання таблеток або ядер драже. Корисними наповнювачами є, зокрема, наповнювачі, такі, як цукри, включаючи лактозу, цукрозу, манітол або сорбітол, препарати целюлози, такі, як наприклад, кукурудзяний крохмаль, рисовий крохмаль та картопляний крохмаль, та інші матеріали, такі, як желатин, трагакант, метилцелюлоза, гідроксипропілметил-целюлоза, карбоксиметилцелюлоза натрія та/або полівінілпіролідон (PVP). У разі необхідності, можуть додаватися дезінтегрувальні агенти, такі, як перехресно-зв'язаний полівінілпіролідон, агар або альгінова кислота. Можуть також використовуватися сіль, така як альгінат натрію.

Ядра драже забезпечуються прийнятним покриттям. З цією метою можуть використовуватися концентровані цукрові розчини, що можуть необов'язково містити гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, карбополевий гель, поліетиленгліколь та/або

діоксид титану, лакові розчини та прийнятні органічні розчинники або суміші розчинників. Барвники або пігменти можуть додаватися до таблеток або покриття драже для ідентифікації або характеристики різноманітних комбінацій доз активної сполуки.

Фармацевтичні композиції, які можуть використовуватися перорально, включають капсули, що розчиняються, які виготовляють з желатини, а також м'які герметичні капсули, виготовлені з желатину та пластифікатора, такого, як гліцерин або сорбітол. Такі капсули можуть містити активні інгредієнти у суміші з наповнювачами, такими, як лактоза, зв'язувальні речовини, такі, як крохмаль, та/або лубрикант, такий, як тальк або стеарат магнію, та необов'язково, стабілізатори. У м'яких кап-

сулах активні сполуки можуть бути розчинені або суспендовані у прийнятних рідинах, таких, як жирні олії, рідкий парафін або рідкі поліетиленгліколі. У ці композиції можуть також додаватися стабілізатори.

Фармацевтичні композиції, що також можуть використовуватися, включають тверді желатинові капсули. Як необмежувальний приклад можна навести композицію лікарського засобу, що містить активну сполуку у вигляді капсули для перорального введення, яка включає 50 та 200мг на дозу. Дві дози виготовляють з тих самих гранул шляхом завантаження у тверді желатинові капсули різного розміру, розмір 3 для капсул на 50мг і розмір 0 для капсул на 200мг. Композиція може бути, наприклад, такою, як показано у Таблиці 2.

Таблиця 2

Інгредієнт Назва/марка	Концентрація у грануляті (% об./об.)	Кількість у капсулі на 50мг (мг)	Кількість у капсулі на 200мг (мг)
Активна сполука NF	65,0	50,0	200,0
Манітол NF	23,5	18,1	72,4
Кроскармелоза натрію NF	6,0	4,6	18,4
Повідон К 30 NF	5,0	3,8	15,2
Стеарат магнію NF	0,5	0,38	1,52
Капсула, шведський жовтий NF		розмір 3	розмір 0

Капсули можуть бути спаковані у пляшки з коричневого скла або пластикові пляшки для того, щоб захистити активну сполуку від світла. Контейнери, що містять активну сполуку у вигляді капсульної композиції, можуть зберігатися при контрольованій кімнатній температурі (15-30°C).

Для введення шляхом інгаляції, сполуки для використання згідно з даним винаходом можуть легко доставлятися у формі аерозольних спреїв при використанні упаковки під тиском або форсунок та прийнятного пропелента, наприклад, без обмеження, дихлордифторметану, трихлорфторметану, дихлортетрафторетану або діоксиду вуглецю.

У випадку аерозолів під тиском одинична доза може контролюватися шляхом забезпечення клапана для доставки дозованої кількості. Капсули та картриджі для використання в інгаляторі або інсуфляторі, що складаються, наприклад, з желатину, можуть бути сформульовані таким чином, що вони містять порошкову суміш сполуки або прийнятну порошкову основу, таку, як лактоза або крохмаль.

Сполуки можуть також бути сформульовані для парентерального введення, наприклад, шляхом болюсної ін'єкції або безперервної інфузії. Композиції для ін'єкції можуть бути представлені в одноступінчовій формі, наприклад, в ампулах або у багатодозових контейнерах з доданням консервантів. Композиції можуть набувати таких форм як суспензії, розчини або емульсії у масляних або водних носіях та можуть містити сформульовані матеріали, такі, як суспендувальні, стабілізуювальні та/або диспергувальні агенти.

Фармацевтичні композиції для парентерального призначення включають водні розчини водорозчинної форми, такі, як, без обмеження, сіль, активної сполуки. Крім того, суспензії активних сполук

можна приготувати у ліпофільному носії. Прийнятні ліпофільні носії включають жирні масла, такі, як масло сезаму, синтетичні естери жирних кислот, такі, як етилолеат та тригліцериди, або матеріали, такі, як ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкції можуть містити речовини, що збільшують в'язкість суспензії, такі, як карбоксиметилцелюлоза натрію, сорбітол або декстран. Необов'язково суспензії можуть містити прийнятні стабілізатори та/або агенти, що збільшують розчинність сполук для того, щоб забезпечити приготування високо концентрованих розчинів.

Альтернативно, активний інгредієнт може бути також у формі порошка для подальшого розведення за допомогою прийнятного носія, наприклад, стерильної, вільної від пірогену води, перед використанням.

Сполуки можуть також бути сформульовані у композиції для ректального застосування, такої, як супозиторії або утримувальної клізми, при використанні, наприклад, традиційних основ для супозиторіїв, таких, як масло какао або інші тригліцериди.

У доповнення до композицій, описаних раніше, сполуки можуть бути також сформульовані як препарати депо. Такі композиції тривалої дії можуть призначатися шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Сполука за даним винаходом може бути сформульована для цього шляху введення з прийнятним полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії з фармакологічно прийнятним маслом), з іонообмінною смолою, або як слабо розчинне похідне, таке, як, без обмеження, слабо розчинна сіль.

Як необмежувальний приклад фармацевтичного носія для гідрофобних сполук за винаходом можна навести систему співрозчинників, що вклю-

чає бензиловий спирт, неполярний сурфактант, органічний полімер, що змішується з водою, та водну фазу, таку, як VPD-система співрозчинників. VPD представляє собою розчин 3% вага/об, бензилового спирту, 8% вага/об, неполярного сурфактанту Полісорбату 80, та 65% вага/об, поліетиленгліколю 300, що доводиться до об'єму в абсолютному етанолі. VPD система співрозчинників (VPD:D5W) складається з VPD, що розведена 1:1 з 5% декстозою у водному розчині. Ця система співрозчинників добре розчиняє гідрофобні сполуки та сама по собі має низьку токсичність при системному введенні. Природно, що пропорції такої системи співрозчинників можна значно варіювати без порушення їх характеристик розчинності та токсичності. Крім того, ідентичність компонентів системи співрозчинників можна варіювати: наприклад, інші низькотоксичні неполярні сурфактанти можна використовувати замість Полісорбату 80, при цьому фракційну частку поліетиленгліколю можна варіювати, інші біосумісні полімери можна заміщувати поліетиленгліколем, наприклад, полівінілпіролідом, а іншими цукри або полісахаридами можна заміщувати на декстозу.

Альтернативно, можна використовувати інші системи доставки для гідрофобних фармацевтичних сполук. Ліпосоми та емульсії представляють собою добре відомі приклади векторів доставки або носіїв для гідрофобних лікарських засобів. У доповнення, певні органічні розчинники, такі, як диметилсульфоксид, також можна використовувати, незважаючи на те, що це часто відбувається за рахунок підвищення токсичності.

Крім того, сполуки можуть доставлятися при використанні систем відстроченої доставки, таких, як напівпроникні матрикси твердих гідрофобних полімерів, що містять терапевтичний агент. У галузі техніки добре відомі різноманітні матеріали для повільного вивільнення. Капсули можуть, в залежності від їх хімічної структури, вивільняти сполуки протягом від декількох тижнів до понад 100 днів. В залежності від хімічної структури та біологічної стабільності терапевтичного реагента, можуть використовуватися додаткові стратегії для білкової стабілізації.

Фармацевтичні композиції, описані в даній заявці, також можуть включати прийнятні тверді або гелеві носії або наповнювачі. Приклади таких носіїв або наповнювачів включають, але не обмежені, карбонат кальцію, фосфат кальцію, різноманітні цукри, крохмалі, похідні целюлози, желатин та полімери, такі, як поліетиленгліколи.

Багато РК-модулюючих сполук за винаходом можуть забезпечуватися як фізіологічно прийнятні солі, в яких заявлені сполуки можуть утворювати негативно або позитивно заряджені форми молекул. Приклади солей, в яких сполука утворює позитивно заряджені залишки, включають, без обмеження, четвертинний амоній (як визначено в даній заявці), солі, такі, як гідрохлорид, сульфат, карбонат, лактат, тартрат, малат, малеат, сукцинат, де атом азоту четвертинної амонієвої групи представляє собою азот вибраної сполуки за цим винаходом, який реагує з прийнятною кислотою. Солі, в яких сполука за даним винаходом утворює негативно заряджені групи, включають, без обме-

ження, солі натрію, кальцію та магнію, що утворюються при реакції групи карбонової кислоти у сполуці з прийнятною основою (наприклад, гідроксид натрію (NaOH), гідроксид калію (KOH), гідроксид кальцію (Ca(OH)<sub>2</sub>, тощо).

Фармацевтичні композиції, прийнятні для використання у даному винаході, включають композиції, в яких активні інгредієнти містяться у кількості, достатній для досягнення поставленої задачі, наприклад, модулювання активності РК або лікування або запобігання розладу, що пов'язаний з РК.

Зокрема, терапевтично ефективна кількість означає кількість сполуки, що є ефективною для запобігання, полегшення або покращення симптомів захворювання або подовження виживання пацієнта, якого піддають лікуванню.

Визначення терапевтично ефективної кількості може легко провести спеціаліст у даній галузі у світлі детального розкриття, що наводиться в даній заявці.

Для будь-якої сполуки, що використовується у способах за даним винаходом, терапевтично ефективна кількість або доза може бути спершу оцінена за допомогою аналізів на культурі клітин. Потім дозу можна вводити у склад композиції для використання на тваринних моделях для того, щоб досягти рівня циркуляції, що включає IC<sub>50</sub>, як визначено на культурах клітин (тобто, концентрація тестової сполуки, що забезпечує половину максимального інгібування активності РК). Така інформація може потім використовуватися для більш точного визначення корисних доз для людини.

Токсичність та терапевтичну ефективність сполук, описаних у даній заявці можна визначати за допомогою стандартних фармацевтичних процедур у культурі клітин або на експериментальних тваринах, наприклад, шляхом визначення IC<sub>50</sub> та LD<sub>50</sub> (обидва показники обговорюються у даній заявці) для цільової сполуки. Одержані за допомогою аналізів на культурі клітин дані та вивчення на тваринах можна використовувати для розробки інтервалу доз при використанні для людини. Доза може варіювати в залежності від використовуваної форми дозованої форми та використовуваного способу введення. Точний склад композиції, спосіб введення та доза можуть вибиратися окремим лікарем з огляду на стан пацієнта [Див., наприклад, Fingl, та ін., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch.1 p.1].

Дозова кількість та інтервал можна доводити індивідуально для забезпечення рівня у плазмі крові активних молекул, що є достатнім для підтримання ефектів модулювання кіназної активності. Ці рівні в плазмі крові відносяться до мінімальних ефективних концентрацій (MEC). MEC будуть варіювати для кожної сполуки, але можуть бути оцінені з даних *in vitro*, наприклад, концентрацію, необхідну для досягнення 50-90%-ного інгібування кінази можна визначати, використовуючи аналізи, описані в даній заявці. Дози, необхідні для досягнення MEC, будуть залежати від індивідуальних характеристик та способу введення. Аналізи HPLC або біоаналізи можна використовувати для визначення концентрацій у плазмі крові.

Дозові інтервали можна також визначати, ви-



користовуючи значення MEC. Сполуки можуть призначатися при використанні режиму, що підтримує рівні в плазмі крові вищі MEC протягом 10-90% часу, бажано між 30-90% та найбільш бажано між 50-90%.

В даний момент терапевтично ефективні кількості сполуки Формул I, Ia або II будуть коливатися від приблизно 25мг/м<sup>2</sup>/доба до 1500мг/м<sup>2</sup>/доба; бажано близько 3мг/м<sup>2</sup>/доба. Навіть більш бажано 50мг/м<sup>2</sup>/доба до 400мг/м<sup>2</sup>/доба.

У випадках місцевого призначення або селективного поглинання ефективна місцева концентрація лікарського засобу може не бути пов'язана з концентрацією у плазмі крові та іншими процедурами, що відомі у даній галузі для визначення правильної дозової кількості та інтервалу.

Кількість композиції, що вводиться, буде, звичайно, залежати від суб'єкта, якого піддають лікуванню, від тяжкості хвороби, способу введення, від висновку практикуючого лікаря, тощо.

Композиція може, якщо це є бажаним, бути представлена в упаковці або пристрої для дозування, такому, як схвалений FDA набір, що може містити одну або більше одиничну дозовану форму, що містить активний інгредієнт. Упаковка може, наприклад, включати металеву або пластикову плівку, таку, як блістерна упаковка. Упаковка або пристрій для дозування може супроводжуватися інструкціями щодо введення. Упаковка або пристрій для дозування може також супроводжуватися інструкціями, пов'язаними з контейнером у формі, встановленій урядовою агенцією, що регулює виробництво, використання або продаж фармацевтичних препаратів, такі інструкції відображають схвалення агенцією форми композиції або призначення для людини або тварини. Такі інструкції, наприклад, можуть бути у формі етикетки, що свідчить про схвалення управлінням з харчових продуктів та лікарських засобів США для приписування лікарських засобів або вкладку, що схвалює продукт. Композиції, що включають сполуку за винаходом, сформульовані у прийнятному фармацевтичному носії, можуть також готуватися у прийнятному контейнері, та можуть містити етикетку для лікування зазначених станів. Прийнятні стани, що вказані на етикетці, можуть включати лікування пухлини, інгібування ангиогенезу, лікування фіброзу, діабету, тощо.

Композиція за даним винаходом може призначатися з СМС суспензійним носієм. Приклади СМС суспензії приведені нижче у Таблиці 3.

Таблиця 3

Компонент	Концентрація % (ваг./об.)
API	*
Карбоксиметилцелюлоза натрію, USP (проміжного ступеня чистоти)	0,5
Хлорид натрію, USP/NF	0,9
Полісорбат 80, NF	0,4
Бензиловий спирт, NF	0,9
Деіонізована вода	до 100мл

\*Залежить від концентрації (проміжка часу),

що вимагається

Пропис для 1,0л СМС суспензійного носія є наступним. Підраховували прийнятну кількість наповнювачів, що необхідна для композиції носія, використовуючи таблицю, що представляє композицію композиції носія та розмір партії. Зважували прийнятний порожній контейнер, такий, як чиста широка скляна пляшка з отвором або пляшка, виготовлена з поліетилену. Додавали близько 600мл води до контейнера. Зважували карбоксиметилцелюлозу натрію (г) та переносили до контейнеру. Перемішували при використанні магнітної мішалки або лабораторної мішалки з лопатями до гомогенності (близько 2-3 годин). Зважували NaCl та додавали до контейнера. Продовжували перемішування до розчинення (приблизно 10 хвилин). Додавали Полісорбат-80. Перемішували, поки розчин не ставав гомогенним (близько 10 хвилин). Додавали воду, що залишилася, для доведення до необхідного об'єму або ваги (1010г або 1000мл, густина при 22°C складає 1,01). Зберігали при температурі 2-8°C (під морозильником).

Суспензійна композиція може бути виготовлена так, як описано нижче. Роздрібнювали API, використовуючи ступку та товчачик, для одержання гомогенного на вигляд порошка з невеликим розміром частинок (без великих брил або великих частинок - ідеально проходять через стандартне сито з розміром пор >80, тобто 180мкм). Зважували підраховану кількість API у контейнері. Додавали приблизно 90% загальної необхідної кількості СМС суспензійного носія у контейнер. Суспендували сполуки у носії, використовуючи лабораторну мішалку з лопатями або її еквівалент. Діаметр лопатей мішалки повинен співпадати з діаметром дна контейнера для забезпечення ефективного перемішування. Перемішували при 50об./хв протягом 30 хвилин або до тих пір, поки лікарський засіб не був добре суспендований. Доводили композицію носія до потрібного об'єму (додаючи воду) (прийнятна якість) до прийнятної ваги, що відповідає розміру партії. Перемішували при 50об./хв протягом додаткових 30 хвилин. Суспензію аліквотували негайно у скляні пляшки з жовтого скла або поліпропіленові контейнери. Контейнери були захищені від світла. Перемішували при 2-8°C (під морозильником, але не заморожуючи).

Ще одним аспектом даного винаходу є те, що сполука, описана вище, або її сіль або проліки, можуть бути поєднані з іншими хемотерапевтичними агентами для лікування захворювань та розладів, описаних вище. Наприклад, сполука, сіль її або проліки може бути поєднана з такими алкілувальними агентами, як фторурацил (5-FU), сам по собі або в комбінації з лейковорином; або іншими алкілувальними агентами, такими, як, без обмеження, інші аналоги піримідину, такі UFT, капецитабін, гемцитабін, цитарабін, алкілсульфонати, наприклад, бусульфат (що використовується для лікування хронічної гранулоцитарної лейкемії), імпросульфат та піпосульфат; азиридини, наприклад, бензодепа, карбоквон, метуредеп та уредеп; етилами́ні та метиламі́ні, наприклад, алтретамін, триетиленемеламін, триетиленфосфорамід, триетилентіофосфорамід та триметилполмеламін;

та аналоги гірчичного газу (іприту), наприклад, хлорамбуцил (що використовується при лікуванні хронічної лімфоцитарної лейкемії, первинної макроглобулінемії та лімфоми не-Ходжкіна), циклофосфамід (що використовується при лікуванні хвороби Ходжкіна, множинної мієломи, нейробластоми, раку молочної залози, раку яєчника, раку легень, пухлини Вілма та рабдоміосаркоми), естрамустину, іфосфаміду, новембрицину, преднімустину та урацилових аналогів гірчичного газу (іприту) (що використовуються при лікуванні первинного тромбозу, лімфоми не-Ходжкіна, хвороби Ходжкіна та раку яєчника); триазини, наприклад, дакарбазин (що використовується при лікуванні саркоми м'яких тканин).

Сполука, сіль або проліки за даним винаходом можуть також використовуватися у комбінації з іншими антиметаболічними хемотерапевтичними агентами, такими, як, без обмеження, аналоги фолієвої кислоти, наприклад, метотрексат (що використовується при лікуванні гострої лімфоцитарної лейкемії, хоріокарциноми, грибоподібного мікозу, раку молочної залози, раку голови та шиї та остеогенної саркоми) та птероптерин; та пуринових аналогів, таких, як меркаптопурин та тіогуанін, що знаходять застосування при лікуванні гострої гранулоцитарної, гострої лімфоцитарної та хронічної гранулоцитарної лейкемії.

