



УКРАЇНА

(19) UA (11) 77002 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/50

A61K 31/44

A61K 31/47

A61K 31/445

A61K 31/42

A61K 31/415

A61K 31/40

A61K 31/38

A61K 31/35

A61K 31/34

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) КОМБІНАЦІЙНА ТЕРАПІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

1

2

(21) 2004031862

(22) 15.08.2002

(24) 16.10.2006

(86) PCT/US02/25797, 15.08.2002

(31) 60/312,413

(32) 15.08.2001

(33) US

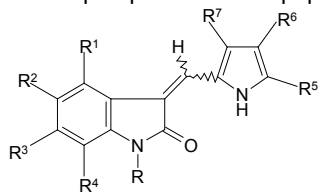
(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.

(72) Масферрер Джейм, CL, Доші Парул, IN, Чер-  
рінгтон Жюлі, US(73) СУДЖЕН, ІНК., US, ФАРМАЦІЯ КОРПО-  
РЕЙШН, US

(56) US 5,972,986 A 26.10.1999

US 6,077,850 A 20.06.2000

US 2002/0156292 A1 24.10.2002

(57) 1. Спосіб лікування або попередження раку,  
який включає введення ссавцю, що потребує тако-  
го лікування, терапевтично ефективної кількості  
інгібітора протеїнкінази формули (I):

(I)

в якій:

R вибирають з групи, що містить водень, піпера-  
зин-1-ілметил, 4-метилпіперазин-1-ілметил, піпе-  
ридин-1-ілметил, 2-гідроксиметилпіролідін-1-  
ілметил, 2-карбоксипіролідін-1-ілметил і піролі-  
дин-1-ілметил; R<sup>1</sup> вибирають з групи, що містить  
водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоал-  
кіл, заміщений циклоалкіл, арил, гетероарил, гете-  
роаліцикліл, гідрокси, алкокси, -C(O)NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>, -  
NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -(CO)R<sup>15</sup> і -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>16</sup>;

R<sup>2</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген,  
алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси,  
алкокси, ціано, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>C(O)R<sup>4</sup>, -C(O)R<sup>15</sup>,  
арил, гетероарил і -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>3</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген,  
алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси,  
алкокси, арил, гетероарил, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -  
NR<sup>13</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>14</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>C(O)R<sup>14</sup>, -  
NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>14</sup>, -(CO)R<sup>15</sup> і -SO<sub>2</sub>R<sup>19</sup>;

R<sup>4</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген,  
алкіл, заміщений алкіл, гідрокси, алкокси і -  
NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>5</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл,  
заміщений алкіл і -C(O)R<sup>10</sup>;

R<sup>6</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл,  
заміщений алкіл і -C(O)R<sup>10</sup>;

R<sup>7</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл,  
заміщений алкіл, арил, гетероарил, -C(O)R<sup>17</sup> і -  
C(O)R<sup>10</sup>, при умові, що коли R є воднем, тоді, при-  
наймні, один з R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> і R<sup>7</sup> є -C(O)R<sup>10</sup>; або  
R<sup>6</sup> і R<sup>7</sup> можуть разом утворювати групу, що виби-  
рають з групи, яка містить -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- і -  
(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-;

R<sup>8</sup> і R<sup>9</sup> незалежно вибирають з групи, яка містить  
водень, алкіл, заміщений алкіл і арил;

R<sup>10</sup> вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокс-  
и, арилокси, -N(R<sup>11</sup>)(алкілен)<sub>n</sub>R<sup>12</sup>, де алкіленова  
група є, необов'язково, заміщеною гідроксигрупою  
і -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>11</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл і  
заміщений алкіл;

R<sup>12</sup> вибирають з групи, що містить -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, гідро-  
кси, -C(O)R<sup>15</sup>, арил, гетероарил, -N<sup>+</sup>(O<sup>-</sup>)R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -  
N(OH)R<sup>13</sup> і -NHC(O)R<sup>18</sup> (де R<sup>18</sup> є алкілом, заміще-  
ним алкілом, галогеналкілом або аралкілом);

(13) C2

(11) 77002

(19) UA

$R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, заміщений алкіл, нижчий алкіл, заміщений гідроксіалкіламіно, ціаноалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, арил і гетероарил; або  $R^{13}$  і  $R^{14}$  можуть об'єднані утворювати гетероциклічну групу;

$R^{15}$  вибирають з групи, що містить водень, гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-C(O)R^{15}$  і  $-C(O)NR^{13}R^{14}$ ;

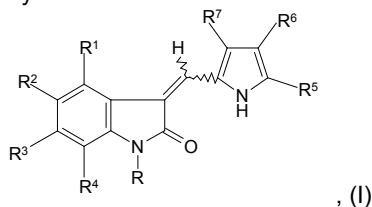
$R^{17}$  вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

$R^{19}$  вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, арил, аралкіл, гетероарил або гетероаралкіл; і

$n$  і  $\epsilon$ , незалежно, 1, 2, 3 або 4;

в комбінації з інгібітором циклооксигенази або його фармацевтично прийнятною сіллю.

2. Спосіб лікування або попередження раку, який включає введення ссавцю, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості сполуки



(I)

в якій:

$R$  вибирають з групи, що містить водень, піперазин-1-ілметил, 4-метилпіперазин-1-ілметил, піперидин-1-ілметил, 2-гідроксиметилпіролідін-1-ілметил, 2-карбоксипіролідін-1-ілметил і піролідін-1-ілметил;

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, арил, гетероарил, гетероаліцикліл, гідрокси, алкокси,  $-C(O)NR^6R^9$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-(CO)R^{15}$  і  $-(CH_2)_2R^{16}$ ;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ ,  $-C(O)R^{15}$ , арил, гетероарил і  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, арил, гетероарил,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$ ,  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ ,  $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ ,  $-(CO)R^{15}$  і  $-SO_2R^{19}$ ;

$R^4$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, гідрокси, алкокси і  $-NR^{13}R^{14}$ ;

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл і  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл і  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл, арил, гетероарил,  $-C(O)R^{17}$  і  $-C(O)R^{10}$ , за умови, що коли  $R$  є воднем, тоді, принаймні, один з  $R^5$ ,  $R^6$  і  $R^7$  є  $-C(O)R^{10}$ ; або

$R^6$  і  $R^7$  можуть об'єднані утворювати групу, що вибирають з групи, яка містить  $-(CH_2)_4$ ,  $-(CH_2)_5$  і  $-(CH_2)_6$ ;

$R^8$  і  $R^9$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, заміщений алкіл і арил;

$R^{10}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси, арилокси,  $-N(R^{11})(\text{алкілен})_nR^{12}$ , де алкіленова група є, необов'язково, заміщеною гідроксигрупою і  $-NR^{13}R^{14}$ ;

$R^{11}$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл і заміщений алкіл;

$R^{12}$  вибирають з групи, що містить  $-NR^{13}R^{14}$ , гідрокси,  $-C(O)R^{15}$ , арил, гетероарил,  $-N^+(O^-)R^{13}R^{14}$ ,  $-N(OH)R^{13}$  і  $-NHC(O)R^{18}$  (де  $R^{18}$  є алкілом, заміщеним алкілом, галогеналкілом або аралкілом);

$R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, заміщений алкіл, нижчий алкіл, заміщений гідроксіалкіламіно, ціаноалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, арил і гетероарил; або  $R^{13}$  і  $R^{14}$  можуть об'єднані утворювати гетероциклічну групу;

$R^{15}$  вибирають з групи, що містить водень, гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-C(O)R^{15}$  і  $-C(O)NR^{13}R^{14}$ ;

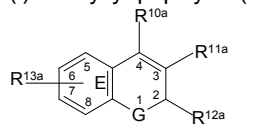
$R^{17}$  вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

$R^{19}$  вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, арил, аралкіл, гетероарил або гетероаралкіл; і

$n$  і  $\epsilon$ , незалежно, 1, 2, 3 або 4;

в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2, що вибирають з групи, яка містить:

(i) сполуку формули (II):



в якій:

$G$  вибирають з групи, що містить  $O$ ,  $S$  і  $-NR^a$ , де  $R^a$  є воднем або алкілом;

$R^{10a}$  вибирають з групи, що містить водень і арил;

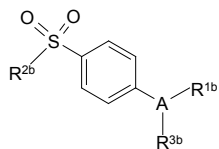
$R^{11a}$  вибирають з групи, що містить карбоксил, алкіл, аралкіл, амінокарбоніл, алкілсульфоніламінокарбоніл і алкоксикарбоніл;

$R^{12a}$  вибирають з групи, що містить галогеналкіл, алкіл, аралкіл, циклоалкіл і арил, необов'язково заміщений одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з алкілтію, нітро і алкілсульфонілу; і

$R^{13a}$  є одним або більшою кількістю радикалів, що незалежно вибирають з групи, яка містить водень, галоген, алкіл, аралкіл, алкокси, арилокси, гетероарилокси, аралкілокси, гетероаралкілокси, галогеналкіл, галогеналкокси, алкіламіно, ариламіно, аралкіламіно, гетероариламіно, гетероарилалкіламіно, нітро, аміно, аміносульфоніл, алкіламіносульфоніл, ариламіносульфоніл, гетероариламіносульфоніл, аралкіламіносульфоніл, гетероаралкіламіносульфоніл, гетероциклосульффоніл, алкілсульфоніл, гідроксіарилкарбоніл, нітроарил, необов'язково заміщений арил, необов'язково заміщений гетероарил, аралкілкарбоніл, гетероарилкарбоніл, арилкарбоніл, амінокарбоніл і алкілкарбоніл;

або  $R^{13a}$  разом з кільцем  $E$  утворюють нафтильне кільце; або

(ii) сполуку формули (III):



в якій:

A вибирають з групи, що містить частково ненасичені або ненасичені гетероциклічні і частково ненасичені або ненасичені карбоциклічні кільця;

$R^{1b}$  вибирають з групи, що містить гетероциклі, циклоалкіл, циклоалкеніл і арил, де  $R^{1b}$  є необов'язково заміщеним в придатному положенні одним або більшою кількістю радикалів, що незалежно вибирають з алкілу, галогеналкілу, ціано, карбоксилу, алкоксикарбонілу, гідроксилу, гідроксіалкілу, галогеналкокси, аміно, алкіламіно, ариламіно, нітро, алкоксіалкілу, алкілсульфінілу, галогену, алкокси і алкілтію;

$R^{2b}$  вибирають з групи, що містить метил і аміно; і  $R^{3b}$  вибирають з групи, що містить радикал, що вибирають з водню, галогену, алкілу, алкенілу, алкінілу, оксо, ціано, карбоксилу, ціаноалкілу, гетероцикліокси, алкілокси, алкілтію, алкілкарбонілу, циклоалкілу, арилу, галогеналкілу, гетероциклілу, циклоалкенілу, аралкілу, гетероцикліалкілу, ацилу, алкілтіоалкілу, гідроксіалкілу, алкоксикарбонілу, арилкарбонілу, аралкілкарбонілу, аралкенілу, алкоксіалкілу, арилтіоалкілу, арилоксіалкілу, аралкілтіоалкілу, аралкоксіалкілу, алкоксиаралкоксіалкілу, алкоксикарбоніларалкілу, амінокарбонілу, амінокарбоніларалкілу, алкіламінокарбонілу, N-ариламінокарбонілу, N-алкіл-N-ариламінокарбонілу, алкіламінокарбоніларалкілу, карбоксіалкілу, алкіламіно, N-ариламіно, N-аралкіламіно, N-алкіл-N-аралкіламіно, N-алкіл-N-ариламіно, аміноалкілу, алкіламіноалкілу, N-ариламіноалкілу, N-аралкіламіноалкілу, N-алкіл-N-аралкіламіноалкілу, N-алкіл-N-ариламіноалкілу, арилокси, аралкокси, арилтію, аралкілтію, алкілсульфінілу, алкілсульфонілу, аміносульфонілу, алкіламіносульфонілу, N-ариламіносульфонілу, арилсульфонілу і N-алкіл-N-ариламіносульфонілу; або її фармацевтично прийнятної солі.

3. Спосіб згідно з пунктом 2, де селективним інгібітором циклооксигенази-2 є сполука формули (II), де:

G вибирають з групи, що містить кисень і сірку;

$R^{11a}$  вибирають з групи, що містить карбоксил, нижчий алкіл, нижчий аралкіл і нижчий алкоксикарбоніл;

$R^{12a}$  вибирають з групи, що містить нижчий галогеналкіл, нижчий циклоалкіл і феніл; і

$R^{13a}$  є одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з групи, яка містить H, галоген, нижчий алкіл, нижчий алкокси, нижчий галогеналкіл, нижчий галогеналкокси, нижчий алкіламіно, нітро, аміно, аміносульфоніл, нижчий алкіламіносульфоніл, 5-членний гетероарилалкіламіносульфоніл, 6-членний гетероарилалкіламіносульфоніл, нижчий аралкіламіносульфоніл, 5-членний азотвмісний гетероциклосульффоніл, 6-членний азотвмісний гетероциклосульффоніл, нижчий алкілсульфоніл, необов'язково заміщений феніл, нижчий аралкілкарбоніл і нижчий алкілкарбоніл; або  $R^{13a}$  разом з кільцем E утворюють нафтил.

4. Спосіб згідно з пунктом 3, де:

$R^{11a}$  є карбоксилком;

$R^{12a}$  є нижчим галогеналкілом; і

$R^{13a}$  є одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з групи, яка містить H, галоген, нижчий алкіл, нижчий галогеналкіл, нижчий галогеналкокси, нижчий алкіламіно, аміно, аміносульфоніл, нижчий алкіламіносульфоніл, 5-членний гетероарилалкіламіносульфоніл, 6-членний гетероарилалкіламіносульфоніл, нижчий аралкіламіносульфоніл, нижчий алкілсульфоніл, 6-членний азотвмісний гетероциклосульффоніл, необов'язково заміщений феніл, нижчий аралкілкарбоніл і нижчий алкілкарбоніл; або  $R^{13a}$  разом з кільцем E утворюють нафтил.

5. Спосіб згідно з пунктом 4, де:

$R^{12a}$  вибирають з групи, що містить фторметил, хлорметил, дихлорметил, трихлорметил, пентафторетил, гептафторпропіл, дифторетил, дифторпропіл, дихлоретил, дихлорпропіл, дифторметил і трифторметил; і

$R^{13a}$  є одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з групи, яка містить водень, хлор, фтор, бром, йод, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, бутіл, ізобутіл, пентил, гексил, метокси, етокси, ізопропілокси, трет-бутилокси, трифторметил, дифторметил, трифторметокси, аміно, N,N-диметиламіно, N,N-діетиламіно, N-фенілметиламіносульфоніл, N-фенілетиламіносульфоніл, N-(2-фурилметил)аміносульфоніл, нітро, N,N-диметиламіносульфоніл, аміносульфоніл, N-метиламіносульфоніл, N-етилсульфоніл, 2,2-диметилетиламіносульфоніл, N,N-диметиламіносульфоніл, N-(2-метилпропіл)аміносульфоніл, N-морфоліносульфоніл, метилсульфоніл, бензилкарбоніл, 2,2-диметилпропілкарбоніл, фенілацетил і феніл; або  $R^{13a}$  разом з кільцем E утворюють нафтил.

6. Спосіб згідно з пунктом 5, де:

$R^{12a}$  вибирають з групи, що містить трифторметил і пентафторетил; і  $R^{13a}$  є одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з групи, яка містить водень, хлор, фтор, бром, йод, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, метокси, трифторметил, трифторметокси, N-фенілметиламіносульфоніл, N-фенілетиламіносульфоніл, N-(2-фурилметил)аміносульфоніл, N,N-диметиламіносульфоніл, N-метиламіносульфоніл, N-(2,2-диметилетил)аміносульфоніл, диметиламіносульфоніл, 2-метилпропіламіносульфоніл, N-морфоліносульфоніл, метилсульфоніл, бензилкарбоніл, і феніл; або, де  $R^{13a}$  разом з кільцем E утворюють нафтил.

7. Спосіб згідно з пунктом 2, де селективний інгібітор циклооксигенази-2 вибирають з групи, що містить:

6-хлор-2-трифторметил-2H-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;

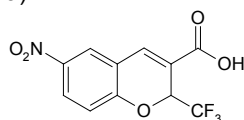
6-хлор-7-метил-2-трифторметил-2H-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;

8-(1-метилетил)-2-трифторметил-2H-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;

6-хлор-7-(1,1-диметилетил)-2-трифторметил-2H-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;

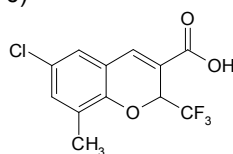
6-хлор-8-(1-метилетил)-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 2-трифторметил-3Н-нафтопіран-3-карбонову кислоту;  
 7-(1,1-диметилетил)-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-бром-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-хлор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-трифторметокси-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 5,7-дихлор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-феніл-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 7,8-диметил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6,8-біс(диметилетил)-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 7-(1-метилетил)-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 7-феніл-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-хлор-7-етил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-хлор-8-етил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-хлор-7-феніл-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6,7-дихлор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6,8-дихлор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 2-трифторметил-3Н-нафто[2,1-*b*]піран-3-карбонову кислоту;  
 6-хлор-8-метил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-хлор-6-метил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-хлор-6-метокси-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-бром-8-хлор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-бром-6-фтор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-бром-6-метил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-бром-5-фтор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-хлор-8-фтор-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-бром-8-метокси-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[[[фенілметил)аміно]сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[(диметиламіно)сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[(метиламіно)сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[(4-морфоліно)сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[(1,1-диметилетил)аміносульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;

6-[(2-метилпропіл)аміносульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-метилсульфоніл-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-хлор-6-[[[фенілметил)аміно]сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-фенілацетил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6,8-дибром-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 8-хлор-5,6-диметил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6,8-дихлор-(*S*)-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-бензилсульфоніл-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[[*N*-(2-фурилметил)аміно]сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-[[*N*-(2-фенілетил)аміно]сульфоніл]-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 6-йод-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту;  
 7-(1,1-диметилетил)-2-пентафторетил-2Н-1-бензопіран-3-карбонову кислоту  
 і 6-хлор-2-трифторметил-2Н-1-бензотіопіран-3-карбонову кислоту;  
 або її фармацевтично прийнятну сіль.  
 8. Спосіб згідно з пунктом 2, де селективним інгібітором циклооксигенази-2 є сполука, що вибирають з групи:  
 а)



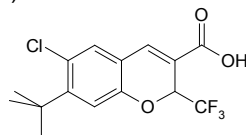
6-нітро-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

б)



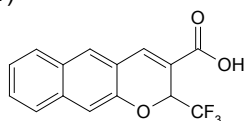
6-хлор-8-метил-2-трифторметил-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

в)



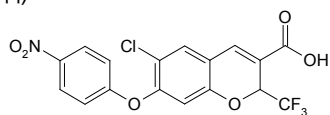
(*S*)-6-хлор-7-(1,1-диметилетил)-2-(трифторметил)-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

г)



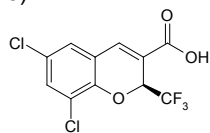
2-трифторметил-2Н-нафто[2,3-*b*]піран-3-карбонова кислота;

д)



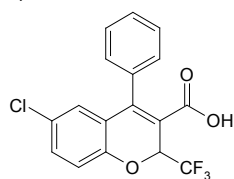
6-хлор-7-(4-нітрофенокси)-2-(трифторметил)-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

е)



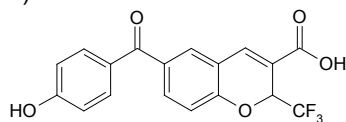
(S)-6,8-дихлор-2-(трифторметил)-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

є)



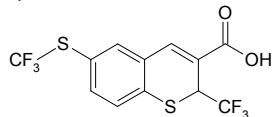
6-хлор-2-(трифторметил)-4-феніл-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

ж)



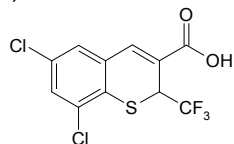
6-(4-гідроксибензоїл)-2-(трифторметил)-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота;

з)



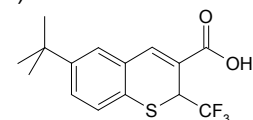
2-(трифторметил)-6-[(трифторметил)тіо]-2Н-1-бензотіопіран-3-карбонова кислота;

і)



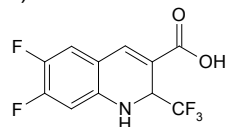
6,8-дихлор-2-трифторметил-2Н-1-бензотіопіран-3-карбонова кислота;

к)



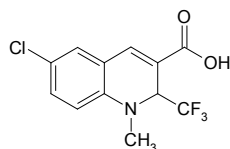
6-(1,1-диметилетил)-2-(трифторметил)-2Н-1-бензотіопіран-3-карбонова кислота;

л)



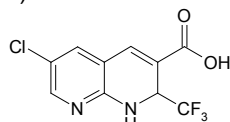
6,7-дифтор-1,2-дигідро-2-(трифторметил)-3-хінолінкарбонова кислота;

м)



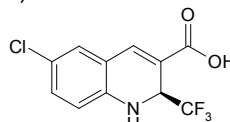
6-хлор-1,2-дигідро-1-метил-2-(трифторметил)-3-хінолінкарбонова кислота;

н)



6-хлор-2-(трифторметил)-1,2-дигідро[1,8]нафтиридин-3-карбонова кислота;

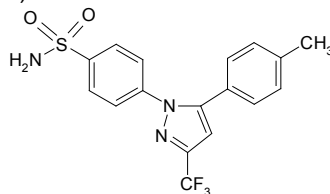
о)



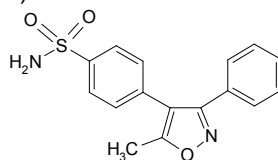
(S)-6-хлор-1,2-дигідро-2-(трифторметил)-3-хінолінкарбонова кислота; або її фармацевтично прийнятна сіль, і будь-які їх комбінації.

9. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданим селективним інгібітором циклооксигенази-2 є сполука формули (III), що вибирають з групи, яка містить:

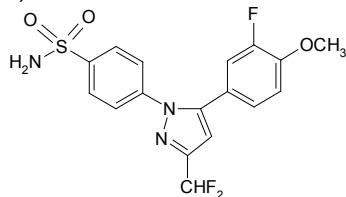
а)



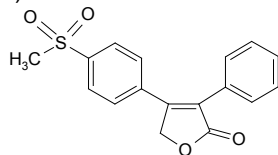
б)

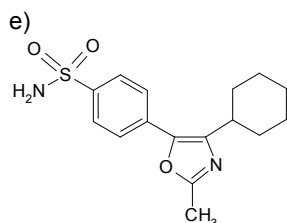
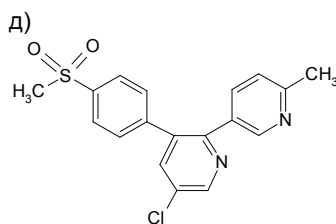


в)



г)

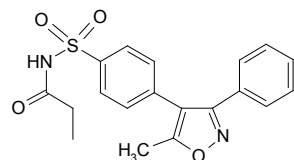




або її фармацевтично прийнятна сіль, і будь-які їх комбінації.

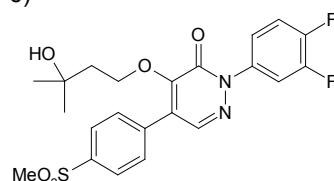
10. Спосіб згідно з пунктом 3, де згаданий селективний інгібітор циклооксигенази-2 вибирають з групи, що містить:

а)



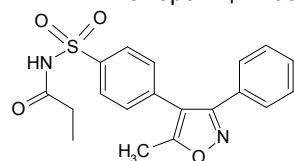
і

б)



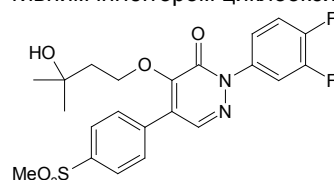
або її фармацевтично прийнятна сіль, і будь-які їх комбінації.

11. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є



або її фармацевтично прийнятна сіль.

12. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є



або її фармацевтично прийнятна сіль.

13. Спосіб згідно з пунктом 1, де селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 4-[4-(метил)сульфоніл]феніл]-3-феніл-2(5Н)фуранон або його фармацевтично прийнятна сіль.

14. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 4-[(5-

метил-3-феніл)-4-ізоксазоліл]фенілсульфонамід або його фармацевтично прийнятна сіль.

15. Спосіб згідно з пунктом 1, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 2-(6-метилпіридин-3-ил)-3-(4-метилсульфонілфеніл)-5-хлорпіридин або його фармацевтично прийнятна сіль.

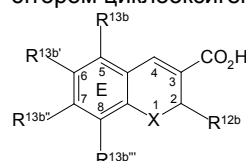
16. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 4-[5-(4-метилфеніл)-3-(трифторметил)-1Н-піразол-1-іл]фенілсульфонамід або його фармацевтично прийнятна сіль.

17. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 4-[(2-метил-4-циклогексил)-5-оксазоліл]фенілсульфонамід або його фармацевтично прийнятна сіль.

18. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є 4-[5-(3-фтор-4-метоксифеніл)-3-(дифторметил)-1Н-піразол-1-іл]-бензолсульфонамід або його фармацевтично прийнятна сіль.

19. Спосіб згідно з пунктом 2, де згаданий селективним інгібітором циклооксигенази-2 є (S)-6,8-дихлор-2-(трифторметил)-2Н-1-бензопіран-3-карбонова кислота або її фармацевтично прийнятна сіль.

20. Спосіб згідно з пунктом 2, де селективним інгібітором циклооксигенази-2 є сполука формули:



де:

X є O або S;

R<sup>12b</sup> є нижчим галогеналкілом;

R<sup>13b</sup> вибирають з групи, що містить водень і галоген;

R<sup>13b'</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, нижчий алкіл, нижчий галогеналкокси, нижчий алкокси, нижчий аралкілкарбоніл, нижчий діалкіламіносульфоніл, нижчий алкіламіносульфоніл, нижчий аралкіламіносульфоніл, нижчий гетероаралкіламіносульфоніл, 5-членний азотвмісний гетероциклосульфоніл і 6-членний азотвмісний гетероциклосульфоніл;

R<sup>13b''</sup> вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл, галоген, нижчий алкокси і арил; і

R<sup>13b'''</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, нижчий алкіл, нижчий алкокси і арил; або її фармацевтично прийнятна сіль.

21. Спосіб згідно з пунктом 20, де:

R<sup>12b</sup> вибирають з групи, що містить трифторметил і пентафторетил;

R<sup>13b</sup> вибирають з групи, що містить водень, хлор і фтор;

R<sup>13b'</sup> вибирають з групи, що містить водень, хлор, бром, фтор, йод, метил, трет-бутил, трифторметокси, метокси, бензилкарбоніл, диметиламіносульфоніл, ізопропіламіносульфоніл, метиламіносульфоніл, бензиламіносульфоніл, фенілетиламіносульфоніл, метилпропіламіносульфоніл, метилсульфоніл і морфоліносульфоніл;

$R^{13b''}$  вибирають з групи, що містить водень, метил, етил, ізопропіл, трет-бутил, хлор, метокси, діетиламіно і феніл; і

$R^{13b'''}$  вибирають з групи, що містить водень, хлор, бром, фтор, метил, етил, трет-бутил, метокси і феніл.

22. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, циклоалкіл, арил, гетероарил, гетероаліциклі, гідрокси, алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-(CH_2)_nR^{16}$  і  $-C(O)NR^8R^9$ ;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси,  $-NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ ,  $-C(O)R^{15}$ , арил, гетероарил і  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси,  $-(CO)R^{15}$ ,  $-NR^{13}R^{14}$ , арил, гетероарил,  $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$ ,  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$  і  $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ ;

$R^4$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, гідрокси, алкокси і  $-NR^{13}R^{14}$ ;

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл і  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^6$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл і  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, 3-карбоксипропіл, гетероарил,  $-C(O)R^{17}$  і  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^6$  і  $R^7$  можуть об'єднані утворювати групу, що вибирають з групи, яка містить  $-(CH_2)_4$ -,  $-(CH_2)_5$ - і  $-(CH_2)_6$ -;

$R^8$  і  $R^9$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл і арил;

$R^{10}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси, арилокси,  $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$  і  $-NR^{13}R^{14}$ ;

$R^{11}$  вибирають з групи, що містить водень і алкіл;

$R^{12}$  вибирають з групи, що містить  $-NR^{13}R^{14}$ , гідрокси,  $-C(O)R^{15}$ , арил і гетероарил;

$R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

$R^{13}$  і  $R^{14}$  можуть об'єднані утворювати групу, що вибирають з групи, яка містить  $-(CH_2)_4$ -,  $-(CH_2)_5$ -,  $-(CH_2)_2O(CH_2)_2$ - і  $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -;

$R^{15}$  вибирають з групи, що містить водень, гідрокси, алкокси і арилокси;

$R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}R^{14}$  і  $-C(O)NR^{13}R^{14}$ ;

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

і n і r є, незалежно, 1, 2, 3, або 4;

або її фармацевтично прийнятна сіль.

23. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або нижчим алкілом;

n є 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  є, незалежно, нижчим алкілом.

24. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або нижчим алкілом;

n є 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють групу, що вибирають з  $-(CH_2)_4$ -,  $-(CH_2)_5$ -,  $-(CH_2)_2O-(CH_2)_2$ - або  $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2$ -.

25. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є N-(2-диметиламіноетил)амінокарбонілом, N-(2-діетиламіноетил)-N-метиладелькарбонілом, N-(3-диметиламінопропіл)амінокарбонілом, N-(2-діетиламіноетил)амінокарбонілом, N-(2-етиладелькарбонілом), N-(3-етиладелькарбонілом)амінокарбонілом або N-(3-діетиладелькарбонілом)амінокарбонілом.

26. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є N-(2-діетиладелькарбонілом)амінокарбонілом або N-(2-етиладелькарбонілом)амінокарбонілом.

27. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є 3-піролідин-1-ілпропіладелькарбонілом, 3-морфолін-4-ілпропіладелькарбонілом, 2-піролідин-1-ілетиладелькарбонілом, 2-морфолін-4-ілетиладелькарбонілом, 2-(4-метилпіперазин-1-іл)етиладелькарбонілом, 2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етиладелькарбонілом, 3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіладелькарбонілом або 3-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)пропіладелькарбонілом.

28. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є нижчим алкілом заміщеним гідрокси, арилом, гетероаліциклілом, гетероарилом або карбокси.

29. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є 2-триазин-1-ілпропіладелькарбонілом, 2-триазин-1-ілетиладелькарбонілом, 3-імідазол-1-ілпропіладелькарбонілом, піридин-4-ілметиладелькарбонілом, 2-піридин-2-ілетиладелькарбонілом або 2-імідазол-1-ілетиладелькарбонілом.

30. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^6$  є  $COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або нижчим алкілом;

n є 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють гетероцикл.

31. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $NR(CH_2)_nR^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або нижчим алкілом;

n є 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють 5-, 6- або 7-членний гетероцикл, що містить карбонільну групу і один або два атоми азоту в кільці.

32. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де  $R^6$  є 2-(3-оксопіперазин-1-іл)етиладелькарбонілом, 2-(імідазолідин-1-іл-2-он)етиладелькарбонілом, 2-(тетрагідропіримідин-1-іл-2-он)етиладелькарбонілом, 2-(2-оксопіролідин-1-іл)етиладелькарбонілом, 3-(3-оксопіперазин-1-іл)пропіладелькарбонілом, 3-(імідазолідин-1-іл-2-он)пропіладелькарбонілом, 3-(тетрагідропіримідин-1-іл-2-он)пропіладелькарбонілом або 3-(2-оксопіролідин-1-іл)пропіладелькарбонілом.

33. Спосіб згідно з будь-яким з пунктів 22-32, де інгібітором протеїнкінази є сполука формули (I), де:

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл; і

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, алкіл, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, нижчим алкілом або арилом.

34. Спосіб згідно з пунктом 33, де:

$R^1$  є воднем, нижчим алкілом,  $-C(O)NR^8R^9$ , циклоалкілом або арилом;

$R^2$  є воднем, галогеном, нижчим алкокси, ціано, арил, або  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є воднем, арилом або алкілом;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ , арил і гетероарил; і

$R^4$  є воднем.

35. Спосіб згідно з пунктом 34, де:

$R^1$  є воднем або фенілом;

$R^2$  є воднем, хлором, бромом, фтором, метокси, етокси, фенілом, диметиламіносульфонілом, ціано, метилсульфонілом, етилсульфонілом, бензилсульфонілом, 3-хлорфеніламіносульфонілом, карбокси, метокси, аміносульфонілом, метиламіносульфонілом, феніламіносульфонілом, піридин-3-іламіносульфонілом, диметиламіносульфонілом або ізопропіламіносульфонілом;

$R^3$  є воднем, метокси, карбокси, фенілом, піридин-3-ілом, 3,4-дихлорфенілом, 2-метоксі-5-ізопропілфенілом, 4-н-бутилфенілом, 3-ізопропілфенілом; і

$R^4$  є воднем.

36. Спосіб згідно з пунктом 35, де:

$R^1$  є воднем;

$R^2$  є воднем, ціано, фтором, хлором або бромом;

$R^3$  є фенілом; і

$R^4$  є воднем.

37. Спосіб згідно з пунктом 2, де:

$R^1$  є воднем, нижчим алкілом,  $-C(O)NR^8R^9$ , циклоалкілом або арилом;

$R^2$  є воднем, галогеном, нижчим алкокси, ціано, арилом або  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є воднем, арилом або алкілом;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ , арил і гетероарил; і

$R^4$  є воднем.

38. Спосіб згідно з пунктом 2, де:

$R^1$  є воднем або метилом;

$R^2$  є воднем, ціано, хлором, фтором або бромом;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень або феніл; і  $R^4$  є воднем.

39. Спосіб згідно з пунктом 2, де  $R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де  $R^{12}$  є  $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$  або  $-N(OH)R^{13}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл.

40. Спосіб згідно з пунктом 2, де  $R^6$  є [2-(діетиламіно)-2-гідроксі]етиламінокарбонілом, 2-(N-етил-N-2-гідроксіетиламіно)етиламінокарбонілом, карбоксиметиламінокарбонілом або 2-гідроксіетиламінокарбонілом.

41. Спосіб згідно з пунктом 2, де  $R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де  $R^{12}$  є  $-N^+(O^-)NR^{13}R^{14}$  або  $-N(OH)R^{13}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл.

42. Спосіб згідно з пунктом 2, де  $R^6$  є 2-(N-гідрокси-N-етиламіно)етиламінокарбонілом або 2-[ $N^+(O^-)(C_2H_5)_2$ ]етиламінокарбонілом.

43. Спосіб згідно з пунктом 41 або 42, де:

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень або метил; і  $R^7$  вибирають з групи, що містить метил, водень або феніл.

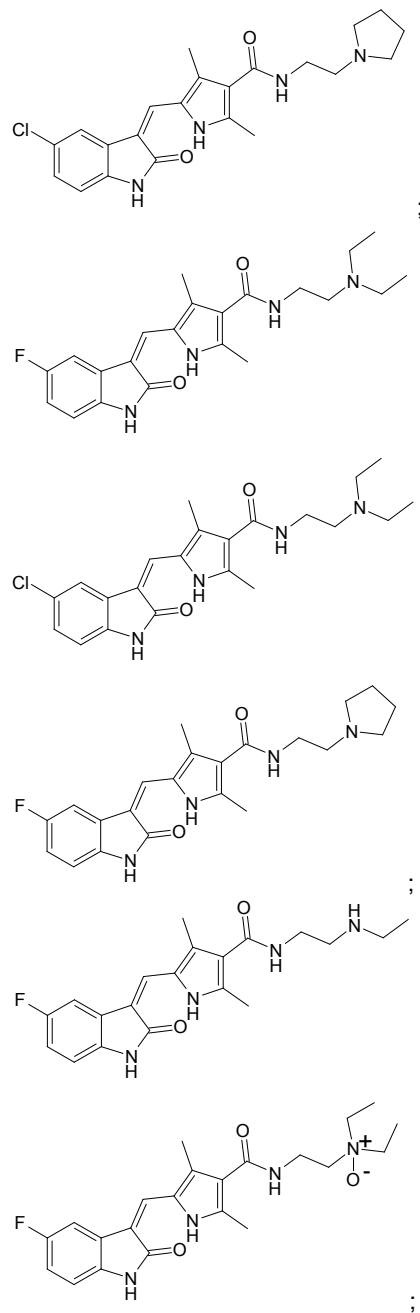
44. Спосіб згідно з пунктом 2, де:

$R^1$  є воднем;

$R^2$  є воднем, ціано, хлором, фтором або бромом;

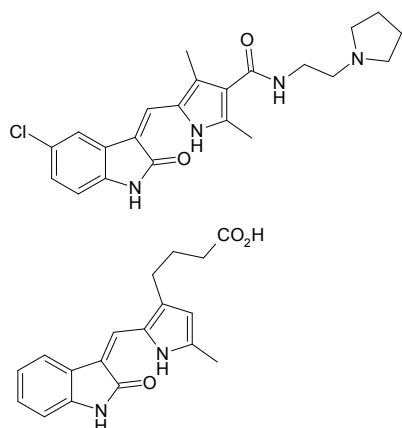
$R^3$  є воднем; і  $R^4$  є воднем.

45. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітор кінази вибирають з групи, що містить:



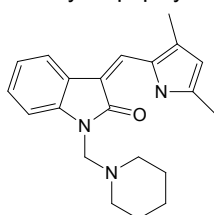


17

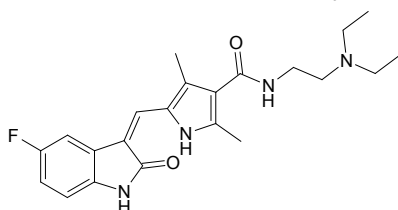


або їх L-малат.

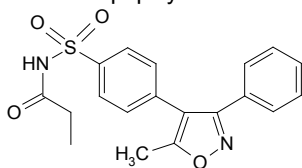
46. Спосіб згідно з пунктом 2, де інгібітором кінзи є сполука формули:



47. Спосіб лікування або попередження раку, що полягає у введенні ссавцеві, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості інгібітора протеїнкінази формули (I):

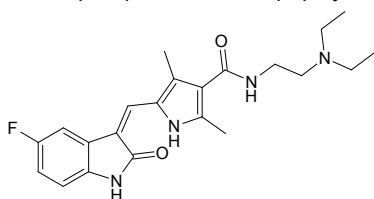


в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2 формули:



або його фармацевтично прийнятною сіллю.

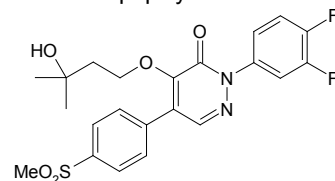
48. Спосіб лікування або попередження раку, що полягає у введенні ссавцеві, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості інгібітора протеїнкінази формули (I):



77002

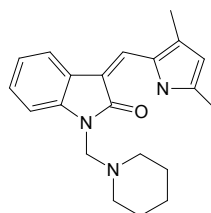
18

в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2 формули:

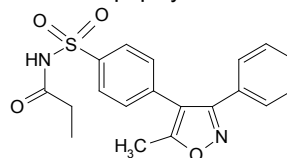


або його фармацевтично прийнятною сіллю.

49. Спосіб лікування або попередження раку, що полягає у введенні ссавцеві, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості інгібітора протеїнкінази формули (I):

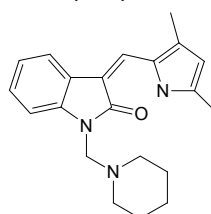


в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2 формули:

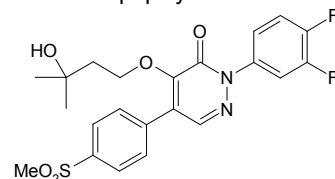


або його фармацевтично прийнятною сіллю.

50. Спосіб лікування або попередження раку, що полягає у введенні ссавцеві, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості інгібітора протеїнкінази формули (I):



в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2 формули:



або його фармацевтично прийнятною сіллю.

Представлений винахід стосується способів лікування або попередження неоплазії використовуючи інгібітори тирозинкінази в комбінації з інгібі-

торами циклооксигенази, зокрема, селективними інгібіторами циклооксигенази-2.

Неоплазма або пухлина є ненормальною нерегульованою і дезорганізованою проліферацією клітин, що ростуть. Неоплазма є злоякісною або раковою, якщо вона має властивості, що полягають у руйнівному рості, інвазійності і метастазах. Інвазійність стосується локального розповсюдження неоплазми шляхом інфільтрації або руйнуванні оточуючої тканини, що зазвичай руйнує базальні пластинки, що визначаються як межі тканин, і таким чином часто потрапляє до циркуляторної системи тіла. Метастазування зазвичай стосується розповсюдження ракових клітин через лімфоцитні або кровоносні судини. Метастазування також стосується міграції ракових клітин шляхом безпосереднього розповсюдження через серозні каверни, або субарахноїдальні або інші місця. За допомогою процесів метастазу, ракові клітини мігрують до інших областей тіла створюючи неоплазми в областях віддалених від місця початкового виникнення.

Рак на сьогоднішній день є другою причиною, що призводить до смерті в Сполучених Штатах і понад 8000000 осіб в Сполучених штатах мають рак. В 1995, рак обумовлював 23,3% всіх смертей в Сполучених Штатах, [дивіться U.S. Dept. of Health and Human Services, National Center for Health Statistics, Health United States 1996-97 and Injury Chartbook 117 (1997)].

Рак ще не повністю зрозумілий на молекулярному рівні. Відомо, що вплив на клітину карциногену, такого як віруси, деякі хімічні речовини або радіація, призводить до зміни ДНК, що інактивує "супресивний" ген або активує "онкоген". Супресивні гени є генами, що регулюють ріст, які після мутації не можуть довго контролювати ріст клітини. Онкогени спочатку є нормальними генами (так звані проонкогени), які через мутацію або альтернативних контекстів експресії стають трансформованими генами. Продукти трансформованих генів викликають неприйнятний ріст клітини. Більш ніж двадцять різних нормальних клітинних генів можуть стати онкогенами завдяки генетичній зміні. Трансформовані клітини відрізняють від нормальних клітин за багатьма ознаками, включаючи клітинну морфологію, клітинно-клітинну взаємодію, склад мембран, цитоскелетна структура, продукування протеїну, експресія гену і смертність (трансформовані клітини можуть рости нескінченно).

Рак зараз лікують за допомогою однієї або комбінації з трьох типів терапій: хірургічне втручання, радіаційне опромінення і хіміотерапія. Хірургічне втручання включає видалення ураженої тканини. Хірургічне втручання є іноді ефективним при видаленні пухлин локалізованих в певних місцях, наприклад, в груді, товстій кишці і шкірі, і воно не може бути використано при лікуванні пухлин розташованих в інших місцях, таких як хребет, і при лікуванні розосереджених неопластичних станів, таких як лейкемія.

Хіміотерапія включає руйнування реплікації клітини або метаболізму клітини. Вона використовується найбільш часто при лікуванні раку грудей, легень і раку яєчників.

Шкідливий вплив системної хіміотерапії, що використовується при лікуванні неопластичного захворювання, є найбільш страшним для пацієн-

тів, що лікуються від раку. Нудота і блювота є найбільш загальним і тяжкими сторонніми проявленнями. Іншими шкідливими сторонніми проявленнями є цитопенія, інфекція, кахексія, мукозит у пацієнтів, що одержують високі дози хіміотерапевтичних препаратів для лікування спинного мозку або радіаційної терапії; алопеція (втрата волосся); шкірні ускладнення [дивіться: M. D. Abeloff, et al: Alopecia and Cutaneous Complications. P.755-56. B Abeloff, M. D., Armitage, J. O., Lichter, A. S., i Niederhuber, J. E. (eds) Clinical Oncology. Churchill Livingstone, N.Y., 1992], для шкірних реакцій на хіміотерапевтичні агенти, такі як прурити, кропивниця і ангіоедема; неврологічні ускладнення; легеневі і серцеві ускладнення у пацієнтів, що одержують радіаційну терапію або хіміотерапію; і репродуктивні і ендокринні ускладнення.

Сторонні появлення внаслідок хіміотерапії значно впливають на якість життя пацієнту і можуть драматично впливати на згоду пацієнта на лікування.

Крім того, шкідливі сторонні проявлення викликані хіміотерапевтичними агентами зазвичай обумовлені дозолімітуючої токсичністю (DLT) при веденні цих лікарських засобів. Наприклад, мукозит, є одним з основних факторів дозолімітуючої токсичності для ряду протиракових агентів, включаючи антиметаболітичні цитотоксичні агенти 5-FU, метотрексан і протиракові антибіотики, такі як доксорубіцин. Більшість з цих хіміотерапевтично-викликаних сторонніх ефектів, якщо тяжкі, можуть призводити до госпіталізації або потребують лікування з використанням анальгетиків для пригнічення болю.

Шкідливі сторонні проявлення викликані хіміотерапевтичними агентами і радіаційною терапією набувають основної важливості для клінічного керівництва пацієнтів хворих на рак.

На даний час, вчені розглядають можливість лікування раку шляхом використання антиангіогенних агентів. Ангіогенез, як припускають, є механізмом за допомогою якого пухлини одержують необхідні поживні речовини для росту і метастазування до інших місць в тілі. Антиангіогенні агенти перетинаються з цими процесами і руйнують або контролюють пухлини.

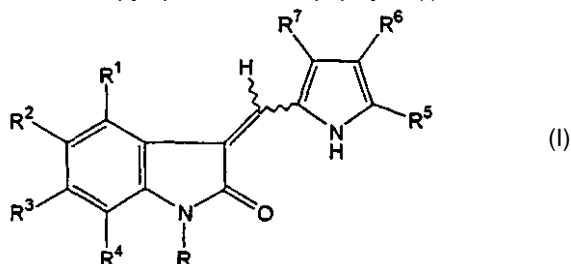
Наприклад, [патент US 5,854,205] описує виділений ендостатинний протеїн, що є інгібітором ендотеліальної проліферації клітини і ангіогенезу; [патент US 5,843,925] описує спосіб інгібування ангіогенезу і ендотеліальної проліферації клітини використовуючи 7-[заміщений аміно]-9-[(заміщений гліцілоамідо)-6-деметил-6-деокситетрациклін; [патент US 5,861,372] описує використання інгібітору ендотеліальної агрегації, ангіостатин, і він використовується при інгібуванні ангіогенезу, [PCT/GB97/00650] описує використання похідних цинноліну для одержання антиангіогенного ефекту і/або для зменшення васкулярної проникності; Tai-Ping, D. описує потенційні антиангіогенні терапії, [дивіться Trends Pharmacol. Sci. 16, No.2, 57-66, 1995; Lode, H. et al.] описує синергізм між антиангіогенними інтегрин альфа v антагоністами і протеїном злиття антитіло-цитокін, що полягає у зупинення спонтанного метастазу пухлини, [дивіться Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 96 (4), 1591-1596, 1999;

Giannis, A. et al.] описує антагоністи інтегрину і інші молекулярні сполуки, як інгібітори ангіогенезу, [дивіться New drugs in cancer therapy. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36(6), 588-590, 1997; WO 97/41,844] описує спосіб, що використовує комбінації ангіостатичних сполук для попередження і/або лікування неоваскуляризації у людей; [WO 98/22,101] описує спосіб, що використовує [піразол-1-іл]бензолсульфонаміди, як антиангіогенні агенти; і [патент US 5,792,783] описує використання 3-гетероарил-2-індолінону, що є інгібіторами протеїнази і антиангіогенними агентами, для лікування різних видів раку.

Нещодавно було повідомлено, що лікування колоректального раку з використанням селективного інгібітору циклооксигенази-2, особливо Целекоксиб®, в комбінації з інгібітором ART-2, особливо Херцептином®, є більш ефективним, ніж коли кожен з агентів використовується окремо. Відповідно, існує потреба в дослідженні нових комбінацій хіміотерапевтичних агентів, що можуть бути використані разом, що є більш ефективними, ніж коли використовуються окремо. Представлений винахід задовольняє цю потребу.

В одному з аспектів, цей винахід стосується способу лікування або попередження раку, що включає введення ссавцю, що потребує такого лікування, терапевтично ефективної кількості:

інгібітору протеїнази формули (I):



в якій:

R вибирають з групи, що містить водень, піперазин-1-ілметил, 4-метилпіперазин-1-ілметил, піперидин-1-ілметил, 2-гідроксиметилпіролідін-1-ілметил, 2-карбоксипіролідін-1-ілметил і піролідін-1-ілметил;

R<sup>1</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, арил, гетероарил, гетероаліцикліл, гідрокси, алкокси, -C(O)NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -(CO)R<sup>15</sup> і -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>R<sup>16</sup>;

R<sup>2</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, ціано, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>C(O)R<sup>14</sup>, -C(O)R<sup>15</sup>, арил, гетероарил і -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>3</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, тригалогенметил, гідрокси, алкокси, арил, гетероарил, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>14</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>C(O)R<sup>14</sup>, -NR<sup>13</sup>C(O)OR<sup>14</sup>, -(CO)R<sup>15</sup> і -SO<sub>2</sub>R<sup>19</sup>;

R<sup>4</sup> вибирають з групи, що містить водень, галоген, алкіл, заміщений алкіл, гідрокси, алкокси і -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>5</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл і -C(O)R<sup>10</sup>;

R<sup>6</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл і -C(O)R<sup>10</sup>;

R<sup>7</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл, заміщений алкіл, арил, гетероарил, -C(O)R<sup>17</sup> і -C(O)R<sup>10</sup>, при умові, що коли R є воднем, тоді, принаймні, один з R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> і R<sup>7</sup> є -C(O)R<sup>10</sup>; або

R<sup>6</sup> і R<sup>7</sup> можуть об'єднані утворювати групу, що вибирають з групи, яка містить -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>- і -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-;

R<sup>8</sup> і R<sup>9</sup> незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, заміщений алкіл і арил;

R<sup>10</sup> вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси, арилокси, -N(R<sup>11</sup>)(алкілен)<sub>n</sub>R<sup>12</sup> де алкіленова група є, необов'язково, заміщеною гідроксигрупою, і -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>11</sup> вибирають з групи, що містить водень, алкіл і заміщений алкіл;

R<sup>12</sup> вибирають з групи, що містить -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, гідрокси, -C(O)R<sup>15</sup>, арил, гетероарил, -N<sup>+</sup>(O-)R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -N(OH)R<sup>13</sup>, і -NHC(O)R<sup>18</sup> (де R<sup>18</sup> є алкілом, заміщеним алкілом, галогеналкілом або аралкілом);

R<sup>13</sup> і R<sup>14</sup> незалежно вибирають з групи, яка містить водень, алкіл, заміщений алкіл, нижчий алкіл заміщений гідроксиалкіламіно, ціаноалкіл, циклоалкіл, заміщений циклоалкіл, арил і гетероарил; або

R<sup>13</sup> і R<sup>14</sup> можуть об'єднані утворювати гетероциклічну групу;

R<sup>15</sup> вибирають з групи, що містить водень, гідрокси, алкокси і арилокси;

R<sup>16</sup> вибирають з групи, що містить гідрокси, -NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>, -C(O)R<sup>15</sup>, і -C(O)NR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>;

R<sup>17</sup> вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, циклоалкіл, арил і гетероарил;

R<sup>19</sup> вибирають з групи, що містить алкіл, заміщений алкіл, арил, аралкіл, гетероарил або гетероаралкіл; і

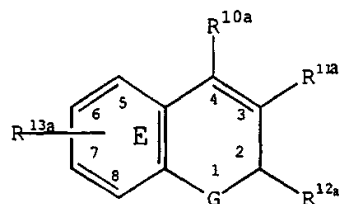
n і r є, незалежно, 1, 2, 3 або 4;

в комбінації з інгібітором циклооксигенази;

або його фармацевтично прийнятною сіллю.

Переважно, інгібітор протеїнази формули (I), що використовується в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2, що вибирають з групи, яка містить:

(i) сполуку формули (II):



в якій:

G вибирають з групи, що містить O, S, і -NR<sup>a</sup>, де R<sup>a</sup> є воднем або алкілом;

R<sup>10a</sup> вибирають з групи, що містить водень і арил;

R<sup>11a</sup> вибирають з групи, що містить карбоксил, алкіл, аралкіл, амінокарбоніл, алкілсульфоніламінокарбоніл і алкоксикарбоніл;

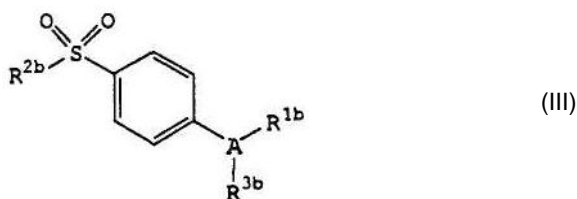
R<sup>12a</sup> вибирають з групи, що містить галогеналкіл, алкіл, аралкіл, циклоалкіл і арил, необов'язково, заміщений одним або більшою кількістю радикалів, що вибирають з алкілтію, нітро і алкілсульфонілу; і

R<sup>13a</sup> є одним або більшою кількістю радикалів, що незалежно вибирають з групи, яка містить во-

день, галоген, алкіл, аралкіл, алкокси, арилокси, гетероарилокси, аралкілокси, гетероаралкілокси, галогеналкіл, галогеналкокси, алкіламіно, ариламіно, аралкіламіно, гетероариламіно, гетероарилалкіламіно, нітро, аміно, аміноссульфоніл, алкіламіноссульфоніл, ариламіноссульфоніл, гетероариламіноссульфоніл, аралкіламіноссульфоніл, гетероаралкіламіноссульфоніл, гетероциклосульффоніл, алкілсульфоніл, гідроксиарилкарбоніл, нітроарил, необов'язково заміщений арил, необов'язково заміщений гетероарил, аралкілкарбоніл, гетероарилкарбоніл, арилкарбоніл, амінокарбоніл і алкілкарбоніл;

або  $R^{13a}$  разом з кільцем E утворюють нафтильне кільце; або

(ii) сполуку формули (III):



в якій:

A вибирають з групи, що містить частково ненасичені або ненасичені гетероциклічні і частково ненасичені або ненасичені карбоциклічні кільця;

$R^{1b}$  вибирають з групи, що містить гетероцикліл, циклоалкіл, циклоалкеніл і арил, де  $R^{1b}$  є, необов'язково, заміщеним при придатному положенні одним або більшою кількістю радикалів, що незалежно вибирають з алкілу, галогеналкілу, ціано, карбоксилу, алкоксикарбонілу, гідроксилу, гідроксиалкілу, галогеналкокси, аміно, алкіламіно, ариламіно, нітро, алкоксиалкілу, алкілсульфінілу, галогену, алкокси і алкілтіо;

$R^{2b}$  вибирають з групи, що містить метил і аміно; і

$R^{3b}$  вибирають з групи, що містить радикал, що вибирають з водню, галогену, алкілу, алкенілу, алкінілу, оксо, ціано, карбоксилу, ціаноалкілу, гетероциклілокси, алкілокси, алкілтіо, алкілкарбонілу, циклоалкілу, арилу, галогеналкілу, гетероциклілу, циклоалкенілу, аралкілу, гетероциклілалкілу, ацилу, алкілтіоалкілу, гідроксиалкілу, алкоксикарбонілу, арилкарбонілу, аралкілкарбонілу, аралкенілу, алкоксиалкілу, арилтіоалкілу, арилоксиалкілу, аралкілтіоалкілу, аралкоксиалкілу, алкоксиаралкоксиалкілу, алкоксикарбонілалкілу, амінокарбонілу, амінокарбонілалкілу, алкіламінокарбонілу, N-ариламінокарбонілу, N-алкіл-N-ариламінокарбонілу, алкіламінокарбонілалкілу, карбоксиалкілу, алкіламіно, N-ариламіно, N-аралкіламіно, N-алкіл-N-аралкіламіно, N-алкіл-N-ариламіно, аміноалкілу, алкіламіноалкілу, N-ариламіноалкілу, N-аралкіламіноалкілу, N-алкіл-N-аралкіламіноалкілу, N-алкіл-N-ариламіноалкілу, арилокси, аралкокси, арилтіо, аралкілтіо, алкілсульфінілу, алкілсульфонілу, аміноссульфонілу, алкіламіноссульфонілу, N-ариламіноссульфонілу, арилсульфонілу і N-алкіл-N-ариламіноссульфонілу;

або її фармацевтично прийнятну сіль.