Передбачається, що сполука, сіль, проліки за даним винаходом можуть також використовуватися у комбінації з натуральними продуктами, що базуються на хемотерапевтичних агентах, таких, як, без обмеження, алкалоїди барвінка, вінбластин (що використовуються при лікуванні тестикулярного раку та раку молочної залози), вінкрестин та віндезин; епіподофілотоксини, наприклад, етопозид та теніпозид, обидва з яких є корисними для лікування тестикулярного раку та саркоми Капоші; антибіотичні хемотерапевтичні агенти, наприклад, даунорубіцин, доксорубіцин, епірубіцин, мітоміцин (що використовуються для лікування шлункового, червікального, кишкового раку, раку молочної залози, раку сечового або жовчного міхура та раку підшлункової залози), дактиноміцин, темозоломід, плікаміцин, блеоміцин (що використовується для лікування раку шкіри, стравоходу, раку сечостатевого тракту), та ферментативних хемотерапевтичних агентів, таких, як L-аспарагіназа.

У доповнення до згаданого вище, сполука, сіль або проліки за даним винаходом можуть також використовуватися у комбінації з координаційними комплексами платини (цисплатин, тощо); заміщеними сечовинами, такими, як гідроксисечовина; похідні метилгідазину, наприклад, прокарбазин; адренкортикальні супресанти, наприклад, мітотан, аміноглутетимід; гормони та антагоністи гормонів, такі, як адренкортикостероїди (наприклад, преднізон), прогестини (наприклад, гідроксипрогестерон капроат); естрогени (наприклад, діетилstilбестерол); антиестрогени, такі, як тамоксифен; андрогени, наприклад, тестостерон пропіонат; та інгібітори ароматази, такі, як анастрозол.

На завершення, також передбачається, що комбінація сполуки за даним винаходом буде ефективною у поєднанні з мітоксантроном, паклітакселем, інгібіторами циклооксигенази-2, що відомі у

галузі техніки, зокрема, Celebrex®, Paracoxib®, Vioxx®, Abbott Cox-189, які розкриті в публікаціях РСТ №99/11605, інгібіторами топоізомерази, такими, як Camptosar®, Her-2 антагоніст рецептора, такий, як Herceptin®, ендостатин, Gleevec®, ImClone антагоніст рецептора VEGF IMC C225® для лікування солідних ракових пухлин або лейкемій, таких, як, без обмеження, гостра мієлогенна (нелімфоцитарна) лейкемія.

Загальна методика синтезу

Наступна загальна методика може бути використана для одержання сполук цього винаходу:

Відповідно заміщений 2-оксиіндол (1екв.), відповідно заміщений 3-карбоксі-5-формілпірол (1,2екв.) і основу (0,1екв.) змішували в розчиннику (1-2мл/ммоль 2-оксиіндолу) і суміш потім нагрівали протягом від приблизно 2 до приблизно 12 годин. Після охолодження, осад, що утворився, фільтрують, промивають холодним етанолом або ефіром і сушать у вакуумі одержуючи відповідний 5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонову кислоту. Якщо осад не утворюється, реакційну суміш концентрують і залишок розтирають з дихлорметан/ефір, одержану тверду речовину збирають фільтруванням і потім сушать. Продукт можна, необов'язково, в подальшому очистити за допомогою хроматографії.

Основа може бути органічною або неорганічною основою. Якщо використовується органічна основа, переважно, вона є азотвмісною основою. Прикладами органічних основ є, але необмежується, дізопропіламін, триметиламін, триетиламін, анілін, піридин, 1,8-діазабіцикло[5,4,1]ундец-7-ен, піролідін і піперидин.

Прикладами неорганічних основ є, без обмеження, аміак, гідроксиди, фосфати, карбонати, бікарбонати, бісульфати і аміді лужних і лужноземельних металів. Лужними металами є, літій, натрій і калій, в той час як лужноземельними металами є кальцій, магній і барій.

В переважних втіленнях цього винаходу, коли розчинник є протонним розчинником, таким як вода або спирт, основа є неорганічною основою лужного або лужноземельного металу, переважно, гідроксидом лужного або лужноземельного металу.

Повинно бути зрозуміло спеціалісту в цій галузі, виходячи з загальних відомих принципів органічного синтезу і опису приведенного тут, яка основа буде найбільш прийнятною для проходження реакції.

Розчинник, в якому проводиться реакція, може бути протонним або апротонним розчинником, переважно, він є протонним розчинником. "Протонним розчинником" є розчинник, який має атом(и) водню ковалентно зв'язані з атомом кисню або азоту, які надають атомам водню достатньої кислотності і, таким чином, здатні до "спільного використання" з розчиненою речовиною зв'язаного водню. Прикладами протонних розчинників є, без обмеження, вода і спирти.

"Апротонний розчинник" може бути полярним або неполярним але, так чи інакше, не містить кислотні водні і тому не здатен до утворення водневого зв'язку з розчиненою речовиною. Прикладами, без обмеження, неполярних апротонних

розчинників, є пентан, гексан, бензол, толуол, метиленхлорид і тетраглідроксид вуглецю. Прикладами полярних апротонних розчинників є хлороформ, тетрагідроксид, диметилсульфоксид і диметилформамід.

В переважному втіленні цього винаходу, розчинником є протонний розчинник, переважно, вода або спирт, такий як етанол.

Реакцію проводять при температурах вище ніж кімнатна. Температура зазвичай становить від приблизно 30°C до приблизно 150°C, переважно від приблизно 80°C до приблизно 100°C, найбільш переважно, від приблизно 60°C до приблизно 85°C, яка є приблизно температурою кипіння етанолу. "Приблизно" означає, що інтервал температур є переважно в межах 10 градусів Цельсія від вказаної температури, більш переважно, в межах 5 градусів Цельсія від вказаної температури і, найбільш переважно, в межах 2 градусів Цельсія від вказаної температури. Таким чином, наприклад, "приблизно 75°C" означає 75°C±10°C, переважно 75°C±5°C і, найбільш переважно, 75°C±2°C.

2-Оксиіндоли і 3-карбоксі-5-форміліпірол, можна легко синтезувати використовуючи методики добре відомі в хімічній галузі використовуючи легко доступні вихідні матеріали.

Конденсування 5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(2H)-іліденметил)-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти з аміном формули  $ZCH(R^5)-CR^4(OH)-CH(R^3)NH_2$  в органічному розчиннику, такому як диметилформамід, тетрагідроксид, і їм подібні в присутності придатного конденсуючого агента, такого як дициклогексилкарбодіімід, DEAD, EDC і HOBT забезпечує сполуку формули (I). Аміни формули  $ZCH(R^5)-CR^4(OH)-CH(R^3)NH_2$  є комерційно доступними або вони можуть бути одержані за методом добре відомим в цій галузі. Деякі з таких методик є описаними тут нижче.

Повинно бути зрозуміло середньому спеціалісту в цій галузі, що доступні інші методики синтезу для одержання сполук винаходу і що запропонований далі метод приведений як приклад, а не з ціллю обмеження винаходу.

#### Приклади

Наступні приготування і приклади приведені для забезпечення кращого розуміння спеціалістом в цій галузі представленого винаходу. Вони не повинні розглядатись як обмеження границь винаходу, але тільки як його ілюстрація і розкриття.

#### Приклади Синтезу

##### Приклад 1

Синтез 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(2H)-іліден-метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти

##### Стадія 1

Диметилформамід (25мл, Зекв.) охолоджували при перемішуванні на бані з льодом. До нього додавали  $POCl_3$  (1,1екв., 10,8мл). Через 30 хвилин, до реакційної суміші додавали розчин 3,5-диметил-4-етилестер піролу (17,7г, 105,8ммоль) в ДМФА (2М, 40мл) і перемішування продовжували. Через 2 години, реакційну суміш розводили водою (250мл) і підлогували до pH=11 використовуючи 1N водний NaOH. Білу тверду речовину видаляли фільтруванням, промивали водою і потім гексаном і сушили одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-

пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (19,75г, 95%) як жовто-коричневу тверду речовину.  $^1H$  ЯМР (360МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  12,11 (ш с, 1H, NH), 9,59 (с, 1H, CHO), 4,17 (к, J=6,7Гц, 2H,  $OCH_2CH_3$ ), 2,44 (с, 3H,  $CH_3$ ), 2,40 (с, 3H,  $CH_3$ ), 11,26 (д, J=6,7Гц, 3H,  $OCH_2CH_3$ )

##### Стадія 2

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (2г, 10ммоль) додавали до розчину гідроксиду калію (3г, 53ммоль) розчиненого в метанолі (3мл) і воді (10мл). Суміш кип'ятили із зворотнім холодильником протягом 3 годин, охолоджували до кімнатної температури і підкислювали 6N хлорводневою кислотою до pH 3. Тверду речовину збирали фільтруванням, промивали водою і сушили у вакуумній печі протягом ночі одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (1,6г, 93%).  $^1H$  ЯМР (300МГц,  $DMCO-d_6$ )  $\delta$  12,09 (с, ш, 2H, NH & COOH), 9,59 (с, 1H, CHO), 2,44 (с, 3H,  $CH_3$ ), 2,40 (с, 3H,  $CH_3$ ).

##### Стадія 3

5-Фторізатин (8,2г, 49,7ммоль) розчиняли в 50мл гідразингідрату і кип'ятили протягом 1 години. Реакційну суміш потім виливали на крижаному воді. Осад фільтрували, промивали водою і сушили у вакуумній печі одержуючи 5-фтор-2-оксиіндол (7,5г).

##### Стадія 4

Реакційну суміш 5-фтороксиіндолу (100мг, 0,66ммоль), 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (133мг, 0,79ммоль) і 10 крапель піперидину в етанолі (3мл) перемішували при 60 °C протягом ночі і фільтрували. Тверду речовину промивали 1M водним розчином гідрохлориду, водою і сушили одержуючи 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (201мг, кількісно) як жовту тверду речовину. MS m/z (відносна інтенсивність, %) 299 ( $[M-1]^+$ , 100).

##### Приклад 2

Синтез 5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліден-метил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)аміду

##### Стадія 1

До 2-хлорметилоксирану (95г, 1,03моль) додавали суміш води (3,08г, 0,17моль) і діетиламіну (106,2мл, 1,03моль) при 30°C. Реакційну суміш потім перемішували при 28-35°C протягом 6 годин і охолоджували до 20-25°C одержуючи 1-хлор-3-діетиламіно-пропан-2-ол.

##### Стадія 2

До розчину гідроксиду натрію (47,9г, 1,2моль) в 78мл води додавали 1-хлор-3-діетиламіно-пропан-2-ол. Одержану суміш перемішували при 20-25°C протягом 1 години, розводили 178 мл води і екстрагували двічі ефіром. Об'єднаний ефірний розчин сушили твердим гідроксидом калію і упарювали одержуючи 135г неочищеного продукту, який очищали за допомогою фракційної перегонки одержуючи чистий гліцидилдіетиламін (98г, 76%) як масло.

##### Стадія 3

До охолодженого льодом розчину гідроксиду амонію (25мл, 159ммоль) 25% (ваг/ваг) додавали по краплям протягом 10 хвилин гліцидилдіетиламін (3,2г, 24,8ммоль). Реакційну суміш перемішували

вали при 0-5°C протягом 1 години і потім при кімнатній температурі протягом 14 годин. Одержану реакційну суміш упарювали і переганяли (84-90°C при 500-600мТ) одержуючи 1-аміно-3-діетиламінопропан-2-ол (3,3г, 92%). МС  $m/z$  147 ( $[M+1]^+$ ).

#### Стадія 4

До розчину 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (100мг, 0,43ммоль), EDC (122,7мг, 0,64ммоль) і HOBT (86,5мг, 0,64ммоль) в 1,0мл ДМФА додавали 1-аміно-3-діетиламінопропан-2-ол (93,2мг, 0,64ммоль). Одержаний реакційний розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі і упарювали. Залишок суспендували в 10мл води і фільтрували. Тверду речовину промивали насиченим бікарбонатом натрію і водою і сушили у печі з високим вакуумом протягом ночі одержуючи неочищений продукт, який очищали хроматографією на колонці використовуючи в якості елюенту 6% метанол-дихлорметан, що містить триетиламін (2 краплі/100мл 6% метанол-дихлорметан) одержуючи 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід (62мг, 34%) як жовту тверду речовину.  $^1\text{H}$  ЯМР (400МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  13,70 (с, 1Н, NH-1<sup>1</sup>), 10,90 (с, 1Н, NH-1), 7,76 (дд, J=2,38, 9,33Гц, 1Н, H-4), 7,72 (с, 1Н, вініл-Н), 7,60 (м, ш, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>CH(OH)-CH<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-4'), 6,93 (дт, J=2,38, 8,99Гц, 1Н, H-5), 6,85 (дд, J=4,55, 8,99Гц, 1Н, H-6), 3,83 (м, ш, 1Н, OH), 3,33 (м, 4Н), 2,67 (м, ш, 5Н), 2,46 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,04 (м, ш, 6Н, CH<sub>3</sub>×2). МС  $m/z$  (відносна інтенсивність, %) 427 ( $[M+1]^+$ , 100).

#### Приклад 3

Синтез 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід

#### Стадія 1

Суміш морфоліну (2,6мл, 30ммоль) і епіхлоргідрину (2,35мл, 30ммоль) в етанолі (50мл) перемішували при 70°C протягом ночі. Після видалення розчинника, залишок розводили з метилехлоридом (50мл). Чисту тверду речовину збирали вакуумним фільтруванням одержуючи 1-хлор-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол (2,0г, 37%).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  3,49 (т, J=4,8Гц, 2Н), 3,60 (т, J=4,6Гц, 2Н), 3,75 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 4,20 (дд, J=5,2, 12Гц, 2Н), 4,54 (м, 2Н), 4,62 (м, 1Н, CH), 6,64 (д, J=6,4Гц, 1Н, OH). МС ( $m/z$ ) 180,2 (M+1).

#### Стадія 2

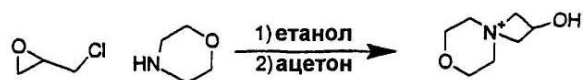
1-Хлор-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол (2,0г, 11ммоль) обробляли розчином NH<sub>3</sub> в метанолі (25ваг.%, 20мл) при кімнатній температурі. Крізь реакційну суміш барботували азот до видалення аміаку. Випарювання розчинника давало гідрохлориду сіль 1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-олу (2,0г, 91%).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,30 (д, J=6,0Гц, 2Н), 2,36 (м, 4Н, NCH<sub>2</sub>), 2,65 (дд, J=8,4, 12,8Гц, 1Н), 2,91 (дд, J=3,6, 12,8Гц, 1Н), 3,52 (м, 4Н, OCH<sub>2</sub>), 3,87 (м, 1Н, CH), 5,32 (с, 1Н, OH), 8,02 (шс, 3Н, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). МС ( $m/z$ ) 161,1 (M+1).

#### Стадія 3

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (120мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-

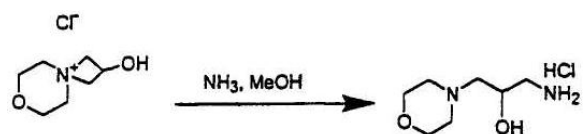
3-морфолін-4-ілпропан-2-олом (74мг, 0,48ммоль) висаджуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід (65мг, 36%). Маточний розчин упарювали до суха і залишок очищали за допомогою флеш хроматографії одержуючи ще 2Н (70мг, 39%).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,28 (м, 1Н), 2,32 (м, 1Н), 2,40 (м, 4Н), 2,40, 2,42 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,15 (с, 1Н), 3,31 (м, 1Н), 3,55 (м, 4Н), 3,78 (м, 1Н), 4,73 (шс, 1Н, OH), 6,82 (дд, J=4,5, 8,4Гц, 1Н), 6,90 (тд, <sup>2</sup>J=2,8, <sup>3</sup>J=10,0Гц, 1Н), 7,53 (м, 1Н), 7,70 (с, 1Н), 7,74 (дд, J=2,0, 9,6Гц, 1Н) (ароматика і вініл), 10,87 (с, 1Н, CONH), 13,66 (с, 1Н, NH). PX-МС ( $m/z$ ) 441,4 (M-1).

Синтез хлориду 2-гідрокси-7-окса-4-азонійспіро[3.5]нонану



До 1л 3-горлої круглодонної колби, спорядженої термopарою, вводим азоту і 250мл воронкою для додавання, завантажували морфолін (91,5г, 91,5мл, 1,05моль, 1,0екв.) і 100мл етанолу. Розчин швидко перемішували і в цей час додавали епіхлоргідрин (10г, 84,5мл, 1,08моль, 1,03екв.) з воронки для додавання протягом приблизно 30 хвилин. Температуру контролювали і коли температура піднімалась вище 27°C, реакційну суміш охолоджували на бані з льодом. Прозорий розчин перемішували 18 годин. Реакційну суміш досліджували за допомогою ГХ (розводили 5 крапель реакційної суміші в 1мл етанолу і вводили в 15м DB-5 капіляр ГХ колонки з наступними робочими параметрами, інжектор 250°C, детектор 250°C, початкова температура духовки 28°C нагрівали до 250°C з швидкістю 10°C на хвилину.). Реакція завершувалась з менше ніж 3% залишком морфоліну. Реакційну суміш концентрували на роторному випаровувачі при 50°C з повним вакуумом доки дистилат не переставав конденсуватись. Одержане масло зберігали при кімнатній температурі протягом 24-48 годин або доки не спостерігалась значна маса кристалів (затравка буде прискорювати процес). Суспензію розводили 250мл ацетону і фільтрували. Тверді речовини сушили у вакуумній печі при 60°C протягом 18-24 годин. Одержували 84г кристалічного продукту. Маточні рідини можна концентрувати і кристалізаційний процес повторити для збільшення виходу.  $^1\text{H}$  ЯМР (400МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  6,55 (д, 1Н), 4,64 (м, 1Н), 4,53 (м, 2Н), 4,18 (м, 2Н), 3,74 (м, 4Н), 3,60 (м, 2Н), 3,48 (м, 2Н).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  70,9, 61,39, 61,04, 60,25, 58,54, 57,80.

Синтез 1-аміно-3-(4-морфолініл)-2-пропанол (рацемічний)

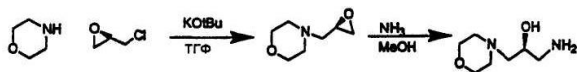


До 3л 1-горлої круглодонної колби з магнітною

мішалкою завантажували 2-хлорид гідрокси-7-окса-4-азонійспіро[3.5]нонану (150г, 835ммоль) після чого 23ваг.% безводного аміаку в метанолі (2120мл). Колбу закривали і одержаний прозорий розчин перемішували при 20-23°C протягом 18 годин. ГХ за умов вказаних вище не показала залишків вихідного матеріалу. Кришку знімали і залишали для виходу аміаку з розчину на 30 хвилин. Колбу потім переносили до роторного випаровувача і концентрували до білої твердої речовини на 45°C бані і повному кімнатному вакуумі. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 3,57 (дд, 2H), 3,3-3,5 (м, 6H), 2,59 (м, 2H), 2,2-2,4 (м, 6H); <sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.

Наслідуючи методику описану в Прикладі 3, вище, але замінюючи 2-(RS)-1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол на 2-(S)-1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол, одержаний як описано нижче, одержуючи бажану сполучку 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндоп-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-(S)-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід.