Переважно, згадані вище сполуки вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить один або більшу кількість згаданих вище сполук і фар-

мацевтично прийнятний екціпієнт. Особливо, терапевтичні агенти цього винаходу можна сформувати як окремі композиції, які вводяться в один і той же час або в різний час, або терапевтичні агенти можуть складати загальну композицію.

Способи представленого винаходу корисні для лікування або попередження неоплазії, включаючи: акральна лентигозна меланома, актинічний кератоз, аденокарцинома, аденоїдноцистична карцинома, аденома, аденосаркома, аденосквамозна карцинома, астроцитарна пухлина, карцинома бартолінової залози, карцинома базальних клітин, карциноми бронхіальних залоз, капілярні карциноми, карцинома, карциносаркома, кавернозна, холонгіокарцинома, кондосаркома, папілома/карцинома хоріоїдних сплеть, світлоклітинна карцинома, цистаденома, ендодермальна синусна пухлина, ендометріальна гіперплазія, ендометріальна стромальна саркома, ендометріоїдна аденокарцинома, епендіма, епітеліоїд, саркома Евінга, фіброламельярна, фокально вузелкова гіперплазія, гастринома, пухлини ембріону, гліобластома, глюкагонома, гемангіобластоми, гемангіоендотеліома, гемангіома, гепатична аденома, гепатичний аденоматоз, гепатоцелюлярна карцинома, інсулінома, інтаепітеліальна неоплазія, інтерепітеліальна неоплазія сквамозних клітин, інвазивна карцинома сквамозних клітин, великоклітинна карцинома, лейоміосаркома, лентигозлякісна меланома, злоякісна меланома, злякісна мезотеліальні пухлини, медулобластома, медулоепітеліома, меланома, менінгеальна, мезотеліальна, метастатична карцинома, мукоепідермоїдна карцинома, нейробластома, нейроепітеліальна аденокарцинома, вузелкова меланома, овсяно-клітинна карцинома, олігодендрогліальна, остеосаркома, панкреатичний поліпептид, сосковидна серозна аденокарцинома, шишковидні клітини, пітуїтарні пухлини, плазмацитом, псевдосаркома, легенева бластома, карцинома ниркових клітин, ретинобластома, рабдоміосаркома, саркома, серозна карцинома, мілкоклітинна карцинома, карциноми м'яких тканин, соматостатин-секретуюча пухлина, сквамозна карцинома, карцинома сквамозних клітин, субмезотеліальна поверхнева генералізована меланома, недиференційована карцинома, увеальна меланома, бородавкова карцинома, вілома, добре диференційована карцинома, і пухлина Вілма.

Способи представленого винаходу забезпечують одну або більшу кількість переваг. Однією з переваг є те, що композиції, агенти і терапії представленого винаходу призначаються в комбінації з меншою дозою, і те, що доза нижча за дозу. Яка зазвичай використовується при клінічному використанні кожного окремого компоненту. Що признається окремо.

Користь від зниження дози сполук, композицій, агентів і терапій представленого винаходу, що призначаються ссавцю полягає у зменшенні дії сторонніх несприятливих проявлень обумовлених вищими дозами. Наприклад, шляхом зниження дози хіміотерапевтичного агенту, такого як метотрексат, знижується частота і складність нудоти і блювоти порівняно з тим, що спостерігається при вищих дозах. Подібні переваги спостерігаються, коли інгібітори протеїнінази представленого ви-

находу використовуються в комбінації з інгібітором циклооксигенази, зокрема, селективним інгібітором циклооксигенази-2.

Через зменшення виникнення несприятливих проявлень, покращується якість життя пацієнту, що зазнає лікування від раку. Наступними перевагами зменшення виникнення випадків несприятливих проявлень є покращення прийняття пацієнтами лікування, зменшення кількості госпіталізацій, що необхідні для лікування сторонніх проявлень і зменшення кількості призначаємих анальгетиків, що необхідні для лікування болю викликаного сторонніми проявленнями.

Іншою перевагою, що спостерігається, є більше інгібування пухлини, коли призначається інгібітор протеїнкінази в комбінації з інгібітором циклооксигенази, переважно селективним інгібітором циклооксигенази-2, ніж коли ці агенти призначаються окремо.

Представлений винахід також стосується наборів, що містять інгібітор COX-2 і інгібітор протеїнкінази формули (I).

#### Визначення

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

"Алкіл" стосується насиченого аліфатичного вуглеводневого радикалу, що включає нерозгалужені і розгалужені групи з 1-20 атомами вуглецю (коли б не приводилась область числових значень; наприклад "1-20", є встановленим тут, означає, що група, в цьому випадку алкільна група, може містити 1 атом вуглецю, 2 атоми вуглецю, 3 атоми вуглецю і т.д. до і включаючи 20 атомів вуглецю). Алкільні групи, що містять від 1 до 4 атоми вуглецю, відносять до нижчоалкільних груп. Коли згадані нижчоалкільні групи потребують замісники, такі групи відносяться до нижчоалкільних груп. Більш переважно, алкіл група є середньорозмірним алкілом, що має від 1 до 10 атомів вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, н-бутил, ізо-бутил, трет-бутил, пентил і їм подібні. Найбільш переважно, вона є нижчим алкілом, що має 1 - 4 атоми вуглецю, наприклад, метил, етил, пропіл, 2-пропіл, н-бутил, ізо-бутил або трет-бутил і їм подібні.

"Заміщений алкіл" означає алкільну групу, як визначено вище, що є заміщеною одним або більшою кількістю, більш переважно одним - трьома, навіть більш переважно одним або двома замісником(ами), що незалежно вибирають з групи, яка містить галоген, гідрокси, нижчий алкокси, арил, необов'язково, заміщений однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, арилокси, необов'язково, заміщений однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, 6-членний гетероарил, що має від 1 до 3 атомів азоту в кільці, атоми вуглецю в кільці є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або ниж-

чим алкокси, 5-членний гетероарил, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту в групі є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, 5- або 6-членна гетероаліциклічна група, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту (якщо присутні) в групі є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, меркапто, (нижчий алкіл)тіо, арилтіо, необов'язково, заміщеним однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, ціано, ацил, тіоацил, О-карбамоїл, N-карбамоїл, О-тіокарбамоїл, N-тіокарбамоїл, С-амідо, N-амідо, нітро, N-сульфонамідо, S-сульфонамідо,  $R^{18}S(O)-$ ,  $R^{18}S(O)_2-$ ,  $-C(O)OR^{18}$ ,  $R^{18}C(O)O-$  і  $-NR^{18}R^{19}$ , де  $R^{18}$  і  $R^{19}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, нижчий алкіл, тригалогенметил,  $(C_3-C_6)$ циклоалкіл, нижчий алкеніл, нижчий алкініл і арил, необов'язково, заміщений однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси.

Переважно, алкільна група є заміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з групи, яка містить гідрокси, 5- або 6-членну гетероаліциклічну групу, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту (якщо присутні) в групі є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, 5-членний гетероарил, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту в групі є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, 6-членний гетероарил, що має від 1 до 3 атомів азоту в кільці, атоми вуглецю в кільці є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю груп, переважно однією, двома або трьома групами, які є, незалежно одна від одної, галогеном, гідрокси, нижчим алкілом або нижчим алкокси, або  $-NR^{18}R^{19}$ , де  $R^{18}$  і  $R^{19}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, нижчий алкіл. Навіть більш переважно алкільна група є заміщеною одним або двома замісниками, які є, незалежно один від одного, гідрокси, диметиламіно, етиламіно, діетиламіно, дипропіламіно, піролідіно, піперидино, морфоліно, піперазіно, 4-нижчий алкілпіперазіно, феніл, імідазоліл, піридиніл, піридазиніл, піримідиніл, оксазоліл, триазиніл і їм подібні.

"Циклоалкіл" стосується 3-8 членного вуглецевого моноциклічного кільця, вуглецевого 5-членно/6-членно або 6-членно/6-членно конденсованого біциклічного кільця або багатоциклічного конденсованого кільця ("конденсована" циклічна система означає, що кожне кільце системи має спільну пару атомів вуглецю з іншим кільцем системи), де одне або більша кількість кілець може містити один або більшу кількість подвійних зв'язків, але відсутні кільця, що мають повністю кон'юговану  $\pi$ -електронну систему.

Прикладами, без обмеження, циклоалкільних груп є циклопропан, циклобутан, циклопентан, циклопентен, циклогексан, циклогексидієн, адамантан, циклогептан, циклогептатрієн і їм подібні.

"Заміщений циклоалкіл" означає циклоалкільну групу, як визначено вище, що є заміщеною одним або більшою кількістю, більш переважно одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, галоген, гідрокси, нижчий алкокси, арил, необов'язково заміщений однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, арилокси, необов'язково заміщений однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, 6-членний гетероарил, що має від 1 до 3 атомів азоту в кільці, атоми вуглецю в кільці є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, 5-членний гетероарил, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту групи є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, 5- або 6-членна гетероаліциклічна група, що має від 1 до 3 гетероатомів, що вибирають з групи, яка містить азот, кисень і сірку, атоми вуглецю і азоту (якщо присутні) в групі є, необов'язково, заміщеними однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, меркапто, (нижчий алкіл)тіо, арилтіо, необов'язково заміщений однією або більшою кількістю, переважно однією або двома групами, незалежно одна від одної, галоген, гідрокси, нижчий алкіл або нижчий алкокси, ціано, ацил, тіоацил, О-карбамоїл, N-карбамоїл, О-тіокарбамоїл, N-тіокарбамоїл, С-амідо, N-амідо, нітро, N-сульфонамідо, S-сульфонамідо,  $R^{18}S(O)-$ ,  $R^{18}S(O)_2-$ ,  $-C(O)OR^{18}$ ,  $R^{18}C(O)O-$  і  $-NR^{18}R^{19}$  є визначеними вище.

"Алкеніл" стосується нижчої алкільної групи, як тут визначено, яка складається з, принаймні, двох атомів вуглецю і, принаймні, одного вуглецево-вуглецевого подвійного зв'язка. Прикладами є, але не обмежується, етеніл, 1-пропеніл, 2-пропеніл, 1-, 2-, або 3-бутеніл і їм подібні.

"Алкініл" стосується нижчої алкільної групи, як тут визначено, яка складається з, принаймні, двох атомів вуглецю і, принаймні, одного вуглецево-

вуглецевого потрійного зв'язка. Прикладами є, але не обмежується, етиніл, 1-пропініл, 2-пропініл, 1-, 2- або 3-бутиніл і їм подібні.

"Арил" стосується вуглецевих моноциклічних або конденсованих поліциклічних (тобто, кільця які мають спільні сусідні атомами вуглецю) груп з 1 - 12 атомами вуглецю, що мають повністю кон'юговану  $\pi$ -електронну систему. Прикладами, без обмеження, арильних груп є феніл, нафталін і антраценіл. Арильна група може бути заміщена або незаміщена. Коли заміщена, заміщувальних груп переважно одна або більше, більш переважно одна, дві або три, навіть більш переважно одна або дві, і їх незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, галоген, гідрокси, нижчий алкокси, меркапто, (нижчий алкіл)тіо, ціано, ацил, тіоацил, О-карбамоїл, N-карбамоїл, О-тіокарбамоїл, N-тіокарбамоїл, С-амідо, N-амідо, нітро, N-сульфонамідо, S-сульфонамідо,  $R^{18}S(O)-$ ,  $R^{18}S(O)_2-$ ,  $-C(O)OR^{18}$ ,  $R^{18}C(O)O-$ , і  $-NR^{18}R^{19}$ , з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  визначеними вище. Переважно, арильна група є, необов'язково, заміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, тригалогеналкілу, гідрокси, меркапто, ціано, N-амідо, моно або діалкіламіно, карбоксі або N-сульфонамідо.

"Гетероарил" стосується моноциклічного або конденсованого кільця (тобто, кільця мають спільну сусідню пару атомів) з 5-12 кільцевими атомами, що містить один, два або три кільцевих гетероатомів, які вибирають з N, O або S, атоми що залишились є C, і, на додаток, що має повністю кон'юговану  $\pi$ -електронну систему. Прикладами, без обмеження, незаміщених гетероарильних груп є пірол, фуран, тіофен, імідазол, оксазол, тіазол, піразол, піридин, піримідин, хінолін, ізохінолін, пурин і карбазол. Гетероарильна група може бути заміщена або незаміщена. Коли заміщена, заміщувальних груп переважно одна або більше, більш переважно одна, дві або три, навіть більш переважно одна або дві, і їх незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, галоген, гідрокси, нижчий алкокси, меркапто, (нижчий алкіл)тіо, ціано, ацил, тіоацил, О-карбамоїл, N-карбамоїл, О-тіокарбамоїл, N-тіокарбамоїл, С-амідо, N-амідо, нітро, N-сульфонамідо, S-сульфонамідо,  $R^{18}S(O)-$ ,  $R^{18}S(O)_2-$ ,  $-C(O)OR^{18}$ ,  $R^{18}C(O)O-$  і  $-NR^{18}R^{19}$ , з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  визначеними вище. Переважно, гетероарильна група є, необов'язково, заміщена одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, тригалогеналкілу, гідрокси, меркапто, ціано, N-амідо, моно або діалкіламіно, карбоксі або N-сульфонамідо.

"Гетероаліцикліл" стосується моноциклічної або конденсованої кільцевої групи, що має кільце(я) з 5-9 кільцевими атомами, де один або два кільцевих атоми є гетероатомами, що вибирають з N, O або  $S(O)_n$  (де n є цілим числом від 0 до 2), кільцеві атоми, що залишились, є C. Кільця також можуть мати один або більшу кількість подвійних зв'язків. Однак, кільця не мають повністю кон'юговану  $\pi$ -електронну систему. Прикладами, без обмеження, незаміщених гетероаліциклічних груп є піролідіно, піперидино, піперазино, морфоліно, тіоморфоліно, гомопіперазино і їм подібні. Гетеро-

аліциклічне кільце може бути заміщеним або не-заміщеним. Коли заміщена, заміщувальних груп переважно одна або більше, більш переважно одна або дві, і їх незалежно вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, тригалогеналкіл, галоген, гідрокси, нижчий алкокси, меркапто, (нижчий алкіл)тіо, ціано, ацил, тіоацил, О-карбамоїл, N-карбамоїл, О-тіокарбамоїл, N-тіокарбамоїл, С-амідо, N-амідо, нітро, N-сульфонамідо, S-сульфонамідо,  $R^{18}S(O)-$ ,  $R^{18}S(O)_2-$ ,  $-C(O)OR^{18}$ ,  $R^{18}C(O)O-$  і  $-NR^{18}R^{19}$ , з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як визначено вище. Переважно, гетероаліциклічна група є, необов'язково, заміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, тригалогеналкілу, гідрокси, меркапто, ціано, N-амідо, моно або діалкіламіно, карбокси або N-сульфонамідо.

Переважно, гетероаліциклічна група є, необов'язково, заміщеною одним або двома замісниками, що незалежно вибирають з галогену, нижчого алкілу, тригалогеналкілу, гідрокси, меркапто, ціано, N-амідо, моно або діалкіламіно, карбокси або N-сульфонамідо.

"Тетероцикл" означає насичений циклічний радикал з 3-8 кільцевими атомами, в якому один або двома кільцеві атоми є гетероатомами, що вибирають з N, O або  $S(O)_n$  (де n є цілим числом від 0-2), атоми, що залишились, є C, де один або два атоми C можуть, необов'язково, бути замінені карбонільною групою. Гетероциклічне кільце може бути, необов'язково, заміщеним, незалежно, одним, двома або трьома замісниками, що вибирають з необов'язково заміщеного нижчого алкілу (заміщений 1 або 2 замісниками, що незалежно вибирають з карбокси або естеру), галогеналкілу, ціаноалкілу, галогену, нітро, ціано, гідрокси, алкокси, аміно, моноалкіламіно, діалкіламіно, аралкілу, гетероаралкілу,  $-COR$  (де R є алкілом) або  $-COOR$  (де R є воднем або алкілом). Більш особливо термін гетероцикліклі включає, але не обмежується, тетрагідропіраніл, 2,2-диметил-1,3-діоксолан, піперидино, N-метилпіперидин-3-іл, піперазине N-метилпіролідин-3-іл, 3-піролідино, морфоліно, тіоморфоліно, тіоморфоліно-1-оксид, тіоморфоліно-1,1-діоксид, 4-етилосикарбонілпіперазино, 3-оксопіперазино, 2-імідазолідон, 2-піролідинон, 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, естером, гідрокси, моно або діалкіламіно.

"Гідрокси" стосується  $-OH$  групи.

"Алкокси" стосується і  $-O-$ (алкіл), і  $-O-$ (циклоалкіл) групи. Прикладами є, але не обмежується, наприклад, метокси, етокси, пропокси, бутокси, циклопропілокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси і їм подібні.

"Арилокси" стосується і  $-O-$ арил, і  $-O-$ гетероарил групи, як тут визначено. Характерними прикладами є, але не обмежується, фенокси, піридинілокси, фуранілокси, тієнілокси, піримідинілокси, піразинілокси і їм подібні, і їх похідні. "Меркапто" стосується  $-SH$  групи.

"Алкілтіо" стосується і  $-S-$ алкіл, і  $-S-$ циклоалкіл групи. Характерними прикладами є, але не обме-

жується, наприклад, метилтіо, етилтіо, пропілтіо, бутилтіо, циклопропілтіо, циклобутилтіо, циклопентилтіо, циклогексилтіо і їм подібні.

"Арилтіо" стосується і  $-S-$ арил, і  $-S-$ гетероарил групи, як тут визначено. Характерними прикладами є, але не обмежується, 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, 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  $-NR^{18}R^{19}$ , гетероарил (приєднаний 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  $-NR^{18}R^{19}$  і гетероаліцикліклі (приєднаний 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  $-NR^{18}R^{19}$ . Характерними ацильними групами є, але не обмежується, 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, за винятком того, що R не може бути воднем.

"Ацетил" стосується  $-C(O)CH_3$  групи.

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

"Тригалогенметил" стосується  $-CX_3$  групи, в якій X є галогеном, як тут визначено. "Тригалогенметансульфоніл" стосується  $X_3CS(=O)_2$ -груп з X як визначено вище. "Ціано" стосується  $-C\equiv N$  групи.

"Метилендіокси" стосується  $-OCH_2O-$ , де два атоми кисню є зв'язаними з сусідніми атомами вуглецю.

"Етилендіокси" стосується  $-OCH_2CH_2O-$ , де два атоми кисню є зв'язаними з сусідніми атомами вуглецю.

"S-сульфонамідо" стосується  $-S(O)_2NR^{18}R^{19}$  групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено.

"N-сульфонамідо" стосується  $-NR^{18}S(O)_2R^{19}$  групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено.

"О-карбамоїл" група стосується  $-OC(O)NR^{18}R^{19}$  групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено.

"N-карбамоїл" стосується  $R^{18}OC(O)NR^{19}$  групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено. "О-тіокарбамоїл" стосується  $-OC(S)NR^{18}R^{19}$ -групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено.

"N-тіокарбамоїл" стосується  $R^{18}OC(S)NR^{19}$ -групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено.

"Аміно" стосується  $-NR^{18}R^{19}$  групи, в якій  $R^{18}$  і  $R^{19}$  обидва є воднями. "С-амідо" стосується  $-C(O)NR^{18}R^{19}$  групи з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  як тут визначено. "N-амідо" стосується  $R^{18}C(O)NR^{19}$ -групи, з  $R^{18}$  і  $R^{19}$  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,  $-\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CCl}_3$  і їм подібні.

"Аралкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, який є заміщеним арильною групою, як визначено вище, наприклад,  $-\text{CH}_2\text{феніл}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{феніл}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{феніл}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{феніл}$  і їм подібні і їх похідні.

"Гетероаралкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, який є заміщеним гетероарилом, наприклад,  $-\text{CH}_2\text{піридиніл}$ ,  $-(\text{CH}_2)_2\text{піримідиніл}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{імідазоліл}$ , і їм подібні і їх похідні.

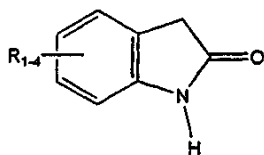
"Моноалкіламіно" означає радикал  $-\text{NHR}$ , де R є незаміщеним алкілом або циклоалкілом, як визначено вище, наприклад, метиламіно, (1-метилетил)аміно, циклогексиламіно і їм подібні.

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

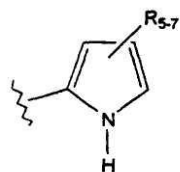
"Ціаноалкіл" означає алкіл, переважно нижчий алкіл, як визначено вище, який є заміщеним 1 або 2 ціаногрупами.

"Необов'язковий" або "необов'язково" означає, що в подальшому описана подія або умова може але завжди мати місце, і що опис включає випадки, коли подія або умова має місце і випадки, коли вона відсутня. Наприклад, "гетероцикльна група, необов'язково, заміщена алкільною групою" означає, що алкіл може бути присутнім або ні, і опис включає ситуації, коли гетероцикльна група є заміщеною алкільною групою і ситуації, коли гетероцикльна група не є заміщеною алкільною групою.

Терміни "2-індолінон", "індолін-2-он" і "2-оксіндол" використовуються по черзі стосовно молекули, що має хімічну структуру:



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



Термін "пірол заміщений 2-індолінон" і "3-піроліденіл-2-індолінон" використовуються по черзі стосовно хімічної сполуки, що має загальну формулу показану на Формулі (I).

Сполуки, що мають однакову молекулярну формулу, але різну природу і послідовність зв'язування її атомів або розташування їх атомів у просторі називаються "ізомерами". Ізомери, що відрізняються розташуванням їх атомів у просторі називаються "стереоізомерами".

Стереоізомери, що не є дзеркальними відображеннями один одного називаються "діастереомерами", а такі, що не співпадають при накладанні

дзеркальних відображень називаються "енантіомерами". Коли сполука має асиметричний центр, наприклад, до нього приєднано чотири різні групи, можливе існування пари енантіомерів. Енантіомер можна охарактеризувати за допомогою абсолютної конфігурації його асиметричного центру і описуються за допомогою правила R- і S-послідовності Кана і Прелога, або за допомогою способу в якому молекула обертає площину поляризованого світла і позначаються як правообертаючий або лівообертаючий (тобто, як (+) або (-)-ізомери відповідно). Хіральна сполука може існувати як або індивідуальний ізомер або як їх суміш. Суміш, що містить еквівалентні кількості енантіомерів, називається "рацемічною сумішшю".

Сполуки цього винаходу можуть мати один або більшу кількість асиметричних центрів; такі сполуки можуть тому одержуватись як індивідуальні (R)- або (S)-стереоізомери або як їх суміші. Наприклад, якщо  $\text{R}^6$  замісник в сполучній формулі (I) є 2-гідроксиетилом, тоді атом вуглецю, до якого приєднана гідроксигрупа є асиметричним центром і тому сполука формули (I) може існувати як (R)- або (S)-стереоізомер. Якщо не вказано інше, опис або назви окремих сполук в описі і пунктах розуміють під собою обидва окремі енантіомери і їх суміші, рацемічні або інші. Способи визначення стереохімії і розділення стереоізомерів добре відомі в цій галузі (дивіться Частина 4 "Введення в органічну хімію", 4-те видання Дж. Марч, Джон Віл'єнд Сане, Нью Йорк, 1992).

Сполуки представленого винаходу можуть проявляти явища таутомерії і структурної ізомерії. Наприклад, сполуки формули (I) описані тут можуть приймати E або Z конфігурацію навколо подвійного зв'язку, що приєднує 2-індоліноновий замісник до пірольного замісника або вони можуть бути сумішшю E і Z. Цей винахід охоплює будь-які таутомерні або структурні ізомерні форми і їх суміші, які проявляють здатність модулювати РТК, СТК і/або СТК активність і не обмежуються будь-якою одною таутомерною або структурною ізомерною формою.

Термін "фармацевтична композиція" стосується суміші одного або більшої кількості сполук описаних тут, або її фізіологічно/фармацевтично прийнятних солей або проліків, з іншими хімічними компонентами, такими як фізіологічно/фармацевтично прийнятні носії і ексіпієнти. Призначенням фармацевтичної композиції є полегшення введення сполуки в організм.

Сполуки представленого винаходу також можуть діяти як пролікарська форма. Вираз "пролікарська форма" стосується агенту, який перетворюється у вихідний лікарський засіб *in vivo*. Пролікарські засоби часто є корисними оскільки, в деяких ситуаціях, їх легше ввести ніж вихідний лікарський засіб. Вони можуть, наприклад, бути біодоступними при оральному введенні, в той час як вихідний лікарський засіб ні. Пролікарський засіб також може мати кращу розчинність в фармацевтичних композиціях ніж вихідний лікарський засіб. Прикладом, без обмеження, пролікарського засобу буде сполука представленого винаходу, яка вводиться як естер ("пролікарський засіб") для полегшення подолання клітинної мембрани, де



розчинність у воді є небажаною для рухливості, але потім метаболічно гідролізує у карбонову кислоту, діючи з іншого боку клітини, де розчинність у воді є корисною.

Наступним прикладом пролікарського засобу може бути короткий поліпептид, наприклад, без обмеження, 2-10 амінокислотний поліпептид, приєднаний через термінальну аміногрупу до карбоксигрупи сполуки цього винаходу, де поліпептид гідролізується або метаболізується *in vivo* з вивільненням активної сполуки. Пролікарські форми сполуки формули (I) знаходяться в межах цього винаходу.

Крім того, зрозуміло, що сполука формули (I) буде метаболізувати під дією ферментів в тілі організму, такого як людина утворюючи метаболіт, що може модулювати активність протеїнінази. Такі метаболіти знаходяться в межах представленого винаходу.

Як тут використовується, "фізіологічно/фармацевтично прийнятний носі" стосується носія або розріджувача, що не спричиняє значного подразнення організму і не впливає на біологічну активність і властивості сполуки, що вводиться.

Вираз "фармацевтично прийнятний екціпієнт" стосується інертного субстрату, що додається до фармацевтичної композиції для наступного полегшення введення сполуки. Прикладами, без обмеження, екціпієнтів є карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри і типи крохмалю, похідні целюлози, желатин, рослинні олії і поліетиленгліколі.

Як тут використовується, термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується тих солей, які зберігають біологічну активність і властивості вихідної сполуки. Такими солями є:

(i) кислотноадитивна сіль, яка утворюється в реакції вільної основи вихідної сполуки з неорганічними кислотами, такими як хлорводнева кислота, бромводнева кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, сірчана кислота і перхлорна 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 маленова кислота і їм подібні, переважно, хлорводневою кислотою або (L)-яблучною кислотою, такі як L-малатна сіль (2-діетиламіноетил)аміду 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1 H-пірол-3-карбонової кислоти; або

(2) солі утворені, коли кислотний протон присутній в основній сполуці або замінюється іоном металу, наприклад, іоном лужного металу, іоном лужноземельного металу; або координується з органічною основою. Прикладами іонів є алюміній, кальцій, літій, магній, калій, натрій і цинк в їх звичайних валентностях. Переважними органічними основами є протоновані третинні аміни і четвертинні амонієві катіони, включаючи частково, триметиламін, діетиламін, N,N'-дигідробензилетилдендіамін, хлорпрокаїн, холін, діетаноламін, етилендіамін, меглумін (N-метилглюкамін) і прокаїн.

"Спосіб" стосується методів, засобів, технік і процедур виконання даних задач включаючи, але не обмежується, тими методами, засобами, техніками і процедурами. Що або відомі, або легко вивести з відомих методів, засобів, технік і процедур спеціалістами в хімічній, фармацевтичній, біологічній, біохімічній і медичних галузях.

"Лікування" стосується будь-якого процесу, дії, застосування, терапії або їм подібного, де ссавець, включаючи людину, є суб'єктом медичних дій направлених на покращення стану ссавця, безпосередньо або не безпосередньо. Стосовно раку, цей термін просто означає, що ймовірність виживання суб'єкту, що зазнає лікування від раку буде збільшуватись або що один або більша кількість симптомів хвороби зникнуть. Це можна контролювати за допомогою затримки появи первинної або вторинної пухлини, уповільнення розвитку первинної або вторинної пухлини, зменшення розповсюдження первинної або вторинної пухлини, уповільнення або зменшення складності вторинних проявлень хвороби, затримки росту пухлини і регресії пухлини, між іншим.

Термін "попередження" включає або попередження появи клінічно очевидної неоплазії в цілому або попередження появи преклінічно очевидної стадії неоплазії у осіб з таким ризиком. Також призначений для охоплення цим визначенням попередження початку виникнення злоякісних клітин або затримки або обернення розвитку дозляючих клітин у злоякісні клітини. Цей термін включає профілактичне лікування ризику розвитку неоплазії.

Фраза "терапевтично ефективна" призначена для оцінки кількості кожного агенту, що буде забезпечувати покращення складності неопластичного захворювання і частоти виникнення неопластичного захворювання під час лікування кожним агентом окремо, в той час як вдається уникнути несприятливих сторонніх проявлень, що типово асоціюються з альтернативними терапіями.

Фрази "терапевтичний ефект" або "терапевтично ефективна кількість" призначені для оцінки кількості протиракового агенту необхідного для зняття до деякого ступеня одного або більшої кількості симптомів неоплазії, включаючи, але не обмежується: 1) зменшення кількості ракових клітин; 2) зменшення розміру пухлини; 3) інгібування (тобто, уповільнення до деякого ступеня, переважно зупинку) інфільтрації ракових клітин в оточуючі органи; 3) інгібування (тобто, уповільнення до деякого ступеня, переважно зупинку) метастазів пухлини; 4) інгібування, до деякого ступеня, росту пухлини; 5) зняття або зменшення, до деякого ступеня, одного або більшої кількості симптомів обумовлених розладом; і/або 6) зняття або зменшення сторонніх проявлень обумовлених введенням протиракових агентів.

Фраза "комбінаційна терапія" (або "котерапія") охоплює введення інгібітору протеїнінази і інгібітору циклооксигенази-2 як частини режиму специфічного лікування призначеного для одержання зцілюючого ефекту від спільної цих терапевтичних агентів. Зцілюючий ефект комбінації включає, але не обмежується, фармакокінетичну або фармакодинамічну співдію, що є результатом комбінування

терапевтичних агентів. Введення цих терапевтичних агентів в комбінації зазвичай проводять протягом визначеного проміжку часу (зазвичай хвилини, години, дні або тижні в залежності від вибраної комбінації). "Комбінаційна терапія" зазвичай не призначена для охоплення введення двох або більше цих терапевтичних агентів як частини режимів окремих монотерапій, що випадково і довільно утворюють комбінації представленого винаходу. "Комбінаційна терапія" призначена для охоплення введення цих терапевтичних агентів послідовно, тобто, коли кожен терапевтичний агент вводиться в різний час, також як введення цих терапевтичних агентів, або принаймні двох терапевтичних агентів, по суті, одночасно. По суті, одночасне введення може бути здійснене, наприклад, шляхом введення суб'єкту однієї капсули, що має фіксоване співвідношення кожного терапевтичного агенту або декількох окремих капсул кожного з терапевтичних агентів. Послідовне або, по суті, одночасне введення кожного терапевтичного агенту може бути здійснено будь-яким прийнятним шляхом включаючи, але не обмежується, пероральні шляхи, внутрішньовенні шляхи, внутрішньом'язові шляхи і безпосередньо абсорбцію через слизову мембрану тканин. Терапевтичні агенти можуть бути введенні тими ж самими шляхами або різними шляхами. Наприклад, перший терапевтичний агент вибраної комбінації може бути введений за допомогою внутрішньовенної ін'єкції, в той час як інші терапевтичні агенти комбінації можуть бути введені перорально. Альтернативно, наприклад, обидва терапевтичні агенти можуть бути введені перорально або обидва терапевтичні агенти можуть бути введенні за допомогою внутрішньовенної ін'єкції. Послідовність в якій вводять терапевтичні агенти не є критичною. "Комбінаційна терапія" також може використовувати введення терапевтичних агентів як описано вище в комбінації з іншими біологічно активними інгредієнтами (такими як, але не обмежується, другий і інший антинеопластичний агент) і не медикаментозні терапії (такі як, але не обмежується, хірургічне втручання або радіаційне лікування). Коли комбінаційна терапія включає радіаційне лікування, радіаційне лікування можна проводити в будь-який придатний час, при умові, що досягається зцілення від спільної дії комбінації терапевтичних агентів і радіаційного лікування. Наприклад, в прийнятних випадках, зцілення досягається, коли час між радіаційним лікуванням і введенням терапевтичних агентів досягає днів або навіть тижнів.

"Додаткова терапія" включає лікування суб'єкту агентами, що зменшують або виключають побічні проявлення обумовлені комбінаційною терапією представленого винаходу, включаючи, але не обмежується, такими агентами, наприклад, що зменшують токсичну дію протиракових агентів, наприклад, інгібітори ресорбції кістками, кардіозахисні агенти; запобігання або зменшення випадків нудоти і блювоти обумовлених хіміотерапією, радіотерапією або операцією; або зменшення випадків інфекції викликані введенням міслосупресивних протиракових лікарських засобів.

Переважні втілення

Хоча в розділі Короткий опис винаходу приведені найширші визначення, деякі сполуки формули (I), (II) і (III) приведені нижче є переважними для використання в представленому винаході.

A. Інгібітор тірозинкінази - сполуки формули (I):

(1) Переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^1$ ,  $R^3$  і  $R^4$  є воднями.

(2) Іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^1$ ,  $R^2$  і  $R^4$  є воднями.

(3) Іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^1$ ,  $R^2$  і  $R^3$  є воднями.

(4) Іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^2$ ,  $R^3$  і  $R^4$  є воднями.

(5) Іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  і  $R^4$  є воднями.

(6) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$ ,  $R^6$  або  $R^7$ , переважно  $R^5$  або  $R^6$ , більш переважно  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або нижчим алкілом, переважно воднем або метилом;

$n$  є 2, 3 або 4, переважно 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  є, незалежно, алкілом, більш переважно нижчим алкілом або  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють групу, що вибирають з  $-(\text{CH}_2)_4-$ ,  $-(\text{CH}_2)_5-$ ,  $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$  або  $-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2-$ , переважно  $R^{13}$  і  $R^{14}$  є, незалежно, водень, метил, етил, або разом утворюють морфолін-4-іл, піролідін-1-іл, піперазин-1-іл або 4-метилпіперазин-1-іл.

Більш переважно,  $R^5$  або  $R^6$  в (6) вище є N-(2-диметиламіноетил)амінокарбонілом, N-(2-етиламіноетил)-N-метиламінокарбонілом, N-(3-диметиламінопропіл)амінокарбонілом, N-(2-діетиламіноетил)амінокарбонілом, N-(3-етиламінопропіл)амінокарбонілом, N-(3-діетиламінопропіл)амінокарбонілом, 3-піролідін-1-іл-пропіламінокарбонілом, 3-морфолін-4-ілпропіламінокарбонілом, 2-піролідін-1-ілетиламінокарбонілом, 2-морфолін-4-ілетиламінокарбонілом, 2-(4-метилпіперазин-1-іл)етиламінокарбонілом, 2-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіламінокарбонілом, 2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етиламінокарбонілом або 2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)пропіламінокарбонілом, навіть більш переважно N-(2-діетиламіноетил)амінокарбонілом або N-(2-етиламіноетил)амінокарбонілом.

(7) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$ ,  $R^6$  або  $R^7$ , переважно  $R^5$  або  $R^6$ , більш переважно  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є алкілом, переважно нижчим алкілом заміщеним гідрокси, арилом, гетероарилом, гетероаліциклілом або карбокси, більш переважно метилом, етилом, пропілом або бутилом заміщеним гідрокси, арилом, гетероаліциклілом, таким як піперидин, піперазин, морфолін і їм подібні, гетероарилом або карбокси. Навіть більш переважно в межах цієї групи (7),  $R^5$  або  $R^6$  є 2-етоксикарбонілметиламінокарбонілом, карбоксиметиламінокарбонілом, 3-гідроксипропіламінокарбонілом, 2-гідроксиетиламінокарбонілом, 3-триазин-1-ілпропіламінокарбонілом, триазин-1-ілетиламінокарбонілом, 4-гідроксифенілетиламінокарбонілом, 3-імідазол-1-

ілпропіламінокарбонілом, піридин-4-  
ілметиламінокарбонілом, 2-піридин-2-  
ілетиламінокарбонілом або 2-імідазол-1-  
ілетиламінокарбонілом.

(8) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$ ,  $R^6$  або  $R^7$ , переважно  $R^5$  або  $R^6$ , більш переважно  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або алкілом, переважно воднем або метилом;

$n$  є 2, 3 або 4, переважно 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють гетероцикл, переважно 5, 6 або 7 членний гетероцикл, що містить карбонільну групу і 1 або 2 атоми азоту. Переважно,  $R^5$  або  $R^6$  є 2-(3-етоксикарбонілметилпіперазин-1-ілетиламінокарбонілом, 2-(3-оксопіперазин-1-ілетиламінокарбонілом, 2-(імідазолідин-1-іл-2-он)етиламінокарбонілом, 2-(тетрагідропіримідин-1-іл-2-он)етиламінокарбонілом, 2-(2-оксопіролідин-1-іл)етиламінокарбонілом, 3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіламінокарбонілом, 3-(3-етоксикарбонілметилпіперазин-1-іл)пропіламінокарбонілом, 3-(3-оксопіперазин-1-іл)пропіламінокарбонілом, 3-(імідазолідин-1-іл-2-он)пропіламінокарбонілом, 3-(тетрагідропіримідин-1-іл-2-он)пропіламінокарбонілом, 3-(2-оксопіролідин-1-іл)пропіламінокарбонілом, 2-(2-оксогомопіперидин-1-іл)етиламінокарбонілом або 3-(2-оксогомопіперидин-1-іл)пропіламінокарбонілом.

(9) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$ ,  $R^6$  або  $R^7$ , переважно  $R^5$  або  $R^6$ , більш переважно  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де:

(а)  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ , де:

$R^{11}$  є воднем або алкілом, переважно воднем або метилом;

$n$  є 2, 3 або 4, переважно 2 або 3; і

$R^{12}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є ціаноалкілом або  $-\text{NCOR}^3$ , де  $R^a$  є алкілом; або

(б)  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  разом утворюють гетероцикл, що не містить карбонільну групу в кільці. Переважно,  $R^5$  або  $R^6$  є 2-(2-ціаноетиламіно)етиламінокарбонілом, 2-(ацетиламіно)етиламінокарбонілом, морфолінокарбонілом, піперидин-1-ілкарбонілом, 2-ціанометиламіноетиламінокарбонілом або піперидин-1-ілкарбонілом.

(10) Іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є нижчим алкілом заміщеним гідрокси, нижчим алкілом заміщеним гідроксиалкіламіно, карбокси або  $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ , де  $R^{18}$  і  $R^{19}$  є, незалежно, воднем або нижчим алкілом, більш переважно  $R^5$  є 2-[(діетиламіно)-2-гідроксиетил]амінокарбонілом, 2-(N-етил-N-2-гідроксиетиламіно)етиламінокарбонілом, карбоксиметиламінокарбонілом або 2-(2-гідроксиетиламіно)етиламінокарбонілом.

(11) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є нижчим алкілом заміщеним гідрокси, нижчим алкілом заміщеним гідроксиалкіламіно, карбокси або  $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$ , де  $R^{18}$  і  $R^{19}$  є, незалежно, воднем або нижчим алкілом; більш переважно  $R^6$  є [2-(діетиламіно)-2-

гідрокси]етиламінокарбонілом, 2-(N-етил-N-2-гідроксиетиламіно)етиламінокарбонілом, карбоксиметиламінокарбонілом або 2-(2-гідроксиетиламіно)етиламінокарбонілом.

(12) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^5$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ , де  $R^{12}$  є  $-\text{N}^+(\text{O}^-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$  або  $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень і нижчий алкіл, переважно  $R^5$  є 2-(N-гідрокси-N-етиламіно)етиламінокарбонілом або 2-[ $\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ]етиламінокарбонілом.

(13) Ще однією іншою переважною групою сполук формули (I) є така, в яких  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , де  $R^{10}$  є  $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$ , де  $R^{12}$  є  $-\text{N}^+(\text{O}^-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$  або  $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$ , де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень і нижчий алкіл, переважно  $R^6$  є 2-(N-гідрокси-N-етиламіно)етиламінокарбонілом або 2-[ $\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ]етиламінокарбонілом.

(14) В вищезгаданих переважних групах (6)-(13), коли  $R^5$  є  $-\text{COR}^{10}$ , тоді більш переважними групами сполук є такі, 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  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, більш переважно воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно метилом, воднем або фенілом.

(15) В вищезгаданих переважних групах (6)-(13), коли  $R^5$  є  $-\text{COR}^{10}$ , тоді іншими більш переважними групами сполук є такі, в яких  $R^6$  і  $R^7$  разом утворюють  $-(\text{CH}_2)_4-$

(16) В вищезгаданих переважних групах (6)-(13), коли  $R^6$  є  $-\text{COR}^{10}$ , тоді іншими більш переважними групами сполук є такі, в яких:

$R^5$  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  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$ , де  $R^{17}$  є гідрокси, алкілом або арилом, більш переважно воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно метилом, воднем або фенілом.

(17) В межах згаданих вище переважних і більш переважних груп (6)-(16), навіть більш переважною групою сполук є така, в яких:

$R^1$  є воднем, алкілом,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^8\text{R}^9$ , циклоалкілом або арилом, переважно воднем, фенілом, 3,4-диметоксифеніламінокарбонілом, 4-метокси-3-хлорфеніламінокарбонілом, навіть більш переважно воднем або метилом, найбільш переважно воднем;

$R^2$  є ціано, воднем, галогеном, нижчим алкокси, арилом або  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є воднем, арилом або алкілом, переважно  $R^2$  є воднем, хлором, бромом, фтором, метокси, етоксифенілом, диметиламіносульфонілом, 3-

хлорфеніламіносальфонілом, карбокси, метокси, аміносальфонілом, метиламіносальфонілом, феніламіносальфонілом, піридин-3-іламіносальфонілом, диметиламіносальфонілом, ізопропіламіносальфонілом, більш переважно воднем, фтором або бромом;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ , арил, переважно арил, необов'язково, заміщений одним або двома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, галоген або нижчий алкокси, і гетероарил, переважно гетероарил, необов'язково, заміщений одним або двома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, галоген або нижчий алкокси; переважно водень, метокси, карбокси, феніл, піридин-3-іл, 3,4-дихлорфеніл, 2-метокси-5-ізопропілфеніл, 4-н-бутилфеніл, 3-ізопропілфеніл, більш переважно водень або феніл; і  $R^4$  є воднем.

(18) Іншою більш переважною групою сполук формули (I) є така, в якій:  $R^1$  є воднем, алкілом,  $-C(O)NR^8R^9$ , циклоалкілом або арилом, переважно воднем, 3,4-диметоксифеніламінокарбонілом, 4-метокси-3-хлорфеніламінокарбонілом, навіть більш переважно воднем або метилом, особливо воднем;

$R^2$  є ціано, воднем, галогеном, нижчим алкокси, арилом або  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ , де  $R^{13}$  є воднем і  $R^{14}$  є воднем, арилом або алкілом, переважно  $R^2$  є воднем, хлором, бромом, фтором, метокси, етоксис, фенілом, диметиламіносальфонілом, 3-хлорфеніламіносальфонілом, карбокси, метокси, аміносальфонілом, метиламіносальфонілом, феніламіносальфонілом, піридин-3-іламіносальфонілом, диметиламіносальфонілом, ізопропіламіносальфонілом, більш переважно воднем, фтором або бромом;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-NR^{13}C(O)R^{14}$ , арил, переважно арил, необов'язково, заміщений одним або двома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, галоген або нижчий алкокси, і гетероарил, переважно гетероарил, необов'язково, заміщений одним або двома замісниками, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, галоген або нижчий алкокси; переважно водень, метокси, карбокси, феніл, піридин-3-іл, 3,4-дихлорфеніл, 2-метокси-5-ізопропілфеніл, 4-н-бутилфеніл, 3-ізопропілфеніл, більш переважно водень або феніл; і  $R^4$  є воднем.

В межах вище згаданої переважної групи (18) більш переважною групою сполук є такі, де:

$R^5$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є як визначено в розділі Короткий опис винаходу, переважно  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$  або  $-NR^{13}R^{14}$  як визначено в розділі Короткий опис винаходу.

$R^6$  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 або арилом, більш переважно воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або кар-

бокси, навіть більш переважно метилом, воднем або фенілом.

В згаданій вище переважній групі (18) більш переважною групою сполук є такі, де:  $R^6$  є  $-COR^{10}$ , де  $R^{10}$  є як визначено в розділі Короткий опис винаходу, переважно  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$  або  $-NR^{13}R^{14}$  як визначено в розділі Короткий опис винаходу.

$R^5$  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 або арилом, більш переважно воднем, метилом, етилом, ізопропілом, н-, ізо або трет-бутилом, фенілом, бензоїлом, ацетилом або карбокси, навіть більш переважно метилом, воднем або фенілом.

(19) Іншою більш переважною групою сполук формули (I) є така, в якій:

$R^1$  і  $R^4$  є воднями;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$  і  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ ,  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ , арил і гетероарил;

$R^5$  є  $-C(O)R^{10}$ ;

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

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

Іншим переважним втіленням цього винаходу є сполуки, що мають структуру описану в (15):

$R^{10}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, нижчий алкокси і  $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ , де  $n$  є 2 або 3;

$R^{11}$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл; і,

$R^{12}$  вибирають з групи, що містить арил і  $-NR^{13}R^{14}$ .

Іншим переважним втіленням цього винаходу є сполуки, що мають структуру описану в попередніх двох параграфах,  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, нижчий алкіл, і, разом,  $-(CH_2)_4-$ ,  $-(CH_2)_5-$ ,  $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$  або  $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$ .

(20) Іншим переважним втіленням цього винаходу є сполука в якій:

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл,  $-(CH_2)_nR^{16}$  і  $-C(O)NR^8R^9$ ;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, арил і  $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл, нижчий алкокси, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{15}$ ;

$R^4$  є воднем;

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл;

$R^6$  є  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл і арил;  $R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси і  $-C(O)R^{15}$ ; і

$n$  є 2 або 3.

Переважним втіленням цього винаходу є сполука, що має структуру описану в тільки що описаному вище параграфі, в якій  $R^3$  є арилом, необо-

в'язково, заміщеним однією або більшою кількістю груп, що вибирають з групи, яка містить нижчий алкіл, нижчий алкокси і галоген.

(21) Крім того, переважним втіленням цього винаходу є сполука, в якій:

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл,  $-(CH_2)_r R^{16}$  і  $-C(O)NR^8 R^9$ ;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, арил і  $-S(O)_2 NR^{13} R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл, нижчий алкокси, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{15}$ ;

$R^4$  є воднем;

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл;

$R^6$  є  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл і арил;

$R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси і  $-C(O)R^{15}$ ; і

$r \in 2$  або  $3$ ,

$R^{10}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, нижчий алкокси,  $-NR^{13} R^{14}$  і  $-NR^{11} (CH_2)_n R^{12}$ , де  $n \in 1, 2$  або  $3$ ,  $R^{11}$  є воднем і  $R^{12}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, нижчий алкокси,  $-C(O)R^{15}$ , гетероарил і  $-NR^{13} R^{14}$ .

(22) Наступним переважним втіленням цього винаходу є сполука, що має структуру описану в попередньому параграфі вище, в якій  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, нижчий алкіл, гетероарил і, разом,  $-(CH_2)_4$ ,  $-(CH_2)_5$ ,  $-(CH_2)_2 O (CH_2)_2$  або  $-(CH_2)_2 N (CH_3) (CH_2)_2$ .

(23) Іншим переважним втіленням цього винаходу є сполука в якій:

$R^1$  є  $-C(O)NR^8 R^9$ , де  $R^8$  є воднем і  $R^9$  є арилом, необов'язково, заміщеним однією або більшою кількістю груп, що вибирають з групи, яка містить галоген, гідрокси і нижчий алкокси;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, арил і  $-S(O)_2 NR^{13} R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл, нижчий алкокси, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{15}$ ;

$R^4$  є воднем;

$R^5$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл;

$R^6$  є  $-C(O)R^{10}$ ;

$R^7$  вибирають з групи, що містить водень, нижчий алкіл і арил;

$R^{16}$  вибирають з групи, що містить гідрокси і  $-C(O)R^{15}$ ; і,

$r \in 2$  або  $3$ ,

(24) Ще одним наступним переважним втіленням цього винаходу є сполука, в якій:

$R^1$  вибирають з групи, що містить водень і нижчий алкіл;

$R^2$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, нижчий алкокси, арил,  $-C(O)R^{15}$  і  $-S(O)_2 NR^{13} R^{14}$ ;

$R^3$  вибирають з групи, що містить водень, галоген, арил, гетероарил і  $-C(O)R^{15}$ ;

$R^4$  є воднем;

$R^5$  є  $-C(O)R^{10}$ ; і,

$R^6$  і  $R^7$  разом утворюють  $-(CH_2)_4$ -групу.

В сполуках що мають структуру описану в попередньому параграфі, переважними є такі, в яких

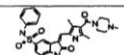
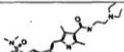
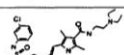
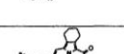
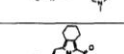
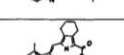
$R^{10}$  вибирають з групи, що містить гідрокси, алкокси,  $-NR^{13} R^{14}$  і  $-NH(CH_2)_n NR^{13} R^{14}$ , де  $n \in 2$  або  $3$ .

Переважним втіленням цього винаходу є такі сполуки, що мають структуру описану в двох тільки що описаних вище попередніх параграфах, де  $R^{13}$  і  $R^{14}$  незалежно вибирають з групи, яка містить водень, нижчий алкіл, і, разом,  $-(CH_2)_4$ ,  $-(CH_2)_5$ ,  $-(CH_2)_2 O (CH_2)_2$  або  $-(CH_2)_2 N (CH_3) (CH_2)_2$ . Приклади сполук формули (I) приведені в Таблиці I, нижче.