Синтез 1-аміно-3-(4-морфолініл)-2-пропанол (Нерацемічний)



До 1л 3-горлої круглодонної колби, спорядженої механічною мішалкою, термopарою і воронкою для додавання, завантажували морфолін (91,5г, 91,5мл, 1,05моль, 1,0екв.) і 45мл т-бутанолу. Розчин швидко перемішували і в цей час з воронки для додавання протягом приблизно 30 хвилин додавали R-епіхлоргідрин (100г, 84,5мл, 1,08моль, 1,03екв.). Контролювали температуру і коли вона піднімалась вище 27°C, реакційну суміш охолоджували на бані з льодом. Прозорий розчин перемішували протягом 18 годин. Реакційну суміш досліджували за допомогою ГХ (розводили 5 крапель реакційної суміші в 1мл етанолу і вводили в 15m DB-5 капіляр ГХ колонки з наступними робочими параметрами, інжектор 250°C, детектор 250°C, початкова температура духовки 28°C нагрівали до 250°C з швидкістю 10°C на хвилину). Реакція завершувалась з менше ніж 3% залишком морфоліну. Розчин охолоджували до 10°C і по краплям додавали 20ваг.% розчин т-бутоксиду калію в ТГФ (576г) підтримуючи температуру нижче 15°C. Одержану білу суспензію перемішували при 10-15°C протягом 2 годин і перевіряли за допомогою ГХ використовуючи описані вище умови. Не спостерігалась присутність хлоргідрину. Суміш концентрували на роторному випаровувачі використовуючи 50°C баню і повний кімнатний вакуум. Одержану суміш розводили водою (500мл) і метиленхлоридом. Фази розділяли і водну фазу промивали метиленхлоридом (500мл). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію і концентрували до прозорого безбарвного масла. Одержували 145г, вихід 97%, епоксиду. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 3,3 (дд, 4H), 3,1 (м, 1H), 2,6 (дд, 1H), 2,5 (дд, 1H), 2,4 (м, 4H), 2,2 (дд, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 65,4, 60,1, 53,1, 48,9, 43,4.

Описаний вище епоксид завантажували до 3л

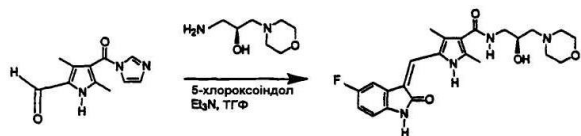
1-горлої круглодонної колби з магнітною мішалкою. Додавали безводний аміак в метанолі (24% ваг/ваг 2,5л), колбу закривали і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. ГХ за умов описаних вище показала відсутність вихідного матеріалу. Кришку видаляли і залишали виходити аміаку з розчину на 30 хвилин. Колбу потім переносили на роторний випаровувач і концентрували до прозорого безбарвного масла на 45°C бані і повному кімнатному вакуумі. Одержували 124г продукту. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 3,57 (дд, 2H), 3,3-3,5 (м, 6H), 2,59 (м, 2H), 2,2-2,4 (м, 6H); <sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.

Синтез 1-аміно-3-(4-морфолініл)-2-(S)-пропанолу

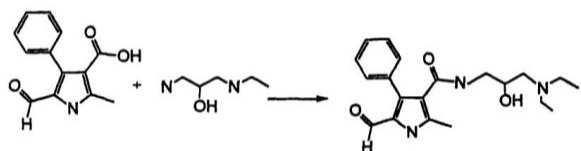
До 1л 3-горлої круглодонної колби, спорядженої механічною мішалкою, термopарою і воронкою для додавання, завантажували морфолін (91,5г, 91,5мл, 1,05моль, 1,0екв.) і 200мл метанолу. Розчин швидко перемішували і в цей час через воронку протягом 30 хвилин додавали R-епіхлоргідрин (100г, 84,5мл, 1,08моль, 1,03екв.). Контролювали температуру і коли вона піднімалась вище 27°C, реакційну суміш охолоджували на бані з льодом. Прозорий розчин перемішували протягом 18 годин. Реакційну суміш досліджували за допомогою ГХ (розводили 5 крапель реакційної суміші в 1мл етанолу і вводили в 15m DB-5 капіляр ГХ колонки з наступними робочими параметрами, інжектор 250°C, детектор 250°C, початкова температура духовки 28°C нагрівали до 250°C з швидкістю 10°C на хвилину). Реакція завершувалась з менше ніж 3% залишком морфоліну. Розчин охолоджували до 10°C і по краплям додавали 25ваг.% розчин метоксиду натрію в метанолі (233г, 1,08моль, 247мл) підтримуючи температуру менше ніж 15°C. Одержану білу суспензію перемішували при 10-15°C протягом 2 годин і перевіряли за допомогою ГХ використовуючи описані вище умови. Не спостерігалась присутність хлоргідрину. Суміш концентрували на роторному випаровувачі використовуючи 50°C баню і повний кімнатний вакуум. Одержану суміш розводили водою (500мл) і метиленхлоридом. Фази розділяли і водну фазу промивали метиленхлоридом (500мл). Об'єднані органічні шари сушили над сульфатом натрію і концентрували до прозорого безбарвного масла. Одержували 145г, вихід 97%, 1,2-епокси-3-морфолін-4-ілпропану. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 3,3 (дд, 4H), 3,1 (м, 1H), 2,6 (дд, 1H), 2,5 (дд, 1H), 2,4 (м, 4H), 2,2 (дд, 2H); <sup>13</sup>C ЯМР (100МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 65,4, 60,1, 53,1, 48,9, 43,4.

Описаний вище 1,2-епокси-3-морфолін-4-ілпропан завантажували до 3л 1-горлої круглодонної колби з магнітною мішалкою. Додавали безводний аміак в метанолі (24% ваг/ваг 2,5л), колбу закривали і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 24 годин. ГХ за умов описаних вище показала відсутність вихідного матеріалу. Кришку видаляли і залишали виходити аміаку з розчину на 30 хвилин. Колбу потім переносили на роторний випаровувач і концентрували до прозорого безбарвного масла на 45°C бані і повному кімнатному вакуумі. Одержували 124г 1-аміно-3-(4-морфолініл)-2-(S)-пропанолу. <sup>1</sup>H ЯМР (400МГц,

ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  3,57 (дд, 2H), 3,3-3,5 (м, 6H), 2,59 (м, 2H), 2,2-2,4 (м, 6H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  70,8, 67,1, 60,1, 53,8, 48,1.



Змішували імідазоламід (7,0г, 32,3ммоль), амін (15,0г, 64,6ммоль), 5-фтороксиіндол (4,93г, 32,6ммоль), триетиламін (9,79г, 96,9ммоль) і ТГФ (88мл) і нагрівали при 60°C. Утворювався коричневий розчин. Після перемішування протягом 24г при 60°C, жовту суспензію охолоджували до кт (кімнатна температура) і фільтрували. Залишок промивали 80мл ТГФ і сушили протягом ночі при 50°C при кімнатному вакуумі. Одержували коричневу тверду речовину (23,2г). Тверду речовину суспендували в 350мл води протягом 5г при кт і фільтрували. Залишок промивали 100мл води і сушили при 50°C при кімнатному вакуумі протягом ночі. Одержували 8,31г з 56% хімічним виходом.



У 0,25л колбу споряджену термометром, холодильником, магнітною мішалкою і вводом азоту завантажували 4,92г 5-фтороксиіндолу, 7,0г імідазоламід, 15,5г (R)-1-аміно-3-(4-морфолініл)-2-пропанолу, 9,78г триетиламіну і 88мл тетрагідрофурану. Суміш нагрівали при 60°C протягом 16,5 годин. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і фільтрували. Одержані тверді речовини суспендували послідовно (3) три рази в ацетонітрилі 11мл/г, сушили у вакуумі одержуючи 3,6г (25,25%). [ВЕРХ, Hypersil BDS, C-18, 5 $\mu$ , (6:4), Ацетонітрил:0,1М хлорид амонію, РНА-571437=4,05хв.]  $^1\text{H}$ ЯМР (ДМСО):  $\delta$  10,86 (1H, шс); 7,75 (1H, д); 7,70 (1H, с); 7,50 (1H, м); 6,88 (2H, м); 4,72 (1H, шс); 3,78 (1H, шс); 3,56 (4H, м); 3,32 (6H, м); 3,15 (1H, м); 2,43 (8H, шм).

#### Приклад 4

Синтез 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)аміду

5-(2-Оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (113мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-олом (74мг, 0,48ммоль) одержуючи 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід (77мг, 45,3%).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,27 (м, 1H), 2,32 (м, 1H), 2,40 (м, 4H), 2,40, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 3,15 (с, 1H), 3,32 (м, 1H), 3,55 (м, 4H), 3,77 (м, 1H), 4,74 (д, J=4,8Гц, 1H, OH), 6,86 (д, J=7,6Гц, 1H), 6,96 (т, J=7,2Гц, 1H), 7,10 (т, J=7,6Гц, 1H), 7,49 (т, J=5,6Гц, 1H), 7,61 (с, 1H), 7,77 (д, J=8,0Гц, 1H) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1H, CONH), 13,62 (с, 1H, NH). РХ-

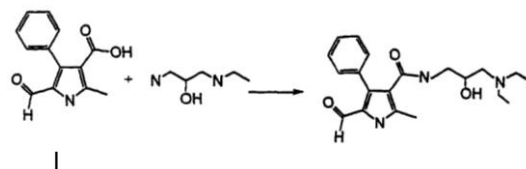
МС (m/z) 425,4 (M+1).

#### Приклад 5

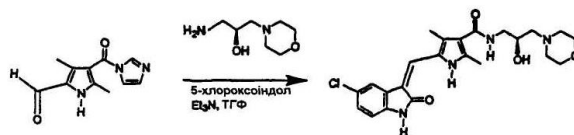
Синтез 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)аміду

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонову кислоту (126,6мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-олом (74мг, 0,48ммоль) одержуючи 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід (107мг, 58%).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,29 (м, 1H), 2,33 (м, 1H), 2,39 (м, 4H), 2,40, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 3,15 (с, 1H), 3,37 (м, 1H), 3,55 (м, 4H), 3,77 (м, 1H), 4,74 (д, J=4,8Гц, 1H, OH), 6,85 (д, J=8,4Гц, 1H), 7,11 (дд, J=2,0, 8,0Гц, 1H), 7,53 (т, J=5,6Гц, 1H), 7,75 (с, 1H), 7,97 (д, J=2,0Гц, 1H) (ароматика і вініл), 10,99 (с, 1H, CONH), 13,62 (с, 1H, NH). РХ-МС (m/z) 457,4 (M-1).

R і S стереоізомери можна одержати наступним чином.



імідазоламід (7,0г, 32,3ммоль), амін (15,5г, 96,9ммоль), 5-хлороксиіндол (5,48г, 32,6ммоль), триетиламін (14мл) і ТГФ (88мл) змішували і нагрівали при 60°C. Утворювався червоний розчин. Після перемішування протягом 16г при 60°C, жовту суспензію охолоджували до кт і фільтрували. Залишок промивали 2х50мл ТГФ і сушили протягом ночі при 50°C при кімнатному вакуумі. Одержували 4,36г з 29% хімічним виходом.



Імідазоламід (6,8г, 31,3ммоль), амін (10,0г, 62,5ммоль), 5-хлороксиіндол (5,3г, 31,6ммоль) і ТГФ (100мл) змішували і нагрівали при 60°C. Утворювався червоний розчин. Після перемішування, протягом 68г при 60°C, додавали триетиламін (14мл) і перемішували протягом 5г при 60°C. Реакція не завершувалась. Додавали 4,6г амін бічного ланцюга і перемішували протягом 20г при 60°C. Жовту суспензію охолоджували до кт і фільтрували. Залишок промивали 2х50мл ТГФ і сушили протягом ночі при 50°C при кімнатному вакуумі. Одержували 5,48г з 38% хімічним виходом.

#### Приклад 6

Синтез 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)аміду

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (72,2мг, 0,2ммоль) конденсували з 1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-олом (38мг, 0,24ммоль) одержуючи 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-

дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)амід (55мг, 55%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,27 (м, 1Н), 2,32 (м, 1Н), 2,39 (м, 4Н), 2,41, 2,42 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,13 (с, 1Н), 3,35 (м, 1Н), 3,55 (м, 4Н), 3,77 (м, 1Н), 4,74 (д, J=4,4Гц, 1Н, OH), 6,80 (д, J=8,4Гц, 1Н), 7,24 (дд, J=2,0, 8,0Гц, 1Н), 7,51 (т, J=5,6Гц, 1Н), 7,76 (с, 1Н), 8,09 (д, J=2,0Гц, 1Н) (ароматика і вініл), 10,99 (с, 1Н, CONH), 13,62 (с, 1Н, NH). РХ-МС (m/z) 503,4 (M-1).

#### Приклад 7

Синтез 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)аміду

#### Стадія 1

Суміш 3-[1,2,3]триазолу (2,0г, 29ммоль), епіхлоргідрину (3,4мл, 43,5ммоль) і N,N-діізопропілетиламіну (2,6мл, 15ммоль) в етанолі (50мл) перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Після видалення розчинників, залишок очищали за допомогою флеш хроматографії (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH=100/1-100/2-100/4) одержуючи 1-хлор-3-(1,2,3)-триазол-2-ілпропан-2-ол (2,1г, 45%). <sup>1</sup>Н ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,52 (м, 2Н, OH і CH<sub>2</sub>), 3,60 (дд, J=5,2, 11,2Гц, 1Н), 4,36 (м, 1Н, CH), 4,68 (м, 2Н), 7,67 (с, 2Н). МС (m/z) 162,1 (M+1) і 1-хлор-3-(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-ол (2,3г, 49%). <sup>1</sup>Н ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,56 (с, 1Н), 3,57 (с, 1Н), 4,35 (м, 1Н), 4,53 (дд, J=7,2, 14Гц, 1Н), 4,67 (дд, J=3,8, 14Гц, 1Н), 7,67 (с, 1Н), 7,71 (с, 1Н). МС (m/z) 162,1 (M+1).

#### Стадія 2

1-Хлор-3-(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-ол (2,3г, 13ммоль) обробляли розчином NH<sub>3</sub> в метанолі (25ваг.%, 20мл) при 60°C протягом ночі в закритій колбі під тиском. Після охолодження до кімнатної температури, через реакційну суміш барботували азот видаляючи аміак. Випарювання розчинника давало гідрохлоридну сіль 1-аміно-3-(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-олу (2,57г, 100%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,68 (дд, J=8,8, 12,8Гц, 1Н), 2,97 (дд, J=3,6, 12,8Гц, 1Н), 4,15 (м, 1Н), 4,44 (дд, J=6,4, 14Гц, 1Н), 4,57 (дд, J=4,6, 14Гц, 1Н), 5,95 (д, J=5,2Гц, 1Н, OH), 7,77 (с, 1Н), 8,01 (шс, 3Н, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8,12 (с, 1Н). МС(m/z) 143,1 (M+1).

#### Стадія 3

5-(2-Оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (113мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-олом (85мг, 0,48ммоль) одержуючи 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід (70мг, 41%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,45, 2,48 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,35 (м, 2Н), 4,02 (м, 1Н), 4,32 (дд, J=7,6, 14Гц, 1Н), 4,53 (дд, J=3,4, 14Гц, 1Н), 5,43 (д, J=5,6Гц, 1Н, OH), 6,91 (д, J=7,6Гц, 1Н), 7,01 (т, J=7,6Гц, 1Н), 7,15 (т, J=8,0Гц, 1Н), 7,66 (с, 1Н), 7,12 (т, J=5,6Гц, 1Н), 7,74 (с, 1Н), 7,77 (д, J=7,6Гц, 1Н), 8,11 (с, 1Н), 10,93 (с, 1Н, CONH), 13,68 (с, 1Н, NH). РХ-МС (m/z) 405,4 (M-1).

#### Приклад 8

Синтез 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліден-метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)аміду

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-

іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонову кислоту (120мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-олом (85мг, 0,48ммоль) одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід (100мг, 62%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,42, 2,44 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,27 (м, 2Н), 3,98 (м, 1Н), 4,27 (дд, J=7,6, 14Гц, 1Н), 4,50 (дд, J=3,4, 13,6Гц, 1Н), 5,38 (д, J=5,6Гц, 1Н, OH), 6,82 (дд, J=4,4, 8,4Гц, 1Н), 6,91 (тд, <sup>2</sup>J=2,4, <sup>3</sup>J=9,0Гц, 1Н), 7,70 (м, 3Н), 7,75 (дд, J=2,4, 9,2Гц, 1Н), 8,11 (с, 1Н), 10,93 (с, 1Н, CONH), 13,73 (с, 1Н, NH). РХ-МС (m/z) 423,4 (M-1).

#### Приклад 9

Синтез 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)аміду

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонову кислоту (126,6мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-олом (85мг, 0,48ммоль) одержуючи 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід (48мг, 27%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,42, 2,44 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,27 (м, 2Н), 3,99 (м, 1Н), 4,28 (дд, J=7,8, 14Гц, 1Н), 4,51 (дд, J=3,2, 14Гц, 1Н), 5,39 (д, J=6,0Гц, 1Н, OH), 6,85 (д, J=8,4Гц, 1Н), 7,12 (дд, J=2,0, 8,2Гц, 1Н), 7,70 (м, 2Н), 7,74 (с, 1Н), 7,97 (д, J=2,0Гц, 1Н), 8,07 (с, 1Н), 10,99 (с, 1Н, CONH), 13,65 (с, 1Н, NH). РХ-МС (m/z) 439,4 (M-1).

#### Приклад 10

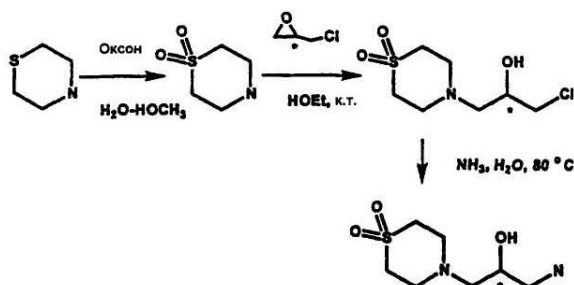
Синтез 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліден-метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)аміду

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (144,4мг, 0,4ммоль) конденсували з 1-аміно-3(1,2,3)триазол-1-ілпропан-2-олом (85мг, 0,48ммоль) одержуючи 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-гідрокси-3-[1,2,3]триазол-1-ілпропіл)амід (130мг, 67%). <sup>1</sup>Н ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,41, 2,44 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 3,27 (м, 2Н), 3,99 (м, 1Н), 4,28 (дд, J=7,6, 14Гц, 1Н), 4,50 (дд, J=3,6, 14Гц, 1Н), 5,40 (д, J=5,6Гц, 1Н, OH), 6,81 (д, J=8,4Гц, 1Н), 7,24 (дд, J=2,0, 8,0Гц, 1Н), 7,70 (м, 2Н), 7,77 (с, 1Н), 8,07 (с, 1Н), 8,10 (д, J=1,6Гц, 1Н), 11,0 (с, 1Н, CONH), 13,64 (с, 1Н, NH). РХ-МС (m/z) 485,4 (M-1).

Синтез 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти, 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти, 5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти описаний, в одночасно поданій 14 лютого 2001 з даною заявкою, під назвою "Піролзаміщений 2-індоліон як інгібітори протеїн кінази", №09/783,264, опис якої включений сюди у всій своїй повноті.