ТАБЛИЦЯ I

| Приклад | Структура | Назва  |
|---------|-----------|--|
| 1       |           | 4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонова кислота   |
| 2       |           | 4-Метил-5-(1-метил-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонова кислота                                       |
| 3       |           | 4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти метиловий естер                              |
| 4       |           | 5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти етиловий естер                        |
| 5       |           | 5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонова кислота  |
| 6       |           | 5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід          |
| 7       |           | 5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід               |
| 8       |           | 5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід                       |
| 9       |           | 5-(2-Оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід                      |
| 10      |           | 5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламід                  |
| 11      |           | 5-(2-Оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламід                 |
| 12      |           | 3-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід                      |
| 13      |           | 5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід               |
| 14      |           | 3-Метил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід              |
| 15      |           | 5-(5-Метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід            |
| 16      |           | 5-(6-Метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід            |
| 17      |           | 3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід |
| 18      |           | 3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбонової кислоти (3-діетиламіноетил)амід |

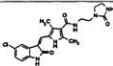
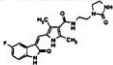
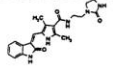
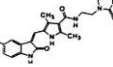
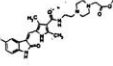


|    |  |   |
|----|--|---|
| 86 |  | 3-[(3,5-диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пирол-2-іл)метилєн]-2-оксо-2,3-дїдрол-1Н-їндол-5-сульфоновї кислоти фєнїламїд    |
| 87 |  | 5-[(5-диметилсульфамїл)-2-оксо-1,2-дїгїдрїндол-3-їлїденметїл]-2,4-дїметїл-1Н-пїрол-3-карбонувї кислоти (2-дїєтїламїноєтїл)амїд      |
| 88 |  | 5-[(5-(3-Хлорфєнїлсульфамїл)-2-оксо-1,2-дїгїдрїндол-3-їлїденметїл)-2,4-дїметїл-1Н-пїрол-3-карбонувї кислоти (2-дїєтїламїноєтїл)амїд |
| 89 |  | 3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дїгїдрїндол-3-їлїденметїл)-4,5,6,7-тетрагїдрол-2Н-їзоїндол-1-карбонувї кислоти (2-дїметїламїноєтїл)амїд        |
| 90 |  | 3-(2-Оксо-1,2-дїгїдрїндол-3-їлїденметїл)-4,5,6,7-тетрагїдрол-2Н-їзоїндол-1-карбонувї кислоти єтїловї єстер                          |
| 91 |  | 3-(4-Метїл-2-оксо-1,2-дїгїдрїндол-3-їлїденметїл)-4,5,6,7-тетрагїдрол-2Н-їзоїндол-1-карбонувї кислоти єтїловї єстер                  |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 92  |  | 3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер              |
| 93  |  | 3-(3-Етоксикарбоніл-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилен)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-карбонова кислота                |
| 94  |  | 3-(5-Метокси-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер           |
| 95  |  | 3-(2-Оксо-5-феніл-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер             |
| 96  |  | 3-(2-Оксо-5-сульфамойл-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер        |
| 97  |  | 3-(5-Метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер   |
| 98  |  | 3-(5-диметилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер |
| 99  |  | 3-(2-Оксо-5-фенілсульфамойл-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер   |
| 100 |  | 3-(6-Бром-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер              |
| 101 |  | 3-(2-Оксо-6-феніл-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер             |
| 102 |  | 3-(3-Етоксикарбоніл-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилен)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-6-карбонова кислота                |
| 103 |  | 3-(6-Метокси-2-оксо-1,2-дигідройндо-3-ілденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбоноїв кислоти етилового естер           |

|     |  |   |
|-----|--|---|
| 104 |  | 3-(5-ізопропілсульфамойл-2-оксо-1,2-дігідріндо-3-ілєнметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбонвої кислоти етиловий естер |
| 105 |  | 3-(3-(3-Диметилкарбамойл-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилєн)-2-оксо-2,3-дігідро-1Н-індол-5-карбонова кислота          |
| 106 |  | 3-(3-Диметилкарбамойл-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилєн)-2-оксо-2,3-дігідро-1Н-індол-5-карбонова кислота             |
| 107 |  | 2-Оксо-3-[3-(піролідин-1-карбоніл)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилєн]-2,3-дігідро-1Н-індол-5-карбонова кислота       |
| 108 |  | 3-[3-(Морфолін-4-карбоніл)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилєн]-2-оксо-2,3-дігідро-1Н-індол-5-карбонова кислота        |
| 109 |  | 3-[3-(Морфолін-4-карбоніл)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилєн]-2-оксо-2,3-дігідро-1Н-індол-6-карбонова кислота        |



|     |  |  |                        |
|-----|--|--|------------------------|
| 144 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(2-оксоісіндазолідин-1-іл)етил]амід                 | 428 [M+1]              |
| 145 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(2-оксоісіндазолідин-1-іл)етил]амід                 | 412 [M+1]              |
| 146 |  | 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(2-оксоісіндазолідин-1-іл)етил]амід                        | 392 [M+1]              |
| 147 |  | 5-[5-Ціано-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(2-оксоісіндазолідин-1-іл)етил]амід                | 419 [M+1]              |
| 148 |  | 4-[2-([5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоніл]аміно)етил]піперазин-1-іл)оцтової кислоти етилового естер | 558 [M+1]<br>560 [M+1] |
| 149 |  | 4-[2-([5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоніл]аміно)етил]піперазин-1-іл)оцтової кислоти етилового естер | 514 [M+1]              |



|     |  |   |                        |
|-----|--|---|------------------------|
| 170 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-метилпіперазин-1-іл)етил]амід           | 484 [M-1]<br>486 [M-1] |
| 171 |  | 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-метилпіперазин-1-іл)етил]амід                  | 406 [M-1]              |
| 172 |  | 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід              | 422 [M+1]              |
| 173 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід       | 438 [M-1]              |
| 174 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід       | 456 [M+1]              |
| 175 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід       | 498 [M-1]<br>500 [M-1] |
| 176 |  | 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амід                | 422 [M+1]              |
| 177 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амід         | 438 [M-1]              |
| 178 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амід         | 454 [M-1]              |
| 179 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амід         | 498 [M-1]<br>500 [M-1] |
| 180 |  | 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-бензилпіперазин-1-іл)етил]амід                 | 482 [M-1]              |
| 181 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-бензилпіперазин-1-іл)етил]амід          | 500 [M-1]              |
| 182 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-бензилпіперазин-1-іл)етил]амід          | 517 [M-1]              |
| 183 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-(4-бензилпіперазин-1-іл)етил]амід          | 560 [M-1]<br>562 [M-1] |
| 184 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (3-піролідін-1-іл-2-он)амід                   | 480 [M+1]              |
| 185 |  | Трифторацетат 4-[2-((5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоніл)аміно)етил]-2-оксопіперазин-1-ію | 440 [M-1]              |
| 186 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (3-піролідін-1-іл-2-он)амід                   |                        |
| 187 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (3-піролідін-1-іл-2-он)амід                   |                        |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 188 |  | 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (3-піролідин-1-іл-2-он)амід                           |
| 189 |  | 5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-піридин-2-ілетил)амід                       |
| 190 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-піридин-2-ілетил)аміду трифторацетатна сіль |
| 191 |  | 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонова кислота (2-піридин-2-ілетил)аміду гідрохлоридна сіль         |
| 192 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-піридин-2-ілетил)аміду трифторацетатна сіль |
| 193 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-етиламіноетил)амід                          |
| 194 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-аміноетил)амід                              |
| 195 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід     |
| 196 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-етил-N-гідроксисаміноетил)амід              |
| 197 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-діетиламіно-2-гідроксипетил)амід                        |
| 198 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-етил-2-(2-гідроксипетил)аміноетил]амід      |
| 199 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти [2-етил-2-(1-гідроксипетил)аміноетил]амід      |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 200 |  | 5-[5-Ціано-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-N-ацетиламіноетил)амід                 |
| 201 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (карбоксиметил)амід                        |
| 202 |  | 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонова кислота [2-(2-гідроксипетил)аміноетил]амід                    |
| 203 |  | 5-[5-Ціано-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (2-піридин-2-ілетил)аміду трифторацетат               |
| 204 |  | 5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбоної кислоти (3-піролідин-1-іл-2-он)пірол-2-ілметиліден-2-індолінон |
| 205 |  | 3-(3,5-диметилпірол-2-ілметиліден)-1-(4-метилпіперазин-1-ілметил)-2-індолінон  |
| 206 |  | 3-(3,5-диметилпірол-2-ілметиліден)-1-(піролідин-1-ілметил)-2-індолінон   |

Номера сполук відповідають номерам сполук з розділу Приклади. Тобто, синтез Сполуки 1 з Таблиці I описується в Прикладі 1. Сполуки представлені в Таблиці I приведені як приклади і не повинні розглядатись як такі, що обмежують рамки цього винаходу будь-яким чином. Додатковими інгібіторами протеїнази, що можуть бути використані в цьому способі включають 3-(3,5-диметилпірол-2-ілметиліден)-2-індолінон (su 5416); 3-[3,5-диметил-4-(2-карбоксиетил)пірол-2-ілметиліден]-2-індолінон (su 6668) і 3-[3-(2-карбоксиетил)-5-метилпірол-2-ілметиліден]-2-індолінон.

Б. Селективні інгібітори циклооксигенази-2 - сполуки формул (II) і (III): Необмежуючі приклади інгібіторів COX-2, що можуть бути використані в представленому винаході приведені в Таблицях II і III, нижче.

Таблиця II

| Сполука   | Торгова назва/ дослі-<br>дницька назва | Посилання   | Доза            |
|---|--|---|-----------------|
| 1,5-Дифеніл-3-заміщені піразоли   |  | WO 97/13755   |                 |
|   | радіцикол                              | WO 96/25928. Kwon et al.<br>(Cancer Res(1992) 52<br>6296) |                 |
|   | GB-02283745                            |   |                 |
|   | TP-72                                  | Cancer Res 1998 58  |                 |
|   |  | 4717-723  |                 |
| 1-(4-хлорбензоїл)-3-[4-(4-фтор-<br>феніл)тіазол-2-ілметил]-5-метокси-2-<br>метиліндол | A-183827.0                             |   |                 |
|   | GR-253035                              |   |                 |
| 4-(4-циклогексил-2-метилоксазол-5-іл)-2-<br>фторбензолсульфонамід                     | JTE-522                                | JP 9052882  |                 |
| 5-хлор-3-(4-(метилсульфоніл)феніл)-2-<br>(метил-5-піридиніл)піридин                   |  |   |                 |
| 2-(3,5-дифтор-феніл)-3,4-<br>(метилсульфоніл)феніл)-2-циклопентен-<br>1-он            |  |   |                 |
|   | L-768277                               |   |                 |
|   | L-783003                               |   |                 |
|   | MK-966; VIOXX ®                        | US 5968974  | 12,5-100мг п.о. |
| Індометацинові похідні індолаканової<br>кислоти                                       |  | WO 96/374679  | 200мг/кг/день   |

Продовження таблиці II

| Сполука  | Торгова назва/ дослідницька назва | Посилання  | Доза         |
|--|-----------------------------------|--|--------------|
| 1-Метилсульфоніл-4-[1,1-диметил-4-(4-фторфеніл)циклопента-2,4-дієн-3-іл]бензол     |                                   | WO 95/30656, WO 95/30652, WO 96/38418, WO 96/38442 |              |
| 4,4-диметил-2-феніл-3-[4-(метилсульфоніл)феніл]цикло-бутенон                       |                                   |  |              |
| 2-(4-метоксифеніл)-4-метил-1-(4-сульфамойлфеніл)пірол                              |                                   | EP 799823  |              |
| N-[5-(4-фторфенокси)тіофен-2-метансульфонамід                                      | RWJ-63556                         |  |              |
| 5(E)-(3,5-ди-трет-бутил-4-гідрокси)бензиліден-2-етил-1,2-ізотіазолідин-1,1-діоксид | S-2474                            | EP 595546  |              |
| 3-форміламіно-7-метилсульфоніламіно-6-фенокси-4H-1-бензопіран-4-он                 | T-614                             | DE 38/34204  |              |
| 4-(5-4-метилфеніл)-3-(трифторметил)-іH-піразол-1-іл)Бензолсульфонамід              | целекоксиб                        | US 5466823   |              |
| CS 502   | (Sankyo)                          |  |              |
| 2-[(2-хлор-6-фторфеніл)аміно]-5-метилбензоцтова кислота                            | Луміракосиб (Сох-189)             | WO 99/11605  |              |
| 5-хлор-6'-метил-3-[4-(метилсульфоніл)феніл]-2,3'-біпіридин                         | Еторикосиб (МК 663)               | WO 98/03484  |              |
|  | BMC 34070                         | US 6180651   |              |
|  | мелоксикам                        | US 4233299   | 15-30мг/день |
|  | німесулід                         | US 3840597   |              |

Таблиця III

|    |           |    |          |    |           |    |          |
|----|-----------|----|----------|----|-----------|----|----------|
| WO | 99/30721  | WO | 99/30729 | US | 5760068   | WO | 98/15528 |
| WO | 99/25695  | WO | 99/24404 | WO | 99/23087  | FR | 27/71005 |
| EP | 921119    | FR | 27/70131 | WO | 99/18960  | WO | 99/15505 |
| WO | 99/15503  | WO | 99/14205 | WO | 99/14195  | WO | 99/14194 |
| WO | 99/13799  | GB | 23/30833 | US | 5859036   | WO | 99/12930 |
| WO | 99/11605  | WO | 99/10332 | WO | 99/10331  | WO | 99/09988 |
| US | 5869524   | WO | 99/05104 | US | 5859257   | WO | 98/47890 |
| WO | 98/47871  | US | 5830911  | US | 5824699   | WO | 98/45294 |
| WO | 98/43966  | WO | 98/41511 | WO | 98/41864  | WO | 98/41516 |
| WO | 98/37235  | EP | 86/3134  | JP | 10/175861 | US | 5776967  |
| WO | 98/29382  | WO | 98/25896 | ZA | 97/04806  | EP | 84/6,689 |
| WO | 98/21195  | GB | 23/19772 | WO | 98/11080  | WO | 98/06715 |
| WO | 98/06708  | WO | 98/07425 | WO | 98/04527  | WO | 98/03484 |
| FR | 27/51966  | WO | 97/38986 | WO | 97/46524  | WO | 97/44027 |
| WO | 97/34882  | US | 5681842  | WO | 97/37984  | US | 5686460  |
| WO | 97/36863  | WO | 97/40012 | WO | 97/36497  | WO | 97/29776 |
| WO | 97/29775  | WO | 97/29774 | WO | 97/28121  | WO | 97/28120 |
| WO | 97/27181  | WO | 95/11883 | WO | 97/14691  | WO | 97/13755 |
| WO | 97/13755  | CA | 21/80624 | WO | 97/11701  | WO | 96/41645 |
| WO | 96/41626  | WO | 96/41625 | WO | 96/38418  | WO | 96/37467 |
| WO | 96/37469  | WO | 96/36623 | WO | 96/36617  | WO | 96/31509 |
| WO | 96/25405  | WO | 96/24584 | WO | 96/23786  | WO | 96/19469 |
| WO | 96/16934  | WO | 96/13483 | WO | 96/03385  | US | 5510368  |
| WO | 96/09304  | WO | 96/06840 | WO | 96/06840  | WO | 96/03387 |
| WO | 95/21817  | GB | 22/83745 | WO | 94/27980  | WO | 94/26731 |
| WO | 94/20480  | WO | 94/13635 | FR | 27/70,131 | US | 5859036  |
| WO | 99/01131  | WO | 99/01455 | WO | 99/01452  | WO | 99/01130 |
| WO | 98/57966  | WO | 98/53814 | WO | 98/53818  | WO | 98/53817 |
| WO | 98/47890  | US | 5830911  | US | 5776967   | WO | 98/22101 |
| DE | 19/753463 | WO | 98/21195 | WO | 98/16227  | US | 5733909  |
| WO | 98/05639  | WO | 97/44028 | WO | 97/44027  | WO | 97/40012 |

Продовження таблиці III

|    |          |    |          |    |          |    |          |
|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|
| WO | 97/38986 | US | 5677318  | WO | 97/34882 | WO | 97/16435 |
| WO | 97/03678 | WO | 97/03667 | WO | 96/36623 | WO | 96/31509 |
| WO | 96/25928 | WO | 96/06840 | WO | 96/21667 | WO | 96/19469 |
| US | 5510368  | WO | 96/09304 | GB | 22/83745 | WO | 96/03392 |
| WO | 94/25431 | WO | 94/20480 | WO | 94/13635 | JP | 09052882 |
| GB | 22/94879 | WO | 95/15316 | WO | 95/15315 | WO | 96/03388 |
| WO | 96/24585 | US | 5344991  | WO | 95/00501 | US | 5968974  |
| US | 5945539  | US | 5994381  | US | 6180651  |    |          |

Піразоли можна одержати за способами [описаними в WO 95/15316]. Піразоли також можна одержати за способами [описаними в WO 95/15315]. Піразоли також можна одержати за способами [описаними в WO 96/03385]. Аналоги тіофену можна одержати за способами [описаними в WO 95/00501]. Одержання аналогів тіофену також [описано в WO 94/15932]. Оксазоли можна одержати за способами [описаними в WO 95/00501]. Одержання оксазолів також [описано в WO 94/27980]. Ізоксазоли можна одержати за способами [описаними в WO 96/25405]. Імідазоли можна одержати за способами [описаними в WO 96/03388]. Одержання імідазолів також [описано в WO 96/03387]. Циклопентенові інгібітори циклооксигенази-2 можна одержати за способами [описаними в патенті US 5,344,991]. Одержання циклопентанових інгібіторів Cox-2 також [описано в WO 95/00501]. Терфеніли можна одержати за способами [описаними в WO 96/16934]. Тіазоли можна одержати за способами [описаними в WO 96/03,392]. Піридини можна одержати за способами [описаними в WO 96/03392]. Одержання піридинів також [описано в WO 96/24585].

Целекоксиб, що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу можна одержати за способом приведеним [в патенті US 5,466,823].

Валдекоксиб, що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу, можна одержати за способом приведеним [в патенті US 5,633,272].

Парекоксиб, що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу, можна одержати за способом приведеним [в патенті US 5,932,598].

Рофекоксиб, що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу можна одержати за способом приведеним [в патенті US 5,968,974].

Джапан Тобакко JTE-522, що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу, можна одержати за способом приведеним [в JP90/52,882].

Луміракоксиб (Cox-189), що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу, можна одержати за способом приведеним [в WO 99/11605].

Еторикоксиб (МК 663), що використовується в терапевтичних комбінаціях представленого винаходу, можна одержати за способом приведеним [в WO 98/03484].

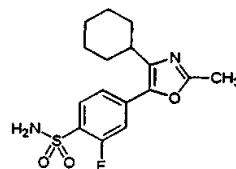
Брістоль Майєрс Сквібб ВМС 34070, що використовується в терапевтичних комбінаціях пред-

ставленого винаходу можна одержати за способом приведеним [в патенті US 6,180,651].

Перелік приведених вище в Таблицях II і III посилань, що описує різні інгібітори COX-2 придатні для використання в представленому тут винаході, і способи їх одержання, включений сюди як посилання.

Переважними інгібіторами COX-2, що можуть бути використані в представленому винаході є, але не обмежується:

C1)



JTE-522, 4-(4-циклогексил-2-метилоксазол-5-іл)-2-фторбензолсульфонамід;

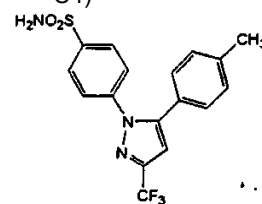
C2)

5-хлор-3-(4-(метилсульфоніл)феніл)-2-(метил-5-піридиніл)піридин;

C3)

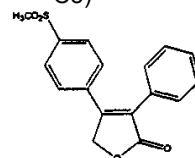
2-(3,5-дифторфеніл)-3-4-(метилсульфоніл)феніл)-2-циклопентен-1-он;

C4)



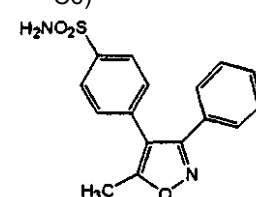
4-[5-(4-метилфеніл)-3-(трифторметил)-1Н-піразол-1-іл]-бензолсульфонамід;

C5)



рофекоксиб, 4-(4-(метилсульфоніл)феніл)-3-феніл-2(5Н)фуранон;

C6)

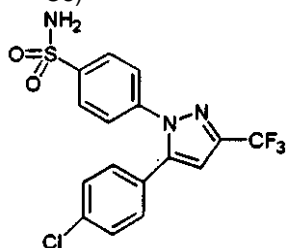


4-(5-метил-3-фенілізоксазол-4-іл)бензолсульфонамід;

C7)

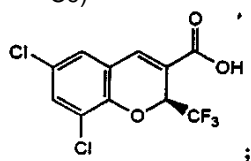
N-[[4-(5-метил-3-фенілізоксазол-4-іл)феніл]сульфоніл]пропапамід;

C8)

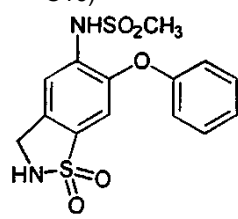


4-[5-(4-хлорфеніл)-3-(трифторметил)-1Н-піразол-1-іл]бензолсульфонамід;

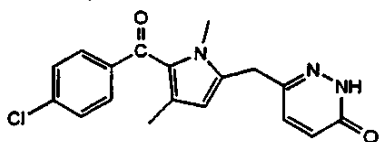
C9)



C10)

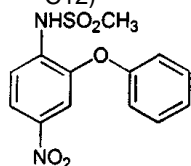


C11)



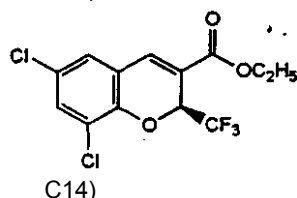
6-[[5-(4-хлорбензоїл)-1,4-диметил-1Н-пірол-2-іл]метил]-3(2Н)-піридазинон;

C12)

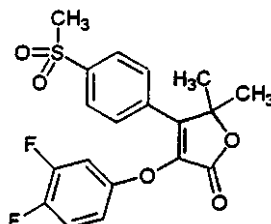


N-(4-нітро-2-феноксифеніл)іветансульфонамід;

C13)

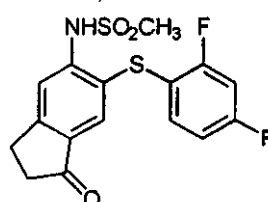


C14)



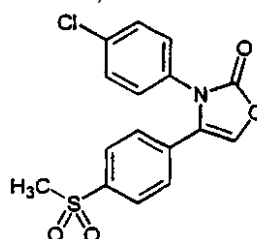
3-(3,4-дифторфенокси)-5,5-диметил-4-[4-(метилсульфоніл)феніл]-2-(5Н)фуранон;

C15)



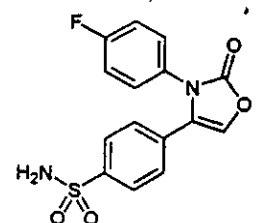
N-[6-[(2,4-дифторфеніл)тіо]-2,3-дигідро-1-оксо-1Н-інден-5-іл]метансульфонамід;

C16)



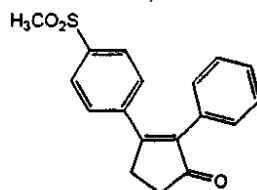
3-(4-хлорфеніл)-4-[4-(метилсульфоніл)феніл]-2-(3Н)-оксазолон;

C17)



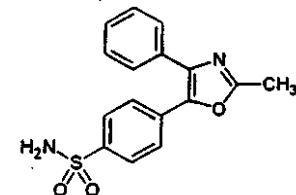
4-[3-(4-фторфеніл)-2,3-дигідро-2-оксо-4-оксазоліл]бензолсульфонамід;

C18)



3-[4-(метилсульфоніл)феніл]-2-феніл-2-циклопентен-1-он;

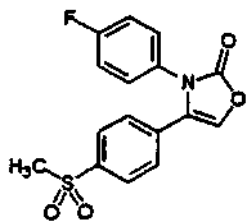
C19)



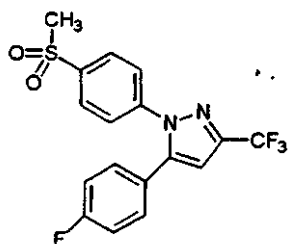
4-(2-метил-4-феніл-5-оксазоліл)бензолсульфонамід;

59

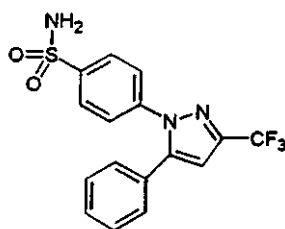
C20)



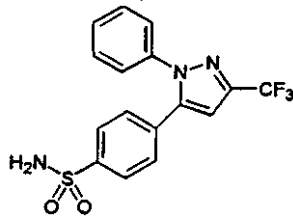
3-(4-фторфеніл)-4-[4-(метилсульфоніл)феніл]-  
2(3H)-оксазолон;  
C21)



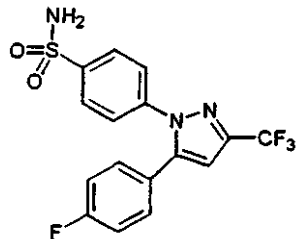
5-(4-фторфеніл)-1-[4-(метилсульфоніл)феніл]-  
3-(трифторметил)-1H-піразол;  
C22)



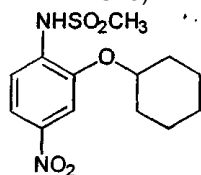
4-[5-феніл]-3-(трифторметил)-1H-піразол-  
1-іл]бензолсульфонамід;  
C23)



4-[1-феніл-3-(трифторметил)-1H-піразол-5-  
іл]бензолсульфонамід;  
C24)



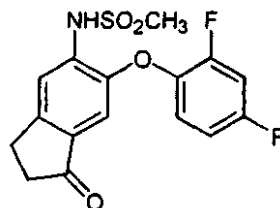
4-[5-(4-фторфеніл)-3-(трифторметил)-1H-  
піразол-1-іл]бензолсульфонамід;  
C25)



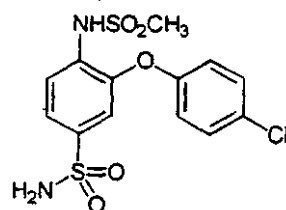
77002

60

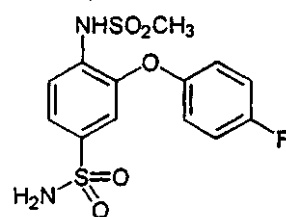
N-[2-(циклогексилокси)-4-  
нітрофеніл]метансульфонамід;  
C26)



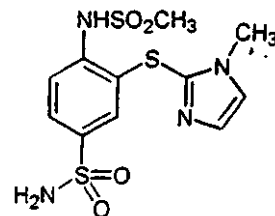
N-[6-(2,4-дифторфенокси)-2,3-дигідро-1-оксо-  
1H-інден-5-іл]метансульфонамід;  
C27)



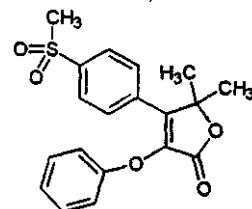
3-(4-хлорфенокси)-4-  
[(метилсульфоніл)аміно]бензолсульфонамід;  
C28)



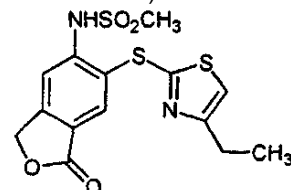
3-(4-фторфенокси)-4-  
[(метилсульфоніл)аміно]бензолсульфонамід;  
C29)



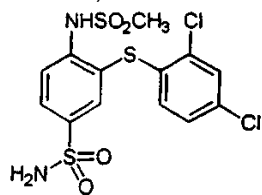
3-[(1-метил-1H-імідазол-2-іл)тіо]-4-  
[(метилсульфоніл)аміно]бензолсульфонамід;  
C30)



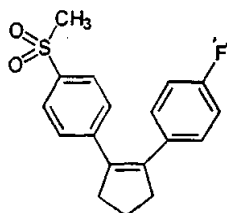
5,5-диметил-4-[4-(метилсульфоніл)феніл]-  
3-фенокси-2(5H)фуранон;  
C31)



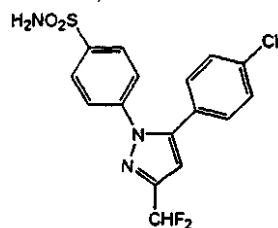
N-[6-[(4-етил-2-тиазоліл)тіо]-1,3-дигідро-1-оксо-5-ізобензофураніл]-метансульфонамід;  
(C32)



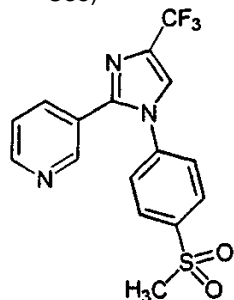
3-[(2,4-дихлорфеніл)тіо]-4-[(метилсульфоніл)аміно]бензолсульфонамід;  
(C33)



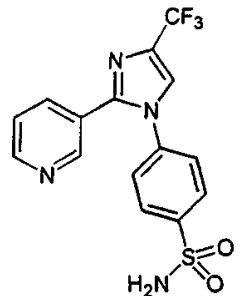
1-фтор-4-[2-[4-(метилсульфоніл)феніл]циклопентен-1-іл]бензол;  
(C34)



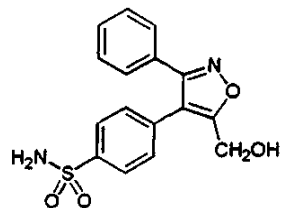
4-[5-(4-хлорфеніл)-3-(дифторметил)-1Н-піразол-1-іл]бензолсульфонамід;  
(C35)