#### Приклад 11

Синтез 1-аміно-3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)пропан-2-олу

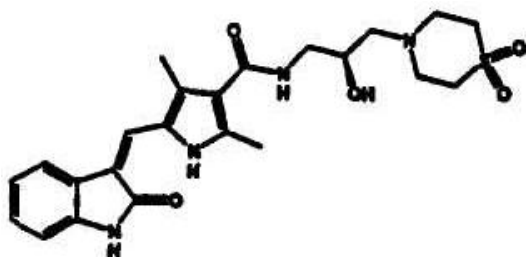


До розчину тіоморфоліну (5,0г, 48,7ммоль) в  $\text{HOCH}_3$  (200мл) додавали розчин оксону (36,0г, 58,5ммоль) в  $\text{H}_2\text{O}$  (100мл). Суміш добре перемішували при 40°C протягом 48г і потім охолоджували до 0°C. По краплям додавали водний  $\text{NaOH}$  роблячи  $\text{pH}=12$ . Тверду речовину відфільтровували і промивали  $\text{HOCH}_3$  (3×40мл). Об'єднані рідини конденсували і очищали за допомогою флеш хроматографії на силікагелі ( $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}=3/1/0,1-2/1/0,1$ ) одержуючи тіоморфоліну 1,1-діоксид (6,2г) з 93% виходом.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,97 (м, 4Н), 3,07 (м, 4Н), 3,42 (шс, 1Н), МС ( $m/z$ ) 136 ( $M+1$ ).

Суміш тіоморфолін 1,1-діоксиду (2,5г, 18,5ммоль) і (R)-(-)епіхлоргідрину (1,55мл, 20ммоль) в суміші розчинників етанол (50мл) і  $\text{H}_2\text{O}$  (5мл) перемішували при 25°C протягом 24г. Після видалення розчинника, залишок очищали за допомогою флеш хроматографії одержуючи (R)-1-хлор-3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)пропан-2-ол (4,0г, 96%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,50 (м, 2Н), 2,94 (м, 4Н), 3,05 (м, 4Н), 3,54 (дд,  $J=5,8, 11,2\text{Гц}$ , 1Н), 3,63 (дд,  $J=4,4, 11,2\text{Гц}$ , 1Н), 3,78 (м, Н, СН), 5,10 (д,  $J=5,2\text{Гц}$ , 1Н, ОН), МС ( $m/z$ ) 228,2 ( $M+1$ ).

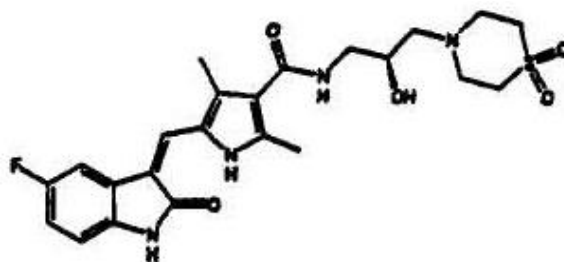
(R)-1-Хлор-3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)пропан-2-ол (2,27г, 10ммоль) обробляли розчином  $\text{NH}_3$  в метанолі (25ваг.%, 20мл) при 50°C протягом 12г. Після випарювання розчинників, залишок обробляли аніонобмінною смолою (AG1x8, ОН форма) у воді одержуючи неочищений (S)-1-аміно-3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)пропан-2-ол (2,0г). Він був забруднений приблизно 30% його димеру і може легко бути очищений за допомогою колонкової хроматографії. МС ( $m/z$ ) 209,2 ( $M+1$ ). Конденсування (S)-1-аміно-3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)пропан-2-олу з оксіндолами давало бажані індолінони (вихід 50-80% після очистки).

(R)-5-(2-Оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]амід



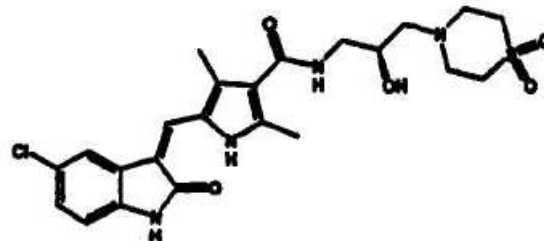
$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,39, 2,42 (2×с, 6Н, 2× $\text{CH}_3$ ), 2,49 (м, 1Н), 2,56 (м, 1Н), 2,97(м, 4Н), 3,07 (м, 4Н), 3,16 (м, 1Н), 3,34 (м, 1Н), 3,74 (м, 1Н), 4,83 (д,  $J=4,8\text{Гц}$ , 1Н, ОН), 6,86 (д,  $J=7,6\text{Гц}$ , 1Н), 6,97 (т,  $J=7,4\text{Гц}$ , 1Н), 7,11 (т,  $J=7,5\text{Гц}$ , 1Н), 7,50 (т,  $J=5,6\text{Гц}$ , 1Н), 7,61 (с, 1Н), 7,76 (д,  $J=7,6\text{Гц}$ , 1Н) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1Н, CONH), 13,62 (с, 1Н, NH), РХ-МС( $m/z$ ) 473,4 ( $M+1$ ).

(R)-5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]амід



$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,40, 2,42 (2×с, 6Н, 2× $\text{CH}_3$ ), 2,47 (м, 1Н), 2,54 (м, 1Н), 2,97 (м, 4Н), 3,06 (м, 4Н), 3,17 (м, 1Н), 3,30 (м, 1Н), 3,74 (м, 1Н), 4,83 (д,  $J=4,4\text{Гц}$ , 1Н), 6,82 (т,  $J=4,0\text{Гц}$ , 1Н) 6,91 (тд,  $J=2,8, ^3J=9,0\text{Гц}$ , 1Н), 7,53 (т,  $J=5,8\text{Гц}$ , 1Н), 7,70 (с, 1Н) 7,75 (дд,  $J=2,4, 9,2\text{Гц}$ , 1Н), 10,88 (с, 1Н), 13,67 (с, 1Н). РХ-МС ( $m/z$ ) 491,4 ( $M+1$ ).

(R)-5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]амід

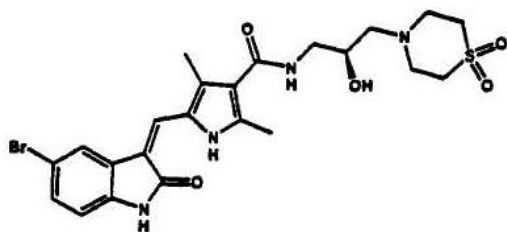


$^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2,40, 2,42 (2×с, 6Н, 2× $\text{CH}_3$ ), 2,45 (м, 1Н), 2,53 (м, 1Н), 2,96 (м, 4Н), 3,06 (м, 4Н), 3,17 (м, 1Н), 3,33 (м, 1Н), 3,75 (м, 1Н), 4,83 (д,  $J=4,4\text{Гц}$ , 1Н, ОН), 6,85 (т,  $J=8,4\text{Гц}$ , 1Н), 7,11 (дд,  $J=2,2, 8,2\text{Гц}$ , 1Н), 7,53 (т,  $J=5,5\text{Гц}$ , 1Н), 7,75 (с, 1Н), 7,97 (д,  $J=2,0\text{Гц}$ , 1Н), 10,98 (с, 1Н), 13,62 (с, 1Н), РХ-МС ( $m/z$ ) 507,2 ( $M+1$ ).

(R)-5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(1,1-діоксо- $\lambda^6$ -тіоморфолін-4-іл)-2-гідроксипропіл]амід



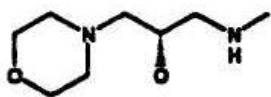
97



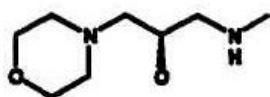
$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,41, 2,42 (2хс, 6H, 2х $\text{CH}_3$ ), 2,47 (м, 1H), 2,54 (м, 1H), 2,97 (м, 4H), 3,06 (м, 4H), 3,18 (м, 1H), 3,30 (м, 1H), 3,74 (м, 1H), 4,83 (д,  $J=4,8\text{Гц}$ , 1H), 6,81 (д,  $J=8,4\text{Гц}$ , 1H), 7,24 (дц,  $J=1,8, 8,2\text{Гц}$ , 1H), 7,53 (т,  $J=5,8, 1\text{H}$ ), 7,76 (с, 1H), 8,09 (д,  $J=2,0\text{Гц}$ , 1H), 10,98 (с, 1H) 13,62 (с, 1H), PX-МС (m/z) 553,6 (M+1).

Приклад 12

Синтез (S) або (R)-1-метиламіно-3-морфолін-4-ілпропан-2-олу



(S)-



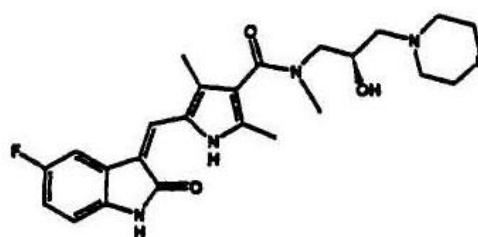
(R)-

Суміш морфоліну (1,74мл, 20ммоль) і (R)-епіхлоргідрину (1,56мл, 20ммоль) в етанолі (10мл) перемішували при кт протягом 48г. Після видалення розчинника, залишок обробляли розчином  $\text{CH}_3\text{NH}_2$  у воді (40ваг.%, 20мл) при кт протягом 14г. Видалення розчинників давало неочищений (S)-1-метиламіно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол, який можна очистити за допомогою вакуумної перегонки або колонкової хроматографії (2,4г, 70%). (R)-1-Метиламіно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол одержували з (S)-епіхлоргідрину в 76% виходом.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,33 (дд,  $J=3,6, 12,4\text{Гц}$ , 1H), 2,42 (м, 1H), 2,44 (дд,  $J=2,8, 9,8\text{Гц}$ , 2H), 2,45 (с, 3H), 2,53 (дд,  $J=7,6, 11,8\text{Гц}$ , 1H), 2,62 (м, 2H), 2,65 (дд,  $J=3,6, 12,0\text{Гц}$ , 1H), 3,71 (м, 4H), 3,85 (м, 1H),  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  67,06, 65,58, 62,80, 55,87, 53,94, 36,72, МС(m/z) 175 (M+1).

(S)-1-Метиламіно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол конденсували з 5-фторіндолом одержуючи (R)-5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоновікислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)метиламід

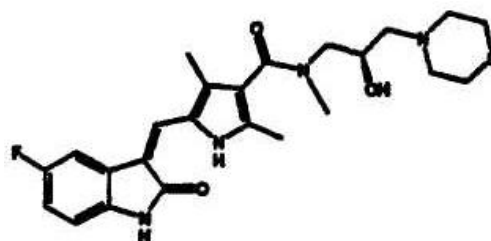
75635

98



$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,0 (с, 3H), 2,15 (м, 1H), 2,25 (м, 6H), 2,28 (м, 2H), 2,42 (с, 1H), 2,95 (с, 1H), 3,0 (с, 3H), 3,25 (м, 2H), 3,57 (м, 2H), 3,97&3,68 (2хшс, 1H), 4,80 & 4,74 (2хшс, 1H), 6,82 (дд,  $J=4,0, 8,0\text{Гц}$ , 1H), 6,90 (тд,  $^2J=2,3, ^3J=8,7\text{Гц}$ , 1H), 7,67 (с, 1H), 7,71 (дд,  $J=2,2, 9,0\text{Гц}$ , 1H), 10,86 (с, 1H), 13,57 (с, 1H), PX-МС (m/z) 457,2 (M+1).

(R)-1-аміно-3-морфолін-4-ілпропан-2-ол давав (S)-5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоновікислоти (2-гідрокси-3-морфолін-4-ілпропіл)-метиламід



$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,0 (м, 3H), 2,10 (м, 1H), 2,22 (м, 6H), 2,25 (м, 2H), 2,38 (м, 1H), 2,90 (с, 1H), 2,96 (с, 3H), 3,27 (м, 2H), 3,52 (м, 2H), 3,93&3,64 (2хшс, 1H), 4,75&4,70 (2хшс, 1H), 6,77 (дд,  $J=4,6, 8,2\text{Гц}$ , 1H), 6,85 (тд,  $^2J=2,5, ^3J=8,8\text{Гц}$ , 1H), 7,62 (с, 1H), 7,67 (дд,  $J=2,0, 9,6\text{Гц}$ , 1H), 10,81 (с, 1H) 13,52 (с, 1H), PX-МС (m/z) 457,2 (M+1).

Приклад 13

Одержання бічного аміну

3-(1H-тетразол-1-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропан і 3-(2H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропан

6,905г тетразолу (100ммоль) і 1,75мл діізопропілетиламіну (10ммоль) і 11,73мл епіхлоргідрину (150ммоль) в безводному ацетонітрилі (30мл) перемішували при 60°C протягом 4 годин. Одержаний розчин упарювали, сушили у високому вакуумі і очищали на колонці з силікагелем в хлороформ-метанол 100:8. Перша фракція давала чистий 3-(2-H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропан, 6,215г (безбарвне масло, 38% вихід), друга фракція давала 9,208г чистого 3-(1-H-тетразол-1-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропану (клейка гума; 57% вихід).

3-(1-H-тетразол-1-іл)]-2-гідрокси-1-амінопропан

9,110г 3-(1-H-тетразол-1-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропану, 15г карбонату калію і 130мл насиченого аміаком метанолу перемішували протягом 21 годин, потім фільтрували і упарювали. Залишок очищали на колонці з силікагелем в хлороформ-метанол-водний аміак 80:35:4. Одержували=7,326г білої клейкої гуми (91,5% вихід).

3-(2-H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-амінопропан

6,105г 3-(2-Н-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-хлорпропану, 10г карбонату калію і 95мл насиченого аміаком метанолу перемішували протягом 21 годин, потім фільтрували і упарювали. Залишок очищали на колонці з силікагелем в хлороформ-метанол-водний аміак 60:25:2. Одержували=3,726г білої кристалічної твердої речовини (69,5% вихід).

3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідрокси-1-амінопропан

4,7мл епіхлоргідрину (60ммоль) додавали до охолодженого льодом розчину цис-2,6-диметилморфоліну (4,607г, 40ммоль) в трифторетанолі (5мл). Розчин перемішували при 0-5°C протягом 1г, охолоджувальну баню видаляли і перемішували при кт протягом ще 5г. Суміш упарювали у високому вакуумі, одержаний маслоподібний залишок розчиняли в безводному етанолі (50мл), розчин охолоджували на бані з льодом, двома порціями додавали твердий метоксид натрію (2,27г) і суміш перемішували при 0-5°C протягом 2г. Реакційну суміш потім фільтрували, солі промивали етанолом (30мл) і об'єднані фільтрати додавали до охолодженого льодом концентрованого водного аміаку (200мл). Суміш перемішували при кт протягом 12г, потім упарювали у високому вакуумі. Залишок очищали на колонці з силікагелем сумішшю хлороформ-метанол-7М метанольний аміак 80:15:3. Одержували=5,75г білої кристалічної гігроскопічної твердої речовини (76,3% вихід).

(2S)-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)-2-гідрокси-1-хлорпропан і (2S)-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)-2-гідрокси-1-амінопропан

3,423г 3-метил-2,5-діоксоімідазолідину (3,423г) і 3,60мл R епіхлоргідрину (-) (99% e.e.) і 0,30мл основи Бартон (1,5ммоль) в безводному ацетонітрилі перемішували при 60°C протягом 20г. Одержаний розчин упарювали у високому вакуумі і очищали на колонці з силікагелем в суміш хлороформ-метанол (градієнт 5-20% метанолу) одержуючи 5,572г хлор-сполуки як білу аморфну тверду речовину (90% вихід). Хлорид перетворювали у амін наступним чином. Одержаний гідрокси-хлор інтермедіат розчиняли в метанолі насиченому аміаком (насичений аміаком), додавали карбонат калію і суміш перемішували в закритій колбі протягом 2½ днів. Реакційну суміш фільтрували, фільтрати упарювали. Залишок очищали на колонці з силікагелем в суміш хлороформ-метанол-конц. водний аміак 80:15:1,5.

Приклад 14

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід (Сполука 22) (Загальна методика)

72мг 3-(2H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 105мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензтриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-((3,3-диметил-4-карбокси-1H-пірол-2-іл)метил)-5-фтор-1,3-дигідро-2H-індол-2-ону (480мг; 1,6ммоль) НАТУ реагентом (570мг; 1,5ммоль) в присутності основи Хюніга (3,0моль; 0,525мл) в ДМФА (5мл) і виділяли чисту форму висадженням

хлороформом (5мл) і сушили у високому вакуумі з 92% виходом (579мг)] в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали для кристалізації в холодильнику (5°C) на 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=106мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 15

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід (Сполука 23) (Загальна методика)

72мг 3-(2H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 109мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензтриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-((3,3-диметил-4-карбокси-1H-пірол-2-іл)метил)-5-хлор-1,3-дигідро-2H-індол-2-ону (1,520г; 4,8ммоль) реагентом НАТУ (1,768г; 4,65ммоль) в присутності основи Хюніга (9,0ммоль; 1,58мл) в ДМФА (20мл) і виділяли в чистій формі шляхом осадження хлороформом (20мл) і сушили у високому вакуумі з 94% виходом (1,907г)] в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали для кристалізації в холодильнику (5°C) на 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=109мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 16

N-[2-гідрокси-3-(2H-тетразол-2-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-1H-пірол-3-карбоксамід (Сполука 24) (Загальна методика)

72мг 3-(2H-тетразол-2-іл)]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 121,5мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-трифторметокси-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензтриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-((3,3-диметил-4-карбокси-1H-пірол-2-іл)метил)-5-трифторметокси-1,3-дигідро-2H-індол-2-ону (1,768г; 4,8ммоль) реагентом НАТУ (1,768г; 4,65ммоль) в присутності основи Хюніга (9,0ммоль; 1,58мл) в ДМФА (25мл) і виділяли в чистій формі шляхом осадження безводним ацетонітрилом і сушили у високому вакуумі з 85,5% виходом (1,929г) в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали для кристалізації в холодильнику (5°C) на 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=113мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 17

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1H-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбоксамід (Сполука 25) її одержували згідно з методикою

Прикладу 14 з 72мг відповідного аміну. Одержували=113мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 18

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 26)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 15 з 72мг відповідного аміну. Одержували=122мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 19

N-[2-гідрокси-3-(1Н-тетразол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 27)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 16 з 72мг відповідного аміну. Одержували=118мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 20

N-[3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 28)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 14 з 95мг відповідного аміну. Одержували=99мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 21

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 29)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 15 з 95мг відповідного аміну. Одержували=101мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 22

N-[3-[(2R,6S)-2,6-диметилморфолін-4-іл]-2-гідроксипропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 30)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 16 з 95мг відповідного аміну. Одержували=89мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 23

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 34)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 14 з 95мг відповідного аміну. Одержували=109мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 24

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 36)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 15 з 95мг відповідного аміну. Одержували=107мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 25

N-[(2S)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден]метил]-1 Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 35)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 16 з 95мг відповідного аміну. Одержували=123мг

оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 26

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 31)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 14 з 95мг відповідного аміну. Одержували=110мг оранжевої кристалічної речовини.

Приклад 27

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[(2R)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 32)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 15 з 95мг відповідного аміну. Одержували=103мг оранжевої кристалічної речовини.

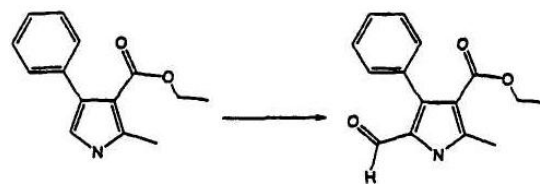
Приклад 28

N-[(2R)-2-гідрокси-3-(3-метил-2,5-діоксоімідазолідин-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-5-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден-1-метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід (Сполука 33)

Її одержували згідно з методикою Прикладу 16 з 95мг відповідного аміну. Одержували=120мг оранжевої кристалічної речовини.

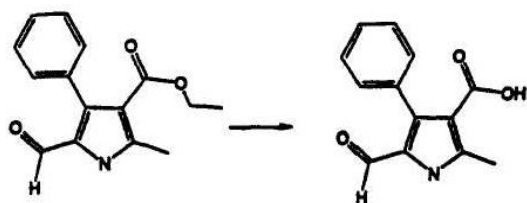
Приклад 29

5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер



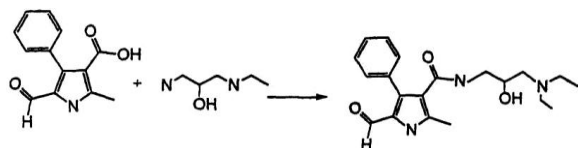
ДМФА (4мл, 3ек.) охолоджували при перемішуванні на бані з льодом. До цього розчину додавали  $\text{POCl}_3$  (1,1екв., 1,8мл). Через 30 хвилин, до реакційної суміші додавали розчин 3,5-диметил-4-етилестеру піролу (4г, 17,4ммоль) в ДМФА (2М, 9мл) і перемішування продовжували. Через 10хв реакційна суміш тверділа. Суміш розводили 5мл ДМФА і нагрівали при  $90^\circ\text{C}$  на масляній бані. Через 1г, реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури і розводили водою (100мл) і підлугували до  $\text{pH}=11$  використовуючи 1N NaOH. Продукт екстрагували в метиленхлорид ( $3 \times 200\text{мл}$ ) і органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію (200мл), сушили ( $\text{MgSO}_4$ ) і концентрували одержуючи 4,3г (95%) 5-форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етилового естеру як коричневу тверду речовину.  $^1\text{H}$  ЯМР (360МГц,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  12,5 (ш с, 1Н, NH), 9,11 (с, 1Н, CHO), 7,35 (с, 5Н, ArH), 3,98 (к, J=6,8 і 7,2Гц, 2Н,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,48 (с, 3Н,  $\text{CH}_3$ ), 0,98 (т, J=7Гц, 3Н,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ )

5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонова кислота



5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер розчиняли у воді (100мл) і метанолі (45мл) при перемішуванні. Додавали КОН (2екв. 1,9г) і нагрівали при 100°C. Через 2,5г, охолоджували до кімнатної температури і естер, що залишився, видаляли екстрагуванням в етилацетат (200мл), сушили і концентрували. Водний шар підкисляли до pH=3 використовуючи 2N HCl. Білу тверду речовину видаляли фільтруванням, промивали водою. Тверду речовину концентрували з толуолу, розтирали з гексанами і сушили одержуючи 2г (52%) майже білої твердої речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (360МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,46 (ш с, 1H, CO $_2$ H), 11,95 (с, 1H, NH), 9,08 (с, 1H, CHO), 7,36 (с, 5H, ArH), 2,49 (с, 3H, CH $_3$ ). MS m/z (відносна інтенсивність %, іон) знайдено 229 (100, M $^+$ ); розраховано 229,2.

5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)амід



Суміш 5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (1,0г, 4,36ммоль), 1-аміно-3-діетиламіно-2-пропанолу (950мг, 6,54ммоль), DDC (900мг, 4,36ммоль) і HOBT (884мг, 6,54ммоль) в хлороформі (60мл) перемішували при кт протягом 12г. Реакційну суміш виливали на насичений бікарбонат натрію (60мл) і до нього додавали 1N NaOH (8мл). Суміш потім екстрагували EtOAc (3×100мл), промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили і концентрували одержуючи 400мг 5-Форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламіно-2-гідроксипропіл)аміду.

#### Приклад 30

##### Методика синтезу сполук 11-21

0,36М розчин кожного оксиіндолу одержували в ДМСО, також як і 0,576М рзчин кожного альдегіду. 300мкл прийнятного оксиіндолу змішували з 300мкл прийнятного альдегіду в присутності 200мкл ДМСО. Потім додавали 40мг діетилентриамін очищувальної смоли. Суміш поміщали в модуль Робінса і модуль закривали і поміщали в 60°C піч, де збовтували протягом 18 годин.

Через 18 годин модуль Робінсу виймали з печі. Кришку знімали і до суміші додавали 800мкл ДМСО. Потім модуль закривали і знову поміщали в піч з 60°C, де перемішування продовжували протягом 1 години.

Через 1 годину реакція завершувалась, модуль Робінса видаляли з печі і залишали охоло-

джуватись. Кришку з модуля Робінса обережно знімали і вміст модуля переносили на пристрій для фільтрування, кожну нову синтезовану сполуку знімали з смоли.

#### Приклад 31

3-[1-Н-(7-азабензтриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-амінопропан

4,083г

1-гідрокси-7-азабензтриазолу

(30ммоль) і 0,53мл діізопропіламіну (3ммоль) і 4,70мл епіхлоргідрину в безводному хлороформі перемішували при 60°C протягом 2 годин. Реакційну суміш виливали на колонку з силікагелем і елюювали сумішню хлороформ-метанол 100:3. Одержували гідрокси-хлор інтермедіат (4,83г, блідо-жовте масло, 70% вихід) розчиняли в метанолноому аміаку (100мл, насичений аміаком), додавали 8,3г карбонату калію і суміш перемішували у закритій колбі протягом 2½ днів. Реакційну суміш фільтрували, фільтрати упарювали. Залишок очищали на колонці з силікагелем в суміші хлороформ-метанол-конц. водний аміак 80:15:1,5. Одержували=2,793г білої кристалічної речовини (63% вихід відносно хіпорида)

3-[1Н-(бензтриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-хлорпропан і 3-[1-Н-(бензтриазоліл-3-Н-оксидо)]-2-гідрокси-1-хлорпропан

12,162г гідроксиазабензтриазолу (90ммоль), 1,59мл діізопропілетиламіну (9ммоль) і 14,1мл епіхлоргідрину (180ммоль) в без. хлороформі перемішували при 55°C протягом 2 годин. Реакційну суміш упарювали, залишок сушили у високому вакуумі, потім очищали на колонці з силікагелем в суміші хлороформ-метанол 100:5. Перші фракції давали 3-[1Н-(бензтриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-хлорпропан 10,570г (блідо-жовте масло; 51,5% вихід), наступна фракція 3-[1-Н-(бензтриазоліл-3-Н-оксидо)]-2-гідрокси-1-хлорпропан 9,990г (біла кристалічна речовина, 48,5% вихід)

3-[1-Н-(бензтриазоліл-3-Н-оксидо)]-2-гідрокси-1-амінопропан

Був одержаний амінолізом 3-[1-Н-(бензтриазоліл-3-Н-оксидо)]-2-гідрокси-1-хлорпропану аналогічно до синтезу 3-[1-Н-(7-азабензтриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-амінопропану

#### Приклад 32

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-б]піридин-3-ілокси)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Загальна методика)

105мг

3-[1-Н-(7-азабензтриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 105мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензтриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-({3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пірол-2-іл}метил)-5-фтор-1,3-дигідро-2Н-індол-2-ону (480мг; 1,6ммоль) ммоль; 0,525мл] в ДМФА (5мл) і виділяли в чистій формі шляхом висадження хлороформом (5мл) і висушування у високому вакуумі з 92% виходом (579мг)] в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали кристалізуватись в холоди-

льнику (5°C) протягом 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=121мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Приклад 33

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]піридин-3-ілокси)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Загальна методика)

105мг 3-[1-Н-(7-азабензотриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 109мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензотриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-({3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пірол-2-іл}метил)-5-хлор-1,3-дигідро-2Н-індол-2-ону (1,520г; 4,8ммоль) реагентом НАТУ (1,768г; 4,65ммоль) в присутності основи Хюніга (9,0ммоль; 1,58мл) в ДМФА (20мл) і виділяли у чистій формі шляхом висадження хлороформом (20мл) і висушування у високому вакуумі з 94% виходом (1,907г) в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали кристалізуватись в холодильнику (5°C) протягом 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=130мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Приклад 34

5-[(Z)-(5-трифторметокси-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-*b*]піридин-3-ілокси)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід (Загальна методика)

105мг 3-[1-Н-(7-азабензотриазоліл)окси]-2-гідрокси-1-амінопропану додавали до суспензії 121,5мг (0,25ммоль) 5-[(Z)-(5-трифторметокси-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти 1-окси-7-азабензотриазолового естеру [одержували шляхом активування (3Z)-3-({3,3-диметил-4-карбокси-1-Н-пірол-2-іл}метил)-5-трифторметокси-1,3-дигідро-2Н-індол-2-ону (1,768г; 4,8ммоль) реагентом НАТУ (1,758г; 4,8ммоль) в присутності основи Хюніга (9,0ммоль; 1,58мл) в ДМФА (25мл) і виділяли у чистій формі шляхом висадження безводним ацетонітрилом і висушування у високому вакуумі з 85,5% виходом (1,929г) в безводному диметилацетаміді (1,5мл). Суміш перемішували протягом 30хв і упарювали у високому вакуумі. Залишок суспендували в суміші метанол-діетиламін 20:1 (3мл), залишали кристалізуватись в холодильнику (5°C) протягом 1г, фільтрували, осад промивали холодним метанолом і сушили у високому вакуумі. Одержували=142мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Приклад 35

5-[(Z)-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід її одержували згідно з методикою Прикладу 32 з 105мг відповідного аміну. Одержували=120мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Приклад 36

5-[(Z)-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-N-[2-гідрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоксамід її одержували згідно з методикою Прикладу 33 з 105мг відповідного аміну. Одержували=127мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Приклад 37

N-[2-гідрокси-3-(3-оксидо-1Н-1,2,3-бензотриазол-1-іл)пропіл]-2,4-диметил-5-[(Z)-[2-оксо-8-(трифторметокси)-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)метил]-1Н-пірол-3-карбоксамід її одержували згідно з методикою Прикладу 34 з 105мг відповідного аміну. Одержували=141мг оранжевої кристалічної речовини.

#### Біологічні приклади

Наступні аналізи використовуються для виявлення тих сполук, що демонструють оптимальну ступінь бажаної активності. А. Процедура аналізу

Наступні аналізи можуть використовуватися для визначення рівня активності та ефекту різних сполук за даним винаходом на одну або більше РК. Подібні аналізи можуть бути змодельовані за тими самими рисами для будь-якої РК при використанні способів, що добре відомі у даній галузі. Декілька анлізів, що описані у даній заявці, проводили за допомогою ELISA (твердофазний імуноферментний сендвіч-аналіз) [Voller та ін., 1980, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" Manual of Clinical Immunology, 2-е видання, Rose and Friedman, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C., pp.359-371]. Загальна процедура є наступною: сполуку вводять у клітини, що експресують тестову кіназу, або природну, або рекомбінантну, протягом вибраного періоду часу, після якого, якщо тестова кіназа є рецептором, додають ліганд, який відомий як такий, що активує рецептор. Клітини піддають лізису та лізати переносять до пробірок ELISA планшету, який попередньо покривають специфічними антитілами, що впізнають субстрат ферментативної реакції фосфорилування. Несубстратні компоненти клітинних лізатів вимивають та ступінь фосфорилування субстрату визначають за допомогою антитіла, що специфічно впізнає фосфотирозин, у порівнянні з контрольними клітинами, які не приводили у контакт з тестовою сполукою.

Переважні прописи для проведення експериментів ELISA по визначенню специфічної РК, що використовуються в даний час, приведені нижче. Проте, адаптація цих прописів для визначення активності сполук проти інших RTK, а також для СТК та STK, знаходиться в межах знань середнього спеціаліста у даній галузі. Інші аналізи, описані у даній заявці, дають змогу вимірювати кількість ДНК, що утворюється у відповідь на активацію тестової кінази, що є загальною мірою проліферативної відповіді. Загальна процедура для цього аналізу є наступною: сполука вводиться у клітини, що експресують тестову кіназу, або природну або рекомбінантну, для вибраного періоду часу, після якого, якщо тестова кіназа є рецептором, додають ліганд, що відомий як такий, що активує рецептор. Після інкубації, принаймні, протягом ночі додають реагент для мічення ДНК, такий, як 5-бромдезоксидуридин (BrdU) або H<sup>3</sup>-тимідин. Кіль-

кість міченої ДНК визначають або за допомогою анти-BrdU антитіла, або шляхом вимірювання радіоактивності та порівнюють з такою для контрольних клітин, що не перебували у контакті з тестовою сполукою.

#### GST-FLK-1 біоаналіз

За допомогою цього аналізу аналізують тирозинкіназну активність GST-Flk1 на полі (glu, tyr) пептидах.

#### Матеріали та реагенти:

1. Планшети для проведення ELISA на 96 комірок (Corning Catalog No. 5805-96)

2. Полі(glu, tyr) 4:1, ліофілізат (Sigma Catalog # P0275)

3. Приготування планшетів для аналізу, вкритих полі(glu, tyr) (pEY): покривали за допомогою 2 мкг/комірку полі(glu, tyr) (pEY) у 100мкл PBS, витримували в темноті при кімнатній температурі протягом 2 годин або при температурі 4°C протягом ночі. Закривали комірки планшета для запобігання випаровування.

4. Буфер PBS: для 1л, суміш 0,2г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,15г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2г KCl та 8г NaCl в приблизно 900мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ . Коли всі реагенти розчинилися, доводили pH до 7,2 за допомогою HCl. Доводили загальний об'єм до 1л за допомогою дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

5. Буфер PBST: до 1л буфера PBS додавали 1,0мл Твін-20.

6. Буфер для блокування TBB: для 1л, перемішували 1,21г трис, 8,77г NaCl, 1мл Твін-20 в приблизно 900 мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ . Доводили pH до 7,2 за допомогою HCl. Додавали 10г BSA, перемішували для розчинення. Доводили загальний об'єм до 1л за допомогою дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ . Фільтрували для видалення частинок матеріалу.

7. 1% BSA в PBS: для одержання 1 х робочого розчину, додавали 10г BSA до приблизно 990мл PBS буфера, перемішували для розчинення. Доводили загальний об'єм до 1л за допомогою PBS буфера, фільтрували для видалення частинок матеріалу.

8. 50мМ Hepes pH7,5.

9. GST-Flk1cd, очищений від sf9 рекомбінантної бакуловірсної трансформації (SUGEN, Inc.).

10. 4% ДМСО в дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$ .

11. 10мМ АТФ в дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$ .

12. 40мМ  $\text{MnCl}_2$ .

13. Кіназний буфер для розведення (KDB): змішували 10мл Hepes (pH 7,5), 1мл 5М NaCl, 40мкл 100 мМ ортованадату натрію та 0,4мл 5% BSA в дистильованій воді з 88,56мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

14. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном, Applied Scientific Catalog # AS-72092.

15. ЕДТА: перемішували 14,12г етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) до приблизно 70мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ . Додавали 10Н NaOH до тих пір, поки ЕДТА не розчинявся. Доводили pH до 8,0. Доводили загальний об'єм до 100мл за допомогою дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

16. Буфер для розведення антитіл: перемішували 10мл 5% BSA в PBS буфері з 89,5мл TBST.

17. Антифосфотирозинове моноклональне антитіло, кон'юговане з пероксидазою хріна (PY99

HRP, Santa Cruz Biotech).

18. 2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).

19. 10% SDS.

#### Процедура:

1. Покривали планшети для ELISA на 96 комірок за допомогою 2 кг поліЕУ пептиду в стерильному PBS, як описано на етапі 3 розділу Матеріали та реагенти.

2. Видаляли незв'язану рідину з комірок шляхом перевертання планшета. Промивали один раз за допомогою TBST. Витрушували планшет на паперову серветку для видалення надлишку рідини.

3. Додавали 100мкл 1% BSA в PBS до кожної пробірки. Інкубували при струшуванні протягом 1 години при кімнатній температурі.

4. Повторювали етап 2.

5. Промивали комірки за допомогою 50мМ HEPES (pH7,5) (150мкл/комірка).

6. Розводили тестову сполуку за допомогою дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ /4% ДМСО до 4 разів для одержання бажаної заключної концентрації у поліпропіленовому планшеті на 96 комірок.

7. Додавали 25мкл розведеної тестової сполуки до планшета ELISA. У контрольні комірки поміщали 25мкл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ /4% ДМСО.

8. Додавали 25мкл 40мМ  $\text{MnCl}_2$  з 4 х АТФ (2мкМ) до кожної комірки.

9. Додавали 25мкл 0,5М ЕДТА до негативних контрольних комірок.

10. Розводили GST-Flk1 до 0,005мкг (5нг)/комірка за допомогою KDB.

11. Додавали 50мкл розведеного ферменту до кожної комірки.

12. Інкубували при струшуванні протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

13. Зупиняли реакцію шляхом додання 50мкл 250мМ ЕДТА (pH 8,0).

14. Промивали 3 х за допомогою TBST, витрушували планшет на паперову серветку для видалення надлишку рідини.

15. Додавали 100мкл на комірку антифосфотирозинового РК3 кон'югату, 1:5,000 розведення в буфері для розведення антитіл. Інкубували при струшуванні протягом 90 хвилин при кімнатній температурі.

16. Промивання, як на етапі 14.

17. Додавали 100мкл розчину ABTS до кожної комірки при кімнатній температурі.

18. Інкубували при струшуванні протягом 10-15 хвилин. Видаляли будь-які бульбашки.

19. Зупиняли реакцію шляхом додання 20мкл 10% SDS до кожної комірки.

20. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

#### PYK2 біоаналіз

Цей аналіз використовували для вимірювання активності кінази in vitro HA епітоп-націлених рук2 повної довжини (FL.pyk2-HA) в аналізі ELISA. Матеріали та реагенти

1. Планшети Corning для ELISA на 96 комірок.

2. 12CA5 моноклональне анти-HA антитіло (SUGEN, Inc.).

3. PBS (забуферений фосфатом фізіологічний

розчин Дюльбекко (Gibco Catalog # 450-1300EB))

4. TBST буфер: для 1л, перемішували 8,766г NaCl, 6,057г трис та 1мл 0,1% Тритон X-100 в приблизно 900мл дистильованої H<sub>2</sub>O. Доводили pH до 7,2, об'єм доводили до 1л.

5. Буфер для блокування: для 1л, перемішували 100г 10% BSA, 12,1г 100мМ трис, 58,44г 1М NaCl та 10мл 1% Твін-20.

6. FL.pyk2-НА з лізатів клітин sf9 (SUGEN, Inc.).

7. 4% ДМСО в MilliQue H<sub>2</sub>O.

8. 10 мМ АТФ в дистильованій H<sub>2</sub>O

9. 1М MnCl<sub>2</sub>.

10. 1М MgCl<sub>2</sub>.

11. 1М дитіотреїтол (DTT).