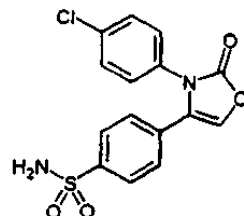
3-[1-[4-(метилсульфоніл)феніл]-4-(трифторметил)-1Н-імідазол-2-іл]піридин;  
(C36)



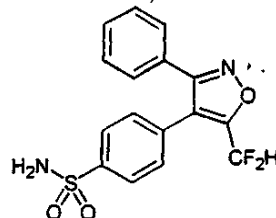
4-[2-(3-піридиніл)-4-(трифторметил)-1Н-імідазол-1-іл]бензолсульфонамід;  
(C37)



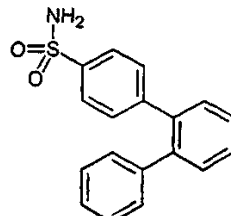
4-[5-(гідроксиметил)-3-фенілізоксазол-4-іл]бензолсульфонамід;  
(C38)



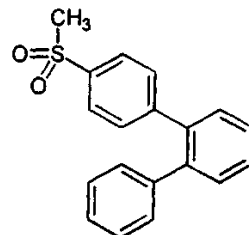
4-[3-(4-хлорфеніл)-2,3-дигідро-2-оксо-4-оксазоліл]бензолсульфонамід;  
(C39)



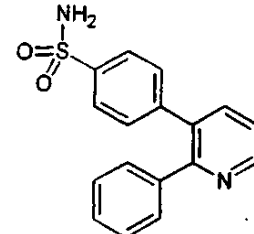
4-[5-(дифторметил)-3-фенілізоксазол-4-іл]бензолсульфонамід;  
(C40)



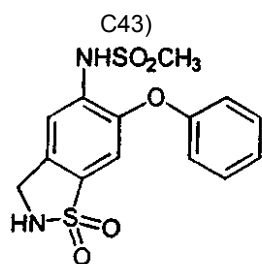
[1,1':2',1''-терфеніл]-4-сульфонамід;  
(C41)



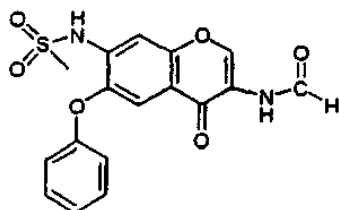
4-(метилсульфоніл)-1,1',2',1''-терфеніл;  
(C42)



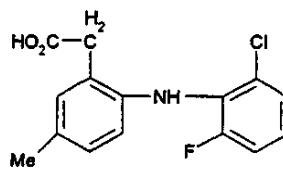
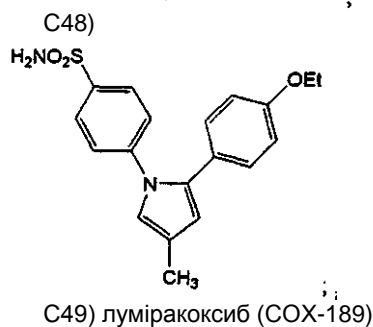
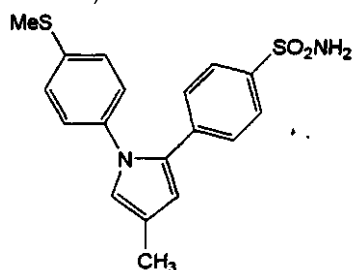
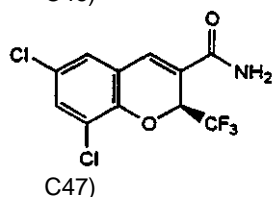
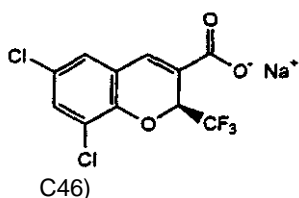
4-(2-феніл-3-піридиніл)бензолсульфонамід;



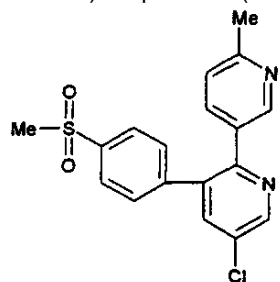
N-(2,3-дигідро-1,1-діоксидо-6-фенокси-1,2-бензізотіазол-5-іл)метансульфонамід;  
C44)



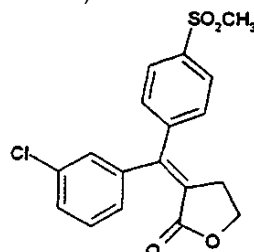
N-[3-(форміламіно)-4-оксо-6-фенокси-4Н-1-бензопіран-7-іл]метансульфонамід;  
C45)



2-[(2-хлор-6-фторфеніл)аміно]-5-метилбензоїтова кислота  
C50) еторікоксиб (МК 663)

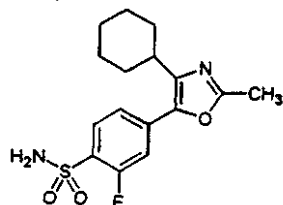


5-хлор-6'-метил-3-[4-(метилсульфоніл)феніл]-2,3'-біпіридин  
C51)BMS 34070



Більш переважні інгібітори COX-2, що можуть бути використані в представленому винаході, вибирають з групи, що містить:

I)



JTE-522, 4-(4-циклогексил-2-метилоксазол-5-іл)-2-фторбензолсульфонамід;

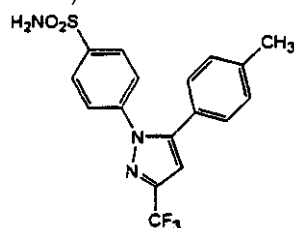
II)

5-хлор-3-(4-метилсульфоніл)феніл)-2-(метил-5-піридиніл)піридин;

III)

2-(3,5-дифторфеніл)-3-4-(метилсульфоніл)феніл)-2-циклопентен-1-он;

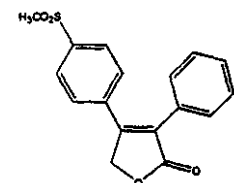
IV)



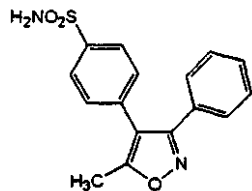
4-[5-(4-метилфеніл)-3-(трифторметил)-1Н-піразол-1-іл]-бензолсульфонамід;

V)



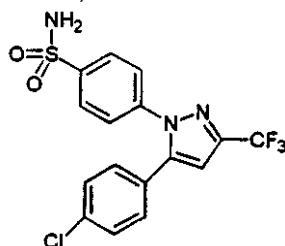


рофекоксиб, 4-(4-(метилсульфоніл)феніл)-3-феніл-2(5H)фуранон;  
(VI)

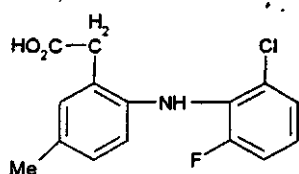


4-(5-метил-3-фенілізоксазол-4-іл)бензолсульфонамід;  
(VII)

N-[[4-(5-метил-3-фенілізоксазол-4-іл)феніл]сульфоніл]пропанамід;  
(VIII)



4-[5-(4-хлорфеніл)-3-(трифторметил)-1Н-піразол-1-іл]бензолсульфонамід; і  
(IX)



2-[(2-хлор-6-фторфеніл)аміно]-5-метилбензоїлова кислота.

Навіть ще більш переважно, інгібіторами COX-2, що можуть бути використані в представленому винаході є, але не обмежується, целекоксиб, валдекоксиб, парекоксиб, рофекоксиб, луміракоксиб і Джанпак Тобакко JTE-522.

Також включені в комбінації винаходу ізомерні форми, пролікарські форми і таутомери описаних сполук і їх фармацевтично прийнятні солі. Ілюстративні фармацевтично прийнятні солі одержують з мурашиної, оцтової, пропіонової, бурштинової, гліколевої, глюконової, молочної, яблучної, винної, лимонної, аскорбінової, глюкуронової, малеїнової, фумарової, піровіноградної, аспарагінової, глутамінової, бензойної, антранілової, мезилатної, стеаринової, саліцилової, п-гідроксибензойної, фенілоцтової, манделової, ембонової (памінової), метансульфонової, етансульфонової, бензолсульфонової, пантотенової, толуолсульфонової, 2-гідроксипантотенової, сульфанілової, циклогексиламіноссульфонової, алгінової, b-гідроксимасляної, галактаринової і галактурової кислот.

## Застосування

Сполуки представленого винаходу є інгібітором протеїнкіназ (ПК) і циклооксигенази, зокрема циклооксигенази-2, і тому є корисними при лікуванні раку.

ПКі, чия каталітична активність модулюється сполуками формули (I) цього винаходу, включають тірозинкінази, такі як рецептори тірозинкіназ (РТК), клітинні тірозинкінази (КТК) і серін-треонін кінази (СТК). РТК, що медіюється сигнальною трансдукцією, ініціюється завдяки зовнішньоклітинній взаємодії з специфічним фактором росту (ліганд), після чого рецептор димеризується, короткочасно стимулює внутрішню активність тірозинкінази і фосфорилується. Сайти зв'язування, таким чином, створюють внутрішньоклітинний сигнал що передається молекулам і призводить до утворення комплексів з рядом цитоплазматичних сигнальних молекул, що полегшує прийнятну клітинну відповідь (наприклад, клітинне ділення, метаболічні ефекти в зовнішньоклітинному мікросередовищі і ті). [Дивіться, Schlessinger and Ullrich, 1992, Neuron 9:303-391].

Було показано, що сайти фосфорилування тирозину на рецепторах гормону росту діють як високоспецифічні сайти зв'язування SH2 (src гомологія) доменів сигнальних молекул. [Fantl et al., 1992, Cell 69: 413-423, Songyang et al., 1994, Mol. Cell. Biol. 14: 2777-2785], Songyang et al., 1993, Cell 72: 767-778, і Koch et al., 1991, Science 252: 668-678]. Були ідентифіковані декілька внутрішньоклітинних субстратних протеїнів, що взаємодіють з РТК. Вони можуть бути розділені на дві принципові групи: (1) субстрати, що мають каталітичний домен, і (2) субстрати, які потребують такий домен, але які служать як адаптери і взаємодіють з каталітичноактивними молекулами. [Songyang et al., 1993, Cell 72:767-778]. Специфічність взаємодії між рецепторами і SH2 доменами їх субстратів визначається за допомогою амінокислотних залишків, що безпосередньо оточують тирозиновий залишок, що фосфорилується. Відмінності у спорідненості зв'язування між SH2 доменами і амінокислотними послідовностями, що оточують залишки фосфотирозину на окремих рецепторах безпосередньо впливає з відмінності їх профілів фосфорилування субстрату. [Songyang et al., 1993, Cell 72:767-778]. Ці спостереження дають можливість припустити, що функція кожного РТК визначається не тільки його здатністю експресування і наявністю ліганду, але також профілем шляхів передачі сигналу, що активує окремі рецептори. Таким чином, фосфорилування забезпечує важливу регуляторну стадію, яка визначає селективність вибору сигнальних шляхів завдяки специфічним рецепторам фактору росту, також як і рецепторам диференціального фактору.

СТК, є спочатку цитозольними, піддаються дії внутрішніх біохімічних процесів клітини, часто як передача відповіді до РТК. СТК включені в сигнальні процеси які ініціюють ДНК синтез і наступний мітоз, що призводить до проліферації клітини.

Таким чином, РК передає сигнал, що призводить до, через інших відповідей, клітинної проліферації, диференціації, росту і метаболізму. Ненормальна проліферація клітин може призводити

до широкого переліку розладів і захворювань, включаючи розвиток неоплазій, таких як карцинома, саркома, гліобlastома і гемангіома, розладів, таких як лейкемія, псоріаз, атеросклероз, артрит і діабетична ретинопатія і інші розлади, що залежать від неконтрольованого ангіогенезу і/або васкулогенезу.

Чітке розуміння механізму за яким сполуки цього винаходу інгібують ПКі не є необхідним для того щоб здійснити представлений винахід. Однак, таким чином не існує зв'язку з будь-яким окремим механізмом або теорією, зрозуміло, що сполуки формули (I) взаємодіють з амінокислотами в каталітичному регіоні ПКі. ПКі зазвичай мають двояку структуру, де АТФ використовується для зв'язування при розколі двох долей в регіоні, де амінокислоти зберігають серед ПКі. Інгібітори ПКі, як припускають, зв'язують за допомогою нековалентної взаємодії, такої як водневий зв'язок, сили ван дер Ваальса і іонні взаємодії в цьому ж загальному регіоні, де згаданий вище АТФ зв'язується з ПКі. Більш особливо, припускають, що 2-індоліноновий компонент сполук формули (I) зв'язується в загальному просторі нормально зайняте з аденіновим кільцем АТФ. Особливість окремої молекули для окремої РК потім може виявлятися як результат додаткової взаємодії між різними замісниками на 2-індоліноновому кільці і амінокислотними доменами специфічними до окремих ПК. Таким чином, різні замісники індолінону можуть впливати на переважне зв'язування окремих ПК. Здатність деяких сполук діяти в різних сайтах зв'язування АТФ (або іншого нуклеотиду) робить сполуки формули (I) корисними для націлювання будь-якого протеїну на такий сайт. Сполуки формули (I), описані тут, мають здатність в *in vitro* дослідженнях таких протеїнів, також як і *in vivo*, проявляти терапевтичну дію через взаємодію з такими протеїнами.

На додаток, сполуки формули (I) забезпечують терапевтичний підхід до лікування багатьох видів солідних пухлини, включаючи, але не обмежується, карциноми, саркоми включаючи саркома Капоці, еритроblastома, гліобlastома, менінгіома, астроцитома, меланома і міобlastома. Лікування або попередження несолідних пухлин, таких як лейкемія, також планується за допомогою цього винаходу. Показаннями можуть бути, але не обмежується, рак мозку, рак сечового міхура, рак яєчників, рак шлунку, рак підшлункової залози, рак прямої кишки, рак крові, рак легені і рак кістки.

Наступними прикладами, без обмеження, типів розладів, що невідповідають активності ПК, при яких сполуки представленого винаходу можуть бути корисні при попередженні, лікуванні і дослідженні, є розлади клітинної проліферації, фібротичні розлади і метаболічні розлади.

Розлади клітинної проліферації, які можуть бути попереджені, вилікувані або в подальшому досліджені за допомогою представленого винаходу є рак, проліферативні розлади кровоносних судин і проліферативні розлади мезангіальних клітин.

Вираз проліферативні розлади кровоносних судин стосується розладів обумовлених ненормальним васкулогенезом (утворення кровоносних судин) і ангіогенезом (розповсюдженням кровоно-

сних судин). В той час як васкулогенез і ангіогенез відіграють важливу роль в різних нормальних фізіологічних процесах, таких як розвиток ембріону, утворення жовтого тіла, ранозагоєння і регенерація органів, вони також відіграють центральну роль в розвитку раку, де вони призводять до утворення нових капілярів необхідних для підтримання життя пухлини. Іншими прикладами розладів проліферації кровоносних судин є артрит, при якому нові кровоносні капіляри уражають суглоби і руйнують хрящі, і окулярні захворювання, подібні діабетичній ретинопатії, при якій нові капіляри в сітківці уражають скловидне тіло, кровоточать і викликають сліпоту.

Були ідентифіковані дві структурно подібні РТК, що зв'язують VEGF з високою спорідненістю: рецептор fms-подібного тірозини (fit-1) [Shibuya et al., 1990, *Oncogene*, 5:519-524; De Vries et al., 1992, *Science*, 255:989-991] і рецептор KDR/FLK-1, також відомий як VEGF-R<sup>2</sup>. Фактор васкулярного росту ендотелію (VEGF), як повідомлялось, є специфічним мітогеном ендотеліальних клітин з *in vitro* промотуючою активністю росту ендотеліальних клітин. [Ferrara & Henzel, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161:851-858; Vaisman et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:19461-19566]. Інформація приведена [в заявці US з серійним №08/193,829, 08/038,596 і 07/975,750], чітко вказує на те, що VEGF не тільки відповідає за ендотеліальну проліферацію клітин, але також є первинним регулятором нормального і патологічного ангіогенезу. [Дивіться, Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10):699-702; Houck, et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:26031-26037].

Нормальний васкулогенез і ангіогенез відіграють важливу роль в різних фізіологічних процесах, таких як розвиток ембріону, загоєння ран, регенерація органів і репродуктивні процеси у жінок, такі як розвиток фолікул в жовтому тілі під час овуляції і ріст плаценти під час вагітності. [Folkman & Shing, 1992, *J. Biological Chem.*, 267(16):10931-34]. Неконтрольований васкулогенез і/або ангіогенез обумовлені захворюваннями, такими як діабет, також як і злоякісними солідними пухлинами, що потребують васкуляризацію для росту. [Klagsburn & Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10):699-702; Folkman, 1991, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:4-6; Weidner, et al., 1991, *New Engl. J. Med.*, 324:1-5].

Припущення про роль VEGF в ендотеліальній проліферації клітин і міграції під час ангіогенезу і васкулогенезу вказують на важливу роль рецептору KDR/FLK-1 в цих процесах. Захворювання, такі як цукровий діабет [Folkman, 198, in *Xlth Congress of Thrombosis and Haemostasis* (Verstraete, et al., eds.), pp.583-596, Leuven University Press, Leuven] і артрит, також як і ріст злоякісної пухлини можуть бути наслідком неконтрольованого ангіогенезу. [Дивіться, наприклад, Folkman, 1971, *N. Engl. J. Med.*, 285:1182-1186]. Рецептори з якими VEGF специфічно зв'язується є важливими і значними терапевтичними цілями для регулювання і модулювання васкулогенезу і/або ангіогенезу і різних складних захворювань, в які включений ненормальний клітинний ріст, що є наслідком цих процесів. [Plowman, et al., 1994, *DN&P*, 7(6):334-339]. Більш особливо, високоспецифічна роль KDR/FLK-1 ре-

цепторів в неоваскуляризації робить їх вибір цільовим для терапевтичних підходів при лікуванні раку і інших захворювань, в які включене неконтрольоване утворення кровоносних судин.

Таким чином, представлений винахід стосується сполук здатних регулювати і/або модулювати сигнальну трансдукцію тирозинкінази включаючи сигнальну трансдукцію рецептору KDR/FLK-1 для того щоб інгібувати або промотувати ангиогенез і/або васкулогенез, тобто, сполуки, що інгібують, попереджають або перешкоджають трансдукції сигналу KDR/FLK-1, коли активовані лігандами такими як VEGF. Хоча, зрозуміло, що сполуки представленого винаходу діють на рецептор або інший компонент вздовж шляху трансдукції сигналу тирозинкінази, вони також можуть безпосередньо діяти на клітини пухлини, що є результатом неконтрольованого ангиогенезу.

Хоча номенклатури людських і мишачих аналогів генеричного "flk-1" рецептору відрізняється, вони є, в багатьох відношеннях, рівноцінними. Мишачий рецептор, Flk-1, і його людський аналог, KDR, мають гомологічність послідовності 93,4% в межах внутрішньоклітинного домену. Крім того, мишачий FLK-1 зв'язує людський VEGF з тією ж самою спорідненістю як і мишачий VEGF, і відповідно, активується лігандом, що є похідним від будь-якого з видів. [Millauer et al., 1993, Cell, 72:835-846; Quinn et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533-7537]. FLK-1 також зв'язується і надалі фосфорилує тирозин субстратів ПТК людини (наприклад, PLC- $\gamma$  або p85), коли співекспресується в 293 клітинах (людські ембріональні фібробласти нірок).

Моделі, які залежать від FLK-1 рецептору, безпосередньо придатні для розуміння рецептору KDR. Наприклад, використання мишачого рецептору FLK-1 в способах, в яких визначаються сполуки, що регулюють мишачі шляхи трансдукції сигналу безпосередньо придатні для визначення сполук, які можуть бути використані для регулювання людських шляхів трансдукції сигналу, тобто, які регулюють активність, що залежить від KDR рецептору. Таким чином, хімічні сполуки визначені як інгібітори KDR/FLK-1 *in vitro*, можуть бути підтверджені в придатних *in vivo* моделях. І *in vivo* мишачі, і щурячі тваринні моделі продемонстрували відмінне значення в досліді клінічної активності агентів, що діють на KDR/FLK-1 включаючи шляхи трансдукції сигналу.

Таким чином, представлений винахід стосується сполук, що регулюють, модулюють і/або інгібують васкулогенез і/або ангиогенез, шляхом впливу на ензиматичну активність рецептору KDR/FLK-1 і заважаючи трансдукції сигналу KDR/FLK-1. Таким чином, представлений винахід стосується терапевтичного підходу лікування багатьох видів солідних пухлин, включаючи, але не обмежується, гліобластома, меланома і саркома Капосі і карциноми яєчників, легені, грудей, простати, підшлункової залози, товстої кишки і епідермоїдної карциноми. На додаток, пропонуються дані введення сполук, які інгібують KDR/FLK-1, що медіює шляхи трансдукції сигналу, також може бути використана при лікуванні гемангіоми, рестенозу і діабетичної ретинопатії.

Крім того, цей винахід стосується інгібування васкулогенезу і ангиогенезу через інші рецептор-медійовані шляхи, включаючи шлях, що включає flt-1 рецептор.

Рецептор тирозинкінази, що медіює трансдукцію сигнальну, ініціюється зовнішньоклітинною взаємодією з специфічним фактором росту (ліганд), після чого рецептор димеризується, короткочасно стимулює активність внутрішньої тирозинкінази і аутофосфорилується. Сайти зв'язування, таким чином, породжують молекули внутрішньоклітинної трансдукції сигналу, що призводить до утворення комплексів з рядом молекул цитоплазматичного сигналювання, що сприяють прийнятній клітинній відповіді, наприклад, ділення клітин і метаболічні явища у зовнішньоклітинному середовищі. [Дивіться, Schlessinger and Ullrich, 1992, Neuron, 9:1-20].

Закрита гомологія внутрішньоклітинних регіонів KDR/FLK-1 разом з тим PDGF- $\beta$  рецептор (50,3% гомологія) і/або подібним flt-1 рецептором вказує на індукцію перекривання шляхів трансдукції сигналу. Наприклад, для PDGF- $\beta$  рецептору, члени src родини [Twamley et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7696-7700], фосфатидилінозитил-3'-кіназа [Hu et al., 1992, Mol. Cell. Biol., 12:981-990], фосфоліпаза  $\text{c}\gamma$  [Kashishian & Cooper, 1993, Mol. Cell. Biol., 4:49-51], ras-GTPазу-активуючий протеїн, [Kashishian et al., 1992, EMBO J., 11:1373-1382], PTP-ID/syp [Kazlauskas et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10 90:6939-6943], Grb2 [Arvidsson et al., 1994, Mol. Cell. Biol., 14:6715-6726], і адаптер молекул Shc і Nek [Nishimura et al., 1993, Mol. Cell. Biol., 13:6889-6896], показали зв'язок з регіонами, що включають різні сайти аутофосфорилування. [Дивіться, Claesson-Welsh, 1994, Prog. Growth Factor Res., 5:37-54]. Таким чином, імовірно, що шляхи трансдукції сигналу, що активуються KDR/FLK-1, включають ras шлях [Rozakis et al., 1992, Nature, 360:689-692], PI-3'-кіназу, src-медійовані і plc $\gamma$ -медійовані шляхи. Кожен з цих шляхів може відігравати критичну роль в ангиогенних і/або васкулогенних ефектах KDR/FLK-1 в ендотеліальних клітинах. Відповідно, ще один наступний аспект цього винаходу стосується використання органічних сполук описаних тут для модулювання ангиогенезу і васкулогенезу, також як і процесів, що контролюють ці шляхи.

Навпаки, розлади, що залежать від зменшення, звуження або закупорювання кровоносних судин, такі як рестеноз, також охоплюються і можуть бути лікувані або попереджені за допомогою способів цього винаходу.

Вираз фібротичні розлади стосується ненормального утворення зовнішньоклітинних матриць. Прикладами фібротичних розладів є цироз печінки і розлади проліферації мезангіальних клітин. Цироз печінки характеризується підвищенням компоненту зовнішньоклітинного матриксу, що призводить до утворення рубців на печінці. Збільшення зовнішньоклітинного матриксу, що призводить до утворення рубців на печінці, також може бути наслідок вірусної інфекції, такою як гепатит. Ліпоцити відіграють основну роль у цирозі печінки. Іншими фібротичними розладами є атеросклероз.

Вираз розлади проліферації мезангіальних клітин стосується розладів, що зводяться до ненормальної проліферації мезангіальних клітин. Розладами мезангіальної проліферації є різні захворювання нирок у людей, такі як гломерулонефрит, діабетична нефропатія і злоякісний нефросклероз, також як і розлади, такі як синдром тромботичної мікроангіопатії, відторгнення трансплантату і гломерулопатія. PTK PDGFR втягнуті в підтримання проліферації мезангіальних клітин. [Floege et al., 1993, *Kidney International* 43:47S-54S].

Багато видів раку є розладами проліферації клітин і, як було зазначено раніше, ПК пов'язані з розладами проліферації клітин. Таким чином, не було сюрпризом, що ПК, такі як, наприклад, члени PTK родини пов'язані з розвитком раку. Деякі з цих рецепторів, подібні EGFR [Tuzi et al., 1991, *Br. J. Cancer* 63:227-233, Torp et al., 1992, *APMIS* 100:713-719] HER2/neu [Slamon et al., 1989, *Science* 244:707-712] і PDGF-R [Kumabe et al., 1992, *Онкоген*, 7:627-633] надмірно експресуються в багатьох пухлинах і/або персистентно активуються аутокринними петлями. Факт, було показано, що в найбільш звичайних і тяжких видах раку надмірно експресується рецептор [Akbasak and Suner-Akbasak et al., 1992, *J. Neurol. Sci.*, 111:119-133, Dickson et al., 1992, *Cancer Treatment Res.* 61:249-273, Korc et al., 1992, *J. Clin. Invest.* 90:1352-1360] і аутокринна петля [Lee і Donoghue, 1992, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070, Korc et al., *supra*, Akbasak і Suner-Akbasak et al., *supra*]. Наприклад, EGFR пов'язаний з карциномою сквамозних клітин, астроцитомою, гліобластомою, раком голови і шиї, раком легень і раком сечового міхура. HER2 пов'язаний з раком грудей, раком яєчників, шлунку, легень, підшлункової залози і раком сечового міхура. PDGFR пов'язаний з гліобластомою і меланою, також як і раком легень, яєчників і простати. PTK c-met також пов'язаний з утворенням злоякісної пухлини. Наприклад, c-met пов'язаний з, серед інших видів раку, колоректальним раком, раком щитовидної залози, підшлункової залози, шлунку і гепатоцелюлярною карциномою і лімфою. Додатково, c-met зв'язаний з лейкемією. Надмірна експресія c-met гену також визначається у пацієнтів з хворобою Ходжкінса і хворобою Буркиттса.

IGF-IR, на додаток до втягнення в підтримання живлення і діабету типу-II, також пов'язаний з деякими типами видів раку. Наприклад, IGF-I втягнутий як аутокринний стимулятор росту деяких типів пухлин, наприклад, карциномні клітини раку грудей людини [Arteaga et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1418-1423] і клітини малої пухлини легень [Macauley et al., 1990, *Cancer Res.*, 50:2511-2517]. Крім того, IGF-I, в той час як повністю втягнуті в нормальний ріст і диференціацію нервової системи, також виступають аутокринним стимулятором гліоми людини. [Sandberg-Nordqvist et al., 1993, *Cancer Res.* 53:2475-2478]. Важливість IGF-IR і його лігандів в проліферації клітин також підтверджується тим фактом, що багато типів клітин в культурі (фібробласти, епітеліальні клітини, клітини гладких м'язів, Т-лімфоцити, міелоїдні клітини, хондроцити і остеобласти (стволові клітини кісткового мозку)) стимулюються до росту IGF-I. [Goldring and Goldring, 1991, *Eukaryotic Gene Expression*, 1:301-326].