12. 10X кінзний буфер для фосфорилування: перемішували 5,0мл 1М HEPES (pH7,5), 0,2мл 1М MnCl<sub>2</sub>, 1,0мл MgCl<sub>2</sub>, 1,0мл 10% Тритон X-100 в 2,8мл дистильованої H<sub>2</sub>O. Безпосередньо перед використанням додавали 0,1мл 1М DTT.

13. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V дном.

14. 500мМ ЕДТА в дистильованій H<sub>2</sub>O

15. Буфер для розведення антитіл: для 100мл, 1мл 5% BSA/PBS та 1мл 10% Твін-20 в 88мл TBS.

16. Анти-Ptyr PY99, кон'юговані з пероксидазою хріна (Santa Cruz Biotech Cat. No SC-7020).

17. ABTS, Moss, Cat.No ABST-2000.

18. 10%SDS.

Процедура

1. Покривали планшети для ELISA на 96 комірок за допомогою 0,5мкг 12CA5 анти-НА антитіла на комірку в 100мкл PBS. Збірдали протягом ночі при температурі 4°C.

2. Видаляли незв'язане НА антитіло з комірок шляхом перевертання планшета. Промивали один раз за допомогою дистильованої H<sub>2</sub>O. Витрушували планшет на паперову серветку для видалення надлишку рідини.

3. Додавали 150мкл буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

4. Промивали планшет 4 x за допомогою TBS-T.

5. Розводили лізат у PBS (1,5мкг лізату/100мкл PBS).

6. Додавали 100мкл розведеного лізату до кожної комірки. Струшували при кімнатній температурі протягом 1 години.

7. Промивали так, як описано на етапі 4.

8. Додавали 50мкл 2 x кінзного буфера до планшета ELISA, що містить захоплене pyk2-НА.

9. Додавали 25мкл 400мкМ тестової сполуки в 4% ДМСО до кожної комірки. Для контрольних комірок використовували тільки 4% ДМСО.

10. Додавали 25мкл 0,5М ЕДТА до комірок негативного контролю.

11. Додавали 25мкл 20мкМ АТФ до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 10 хвилин.

12. Зупиняли реакцію шляхом додання 25мкл 500мМ ЕДТА (pH 8,0) до всіх комірок.

13. Промивали так, як на етапі 4.

14. Додавали 100мкл анти-Ptyr, кон'югованого з пероксидазою хріна, що розведена 1:6000 в буфері для розведення антитіл, до кожної комірки.

Інкубували при струшуванні протягом 1 години при кімнатній температурі.

15. Промивали планшет 3X за допомогою TBST та 1X за допомогою PBS.

16. Додавали 100мкл ABST розчину до кожної комірки.

17. В разі необхідності, зупиняли реакцію шляхом додання 20мкл 10% SDS до кожної комірки.

18. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

FGFR1 біоаналізи

Цей аналіз використовували для вимірювання in vitro кінзної активності FGF1-R в аналізі ELISA.

Матеріали та реагенти:

1. Планшети Costar на 96 комірок для проведення ELISA (Corning Catalog # 3369).

2. Полі(Glu -Tyr) (Sigma Catalog # PO275).

3. PBS (Gibco Catalog # 450-1300EB).

4. 50мМ буферного розчину HEPES.

5. Буфер для блокування (5%BSA/PBS).

6. Очищений GST-FGFR1 (SUGEN, Inc.).

7. Кінзний буфер для розведення. Перемішували 500мкл 1М HEPES (GIBCO), 20мкл 5% BSA/PBS, 10мкл 100мМ ортованадата натрію та 50мкл 5М NaCl.

8. 10мМ АТФ

9. АТФ/MnCl<sub>2</sub> суміш для фосфорилування: перемішували 20мкл АТФ, 400мкл 1М MnCl<sub>2</sub> та 9,56мл дистильованої H<sub>2</sub>O.

10. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном (Applied Scientific Catalog # AS-72092).

11. 0,5МЕДТА.

12. 0,05% TBST. Додавали 500мкл ТВІН до 1л TBS.

13. Кроляча поліклональна анти-фосфотирозина сироватка (SUGEN, Inc.).

14. Гусячий анти-кролячий IgG, кон'югований з пероксидазою.

15. Розчин ABTS.

16. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчин.

Процедура:

1. Costar планшет на 96 комірок для проведення ELISA, покритий 1мкг на комірку полівії, Tyr) в 100мкл PBS. Збірдали протягом ночі при температурі 4°C.

2. Промивали покриті планшети один раз за допомогою PBS.

3. Додавали 150мкл 5% BSA/PBS буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 1 години при кімнатній температурі.

4. Промивали планшети 2 X за допомогою PBS, потім один раз за допомогою 50мМ HEPES. Витрушували планшети на паперову серветку для видалення надлишка рідини та бульбашок.

5. Додавали 25мкл 0,4мМ тестової сполуки в 4% ДМСО або 4% тільки ДМСО (контроль) до планшету.

6. Розводили очищену GST-FGFR1 у кінзному буфері для розведення (5нг кінзи/50мкл KDB/комірку).

7. Додавали 50мкл розведеної кінзи до кожної комірки.

8. Починали кінзну реакцію шляхом додання

25мкл/комірка свіжо приготовленого АТФ/Mn<sup>++</sup> (0,4мл 1М MnCl<sub>2</sub>, 40мкл 10мМ АТФ, 9,56мл дистильованої Н<sub>2</sub>О), свіжо приготовлений).

9. Проводили швидку кінзну реакцію, яку необхідно було зупиняти за допомогою 25мкл 0,5М ЕДТА способом, подібним до додання АТФ.

10. Промивали планшет 4 X за допомогою свіжого TBST.

11. Готували буфер для розведення антитіл: на 50мл, перемішували 5мл 5% BSA, 250 мкл 5% молока та 50мкл 100мМ ванадату натрію, доводили до заключного об'єму за допомогою 0,05% TBST.

12. Додавали 100мкл на комірку антифосфотирозину (1:10000 розведення в ADB). Інкубували при струшуванні протягом 1 години при кімнатній температурі.

13. Промивали так, як на етапі 10.

14. Додавали 100мкл на комірку козячого антикролячого IgG, кон'югованого з пероксидазою (1:6000 розведення в ADB). Інкубували при струшуванні протягом 1 години при кімнатній температурі.

15. Промивали так, як на етапі 10, а потім промивали за допомогою PBS для видалення бульбашок та надлишку Твін.

16. Додавали 100мкл ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчину до кожної комірки.

17. Інкубували при струшуванні протягом 10-20 хвилин. Видаляли будь-які бульбашки.

19. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

EGFR біоаналіз

Цей аналіз використовували для визначення in vitro кінзної активності FGF1-R в аналізі ELISA.

Матеріали та реагенти:

1. Corning планшети для проведення ELISA на 96 комірок.

2. SUMOI моноклональне анти-EGFR антитіло (SUGEN, Inc.).

3. PBS

4. TBST буфер

5. Буфер для блокування: для 100мкл, перемішували 5,0г розчинного знежиреного молока Carnation® з 100мл PBS.

6. Клітинні лізати A431 (SUGEN, Inc.)

7. Буфер TBS:

8. TBS+10% ДМСО: для 1л, перемішували 1,514г трис, 2,192г NaCl та 25мл ДМСО, доводили до 1л загальний об'єм за допомогою дистильованої Н<sub>2</sub>О.

9. АТФ (Аденозин-5'-трифосфат, з м'язів коня, Sigma Cat. No.A-5394), 1,0мМ розчин дистильованої Н<sub>2</sub>О. Цей реагент потрібно готувати безпосередньо перед використанням та витримувати на льоду.

10. 1,0мМ MnCl<sub>2</sub>.

11. АТФ/MnCl<sub>2</sub> суміш для фосфорилування: для одержання 10мл, перемішували 300мкл 1мМ АТФ, 500мкл MnCl<sub>2</sub> та 9,2мл дистильованої Н<sub>2</sub>О.

12. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном.

13. ЕДТА

14. Кроляча поліклональна антифосфотирозинова сироватка (SUGEN, Inc.)

15. Козячий анти-кролячий IgG, кон'югований з пероксидазою хріна (Biosource Cat.No. ALI0404).

16. ABTS.

17. 30% пероксид водню

18. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

19. 0,2М HCl

Процедура:

1. Покривали планшети Corning на 96 комірок для проведення ELISA за допомогою 0,5мг SUMOI в 100мкл PBS на комірку, зберігали протягом ночі при температурі 4°C.

2. Видаляли SUMOI, що не зв'язався, з комірок шляхом перевертання планшета для видалення рідини. Промивали 1X за допомогою дистильованої Н<sub>2</sub>О. Витрушували планшет на паперову серветку та видаляли надлишок рідини.

3. Додавали 150мкл буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

4. Промивали планшет 3 X за допомогою деіонізованої води, потім один раз за допомогою TBST. Витрушували планшет на паперову серветку для видалення надлишку рідини та бульбашок.

5. Розводили лізат в PBS (7мкл лізату/100мкл PBS).

6. Додавали 100мкл розведеного лізату до кожної комірки. Струшували при кімнатній температурі протягом 1 години.

7. Промивали планшети так, як описано вище на етапі 4.

8. Додавали 120мкл TBS до планшета ELISA, що містить захоплений EGFR.

9. Розводили тестову сполуку 1:10 в TBS, поміщали в комірку.

10. Додавали 13,5мкл розведеної тестової сполуки до планшета ELISA. До контрольної комірки додавали 13,5мкл TBS в 10% ДМСО.

11. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

12. Додавали 15мкл суміші для фосфорилування в усі комірки за винятком комірки негативного контролю. Заключний об'єм, що міститься у комірці, складав приблизно 150мкл з 3мкл АТФ/5мМ MnCl<sub>2</sub> заключної концентрації в кожній комірці. Інкубували при струшуванні протягом 5 хвилин.

13. Зупиняли реакцію шляхом додання 16,5мкл розчину ЕДТА при струшуванні. Струшували протягом додаткової 1 хвилини.

14. Промивали 4X за допомогою деіонізованої води, 2X за допомогою TBST.

15. Додавали 100мкл антифосфотирозину (1:3000 розведення в TBST) на комірку. Інкубували при струшуванні протягом 30-45 хвилин при кімнатній температурі.

16. Промивали так, як описано на етапі 4 вище.

17. Додавали 100мкл козячого анти-кролячого IgG, кон'югованого з пероксидазою Biosource (розведення 1:2000 в TBST) до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

18. Промивали так, як описано на етапі 4 вище.

19. Додавали 100мкл ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчину до кожної комірки.

20. Інкубували протягом 5-10 хвилин при



струшуванні. Видаляли будь-які бульбашки.

21. В разі необхідності, зупиняли реакцію шляхом додавання 100мкл 0,2М HCl на комірку.

22. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

PDGFR біоаналіз

Цей аналіз використовували для визначення *in vitro* кіназної активності FGF1-R в аналізі ELISA.

Матеріали та реагенти

1. Corning планшети на 96 комірок для проведення ELISA.

2. 28D4C10 моноклональне анти-PDGFR анти-тіло (SUGEN, Inc.).

3. PBS

4. TBST буфер

5. Буфер для блокування (такий самий, як і для біоаналізу EGFR).

6. Клітинні лізати NIH 3T3, що експресують PDGFR- $\beta$  (SUGEN, Inc.).

7. Буфер TBS.

8. TBS+10%ДМСО

9. АТФ

10.  $MnCl_2$ .

11. Кіназний буфер для фосфорилювання: для 10мл, перемішували 250мкл 1М трис, 200мкл 5М NaCl, 100мкл  $MnCl_2$  та 50мкл 100мМ Тритон X-100 в достатній кількості дистильованої  $H_2O$  10мл.

12. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном.

13. EDTA

14. Кроляча поліклональна анти-фосфотирозинова сироватка (SUGEN, Inc.)

15. Козячий анти-кролячий IgG, кон'югований з пероксидазою (Biosource Cat.No. ALI0404).

16. ABTS.

17. Пероксид водню

18.  $ABTS/H_2O_2$

19. 0,2М HCl

Процедура:

1. Покривали планшети Corning на 96 комірок для проведення ELISA за допомогою 0,5мкг SUMOI в 100мкл PBS на комірку, зберігали протягом ночі при температурі 4°C.

2. Видаляли 28D4C10, що не зв'язався, з комірок шляхом перевертання планшету для видалення рідини. Промивали 1X за допомогою дистильованої  $H_2O$ . Витрушували планшет на паперову серветку та видаляли надлишок рідини.

3. Додавали 150мкл буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

4. Промивали планшет 3X за допомогою деіонізованої води, потім один раз за допомогою TBST. Витрушували планшет на паперову серветку для видалення надлишку рідини та бульбашок.

5. Розводили лізат в HNTG (10мкл лізату/100мкл HNTG).

6. Додавали 100мкл розведеного лізату до кожної комірки. Струшували при кімнатній температурі протягом 60 хвилин.

7. Промивали планшети, як описано вище на етапі 4.

8. Додавали 80мкл робочого кіназного буфера до планшета ELISA, що містить захоплений PDGFR.

9. Розводили тестову сполуку 1:10 в TBS у поліпропіленовому планшеті на 96 комірок.

10. Додавали 10мкл розведеної тестової сполуки до планшета ELISA. До контрольних комірок додавали 10мкл TBS + 10% ДМСО. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

11. Додавали 10мкл АТФ безпосередньо до усіх комірок, за винятком комірки негативного контролю (заключний об'єм комірки мав бути приблизно 100мкл з 20мкл АТФ в кожній комірці). Інкубували протягом 30 хвилин при струшуванні.

12. Зупиняли реакцію шляхом додавання 10мкл розчину EDTA до кожної пробірки.

13. Промивали 4X за допомогою деіонізованої води, двічі за допомогою TBST.

14. Додавали 100мкл анти-фосфотирозину (1:3000 розведення в TBST) на комірку. Інкубували при струшуванні протягом 30-45 хвилин при кімнатній температурі.

15. Промивали так, як описано на етапі 4.

16. Додавали 100мкл Biosource козячого анти-кролячого IgG, кон'югованого з пероксидазою хріна (розведення 1:2000 в TBST), до кожної комірки. Інкубували при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

17. Промивали так, як описано на етапі 4.

18. Додавали 100мкл  $ABTS/H_2O_2$  розчину до кожної комірки.

19. Інкубували протягом 10-30 хвилин при струшуванні. Видаляли будь-які бульбашки.

20. В разі необхідності, зупиняли реакцію шляхом додавання 100мкл 0,2М HCl на комірку.

21. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

Аналіз клітинної HER-2 кінази

Цей аналіз використовували для вимірювання активності HER-2 кінази у клітинах в форматі ELISA.

Матеріали та реагенти:

1. DMEM (Gibco Catalog #11965-092).

2. Фетальна теляча сироватка (FBS, Gibco Catalog #16000-044), температурно інактивована на водяній бані протягом 30 хвилин при температурі 56°C.

3. Трипсин (Gibco Catalog#25200-056).

4. L-глутамін (Gibco Catalog#252030-081).

5. HEPES (Gibco Catalog#15630-080).

6. Ростове середовище: перемішували 500мл DMEM, 55мл температурно інактивованої FBS, 10мл HEPES та 5,5мл L-глутаміну.

7. Виснажене середовище: перемішували 500мл DMEM, 2,5мл температурно інактивованої FBS, 10мл HEPES та 5,5мл L-глутаміну.

8. PBS.

9. Мікротитрувальні планшети для культури тканин на 96 комірок з плоским дном (Corning Catalog #25860).

10. Чашки діаметром 15см для культури тканин (Corning Catalog #08757148).

11. Corning планшети на 96 комірок для проведення ELISA.

12. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном.

13. Costar картриджі для переносу, призначені

для Transtar 96 (Costar Catalog #7610).

14. SUMO1: моноклональне анти-EGFR анти-тіло (SUGEN, Inc.).

15. Буфер TBST.

16. Буфер для блокування: 5% розчинного молока Carnation® в PBS.

17. Ліганд EGF: EGF-201, Shinko American, Japan. Суспендували порошок в 100мкл 10мМ HCl. Додавали 100мкл 10мМ NaOH. Додавали 800мкл PBS та переносили в колбу Еппендорфа, зберігали при температурі -20°C до використання.

18. HNTG буфер для лізису: для стандартного 5X HNTG, перемішували 23,83г HEPES, 43,83г NaCl, 500мл гліцерину та 100мл Тритону X-100, а також достатню кількість дистильованої H<sub>2</sub>O для одержання 1л загального розчину. Для 1X HNTG\*, перемішували 2мл HNTG, 100мкл 0,1 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 250мкл 0,2M Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> та 100мкл води.

19. EDTA.

20. Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Для одержання стандартного розчину, перемішували 1,84г Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> з 90мл дистильованої H<sub>2</sub>O. Доводили pH до 10. Кип'ятили у мікрохвильовій печі протягом 1 хвилини (розчин ставав прозорим). Охолоджували при кімнатній температурі. Доводили pH до 10. Повторювали цикл нагрівання/охолодження до тих пір, поки pH залишалося на рівні 10.

21. 200мМ Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

22. Кроляча поліклональна антисироватка, специфічна для фосфотирозину (анти-Ptyr антитіло, SUGEN, Inc.).

23. Афінно очищена антисироватка, козячий анти-кроляче IgG антитіло, кон'юговане з пероксидазою хріна (Biosource Cat.#ALI0404).

24. Розчин ABTS.

25. 30% розчин пероксиду водню.

26. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

27. 0,2M HCl.

Процедура:

1. Покривали планшети на 96 комірок для проведення ELISA за допомогою SUMO1 при 1,0мг на комірку в PBS, 100мкл заключного об'єму на комірку. Зберігали протягом ночі при температурі 4°C.

2. У день використання видаляли буфер для покриття та тричі промивали планшет за допомогою дистильованої H<sub>2</sub>O та один раз за допомогою буфера TBST. Усі промивання у цьому аналізі проводили таким самим чином, якщо інше не вказано.

3. Додавали 100мкл буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували планшет при струшуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Безпосередньо перед використанням промивали планшет.

4. Використовували EGF/HER-2 химерну/3T3-S7 клітинну лінію для цього аналізу.

5. Вибирали чашки, що мають 80-90%-не злиття. Збирали клітини шляхом трипсинізації та центрифугували при 100об./хв. при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.

6. Ресуспендували клітини у виснаженому середовищі та підраховували в трипановому голубому. Необхідна життєздатність вище 90%. Засівали клітинами виснажене середовище при густині 2,500 клітин на комірку, 90мкл на комірку у мікротитрувальному планшеті на 96 комірок. Інкубували

засіяне клітинами середовище при температурі 37°C при 5% CO<sub>2</sub>.

7. Починали аналіз через два дні після засівання.

8. Тестові сполуки розчиняли у 4% ДМСО. Зразки потім розводили у планшеті за допомогою стандартного DMEM. Типово, коли це розведення було 1:10 або більшим. Вміст усіх комірок потім переносили у планшет для клітин у розведенні 1:10 (10мкл зразка та середовища в 90мкл стандартного середовища). Заключна концентрація ДМСО повинна бути 1% або нижче. Стандартні серійні розведення також можна використовувати.

9. Інкубували при 5% CO<sub>2</sub> при температурі 37°C протягом 2 годин.

10. Готували EGF ліганд шляхом розведення стандартного EGF (16,5мкМ) у теплому DMEM до 150нМ.

11. Готували свіжий HNTG\* у кількості, достатній для приготування 100мкл на комірку; поміщали на лід.

12. Через 2 години інкубації з тестовою сполукою додавали приготовлений EGF ліганд до клітин, 50мкл на комірку, для одержання заключної концентрації 50нМ. Комірки позитивного контролю одержували таку саму кількість EGF. В негативні контролі не вносили EGF. Інкубували при температурі 37°C протягом 10 хвилин.

13. Видаляли тестову сполуку, EGF та DMEM. Один раз промивали клітини за допомогою PBS.

14. Переносили HNTG\* до клітин, 100мкл на комірку. Поміщали на лід на 5 хвилин. Тим часом видаляли буфер для блокування з планшета ELISA та промивали.

15. Знімали клітини з планшета за допомогою мікропіпетки та гомогенізували клітинний матеріал шляхом повторюваного пікетування лізисного буфера HNTG. Переносили лізат у покриті, блоковані, промиті планшети ELISA, або використовували Costar картридж для переносу лізату до планшета.

16. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 1 години.

17. Видаляли лізат, промивали. Переносили свіжо розведене анти-Ptyr антитіло (1:3000 і TBST) до планшета ELISA, 100мкл на комірку.

18. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

19. Видаляли анти-Ptyr антитіло, промивали. Переносили тільки-но розведене Biosource антитіло до планшета ELISA (1:8000 bTBST), 100мкл на комірку.

20. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

21. Видаляли Biosource антитіло, промивали. Переносили тільки-но приготовлений розчин ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до планшета ELISA, 100мкл на комірку.

22. Інкубували при струшуванні протягом 5-10 хвилин. Видаляли будь-які бульбашки.

23. Зупиняли реакцію шляхом додання 100мкл 0,2M HCl на комірку.

24. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

СОК2/циклін А аналіз

Цей аналіз використовували для вимірювання in vitro серин/треонін кіназної активності людського

cdk2/цикліну А в сцинтиляційно-подібному аналізі (SPA).

Матеріали та реагенти:

1. Wallac поліетилен терефталатні планшети (flexi) на 96 комірок (Wallac Catalog #1450-401).

2. Amersham Redivue [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] АТФ (Amersham Catalog # AH 9968).

3. Amersham SPA полівінілтолуолові частинки, вкриті стрептавідином (Amersham Catalog #RPNQ0007). Частинки мають бути реконституовані без магнію або кальцію при концентрації 20мг/мл.

4. Активований cdk2/циклін А ферментативний комплекс, очищений від Sf9 клітин (SUGEN, Inc.).

5. Біотинильований пептидний субстрат (Debtide). Пептид-біотин-Х-РКТРККАККЛ розчиняли в дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$  при концентрації 5мг/мл.

6. Суміш пептид/АТФ: для 10мл, перемішували 9,979мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,00125мл "холодної" АТФ, 0,010мл Debtide та 0,010мл  $\gamma^{33}\text{P}$  АТФ.

7. Кіназний буфер: для 10мл, перемішували 8,85мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,625мл трис (pH7,4), 0,25мл 1М  $\text{MgCl}_2$ , та 0,25мл 10% NP40 та 0,025мл 1М DTT додавали перед використанням.

8. 10мМ АТФ в дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$ .

9. 1М трис, pH доведене до 7,4 за допомогою HCl.

10. 1М  $\text{MgCl}_2$

11. 1М DTT

12. PBS (Gibco Catalog\* 14190-144).

13. 0,5 МЕДТА

14. Розчин для зупинки реакції: для 10мл, перемішували 9,25мл PBS, 0,005мл 100мМ АТФ, 0,1мл 0,5М ЕДТА, 0,1мл 10% Тритон X-100 та 1,25мл 20мг/мл частинок SPA.

Процедура:

1. Приготування розчинів тестових сполук у 5Х від бажаної заключної концентрації в 5% ДМСО. Додавали 10мкл до кожної комірки. Для негативних контролів використовували 10мкл тільки 5% ДМСО у кожній комірці.

2. Розводили 5мкл розчину cdk2/цикліну А за допомогою 2,1мл 2Х кіназним буфером.

3. Додавали 20мкл ферменту до кожної комірки.

4. Додавали 10мкл 0,5М ЕДТА до комірок негативного контролю.

5. До початкового складу кіназної реакції додавали 20мкл суміші пептид/АТФ до кожної комірки. Інкубували протягом 1 години без струшування.

6. Додавали 200мкл розчину для зупинки реакції до кожної комірки.

7. Витримували принаймні 10 хвилин.

8. Центрифугували планшет при швидкості близько 2300об./хв. Протягом 3-5 хвилин.

9. Підраховували результати реакції, використовуючи Trilux або подібний зчитувач.

МЕТ трансфосфорильяційний аналіз

Цей аналіз використовували для вимірювання рівнів фосфотирозину на полі(глутамінова кислота.тирозин (4:1)) субстраті як засобу ідентифікації агоністів/антагоністів met трансфосфорильювання субстрату.

Матеріали та реагенти:

1. Corning планшети на 96 комірок для проведення ELISA (Corning Catalog # 25805-96).

2. Полі(glu, tyr) 4:16 Sigma, Cat. No: P0275.

3. PBS, Gibco Catalog #450-1300EB

4. 50ММ HEPES

5. Буфер для блокування: розчиняли 25г телячого сироваткового альбуміну, Sigma Cat. No A-7888 в 500мл PBS, фільтрували через фільтр 4мкм.

6. Очищали GST злитий білок, що містить Met кіназний домен, SUGEN, Inc.

7. Буфер TBST

8. 10% водний розчин (Millique  $\text{H}_2\text{O}$ ) ДМСО.

9. 10мМ водного (дистильована  $\text{H}_2\text{O}$ ) аденозин-5'-трифосфату, Sigma Cat.No. A-5394.

10. 2Х кіназний буфер для розведення: для 100мл, перемішували 10мл 1М HEPES при pH 7,5 з 0,4мл 5% BSA/PBS, 0,2мл 0,1М ортаванадату натрію та 1мл 5М хлориду натрію в 88,4мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

11. 4Х АТФ реакційна суміш: для 10мл, перемішували 0,4мл 1М хлориду марганцю та 0,02мл 0,1М АТФ в 9,56мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

12. 4Х суміш для негативних контролей: для 10мл, перемішували 0,4мл 1М хлориду марганцю в 9,6мл дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

13. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном, Applied Scientific Catalog #S72092.

14. 500мМ ЕДТА.

15. Буфер для розведення антитіл: для 100мл, перемішували 10мл 5% BSA/PBS, 0,5мл 5% розчинного молока Carnation® в PBS та 0,1мл 0,1М ортаванадату натрію в 88,4мл TBST.

16. Кроляче поліклональне анти-фосфотирозинове антитіло, SUGEN, Inc.

17. Козяче анти-кроляче антитіло, кон'юговане з пероксидазою хріна, Biosource, Inc.

18. Розчин ABTS: для 1л, перемішували 19,21г лимонної кислоти, 35,49г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  та 500мг ABTS з достатньою кількістю дистильованої  $\text{H}_2\text{O}$  для одержання 1л.

19. ABTS/ $\text{H}_2\text{O}_2$ : перемішували 15мл ABTS розчину з 2мкл  $\text{H}_2\text{O}_2$  п'ять хвилин перед використанням.

20. 0,2М HCl

Процедура:

1. Покривали планшети ELISA за допомогою 2мкг полі(glu-tyr) в 100мкл PBS зберігали протягом ночі при температурі 4°C.

2. Блокували планшет за допомогою 150мкл 5% BSA/PBS протягом 60 хвилин.

3. Промивали планшет двічі за допомогою PBS, один раз за допомогою 50ММ HEPES буфера pH 7,4.

4. Додавали 50мкл розведеної кінази до усіх комірок. (Очищену кіназу розводили кіназним буфером для розведення. Заклучна концентрація повинна складати (10нг/комірка)).

5. Додавали 25мкл тестової сполуки (в 4% ДМСО) або тільки ДМСО (4% в дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$ ) для контролів.

6. Інкубували суміш кіназа/сполука протягом 15 хвилин.

7. Додавали 25мкл 40мМ  $\text{MnCl}_2$  до комірок з негативним контролем.

8. Додавали 25мкл суміші АТФ/ $\text{MnCl}_2$  до усіх інших комірок (за винятком негативних контролів).

Інкубували протягом 5 хвилин.

9. Додавали 25мкл 500мМ ЕДТА для зупинки реакції.

10. Промивали планшет 3X за допомогою TBST.

11. Додавали 100мкл кролячого поліклонального анти-Ptyr антитіла, розведеного 1:10 000 в буфері для розведення антитіл до кожної комірки.

12. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 1 години.

13. Розводили Biosource анти-кроляче антитіло, кон'юговане з HRP, розведене 1:6,000, в буфері для розведення антитіл. Додавали 100мкл на комірку та інкубували при кімнатній температурі при струшуванні протягом 1 години.

14. Промивали планшет 1X за допомогою PBS.

15. Додавали 100мкл розчину ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кожної комірки.

16. У разі необхідності, зупиняли реакцію шляхом додання 100мкл 0,2М HCl на комірку.

17. Зчитували результати на Dynatech MR7000 зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

IGF-1 трансфосфориляційний аналіз

Цей аналіз використовували для вимірювання рівня фосфотирозину у полі(глутамінова кислота.тирозин) (4:1) для ідентифікації агоністів/анатагоністів gst-IGF-1 трансфосфорилювання субстрату.

Матеріали та реагенти:

1. Corning планшети ELISA на 96 комірок.

2. Полі(glu-tyr) (4:1), Sigma Cat. No P0275.

3. PBS, Gibco Catalog#450-1300EB.

4. 50ММ HEPES

5. TBV буфер для блокування: для 1л, перемішували 100г BSA, 12,1г трис (pH 7,5), 58,44г, хлориду натрію та 10мл 1% Твін-20.

6. Очищений GST- злитий білок, що містить IGF-1 кіназний домен (SUGEN, Inc.).

7. TBST буфер: для 1л, перемішували 6,057г трис, 8,766г хлориду натрію та 0,5мл Твін-20 з достатньою кількістю дистильованої H<sub>2</sub>O для одержання 1 літра.

8. 4%ДМСОв Milli-QH<sub>2</sub>O.

9. 10ММ АТФ в дистильованій H<sub>2</sub>O.

10. 2X кіназний буфер для розведення: для 100мл, перемішували 10мл 1М HEPES (pH 7,5), 0,4мл 5% BSA в дистильованій H<sub>2</sub>O, 0,2мл 0,1М ортованадату натрію та 1мл 5М хлориду натрію з достатньою кількістю дистильованої H<sub>2</sub>O для одержання 100мл.

11. 4X АТФ реакційна суміш: перемішували 0,4мл 1М MnCl<sub>2</sub> та 0,008мл 0,01М АТФ та 9,56мл дистильованої H<sub>2</sub>O.

12. 4X суміш для негативних контролен: перемішували 0,4мл 1М хлориду марганцю в 9,60мл дистильованої H<sub>2</sub>O.

13. NUNC поліпропіленові планшети на 96 комірок з V-подібним дном.

14. 500ММ ЕДТА в дистильованій H<sub>2</sub>O.

15. Буфер для розведення антитіл: для 100мл, перемішували 10мл 5% BSA в PBS, 0,5мл 5% знежиреного розчинного молока Carnation® в PBS та 0,1мл 0,1М ортованадату натрію в 88,4мл TBST.

16. Кроляче поліклональне анти-

фосфотирозинове антитіло, SUGEN, Inc.

17. Козяче анти-кроляче антитіло, кон'юговане з HRP, Biosource.

18. ABTS розчин.

19. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: перемішували 15мл ABTS з 2мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 хвилин перед використанням.

20. 0,2М HCl в дистильованій H<sub>2</sub>O. Процедура:

1. Покривали планшет ELISA за допомогою 2,0мкл/комірка полі(glu, tyr) 4:1 (Sigma P0275) в 100мкл PBS. Зберігали планшет протягом ночі при температурі 4°C.

2. Промивали планшет один раз за допомогою PBS.

3. Додавали 100мкл TBV буфера для блокування до кожної комірки. Інкубували планшет протягом 1 години при струшуванні з 50ММ HEPES буфера pH 7,5.

4. Промивали планшет один раз за допомогою PBS, а потім двічі за допомогою 50ММ HEPES буфера pH 7,5.

5. Додавали 25мкл тестової сполуки в 4% ДМСО (що одержана шляхом розведення стандартним розчином 10ММ тестової сполуки в 100% ДМСО за допомогою дистильованої H<sub>2</sub>O) до планшета.

6. Додавали 10,0нг gst-IGF-1 кінази в 50мкл кіназного буфера для розведення до усіх комірок.

7. Починали кіназну реакцію шляхом додання 25мкл 4X АТФ реакційної суміші до усіх тестових комірок та позитивних контрольних комірок. Додавали 25мкл суміші для негативних контролен до усіх комірок негативних контролей.

8. Додавали 25мкл 0,5М ЕДТА (pH8,0) до усіх комірок.

9. Промивали планшет 4X за допомогою TBST буфера.

10. Додавали кролячу поліклональну анти-фосфотирозинову антисироватку у розведенні 1:10 в 100мкл буфера для розведення антитіл до усіх комірок. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 1 години.

11. Промивали планшет так, як описано на етапі 9.

12. Додавали 100мкл анти-кролячого HRP Biosource у розведенні 1:10,00 у буфері для розведення антитіл до усіх комірок. Інкубували при струшуванні при кімнатній температурі протягом 1 години.

13. Промивали планшет так, як описано на етапі 9, після чого один раз промивали PBS для видалення бульбашок та надлишку Твін-20.

14. Реакцію продовжували доданням 100мкл/комірку ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кожної комірки.

15. Через 5 хвилин зчитували результати на зчитувачі для ELISA з тестовим фільтром при 410нм та фільтром порівняння при 630нм.

BRDU аналіз на вбудовування

Наступні аналізи використовували клітини, одержані для експресії вибраного рецептора, а потім оцінювали вплив сполуки, що представляє інтерес, на активність ліганд-індукованого синтезу ДНК шляхом визначення BrdU вбудовування в ДНК.

Наступні матеріали, реагенти та процедури є загальними для кожного з наступних BrdU аналізів вбудовування. Наведені варіації для специфічних

аналізів.

Матеріали та реагенти:

1. Прийнятний ліганд.
2. Прийнятні генно-інженерні клітини.
3. BrdU агент для мічення: 10мМ в PBS (pH 7,4) (Boehringer Mannheim, Germany).
4. Денатуруючий буфер для фіксації: розчин для фіксації (готовий для використання) (Boehringer Mannheim, Germany).
5. Анти-BrdU-POD: мишаче моноклональне антитіло, кон'юговане з пероксидазою хріна (Boehringer Mannheim, Germany).
6. TMB субстратний розчин: тетраметилбензидин (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).
7. PBS розчин для промивання: 1X PBS, pH7,4.
8. Альбумін великої рогатої худоби, фракція V, порошок (Sigma Chemical Co., USA).

Загальна процедура:

1. Клітини засівали у кількості 8000 клітин/комірка в 10% CS, 2мМ Gln в DMEM, в планшеті на 96 комірок. Клітини інкубували протягом ночі при температурі 37°C в присутності 5% CO<sub>2</sub>.
2. Через 24 години клітини промивали за допомогою PBS, а потім виснажували сироватку у середовищі, вільному від сироватки (0% CS DMEM з 0,1% BSA) протягом 24 годин.
3. На третій день прийнятний ліганд та тестову сполуку додавали до клітин одночасно. Комірки негативного контролю одержували вільне від сироватки середовище DMEM тільки з 0,1% BSA; до клітин позитивного контролю вносили ліганд, але не вносили тестової сполуки. Тестові сполуки готували в середовищі DMEM, вільному від сироватки, з лігандом в планшеті на 96 комірок та серійно розводили для 7 тестових концентрацій.
4. Через 18 годин активації ліганда додавали до клітин розведений BrdU реагент для мічення (1:100 в DMEM, 0,1% BSA) та інкубували з BrdU (заключна концентрація дорівнює 10мкМ) протягом 1,5 годин.
5. Після інкубації з агентом для мічення видаляли середовище шляхом декантування та перевертання планшета на паперову серветку. Додавали розчин для фіксації та денатурації (50мкл/комірка) та планшети інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин на струшувачі для планшетів.
6. Денатуруючий розчин для фіксації повністю видаляли шляхом декантування та перевертання планшета на паперову серветку. Додавали молоко (5% дегідратоване молоко в PBS, 200мкл/комірка) як розчин для блокування та планшет інкубували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на струшувачі для планшетів.
7. Розчин для блокування видаляли та комірки промивали один раз за допомогою PBS. Додавали розчин анти-BrdU-POD (розведення 1:200 в PBS, 1% BSA) у кількості 50мкл/комірка та інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі на струшувачі для планшетів.
8. Кон'югат антитіла повністю видаляли шляхом декантування та промивання комірок 5 разів за допомогою PBS, після цього планшет висушували шляхом перевертання на паперову серветку.
9. Додавали TMB субстратний розчин

(100мкл/комірка) та інкубували протягом 20 хвилин при кімнатній температурі на струшувачі для планшета до тих пір, доки розвиток забарвлення не був достатнім для фотометричного визначення.

10. Поглинання зразків вимірювали при довжині хвилі 410нм (шляхом способу «подвійної довжини хвилі» з фільтром для зчитування при 490 як стандартної довжини хвилі) на Dynantech зчитувачі для планшетів для ELISA.

EGF-індукований BrdU аналіз вбудовування  
Матеріали та реагенти:

1. Мишачий EGF, 201 (Toyobo., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFR7.

EGF-індукований Her-2-керований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Мишачий EGF, 201 (Toyobo., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFR/Her2/EGFR (EGFR з Her-2 кіназним доменом).

EGF-індукований Her-4-керований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Мишачий EGF, 201 (Toyobo., Ltd., Japan).
2. 3T3/EGFR/Her4/EGFR (EGFR з Her-4 кіназним доменом).

PDF-індукований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Людський PDGF B/B (Boehringer Mannheim, Germany).
2. 3T3/EGFR7.

FGF-індукований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Людський FGF2/bFGF (Gibco BRL, USA).
2. 3T3/EGFR.

IGF1-індукований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Людський рекомбінантний IGF1 (G511, Promega Corp. USA).
2. 3T3/IGF1r.

Інсулін-індукований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Інсулін, кристалічний, великої рогатої худоби, Zinc (13007, Gibco BRL, USA).
2. 3T3/H25.

HGF1-індукований BrdU аналіз вбудовування

Матеріали та реагенти:

1. Рекомбінантний людський HGF (Cat.No. 249-HG, R&D Systems, Inc. USA).
2. VxPC-3 клітини (ATCC CRL-1687).

Процедура:

1. Клітини висівали у кількості 9000клітин/комірка в RPMI 10% FBS в планшеті на 96 комірок. Клітини інкубували протягом ночі при температурі 37°C при 5% CO<sub>2</sub>.
2. Через 24 години клітини промивали за допомогою PBS, а потім виснажували сироватку в 100мкл середовища, вільного від сироватки (RPMI з 0,1% BSA) протягом 24 годин.