Baserga і Coppola запропонували, що IGF-IR відіграють центральну роль в механізмі трансформації і, як такі, можуть бути переважною ціллю для терапевтичного втручання для широкого спектру злоякісних утворень у людини. [Baserga, 1995, *Cancer Res.*, 55:249-252, Baserga, 1994, *Cell* 79:927-930, Coppola et al., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:4588-4595].

СТК втягнута в багато типів раку включаючи, винятково, рак грудей [Cance, et al, *Int. J. Cancer*, 54:571-77 (1993)].

Близькість між ненормальною активністю ПК і захворюванням не обмежується раком. Наприклад, PTK поєднують з такими захворюваннями як псоріаз, цукровий діабет, ендометріоз, ангіогенез, розвиток атероматозної плями, хвороба Альцгеймера, рестеноз, хвороба вон Хіррель-Ліндаи, епідермальна гіперпроліферація, нейродегенеративні захворювання, вікозалежна макулярна дегенерація і гемангіома. Наприклад, EGFR вказує на кореняльне і дермальне загоснення рани. Дефекти в інсулін-R і IGF-1R вказують на цукровий діабет типу-II. Більша кореляція між специфічністю PTK і її терапевтичними показаннями приведена в [Plowman et al., 1994, *DN&P* 7:334-339].

Як зазначалось раніше, не тільки PTK, але і КТК включають, але не обмежуються, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, bik, hck, fgr і yrk [огляд Bolen et al., 1992, *FASEB J.*, 6:3403-3409] включені в проліферативні і метаболітичні шляхи трансдукції сигналу і таким чином можна очікувати і, було показано, втягнуті в багато PTK-медіованих розладів, і яких представлений винахід стосується. Наприклад, мутований src (v-src), як було показано, є онкопротейном (pp60<sup>v-src</sup>) у курей. Однак, його клітинна гомологія, прото-онкоген pp60<sup>c-src</sup> передає онкогенні сигнали багатьом рецепторам. Надмірна експресія EGFR або HER2/neu в пухлинах призводить до значної активації pp60<sup>c-src</sup>, яка є характеристикою злоякісних клітин, але відсутня у нормальних клітин. З іншого боку, відсутність у мишей експресії c-src проявляється на остеопетротному фенотипі, що вказує на ключову участь c-src в функції остеокласту і можливе втягнення у подібні розлади.

Подібним чином, Zar70 втягнутий в Т-клітинне сигналювання, яке може мати відношення до аутоімунних розладів.

СТК пов'язані з запальними, аутоімунними захворюваннями, імунівідповідями і гіперпроліферативними розладами, такими як рестеноз, фіброз, псоріаз, остеоартрит і ревматоїдний артрит.

ПК також втягнуті в імплантацію ембріону. Таким чином, сполуки цього винаходу можуть забезпечувати ефективний спосіб попередження такої імплантації ембріону і звідси бути корисними як протизаплідні агенти. Додатковими розладами, які можуть бути виліковані або попереджені використовуючи сполуки цього винаходу є імунологічні розлади, такі як аутоімунні захворювання, СНІД і кардіоваскулярні розлади, такі як атеросклероз.

В кінці кінців, і PTK, і КТК є як зараз підозрюють включеними в гіперімунні розлади. Приклади дії ряду характерних сполук цього винаходу на деякі PTK показані в Таблиці 2, нижче. Представлені сполуки і дані не є приведеними з ціллю обмеження рамок цього винаходу будь-яким чином.

Б. Інгібітором циклооксигенази-2 або інгібітором COX-2 або інгібітором циклооксигенази-2 є агенти, що специфічно інгібують клас ферментів, циклооксигеназа-2, з менш значним інгібуванням циклооксигенази-1. Переважно, ним є сполуки, які мають IC<sub>50</sub> до циклооксигенази-2 менше ніж приблизно 0,2мкМ, і також мають співвідношення інгібування циклооксигенази-2 до інгібування циклооксигенази-1, принаймні, 50, і більш переважно, принаймні, 100. Навіть більш переважно, сполуки мають IC<sub>50</sub> до циклооксигенази-1 більше ніж приблизно 1мкМ, і більш переважно більше ніж 10мкМ.

Дослідження вказують, що простагландини синтезовані циклооксигеназами відіграють критичну роль у ініціації і промотуванні раку. Однак, COX-2 надмірно експресується в неопластичних пошкодженнях товстої кишки, грудей, легені, простати, езофагу, підшлункової залози, кишечника, шиї, яєчників, сечового міхура і голови & шиї. В деяких *in vitro* і тваринних моделях, інгібітори COX-2 інгібують ріст пухлин і метастази.

На додаток раку *per se*, COX-2 також експресується в середині ангіогенного васкуляру і по сусідству з гіперпластичними і неопластичними ушкодженнями, що вказує на те, що COX-2 відіграє роль в ангіогенезі. Як у мишей, так і щурів, інгібітори COX-2 значно інгібують bFGF-індуковану васкуляризацію. Здатність інгібіторів COX-2 як хемопреентивних, антиангіогенних і хемотерапевтичних агентів описується в літературі [Koki et al., Potential utility of COX-2 inhibitors in chemoprevention and chemotherapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1999) 8(10) pp.1623-1638], який включений сюди як посилання). Збільшена і/або надмірна експресія HER-2/neu (ErbB2) зустрічається у 20-30% людей з раком грудей і яєчників, тако; як і в 5-15% людей з раком шлунку і страваходу і пов'язана з поганим прогнозуванням. Крім того, нещодавно було встановлено *in vitro*, що експресія COX-2 надмірно регулюється в клітинах, що надмірно експресують онкоген HER-2/neu. (Subbaramaiah et al., Increased expression of cyclooxygenase-2 in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Cancer Research* (submitted 1999), включена сюди як посилання). В цьому дослідженні, детектувалось безперечне збільшення рівнів PGE<sub>2</sub> продукування протеїну COX-2 і mPHK в HER-2/neu трансформованих грудних епітеліальних клітинах порівняно з нетрансформованою партнерською лінією клітин. Продукти з активністю COX-2, тобто, простагландини, стимулятори проліферації, збільшувачи інвазивності злоякісних клітин і збільшувачи продукування фактору росту ендотеліальної васкулярності промотують ангіогенез. Крім того, HER-2/neu індукує продукування ангіогенних факторів, таких як фактор росту ендотеліальної васкулярності.

Відповідно, введення інгібітору COX-2 в комбінації з анти HER-2/neu антитілами, такими як трастузумаб (Herceptin®) і інші терапії, що стосуються інгібування HER-2/neu, розглядають лікування раку, в якому надмірно експресується HER-2/neu.

Також, планується, що рівні COX-2 збільшуються в пухлині із збільшенням і/або надмірною експресією інших онкогенів включаючи, але не обмежуються, c-мус, N-мус, L-мус, K-ras, H-ras, N-

gas. Продукти з активністю COX-2 стимулюють проліферацію клітин, інгібують імунний контроль, збільшують інвазивність злоякісних клітин і промотують ангіогенез. Відповідно, введення інгібітору протеїнінази в комбінації з інгібітором COX-2 представленого винаходу є корисним для попередження або лікування видів раку, в яких надмірно експресуються онкогени.

Специфічні інгібітори COX-2 корисні для лікування раку (WO98/16227) і в деяких тваринних моделях зменшують ангіогенез, що викликається різними факторами росту (WO98/22101). Антиангіогенез досягається з використанням інгібітору COX-2 у щурів з імплантованим bFGF, фактором росту ендотеліальної васкулярності (VEGF) або каррагінаном, протеїнами з добре відомими ангіогенними властивостями. (Masferrer, et al., 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, March 1998.)

Фармацевтична композиція і введення

Сполука представленого винаходу або її фармацевтично прийнятна сіль може бути введена, як така пацієнту або може бути введена в фармацевтичні композиції, в яких згадані вище матеріали змішуються з придатними носіями або екіпієнтом(ами). Методики одержання і введення лікарських засобів можна знайти [в "Remington's Pharmacological Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa.], остання видання.

Як тут використовується, "введення" стосується вивільнення сполуки формули (I) або її фармацевтично прийнятної солі або фармацевтичної композиції, що містить сполуку формули (I) або її фармацевтично прийнятну сіль цього винаходу в організм з ціллю попередження або лікування ПК-залежного розладу.

Придатними шляхами введення є, без обмеження, пероральне, ректальне, місцеве, трансмукозальне або інтестинальне введення або внутрішньом'язові, підшкірні, внутрішньомозкові, інтратекальні, безпосередньо у шлуночок, внутрішньовенні, в скловидне тіло, інтраперитонеальні, інтраназальні або інтраокулярні ін'єкції. Переважними шляхами введення є пероральний і парентеральний.

Альтернативно, локальне введення сполуки є вигіднішим ніж системне введення, наприклад, за допомогою ін'єкції сполуки безпосередньо в солідну пухлину, часто як депо або рецептури з тривалим вивільненням.

Крім того, вона може вводити лікарський засіб в систему вивільнення з націлюванням лікарського засобу, наприклад, в ліпосомі покритому пухлино-специфічним антитілом. Ліпосоми будуть націлювати і доставляти селективно до пухлини.

Фармацевтичні композиції представленого винаходу можна виготовити за способами добре відомими в цій галузі, наприклад, за допомогою засобів звичайного змішування, розчинення, гранулювання, одержання драже, розтирання, емульсифікування, інкапсулювання, включення або ліофілізації.

Фармацевтичні композиції для використання згідно з представленим винаходом можуть бути сформовані загальновідомим чином використовуючи один або більшу кількість фізіологічно прий-

ятних носіїв, що містять експіканти і допоміжні речовини, які полегшують переведення активних сполук в рецептури, які можуть бути використані фармацевтично. Властивості рецептури залежать від вибору шляху введення.

Для ін'єкування, сполуки винаходу можуть бути сформовані в водні розчини, переважно в фізіологічно сумісні буфери, такі як розчин Ханка, розчин Рінгера або фізіологічно забуферений салін. Для трансмукозального введення, пенетранти прийнятні для проникнення через бар'єр використовуються в рецептурі. Такі пенетранти добре відомі в цій галузі.

Для перорального введення, сполуки можуть бути введенні як комбінація активних сполук з фармацевтично прийнятними носіями добре відомими в цій галузі. Такі носії дають можливість сформувати сполуки у таблетки, пілюлі, лозенги, драже, капсули, рідини, гелі, сиропи, суспензії і їм подібні, придатні для перорального вживання пацієнтом. Фармацевтичні рецептури для перорального використання можна одержати використовуючи твердий експікент, необов'язково, змоловши одержану суміш, і піддавши суміш гранулюванню, після додавання інших придатних допоміжних речовин, якщо бажано, з одержанням таблеток або ядер драже. Корисними експікентами є, зокрема, наповнювачі, такі як цукри, включаючи лактозу, цукрозу, маніт або сорбіт, похідні целюлози, такі як, наприклад, кукурудзяний крохмаль, пшеничний крохмаль, рисовий крохмаль і картопляний крохмаль і інші матеріали, такі як желатин, трагакантова камянь, метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, натрій карбоксиметилцелюлоза, і/або полівінілпіролідон (ПВП). Якщо бажано, можуть бути додані дезінтегруючі агенти, такі як поперечно зшитий полівінілпіролідон, агар або алгінова кислота. Також може бути використана сіль, така як алгінат натрію.

Ядра драже забезпечують придатними покриттями. Для цих цілей, можуть бути використані концентровані розчини цукрів, які можуть, необов'язково, містити арабську смолу, тальк, полівінілпіролідон, гель карбополу, поліетиленгліколь і/або діоксид титану, розчини глазурей, і придатні органічні розчинники або суміші розчинників. Барвники або пігменти можуть бути додані до покриття таблеток або драже для ідентифікування або для відображення різних комбінацій доз активної сполуки.

Фармацевтичні композиції, які можуть бути використані перорально включають щільно підігнані капсули виготовлені з желатину, також як і м'які, закриті капсули виготовлені з желатину і пластифікатору, такого як гліцерин або сорбіт. Щільно підігнані капсули можуть містити активні інгредієнти в суміші з наповнювачами, такими як лактоза, зв'язувальні агенти, такі як крохмаль, і/або змащувальні агенти, такі як тальк або стеарат магнію і, необов'язково, стабілізатори. В м'яких капсулах, активні сполуки можуть бути розчинені або суспендовані в придатних рідинах, таких як жирні олії, рідкі парафіни або рідкі поліетиленгліколи. Також до цих рецептур можуть бути додані стабілізатори.

Капсули можуть упаковані у пляшечки з коричневого скла або пластмаси для захисту активної сполуки від світла. Контейнери, що містять рецептуру капсули активної сполуки повинні зберігатись при контрольованій кімнатній температурі (15-30°C).

Для введення за допомогою інгаляції, сполуки для використання у представленому винаході зазвичай вивільнюються у формі аерозольного спрею використовуючи контейнер під тиском або розпилювач і придатний попелант, наприклад, без обмеження, дихлордифторметан, трихлорфторметан, дихлортетрафторетан або діоксид вуглецю. У випадку стиснутого аерозолю, дозована одиниця може бути відміряна за допомогою клапану для вивільнювання вимірюваної кількості. Капсули і картриджі, наприклад, желатинові можуть бути сформовані для використання в інгаляторі або інсуфляторі так, що містять порошкоподібну суміш сполуки і придатну порошкоподібну основу, таку як лактоза або крохмаль.

Сполуки також можуть бути сформовані для парентерального введення, наприклад, за допомогою ін'єкції болусу або безперервного вливання. Рецептури для ін'єкції можуть бути представлені в одиничній дозованій формі, наприклад, ампул або мультидозових контейнерів, з додаванням консервантів. Композиції можуть мати такі форми, як суспензії, розчини або емульсії в масляному або водних розчинниках, і можуть містити формулюючі матеріали, такі як суспендувальні, стабілізуювальні і/або диспергувальні агенти.

Фармацевтичні композиції для парентерального введення включають водні розчини водорозчинних форм, таких як, без обмеження, сіль активної сполуки. Крім того, суспензії активної сполуки можна одержати в ліпофільному розчиннику. Придатними ліпофільними розчинниками є жирні олії, такі як сезамова олія, синтетичні естери жирних кислот, такі як етил олеат і тригліцериди, або матеріали, такі як ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкції можуть містити речовини, що надають вищу в'язкість суспензії, такі як натрій карбоксиметилцелюлоза, сорбіт або декстран. Необов'язково, суспензія також може містити придатні стабілізатори і/або агенти, що збільшують розчинність сполуки і дозволяють одержати висококонцентровані розчини.

Альтернативно, активний інгредієнт може бути порошком для відновлення придатним розчинником, наприклад, стерильною пірогенвільною водою, перед використанням.

Сполуки також можна сформувати в ректальні композиції, такі як супозиторії або клізми, що утримуються, використовуючи, наприклад, загальновідомі основи супозиторіїв, такі як масло какао або інші гліцериди.

На додаток до рецептур описаних раніше, сполуки також можуть бути сформовані як депо. Такі довгодіючі рецептури можуть бути введенні шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Сполука цього винаходу може бути об'єднана для цього шляху введення з придатними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії з фармаколо-

гічно прийнятною олією), з іонообмінними смолами, або як поганорозчинне похідне, таке як, без обмеження, поганорозчинна сіль.

Необмежувачим прикладом фармацевтичного носія для гідрофобних сполук винаходу є система співрозчинників, що містить бензиловий спирт, неполярні поверхнево-активні речовини, водозмішувані органічні полімери і водна фаза, така як співрозчинна система VPD. VPD є розчином 3% в/о бензинового спирту, 8% в/о неполярної поверхневоактивної речовини Полісорбат 80 і 65% в/о поліетиленгліколю 300, доведеної до об'єму абсолютним етанолом. VPD співрозчинна система (VPD:D5W) містить VPD розведену 1:1 5% розчином декстрази у воді. Ця співрозчинна система добре розчиняє гідрофобні сполуки і сама по собі має низьку токсичність при системному призначенні. Природно, співвідношення такої співрозчинної системи може змінюватись без руйнування її розчинності і токсичності. Крім того, ідентичні співрозчинні компоненти можуть бути замінені: наприклад, замість Полісорбату 80 можуть бути використані інші низькотоксичні неполярні поверхневоактивні речовини, фракційна частина поліетиленгліколю може бути змінена, замість поліетиленгліколю можуть бути використані інші біосумісні полімери, наприклад, полівінілпіролідон, і інші цукри або полісахариди можуть замінити декстразу.

Альтернативно, можуть бути використані інші системи вивільнення гідрофобним фармацевтичних сполук. Ліпосоми і емульсії добре відомі приклади розчинників або носіїв вивільнення гідрофобних лікарських засобів. На додаток, деякі органічні розчинники, такі як диметилсульфоксид також можуть бути використані, хоча часто ціною збільшення токсичності.

Додатково, сполуки можуть бути вивільнені використовуючи систему тривалого вивільнення, таку як напівпроникні матриці твердих гідрофобних полімерів, що містять терапевтичний агент. Прийняті різними матеріали тривалого вивільнення і вони добре відомі спеціалістам в цій галузі. Капсули тривалого вивільнення можуть, в залежності від її хімічної природи, вивільнювати сполуки протягом від декількох тижнів до понад 100 днів. В залежності від хімічної природи і біологічної стабільності терапевтичного реагенту, можуть бути використані додаткові стратегії стабілізації протеїну.

Фармацевтичні композиції описані тут також можуть містити придатні тверді або гелеподібні носії або екціпієнти. Прикладами таких носіїв або екціпієнтів є, але не обмежується, карбонат кальцію, фосфат кальцію, різні цукри, крохмалі, похідні целюлози, желатин і полімери, такі як поліетиленгліколи.

Багато ПК модулюючих сполук винаходу можуть бути одержані як фізіологічно прийнятні солі, де заявлена сполука може бути у формі негативно або позитивно зарядженої молекули. Прикладами солей, в яких сполуки є позитивно зарядженим замісником є, без обмеження, четвертинні амонієві (обговорені тут в іншому місці) солі, такі як гідроклорид, сульфат, карбонат, лактат, тартрат, малат, малеат, сукцинат, де атом азоту четвертинної

амонієвої групи є азот, що вибирають на сполуці цього винаходу, який реагує з прийнятною кислотою. Солями, в яких сполука цього винаходу утворює негативно заряджені молекули є, без обмеження, натрієві, калієві, кальцієві і магнієві солі, що утворюються в наслідок реакції карбокислової групи сполуки з прийнятною основою (наприклад гідроксидом натрію (NaOH), гідроксидом калію (KOH), гідроксидом кальцію (Ca(OH)<sub>2</sub>) і т.і.).

Фармацевтичними композиціями придатними для використання в представленому винаході є композиції, де активний інгредієнт міститься кількості достатній для досягнення запланованої цілі, наприклад, модулювання активності ПК або лікування або попередження ПК-залежного захворювання.

Більш особливо, терапевтично ефективна кількість означає кількість сполуки ефективну для попередження, полегшення або покращення симптомів захворювання або пролонгування виживання суб'єктів, що лікуються.

Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в межах здатності спеціаліста в цій галузі, особливо в світлі детального опису приведеного тут.

Для будь-якої сполуки, що використовується в способах цього винаходу, терапевтично ефективна кількість або доза може бути оцінена виходячи з дослідження культур клітин. Потім, доза може бути сформована для використання в тваринних моделях для того щоб досягти інтервала циркулюючої концентрації, що включає IC<sub>50</sub> визначену в культурі клітин (тобто, концентрації тестованої сполуки, яка забезпечує половину від максимального інгібування активності ПК). Така інформація може бути потім використана для більш точного визначення дози корисної для людей.

Токсичність і терапевтичну ефективність сполук описаних тут можна визначити за допомогою стандартних фармацевтичних методик в культурах клітин або на експериментальних тваринах, наприклад, шляхом визначення IC<sub>50</sub> і LD<sub>50</sub> (обидва з яких обговорювались тут раніше) для певної сполуки. Дані одержані з цих досліджень культур клітин і дослідженнях тварин можуть бути використані для формування інтервалу доз для використання людьми. Доза може змінюватись в залежності від дози що використовується і шляху введення. Точна рецептура, шлях введення і доза може бути вибрана лікарем з огляду на стан пацієнта. [Дивіться наприклад, Fingl, et al., 1975, в "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1].

Розмір дози і інтервал між дозами може встановлювати індивідуально одержавши рівні в плазмі активних речовин, які достатні для підтримання кіназомодулюючих ефектів. Ці рівні в плазмі виражають як мінімальні ефективні концентрації (МЕК). МЕК будуть змінюватись для кожної сполуки, але можуть бути оцінені з *in vitro* даних, наприклад, концентрація необхідна для досягнення 50-90% інгібування кінази може бути встановлена використовуючи дослідження описані тут. Дози необхідні для досягнення МЕК будуть залежати від індивідуальних характеристик і шляху введення. ВЕРХ дослідження або біодослідження можуть бути використані для визначення концентрації в плазмі.

Інтервали доз також можна визначити використовуючи значення МЕК. Сполуки повинні бути введені використовуючи інтервал, що підтримує рівні в плазмі вищі за МЕК на 10-90%, переважно 30-90% і найбільш переважно 50-90%.

На даний момент, терапевтичні кількості сполук формули (I) можуть змінюватись в інтервалі від приблизно 0,25мг/м<sup>2</sup> до 1500мг/м<sup>2</sup> на день; переважно приблизно 3мг/м<sup>2</sup>/день. Навіть більш переважно 50мг/м<sup>2</sup> до 400мг/м<sup>2</sup> на день.

Терапевтично ефективні кількості інгібітору циклооксигенази становлять від приблизно 0,1мг до приблизно 10000мг для лікування згаданих вище станів, з переважними рівнями від приблизно 1,0мг до приблизно 1,000мг.

Кількість активного інгредієнту, що може бути об'єднаний з іншими протираковими агентами для держання одиначної дозованої форми буде змінюватись в залежності стану, що лікується, і шляху введення.

У випадку локального введення або селективного поглинання, ефективна локальна концентрація лікарського засобу може не бути зв'язаною з концентрацією в плазмі і інші процедури відомі в цій галузі можуть бути використані для визначення коректної кількості дози і інтервалу.

Кількість композиції, що вводиться буде, безперечно, залежати від суб'єкту, що лікується, складності хвороби, способу введення, рішення лікаря і т.і..

Якщо бажано, композиції можуть бути представлені в упаковці або роздатчика, такому як набір схвалений FDA, який може містити один або більшу кількість одиначних дозованих форм, що містять активний інгредієнт. Упаковка може, наприклад, включати металеву або пластикову фольгу, така як блістер. Упаковка або роздатчик може доповнюватись інструкцією по прийому. Упаковка або роздатчик також може доповнюватись пам'яткою, що прикріплена до контейнеру у формі, що відповідає запровадженій урядовим агентством з регулювання виробництва, використання або продажу фармацевтичних препаратів, де пам'ятка відображає в схваленій агентством формі склад або введення людині або тварині. Така пам'ятка, наприклад, може бути маркована відповідно до схваленої Управлінням по санітарному нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів (США) (U.S. Food and Drug Administration) для рецептів лікарських засобів або схвалених добавок. Композиція, що містить сполуку винаходу сформовану з сумісним фармацевтичним носієм також може бути одержана, поміщена в прийнятний контейнер і маркована для лікування вказаного стану. Придатними станами, що вказуються на етикетці може бути лікування пухлини, інгібування ангиогенезу, лікування фіброзу, діабету і їм подібних.

Також в аспекті цього винаходу, сполука описана тут або її сіль або пролікарська форма, може бути об'єднана з іншими хіміотерапевтичними агентами для лікування захворювань і станів, що обговорювались вище. Наприклад, сполука, сіль або пролікарська форма цього винаходу може бути об'єднана з алкілувальними агентами, такими як фторурацил (5-FU), окремо або в комбінації з

лейковорином; або іншими алкілувальними агентами, такими як, без обмеження, інші аналоги піримідину, такі як UFT, капецитабін, гемцитабін і цитарабін, алкілсульфонати, наприклад, бусульфан (використовується для лікування хронічної гранулоцитної лейкемії), імпротульфан і піпротульфан; азиридины, наприклад, бензодепа, карбохон, метуредепи і уредепи; етиленіміни і метилмеламіни, наприклад, алтретамін, триетиленмеламін, триетилфосфорамід, триетилентіофосфорамід і триметилполмеламін; і азотисті сполуки гірчиці, наприклад, хлорамбуцил (використовується в лікуванні хронічної лімфоцитарної лейкемії, первинної макроглобулінемії і лімфоми не-Ходжкіна), циклофосфамід (використовуються при лікуванні хвороби Ноджкіна, множинної мієломи, нейробластоми, раку грудей, раку яєчників, раку легень, пухлини Вілма і рабдоміосаркоми), естамустин, іфосфамід, новембрицин і преднімустин і урацилові похідні гірчиці (використовується при лікуванні первинного тромбоцитозу, лімфоми не-Ходжкіна, хвороби Ходжкіна і раку яєчників); і триазини, наприклад, дакарбазин (використовується при лікуванні саркоми м'яких тканин).

Сполуку, сіль або пролікарську форму цього винаходу також можна використовувати в комбінації з іншими антиметаболітично хемотерапевтичними агентами, такими як, без обмеження, аналоги фолієвої кислоти, наприклад, метотрексат (використовується для лікування гострої лімфоцитної лейкемії, хоріокарциноми, фунгоїдної гранулеми, раку грудей, раку голови і шиї і остеогенної саркоми) і птероптерин; і аналоги пурину, такі як меркаптопурин і тіогуанін, який знаходить використання при лікуванні гострого гранулоциту, гострої лімфоцитної і хронічної гранулоцитної лейкемії.

Розглядається, що сполуку, сіль або пролікарську форму цього винаходу також можна використовувати в комбінації з природними продуктами, що є хемотерапевтичними агентами, такими як, без обмеження, алкалоїди в'юнка, наприклад, вінбластин (використовується при лікуванні раку грудей і раку яєчників), вінкрисин і віндезин; епідофілотоксини, наприклад, етопозиди і теніпозид, обидва з яких є корисними при лікуванні раку яєчників і саркоми Капосі; антибіотичні хемотерапевтичні агенти, наприклад, даунорубіцин, доксорубіцин, епірубіцин, мітоміцин (використовується для лікування раку шлунку, шиї, товстої кишки, грудей, сечового міхура і підшлункової залози), дактиноміцин, темозоломід, плікаміцин, блеоміцин (використовується для лікування раку шкіри, стравоходу і сечостатевого тракту); і ферментні хіміотерапевтичні агенти, такі як L-аспаргіназа.