3. На 3 день додавали 25мкл середовища, що містить ліганд (приготовлений у концентрації 1мкг/мл у RPMI з 0,1% BSA; заключна концентрація HGF складає 200нг/мл), та тестові сполуки, до клітин. Комірки негативних контролів одержували 25мкл середовища RPMI, вільного від сироватки RPMI з 0,1% тільки BSA; клітини позитивного контролю одержували ліганд (HGF), але не одержува-

ли тестової сполуки. Тестові сполуки готували у п'ятикратній їх заключній концентрації у середовищі RPMI, вільному від сироватки, з лігандом, у планшеті на 96 комірок, серійно розводили для одержання 7 тестових концентрацій. Типово, найвища заключна концентрація тестової сполуки складала 100мкМ, використовувалися 1:3 розведення (тобто заключна концентрація тестової сполуки коливалась в межах 0,137-100мкМ).

4. Через 18 годин активації ліганда до кожної комірки додавали 12,5мкл розведеного BrdU реагента для мічення (1:100 в RPMI, 0,1% BSA) та клітини інкубували з BrdU (заклучна концентрація складала 10мкМ) протягом 1 години.

5. Подібно до загальної процедури.

6. Подібно до загальної процедури.

7. Розчин для блокування видаляли шляхом декантування та комірки промивали один раз за допомогою PBS. Анти-BrdU-POD розчин (розведення 1:100 в PBS, 1% BSA) додавали (100мкл/комірка) та планшет інкубували протягом 90 хвилин при кімнатній температурі на струшувачі для планшетів.

8. Подібно до загальної процедури.

9. Подібно до загальної процедури.

10. Подібно до загальної процедури.

HUV-EC-C аналіз

Цей аналіз використовували для вимірювання активності сполуки проти PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF або Flk-1/KDR, усі з яких в природі експресуються HUV-EC клітинами.

День 0

1. Промивали та піддавали трипсинізації клітини HUV-EC-C (ендотеліальні клітини пупочної вени людини, (Американська Колекція Типових Культур, номер за каталогом 1730 CRL). Промивали забуференим фосфатом фізіологічним розчином Дюльбекко (D-PBS, що одержаний від Gibco BRL, номер за каталогом 14190-029) два рази у кількості 1мл/10см<sup>2</sup> на флакон для культури тканин. Піддавали трипсинізації з 0,05% сумішшю трипсин-ЕДТА в неферментативному розчині для дисоціації клітин (Sigma Chemical Company, номер за каталогом C-1544). 0,05%-ний розчин трипсину готували шляхом розведення 0,25% трипсину/1мМ ЕДТА (Gibco, номер за каталогом 25200-049) у розчині для дисоціації клітин. Клітини піддавали трипсинізації у кількості 1мл/25-30см<sup>2</sup> на флакон для культури тканин протягом 5 хвилин при температурі 37°C. Після того, як клітини відокремлювалися від флакону, додавали рівну кількість середовища для аналізу та переносили у стерильну центрифужну пробірку на 50мл (Fisher Scientific, номер за каталогом 05-539-6).

2. Промивали клітини за допомогою 35мл середовища для аналізу в центрифужній пробірці на 50мл шляхом додавання середовища для аналізу, центрифугували протягом 10 хвилин при швидкості приблизно 200g, видаляли супернатант та ресуспендували у 35мл D-PBS. Повторювали промивання два або більше разів за допомогою D-PBS, ресуспендували клітини у флаконах для культури тканин у кількості приблизно 1мл середовища для аналізу/15см<sup>2</sup> поверхні. Середовище для аналізу складалося з 0,5% фетальної сироватки великої рогатої худоби, інактивованої прогріванням. Під-

раховували клітини за допомогою Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) та додавали середовище для аналізу до клітин для одержання концентрації 0,8-1,0×10<sup>5</sup>клітин/мл.

3. Додавали клітини до планшетів на 96 комірок з плоским дном у кількості 100мкл/комірка або 0,8-1,0×10<sup>4</sup>клітин/комірка, інкубували протягом приблизно 24 годин при температурі 37°C, та 5% CO<sub>2</sub>.

День 1

1. Готували двократні титрування тестової сполуки в окремих планшетах на 96 комірок, взагалі від 50мкМ вниз до 0мкМ. Використовували те саме середовище для аналізу, що згадане на етапі дня 0 (етап 2) вище. Титрування готували шляхом додання 90мкл/комірка тестової сполуки при 200мкМ (4X заключна концентрація у комірці) до верхньої комірки окремого ряду планшета. Оскільки стандартна тестова сполука звичайно складала 200мкМ в ДМСО, концентрація лікарського засобу 200мкМ містила 2% ДМСО.

Розріджувач, поповнений до 2% ДМСО в середовищі для аналізу (F12K+0,5% фетальної сироватки великої рогатої худоби), використовували як розріджувач для титрування тестової сполуки для того, щоб розводити тестову сполуку, але при цьому залишали концентрацію ДМСО незмінною. Додавали цей розріджувач до комірок, що залишилися в окремому ряді планшета у кількості 60мкл/комірка. Відбирали 60мкл від 120мкл розведення 200мкМ тестової сполуки у верхній комірці окремого ряду планшета та перемішували з 60мкл другої комірки ряду планшета. Відбирали 60мкл з цієї комірки та перемішували з 60мкл в третій комірці ряду, і так далі, доки двократне титрування не було завершено. Коли перемішували вміст передостанньої комірки, відбирали 60мкл 120мкл в цій комірці та відкидали. Залишали останню комірку з 60мкл ДМСО/середовище розріджувача як контроль, що не містить тестової сполуки. Робили 9 рядів титрувань тестової сполуки, що достатньо для потрібних комірок, кожна з яких для: (1) VEGF (одержаний від Perpro Tech Inc., номер за каталогом 100-200, (2) фактор росту ендотеліальних клітин (ECGF) (що також відомий як кислотний фактор росту фібробластів, або aFGF) (одержаний від Boehringer Mannheim Biochemia, номер за каталогом 1439 600), або (3) людський PDGFB/B (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany), та контроль, що містить середовище для аналізу. ECGF вводили як препарат з гепарином натрію.

2. Переносили 50мкл/комірка розведень тестової сполуки у планшети для аналізу на 96 комірок, що містять 0,8-1,0×10<sup>4</sup>клітин/100 мкл/комірка HUV-EC-C, одержаних у день 0, та інкубували приблизно 2 години при температурі 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

3. У потрібній повторності додавали 50мкл/комірка 80мкг/мл VEGF, 20нг/мл ECGF, або контроль середовища до кожної комірки, що містить тестову сполуку. Як і з тестовими сполуками, концентрації ростового фактора складали 4X бажаної заключної концентрації. Використовували середовище для аналізу, одержане у день 0 (етап 2), для одержання концентрацій ростових факторів, інкубували приблизно 24 години при темпера-

турі 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Кожна комірка містила розведення 50мкл тестової сполуки, 50мкл ростового фактора або середовища, та 100мкл клітин, усі ці концентрації підраховували до загальних 200мкл/комірка. Таким чином, 4X концентрації тестової сполуки та ростових факторів ставали 1X після того, як усі складові додавали до комірок.

#### День 2

1. Додавали <sup>3</sup>H-тимідин (Amersham, номер за каталогом TRK-686) при 1мкКі/комірка (10мкл/комірка 100мкКі/мл розчину, приготовленого у RPMI середовищі + 10% інактивованої прогрівання фетальної сироватки великої рогатої худоби) та інкубували приблизно 24 години при температурі 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. RPMI одержували від Gibco BRL, номер за каталогом 11875-051.

#### День 3

1. Заморожували планшети протягом ночі при температурі -20°C.

#### День 4

Розморожували планшети та збирали за допомогою збирача для планшетів на 96 комірок (Tomtec Harvester 96®) на фільтр (Wallac, номер по каталогу 1205-401) підраховували на рідинному сцинтиляційному лічильнику Betaplate™.

Біоаналізи, які використовувалися або можуть використовуватися для оцінки сполук, описані у деталях нижче. Сполуки 1-9 були перевірені та знайдені активними в аналізах flkGST, FGFR1 та PDGF.

#### Тваринні моделі in vitro

##### Моделі тваринних ксенотрансплантатів

Здатність пухлин людини до росту як ксенотрансплантатів у атимічних мишей (наприклад, Balb/c, nu/nu) забезпечувала корисну модель in vivo для вивчення біологічної відповіді на терапію людських пухлин. З часу першої успішної ксенотрансплантації людських пухлин в атимічних мишей (Rygaard та Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 77: 758-760), було трансплантовано та успішно приживлено багато різних людських клітинних ліній (наприклад, пухлин молочної залози, легень, генітально-сечовивідного тракту, гастроінтестинального тракту, пухлин голови та шиї, гліобластоми, кісток та злоякісних меланом) у безшерстних мишей. Наступні аналізи можуть використовуватися для визначення рівня активності, специфічності та впливу різних сполук за даним винаходом. Три загальні типи аналізів є корисними для оцінки сполук: клітинний/каталітичний, клітинний/біологічний аналіз та аналіз in vivo. Об'єкт клітинних/каталітичних аналізів полягає у визначенні впливу сполуки на здатність ТК фосфорилувати тирозини у відомому субстраті у клітині. Об'єктом клітинних/біологічних аналізів є визначення впливу сполуки на біологічну відповідь, стимульовану ТК у клітині. Об'єкт аналізів in vivo полягає у визначенні ефекту сполуки у тваринних моделях розладу, такого, як рак.

Прийнятні клітинні лінії для експериментів по підшкірній ксенотрансплантації включають C6 клітини (гліома, ATCC # CCL 107), A375 клітини (меланома, ATCC #CRL 1619), A431 клітини (епідермоїдна карцинома, ATCC #CRL 1555), Calu 6 клітини (легені, ATCC #HTB 56), PC3 клітини (перемішурова залоза, ATCC #CRL 1435), SKOV3TP5

клітини та NIH 3T3 генетично модифіковані фібробласти для понадекспресії EGFR, PDGFR, IGF-1R або будь-яких інших тестових кіназ. Наступний пропис можна використовувати для проведення експериментів по ксенотрансплантації:

Самок атимічних мишей (BALB/c, nu/nu) використовували з Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Усіх тварин вирощували в стерильних умовах у мікро-ізоляторних боксах для утримання з підстилкою Alpha-dri. Вони одержували стерильний корм для гризунів та доволі води.

Клітинні лінії вирощували на прийнятному середовищі (наприклад, MEM, DMEM, Ham's F10 або Ham's F12 плюс 5%-10% фетальної сироватки великої рогатої худоби (FBS) та 2мМ глутаміну (gln)). Усі середовища для культур клітин, глутамін та сироватку великої рогатої худоби одержували від Gibco Life Technologies (Grand Island, NY), якщо інше не вказано. Усі клітини вирощували у вологій атмосфері з вмістом 90-95% повітря та 5-10% CO<sub>2</sub> при температурі 37°C. Усі клітинні лінії звичайно субкультивували двічі на тиждень, вони були негативними на мікоплазму, як було визначено за допомогою способу Mycotect (Gibco).

Клітини збирали під час злиття або незадовго перед злиттям за допомогою 0,05% трипсин-ЕДТА та осаджували при 450 x g протягом 10 хвилин. Осади ресуспендували в стерильному PBS або середовищі (без FBS) до певної концентрації та клітини імплантували у задній відділ стопи мишей (8-10 мишей на групу, 2-10×10<sup>6</sup> клітин/тварина) Ріст пухлин визначали через 3-6 тижні, використовуючи кавернометри. Об'єми пухлин підраховували як результат довжина x ширина x висота, якщо інше не вказано. Значення Р підраховували, використовуючи коефіцієнт Ст'юдента. Тестові сполуки в 50-100мкл наповнювача (DMCO або VPD:D5W) вводили шляхом внутрішньочеревинного введення при різних концентраціях, звичайно, починаючи на наступний день після імплантації.

#### Модель пухлинної інвазії

Були використані наступні моделі пухлинної інвазії, вони можуть використовуватися для оцінки терапевтичного значення та ефективності ідентифікованих сполук для селективного інгібування KDR/FLK-1 рецептора.

#### Процедура

Безшерстних мишей віком 8 тижнів (самки) (Simonsen Inc.) використовували для експерименту. Імплантація пухлинних клітин може бути проведена у ламінарному боксі. Для анестезії вводили суміш ксилазин/кетамін (100мг/кг кетаміну та 5мг/кг ксилазину) внутрішньочеревинно. Надрізи по середній лінії проводили для розкриття черевної порожнини (приблизно 1,5см у довжину) для введення 10<sup>7</sup> пухлинних клітин в об'ємі 100мкл середовища. Клітини вводили або в дуоденальну долю підшлункової залози або під серозну оболонку кишечника. Черевину та м'язи зашивали за допомогою накладання суцільного 6-0 шва за допомогою шовкової нитки, шкіру закривали при використанні зажимів для рани. За тваринами спостерігали щодня.

#### Аналіз

Через 2-6 тижнів, в залежності від грубих спостережень за тваринами, мишей забивали, вида-

ляли локальні пухлинні метастази різних органів (легенів, печінки, мозку, шлунку, селезінки, серця, м'язів) та піддавали аналізу (вимірювали розмір пухлин, ступінь інвазії, імунохімію, проводили гібридизацію *in situ*, тощо).

#### С-KIT аналіз

Цей аналіз використовували для визначення рівня с-kit тирозин-фосфорилування.

Клітини MO7E (гостра мієлоїдна лейкемія людини) виснажували на сироватку протягом ночі в 0,1% сироватці. Клітини попередньо обробляли за допомогою сполуки (одночасно з виснаженням сироватки) перед стимуляцією за допомогою ліганду. Клітини стимулювали за допомогою 250нг/мл rh-SCF протягом 15 хвилин. Після стимуляції клітини піддавали лізису та імуноосаджували за допомогою анти-с-kit антитіла. Рівні фосфотирозину та білка визначали шляхом Вестерн-блоттингу.

#### Аналіз МІГ проліферації

Клітини MO7E виснажували на сироватку та попередньо обробляли за допомогою сполуки, як описано для експериментів по фосфорилуванню. Клітини засівали у кількості  $4 \times 10^5$  клітин/комірка у чашки на 96 комірок в 100мкл RPMI + 10% сироватки. Додавали rh-SCF (100нг/мл) та чашку інкубували протягом 48 годин. Через 48 годин додавали 10мкл 5мг/мл MTT [3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2-5-дифеніл тетразолій бромід] та інкубували протягом 4 годин. Кислий ізопропанол (100мкл 0,04N HCl в ізопропанолі) додавали та вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 550нм.

#### Аналіз апоптозу

Клітини MO7E інкубували +/- SCF та +/- сполука в 10% FBS з rh-GM-CSF (10нг/мл) та rh-IL-3 (10нг/мл) Зразки аналізували через 24 та 48 годин. Для вимірювання активованої caspase-3 зразки промивали за допомогою PBS та порушували проникність клітин за допомогою охолодженого на льоду 70% етанолу. Клітини потім забарвлювали за допомогою поліклональної кролячої анти-активної caspase-3, кон'югованої з PE, та аналізували за допомогою FACS. Для вимірювання відщепленого PARP зразки піддавали лізису та аналізували шляхом Вестерн-блоттингу з анти-PARP антитілом.

#### Додаткові аналізи

Додаткові аналізи, що можуть використовуватися для оцінки сполук за даним винаходом, включають, без обмеження, біо-flk-1 аналіз, аналіз на химерний рецептор EGF-HER2 у цільних клітинах, біо-src аналіз, біо-lck аналіз та аналіз вимірювання функції фосфорилування raf. Прописи для кожного з цих аналізів можуть бути знайдені в патентній заявці США з серійним номером 09/099,842, що введена в дану заявку як посилання, включаючи будь-які малюнки.

#### Вимірювання клітинної токсичності

Терапевтичні сполуки повинні бути більш ефективними при інгібуванні активності рецептора тирозинкінази, ніж у прояві цитотоксичного ефекту. Вимірювання ефективності та клітинної токсичності сполуки може бути проведене шляхом визначення терапевтичного індексу, наприклад,  $IC_{50}/LD_{50}$ .  $IC_{50}$ , доза, що необхідна для досягнення 50%-ного інгібування, може вимірюватися при використанні стандартних методик, таких, як ті, що

описані у даній заявці.  $LD_{50}$ , доза, що приводить до 50% токсичності, може також вимірюватися стандартними способами (Mossman, 1983, J. Immunol. Methods, 65:55-63), шляхом вимірювання кількості LDH, що вивільнився (Korzeniewski та Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 64:313, Decker та Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods, 115:61) або вимірюванням летальної дози на тваринних моделях. Сполуки, що мають високий терапевтичний індекс, є бажаними. Терапевтичний індекс повинен бути більшим, ніж 2, бажано, принаймні, 10, більш бажано, принаймні, 50.

Середній спеціаліст у даній галузі може також легко пересвідчитися, що даний винахід легко адаптується до реалізації окремих об'єктів та забезпечує згадані переваги, що описані у даній заявці. Молекулярні комплекси та методи, процедури, способи лікування, молекули, специфічні сполуки, описані у даній заявці, представлені як бажані втілення, представляють собою тільки приклади і не призначені як такі, що обмежують об'єм даного винаходу. Зміни та інші можливі використання будуть зрозумілі середньому спеціалістові у даній галузі, такі зміни також входять в область даного винаходу та визначені об'ємом пунктів формули.

Спеціалістові у даній галузі зрозуміло, що можуть бути зроблені заміни та модифікації винаходу, який розкритий у даній заявці без відходження від духу та букви даного винаходу.

Усі патенти та публікації, згадані в описі, є показними для середніх спеціалістів у галузі, до якої відноситься винахід. Усі патенти та публікації введені у дану заявку як посилання так, що кожна індивідуальна публікація специфічно та індивідуально відображає той факт, що вона введена як посилання.

Винахід ілюстративно описує, що він може застосовуватися при відсутності будь-якого елементу або елементів, обмеження чи обмежень, які специфічно не розкриті у даній заявці. Таким чином, наприклад, у кожному випадку у даній заявці будь-який з термінів "що включає", "що суттєво складається з" та "складається з" може бути замінений на інший з двох інших термінів. Терміни та вирази, що використовуються у даній заявці, застосовуються як терміни опису та не представляють собою обмеження, а також не переслідують мети, що при використанні таких термінів та виразів не виключаються будь-які еквіваленти представлених або описаних ознак або їх частини, але при цьому визнається, що різноманітні модифікації є можливими у межах заявленого винаходу. Таким чином, зрозуміло, що, незважаючи на те, що даний винахід було специфічно розкрито за допомогою бажаних втілень та необов'язкових ознак, модифікації та варіації загальної ідеї даної заявки можуть бути зрозумілими для спеціаліста в даній галузі, крім того, такі модифікації та варіації можуть вважатися такими, що входять в об'єм даного винаходу, як визначено в прикладених до даної заявки пунктах формули.

Крім того, коли ознаки або аспекти винаходу описані у межах груп Маркуша, будь-який спеціаліст у даній галузі може визнати, що винахід також, таким чином, описаний у межах будь-якого індиві-



129

дуального члена або підгрупи членів групи Маркуша. Наприклад, якщо X описаний як вибраний з групи, яка складається з бром, хлору та йоду, то пункти, де X є бромом, та пункти, де X є бромом та

75635

хлором, повністю описані.

Інші втілення знаходяться у межах викладених нижче пунктів формули.

130