На додаток до вище згаданого, сполуку, сіль або пролікарську форму цього винаходу також можна використати в комбінації з координаційними комплексами платини (цисплатин і т.і.); заміщені сечовини, такі як гідроксисечовина; похідні метилгідразину, наприклад, прокарбазин; адренкортикоїдні супресанти, наприклад, мітотан, аміноглутетимідин; і гормон і антагоністи гормону, такі як адренкортикостероїди (наприклад, преднізон), прогестини (наприклад, гідроксипрогестерон капроат); естрогени (наприклад, діетилстільбестерол); антиестрогени, такі як томоксифен; андроген-



ни, наприклад, тетгестерону пропіонат; і інгібітори ароматази, такі як анастрозол. Інші антинеопластичні агенти відомі з літератури і можуть бути використані окремо або в комбінаційній терапії представленого винаходу. Приклади цих неопластичних агентів і інші агенти приведені [в заявці на патент US з серійним номером 60/113,786, що подана 23 грудня 1998, і публікації PCT №WO 00/38716], опис якої включений сюди як посилення.

На закінчення, також припускається, що комбінація сполук цього винаходу буде ефективна в комбінації з міготрексаном або паклитакселом для лікування солідних пухлин або лейкоїд, таких як, без обмеження, гостра мієлоїд (не-лімфоцитна) лейкоїд.

#### Приклади

##### Синтетичні приклади

Наступні приготування і приклади приведені для того щоб спеціаліст в цій галузі більш ясно зрозумів і відтворив представлений винахід. Вони не повинні розглядатись як такі, що обмежують границі винаходу, але просто приведені для його ілюстрації і розкриття.

Синтез інгібітору протеїнази представлено-го винаходу - сполук Формули (I)

##### Загальна методика синтезу:

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

Прийнято заміщений 2-оксиіндол (1еквів.), прийнято заміщений альдегід (1,2еквів.) і основу (0,1еквів.) 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, фільтрували, промивали холодним етанолом або етером і сушили у вакуумі одержуючи твердий продукт. Якщо осад не утворювався, реакційну суміш концентрували і залишок розтирають з дихлорметан/етер, одержуючи тверду речовину збирають фільтруванням і потім сушать. Продукт може, необов'язково, бути в подальшому очищений за допомогою хроматографії.

Основою може бути органічна або неорганічна основа. Якщо використовується органічна основа, переважно вона є азотвмісною основою. Прикладами органічних азотвмісних основ є, але не обмежуються, діізопропіламін, триметиламін, триетиламін, анілін, піридин, 1,8-діазабіцикло[5.4.1]ундец-7-ен, піролідин і піперидин.

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

В представленому переважному втіленні 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.

Спеціалісту в цій галузі повинно бути зрозуміло, виходячи з загальних відомих принципів орга-

нічного синтезу і описаного тут, які основи будуть найбільш прийнятними для проведення реакції.

Розчинник в якому проводять реакцію може бути протонним або апротонним розчинником, переважно, він є протонним розчинником. "Протонним розчинником" є розчинник, який має атом(и) водню ковалентно приєднані до атомів кисню або азоту, які віддають атоми водню сильним кислотам і таким чином здатні бути "розділені" з розчиною речовиною через водневий зв'язок. Прикладами протонних з розчинників є, без обмеження, вода і спирти.

"Апротонним розчинником" може бути полярним або неполярним але, так чи інакше, не містити кислотних воднів і таким чином не здатним зв'язуватись через водневий зв'язок з розчинними речовинами. Прикладами, без обмеження, неполярних апротонних розчинників є пентан, гексан, бензол, толуол, метилхлорид і тетраглідрол вуглецю. Прикладами полярних апротонних розчинників є хлороформ, тетрагідролфурани, диметилсульфоксид і диметилформамід.

В представленому переважному втіленні цього винаходу, розчинник є протонним розчинником, переважно, вода або спирт, який як етанол.

Реакцію проводять при температурах більше ніж кімнатна температура. Температура зазвичай знаходиться в межах від приблизно 30°C до приблизно 150°C, переважно від приблизно 80°C до приблизно 100°C, найбільш переважно від приблизно 75°C до приблизно 85°C, яка є приблизно температурою кипіння етанолу. "Приблизно" означає, що температура коливається в межах 10 градусів Цельсія від вказаної температури, більш переважно в межах 5 градусів Цельсія вказаної температури і, найбільш переважно, в межах 2 градусів Цельсія 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 альдегіди, можна легко синтезувати використовуючи методики добре відомі в хімічній галузі. Для спеціаліста в цій галузі повинно бути зрозуміло, що доступні інші синтетичні шляхи одержання сполук винаходу і що наступні запропоновані в прикладах шляхи не слід розглядати як такі, що обмежують.

##### Спосіб А: Формілювання піролів

POCl<sub>3</sub> (1,1еквів.) додавали по краплям до диметилформаміду (Зеквів.) при -10°C з наступним додаванням прийнятного піролу розчиною в диметилформаміді. Після перемішування протягом двох годин, реакційну суміш розводили H<sub>2</sub>O і підлговували до pH11 використовуючи 10N KOH. Осад, який утворився збирали фільтруванням, промивали H<sub>2</sub>O і сушили у вакуумній печі одержуючи бажаний альдегід.

##### Спосіб Б: Омилення естерів піролкарбонової кислоти

Суміш естеру піролкарбонової кислоти і KOH (2-4еквів.) в EtOH кип'ятили із зворотнім холодильником до завершення реакції, що визначали за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ). Охолоджену реакційну суміш підкислювали до pH3 використовуючи 1N HCl. Осад, що утворився, збирали фільтруванням, промивали H<sub>2</sub>O і сушили у

вакуумній печі одержуючи бажану піролкарбонову кислоту.

#### Спосіб В: Амідування

До розчину, що перемішується, піролкарбонової кислоти розчиненої в диметилформаміді (0,3м) додавали 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід (1,2еквів.), 1-гідроксибензотриазол (1,2еквів.) і триетиламін (2еквів.). Додавали прийнятний амін (1еквів.) і реакцію перемішували до завершення, що визначали за ТШХ. Потім до реакційної суміші додавали етилацетат і розчин промивали насиченим  $\text{NaHCO}_3$  і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним  $\text{MgSO}_4$  і концентрували одержуючи бажаний амід.

Спосіб Г: Конденсування альдегідів і оксиіндолів, що містять замісники з карбоксильною групою

Суміш оксиіндолу (1 еквівалент), 1 еквіваленту альдегіду і 13 еквівалентів піперидину (або піролідину) в етанолі (0,4м) перемішували при 90-100°C до завершення реакції, що визначали за ТШХ. Суміш потім концентрували і залишок підкислювали 2N HCl. Осад, що утворився, промивали  $\text{H}_2\text{O}$  і EtOH і потім сушили у вакуумній печі одержуючи продукт.

Спосіб Д: Конденсування альдегідів і оксиіндолів, що не містять замісників з карбоксильною групою

Суміш оксиіндолу (1 еквівалент), 1 еквіваленту альдегіду і 1-3 еквівалентів піперидину (або піролідину) в етанолі (0,4м) перемішували при 90-100°C до завершення реакції, що визначали за ТШХ. Суміш охолоджували до кімнатної температури і тверду речовину, що утворилась збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і сушили одержуючи продукт. Якщо після охолодження реакційної суміші осад не утворювався, суміш концентрували і очищали за допомогою колонкової хроматографії.

#### В. Приклади синтезів оксиіндолу

Наступні приклади синтезу типових оксиіндолів не повинні розглядатись як такі, що обмежують рамки цього винаходу будь-яким чином. Альтернативні шляхи одержання оксиіндолів, також як і інші оксиіндоли, що використовуються для одержання сполук цього винаходу будуть очевидні спеціалісту в цій галузі виходячи з наступного опису. Такі синтези і оксиіндоли є в межах і дусі цього винаходу.

##### 5-Аміно-2-оксиіндол

5-Нітро-2-оксиіндол (6,3г) гідрували в метанолі над 10% паладієм на вугіллі одержуючи 3,0г (60% вихід) вказаної в заголовку сполуки як білу тверду речовину.

##### 5-Бром-2-оксиіндол

2-Оксиіндол (1,3г) в 20мл ацетонітрилу охолоджували до -10°C і повільно при перемішуванні додавали 2,0г N-бромсукцініміду. Реакцію перемішували протягом 1 години при -10°C і 2 години при 0°C. Осад збирали, промивали водою і сушили одержуючи 1,9 г (90% вихід) вказаної в заголовку сполуки.

##### 4-Метил-2-оксиіндол

Діетил оксалат (30мл) в 20мл сухого етеру додавали при перемішуванні до 19г етоксиду калію суспендованого в 50мл сухого етеру. Суміш охолоджували в бані з льодом і повільно додавали

20мл 3-нітро-о-ксилену в 20мл сухого етеру. Мутну темно-червону суміш нагрівали при температурі кипіння протягом 0,5г, концентрували до темно-коричневої твердої речовини і обробляли 10% гідроксидом натрію до розчинення майже усієї твердої речовини. Темно-червону суміш обробляли 30% пероксидом водню до зміни червоного кольору на жовтий. Суміш обробляли, альтернативно, 10% гідроксидом натрію і 30% пероксидом водню до зникнення темно-червоного кольору. Тверду речовину відфільтровували і фільтрат підкислювали 6N хлорводневою кислотою. Одержаний осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали водою і сушили у вакуумі одержуючи 9,8г (45% вихід) 2-метил-6-нітрофенілоцтової кислоти як майже-білу тверду речовину. Тверду речовину гідрували в метанолі над 10% паладієм на вугіллі одержуючи 9,04г вказаної в заголовку сполуки як білу тверду речовину.

##### 7-Бром-5-хлор-2-оксиіндол

5-Хлор-2-оксиіндол (16,8г) і 19,6г N-бромсукцініміду суспендували в 140мл ацетонітрилу і кип'ятили протягом 3 годин. Тонкошарова хроматографія (сілікагель, етилацетат) після 2 годин кип'ятіння показала 5-хлор-2-оксиіндол або N-бромсукцінімід (Rf 0,8), продукт (Rf 0,85) і другий продукт (Rf 0,9) співвідношення яких не змінювалось після години кип'ятіння. Суміш охолоджували до 10°C, осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали 25мл етанолу і відсмоктували до суха протягом 20 хвилин у воронці одержуючи 14,1г вологого продукту (56% вихід). Тверду речовину суспендували в 200мл денатурованого етанолу і суспензію перемішували і кип'ятили протягом 10 хвилин. Суміш охолоджували в бані з льодом до 10°C. Твердий продукт збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали 25мл етанолу і сушили у вакуумі при 40°C одержуючи 12,7г (51% вихід) 7-бром-5-хлор-2-оксиіндолу.

##### 5-Фтор-2-оксиіндол

5-Фторізатин (8,2г) розчиняли в 50мл гідрату гідразину і кип'ятили протягом 1,0г. Реакційну суміш виливали у льодяну воду. Осад потім фільтрували, промивали водою і сушили у вакуумній печі одержуючи вказаний в заголовку продукт.

##### 5-Нітро-2-оксиіндол

2-Оксиіндол (6,5г) розчиняли в 25мл концентрованої сірчаної кислоти і суміш витримували при -10 - -15°C і в цей час по краплям додавали 2,1мл азотної кислоти, що димить. Після додавання азотної кислоти реакційну суміш перемішували при 0°C протягом 0,5г і виливали у лід-вода. Осад збирали фільтруванням, промивали водою і кристалізували з 50% оцтової кислоти. Кристалічний продукт потім фільтрували, промивали водою і сушили у вакуумі одержуючи 6,3г (70%) 5-нітро-2-оксиіндолу.

##### 5-Аміносультфоніл-2-оксиіндол

До 100мл колби, що містила 27мл хлорсульфонової кислоти, повільно додавали 13,3г 2-оксиіндолу. Температуру реакції підтримували нижче 30°C під час додавання. Після додавання, реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1,5г, нагрівали при 68°C протягом 1г, охолоджували і виливали у воду. Осад

промивали водою і сушили у вакуумній печі одержуючи 11,0г 5-хлорсульфоніл-2-оксиіндолу (50% вихід), який використовували без подальшого очищення.

5-Хлорсульфоніл-2-оксиіндол (2,1г) додавали до 10мл гідроксиду амонію в 10мл етанолу і перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Суміш концентрували і тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування одержуючи 0,4г (20% вихід) вказаної в заголовку сполуки як майже-білу тверду речовину.

#### 5-Ізопропіламіносультфоніл-2-оксиіндол

До 100мл колби, що містила 27мл хлорсульфонової кислоти, повільно додавали 13,3г 2-оксиіндолу. Температуру реакції підтримували нижче 30°C під час додавання. Реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1,5 годин, нагрівали при 68°C протягом 1 години, охолоджували і виливали у воду. Осад, що утворився, фільтрували, промивали водою і сушили у вакуумній печі одержуючи 11,0г (50%) 5-хлорсульфоніл-2-оксиіндолу, який використовували без подальшого очищення.

Суспензію 3г 5-хлорсульфоніл-2-оксиіндолу, 1,15г ізопропіламіну і 1,2мл піридину в 50мл дихлорметану перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин під час чого утворювалась біла тверда речовина. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування, суспендували в гарячому етанолі, охолоджували, збирали за допомогою вакуумного фільтрування і сушили у вакуумі при 40°C протягом ночі одержуючи 1,5г (45%) 5-ізопропіламіносультфоніл-2-оксиіндолу.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,69 (с, ш, 1Н, NH), 7,63 (дд, J=2 і 8Гц., 1Н), 7,59 (д, J=2Гц., 1Н), 7,32 (д, J=7Гц., 1Н, NH-SO<sub>2</sub>-), 6,93 (д, J=8Гц., 1Н), 3,57 (с, 2Н), 3,14-3,23 (м, 1Н, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,94 (д, J=7Гц., 6Н, 2×CH<sub>3</sub>).

#### 5-Феніламіносультфоніл-2-оксиіндол

Суспензію 5-хлорсульфоніл-2-оксиіндолу (1,62г, 7ммоль), аніліну (0,782мл, 8,4ммоль) і піридину (1мл) в дихлорметані (20мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Реакційна суміш розводили етилацетатом (300мл) і підкислювали 1N хлорводневою кислотою (16мл). Органічний шар промивали бікарбонатом натрію і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили і концентрували. Залишок промивали етанолом (3мл) і потім хроматографували на силікагелі використовуючи як елюент метанол/дихлорметан 1:9 одержуючи 5-феніламіносультфоніл-2-оксиіндолу.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,71 (с, ш, 1Н, NH), 10,10 (с, ш, 1Н, NH), 7,57-7,61 (м, 2Н), 7,17-7,22 (м, 2Н), 7,06-7,09 (м, 2Н), 6,97-7,0 (м, 1Н), 6,88 (д, J=8,4Гц., 1Н), 3,52 (с, 2Н).

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти піридин-3-іламід

Розчин 5-хлорсульфоніл-2-оксиіндолу (3г) і 3-амінопіридину (1,46г) в піридині (15мл) перемішували при кімнатній температурі протягом ночі під час чого утворювалась коричнева тверда речовина. Тверду речовину фільтрували, промивали етанолом і сушили у вакуумі одержуючи 1,4г (38%) 2-

оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти піридин-3-іламід.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,74 (с, 1Н, NH), 10,39 (с, 1Н, SO<sub>2</sub>NH), 8,27-8,28 (д, 1Н), 8,21-8,23 (м, 1Н), 7,59-7,62 (м, 2Н), 7,44-7,68 (м, 1Н), 7,24-7,28 (м, 1Н), 6,69-6,71 (д, 1Н), 3,54 (с, 2Н).

МС m/z (XIAT+) 290,2.

#### 5-Фенілоксиіндол

5-Бром-2-оксиіндол (5г, 23,5ммоль) розчиняли в 110мл толуолу і 110мл етанолу при перемішуванні і легкому нагріванні. Додавали тетракіс(трифенілфосфін)паладію (0) (1,9г, 1,6ммоль) після додавання 40мл (80ммоль) 2М водного розчину карбонату натрію. До цієї суміші додавали бензолборну кислоту (3,7г, 30,6ммоль) і суміш нагрівали в 100°C масляній бані протягом 12 годин. Реакцію охолоджували, розводили етилацетатом (500мл), промивали насиченим бікарбонатом натрію (200мл), водою (200мл), 1N HCl (200мл) і насиченим водним розчином хлориду натрію (200мл). Органічний шар сушили над сульфатом магнію і концентрували одержуючи коричневу тверду речовину. Розтирали з дихлорметаном одержуючи 3,8г (77%) 5-феніл-2-оксиіндолу як жовто-коричневу тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,4 (ш с, 1Н, NH), 7,57 (дд, J=1,8 і 7,2Гц., 1Н), 7,5-7,35 (м, 5Н), 7,29 (м, 1Н), 6,89 (д, J=8,2Гц., 1Н), 3,51 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO).

МС m/z 209 [M<sup>+</sup>].

Подібним чином, можна одержати наступні оксиіндоли:

#### 6-(3,5-Дихлорфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,46 (ш, 1Н, NH), 7,64 (д, J=1,8Гц., 2Н), 7,57 (м, 1Н), 7,27 (м, 2Н), 7,05 (д, J=1,1Гц., 1Н), 3,5 (с, 2Н).

МС-EI m/z 277/279 [M<sup>+</sup>].

#### 6-(4-Бутилфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,39 (с, 1Н, NH), 7,49 (д, J=8,0Гц., 2Н), 7,25 (д, J=8Гц., 3Н), 7,17 (дд, J=1,5 і 7,8Гц., 1Н), 6,99 (д, J=1,5Гц., 1Н), 3,48 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO), 2,60 (т, J=7,5Гц., 2Гц., CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,57 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,32 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 0,9 (т, J=7,5Гц., 3Н, CH<sub>3</sub>).

#### 6-(5-ізопропіл-2-метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,29 (ш с, 1Н, NH), 7,16-7,21 (м, 2Н), 7,08 (д, J=2,4Гц., 1Н), 6,97-7,01 (м, 2Н), 6,89 (д, J=0,8Гц., 1Н), 3,71 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,47 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO), 2,86 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,19 (д, J=6,8Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 281 [M<sup>+</sup>].

#### 6-(4-Етилфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,39 (ш с, 1Н, NH), 7,50 (д, J=8,2Гц., 2Н), 7,28 (д, J=8,2Гц., 2Н), 7,25 (д, J=7,5Гц., 1Н), 7,17 (дд, J=1,6 & 7,5Гц., 1Н), 6,99 (д, J=1,6Гц., 1Н), 3,48 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO), 2,63 (к, J=7,6Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,20 (т, J=7,6Гц., 3Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 237 [M<sup>+</sup>].

#### 6-(3-ізопропілфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,37 (ш с, 1Н, NR), 7,43 (м, 1Н), 7,35-7,39 (м, 1Н), 7,17-7,27 (м, 3Н), 7,01 (д, J=1,8Гц., 1Н), 3,49 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO), 2,95 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,24 (д, J=6,8Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 251 [M]<sup>+</sup>.

6-(2,4-Диметоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он  
<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,28 (ш с, 1Н, NH), 7,17 (м, 2Н), 6,93 (дд, J=1,6 & 7,6Гц., 1Н), 6,86 (д, J=1,6Гц., 1Н), 6,63 (д, J=2,4Гц., 1Н), 6,58 (дд, J=2,4 & 8,5Гц., 1Н), 3,79 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,74 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,45 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO).

МС-ЕІ m/z 269 [M]<sup>+</sup>.

6-Піридин-3-іл-1,3-дигідроіндол-2-он  
<sup>1</sup>Н ЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,51 (с, 1Н, NH), 8,81 (д, J=2,5Гц., 1Н), 8,55 (дд, J=1,8 & 5,7Гц., 1Н), 8 (м, 1Н), 7,45 (дд, J=5,7 & 9,3Гц., 1Н), 7,3 (м, 2Н), 7,05 (с, 1Н), 3,51 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>CO).

МС m/z 210 [M]<sup>+</sup>.

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-4-карбонової кислоти (3-хлор-4-етоксифеніл)амід

До розчину 4-карбокси-2-оксиіндолу (200мг, 1,13ммоль) і 3-хлор-4-метоксифеніламіну (178мг, 1,13ммоль) в диметилформаміді (15мл) при кімнатній температурі додавали бензотриазол-1-ілокситрис(диметиламіо)фосфонію гексафторфосфат (BOP реагент, 997мг, 2,26ммоль) після чого 4-диметиламінопіридин (206мг, 1,69ммоль). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 72 годин. Реакцію потім розводили етилацетатом (300мл), промивали насиченим бікарбонатом натрію (100мл), водою, 2N хлорводневою кислотою (100мл), водою (3×200мл) і насиченим водним розчином хлориду натрію. Її потім сушили над сульфатом магнію і концентрували. Залишок розтирали з етилацетатом одержуючи 2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-4-карбонової кислоти (3-хлор-4-метоксифеніл)амід як рожеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 10,50 (с, ш, 1Н, NH), 10,12 (с, ш, 1Н, NH), 7,9 (с, J=2,5Гц., 1Н), 7,62 (дд, J=2,5 & 9Гц., 1Н), 7,38 (д, J=7,6Гц., 1Н), 7,32 (т, J=7,6Гц., 1Н), 7,13 (д, J=9Гц., 1Н), 6,98 (д, J=7,6Гц., 1Н), 3,83 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,69 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 316 [M]<sup>+</sup>.

4-Карбокси-2-оксиіндол

Розчин триметилсилілдіазометану в гексані (2м) додавали по краплям до розчину 2,01г 2-хлор-3-карбоксинітробензолу в 20мл метанолу при кімнатній температурі до завершення виділення газу. Потім додавали оцтову кислоту для гасіння надлишку триметилсилілдіазометану. Реакційна суміш випарювали у вакуумі і залишок сушили в печі протягом ночі. Одержаний 2-хлор-3-метоксикарбонілнітробензол був достатньо чистим для наступної реакції.

Диметилмалонат (6,0мл) додавали до охолодженої льодом суспензії 2,1г гідриду натрію в 15мл ДМСО. Реакційну суміш перемішували при 100°C протягом 1 години і охолоджували до кімнатної температури. Однею порцією додавали 2-хлор-3-метоксикарбонілнітробензол (2,15г) і суміш нагрівали при 100°C протягом 1,5 годин. Реакційна суміш потім охолоджували до кімнатної температури, виливали у льодяну воду, підкислювали до рН5 і екстрагували етилацетатом. Органічний шар промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували одержуючи 3,0г диметил 2-метоксикарбоніл-6-нітрофенілмалонату.

Диметил 2-метоксикарбоніл-6-нітрофенілмалонат (3,0г) кип'ятили в 50мл 6N

хлорводневої кислоти протягом ночі. Суміш концентрували до суха, додавали 20мл етанолу і 1,1г хлориду олова (II) і суміш кип'ятили протягом 2 годин. Суміш фільтрували крізь Целіт, концентрували і хроматографували на силікагелі використовуючи етилацетат:гексан:оцтова кислота як елюент одержуючи 0,65 г (37%) 4-карбокси-2-оксиіндолу як білу тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-cl<sub>6</sub>) δ 12,96 (с, ш, 1Н, COOH), 10,74 (с, ш, 1Н, NH), 7,53 (д, J=8Гц., 1Н), 7,39 (т, J=8Гц., 1Н), 7,12 (д, J=8Гц., 1Н), 3,67 (с, 2Н).

Г. Синтез піролзаміщених 2-індолінонів.

Приклад 1

4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонова кислота

4-Метил-2-піролкарбонової кислоти етиловий естер (комерційно доступний) формілювали використовуючи спосіб А одержуючи (73%) 5-форміл-4-метил-2-піролкарбонової кислоти етиловий естер. Його потім гідролізували використовуючи спосіб Б одержуючи 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбонову кислоту (58%).

Оксиіндол (133мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбоною кислотою (153мг) використовуючи спосіб Г одержуючи 268мг (100%) вказаної в заголовку сполуки як оранжево-червону тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,84 (с, ш, 1Н, NH), 12,84 (с, ш, 1Н, COOH), 10,98 (с, ш, 1Н, NH), 7,82 (д, J=7,5Гц., 1Н), 7,67 (с, 1Н, Н-вініл), 7,18 (т, J=7,5Гц., 1Н), 7,01 (т, J=7,5Гц., 1Н), 6,88 (д, J=7,5Гц., 1Н), 6,71 (д, J=2,2Гц., 1Н), 2,32 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС (негативний метод) 266,8 [M-1]<sup>+</sup>.

Приклад 2

4-Метил-5-(1-метил-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонова кислота

1-Метил-1,3-дигідроіндол-2-он (147мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбоною кислотою (153мг) використовуючи спосіб Г одержуючи 250мг (86%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,82 (с, ш, 1Н, NH), 12,88 (с, ш, 1Н, 7,83 (д, J=7,5Гц., 1Н), 7,65 (с, 1Н, Н-вініл), 7,26 (т, J=7,5Гц., 1Н), 7,02-7,09 (м, 2Н), 6,70 (д, J=2,2Гц., 1Н), 2,32 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС m/z 283,0 [M+1]<sup>+</sup>.

Приклад 3

4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти метиловий естер

Оксиіндол (105мг, 0,79ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти метиловим естером (110мг, 0,67ммоль) використовуючи спосіб Д одержуючи 153,2мг (81%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (360мгц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,98 (с, ш, 1Н, NH), 10,97 (с, ш, 1Н, NH), 7,82 (д, J=7,6Гц., 1Н), 7,67 (с, 1Н, Н-вініл), 7,2 (дт, J=1,2 & 7,7Гц., 1Н), 7,01 (дт, J=1,2, 7,7Гц., 1Н), 6,90 (д, J=7,6Гц., 1Н), 6,77 (д, J=2Гц., 1Н).

МС (ЕС) m/z 283 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 4

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти етиловий естер

5-Хлор-1,3-дигідроіндол-2-он (2,22г, 13,2ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти етиловим естером (2,43г) використовуючи спосіб Д одержуючи 4,1г (94%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,95 (с, ш, 1Н, NH), 7,98 (д, J=2,2Гц., 1Н, Н-4), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,18 (дд, J=2,2 & 8,3Гц., 1Н, Н-6), 6,87 (д, J=8,3Гц., 1Н, Н-7), 7,34 (д, J=1,8Гц., 1Н, Н-3'), 4,27 (к, J=7,2Гц., 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>), 2,33 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>), 1,29 (т, J=7,2Гц., 3Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 330 [M<sup>+</sup>].

Приклад 5

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонова кислота

Суміш 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти етилового естеру (1,3г, 4ммоль) і гідроксиду калію в метанолі (25мл) і етанолі (25мл) нагрівали при температурі кипіння протягом ночі. Нерозчинні матеріали видаляли фільтруванням і суміш нейтралізували 6N хлорводневою кислотою одержуючи 0,876г (70%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-cl<sub>6</sub>) δ 13,80 (с, ш, 1Н, NH), 12,90 (с, ш, 1Н, COOH), 11,06 (с, ш, 1Н, NH), 8,02 (д, J=1,8Гц., 1Н, Н-4), 7,81 (с, 1Н, Н-вініл), 7,20 (дд, J=1,8 & 8,3Гц., 1Н, Н-6), 6,89 (д, J=8,3Гц., 1Н, Н-7), 6,72 (д, J=1,8Гц., 1Н, Н-3'), 2,35 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 302 [M<sup>+</sup>].

Приклад 6

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-іл-пропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,16г, 0,76ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амідом (0,2г, одержували за способом В) одержуючи 60мг (17%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 11,02 (с, ш, 1Н, NH), 8,42 (т, J=5,8Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 8,12 (д, J=1,8Гц., 1Н, Н-4), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,30 (дд, J=1,8 & 8,4Гц., 1Н, Н-6), 6,82 (д, J=8,4Гц., 1Н, Н-7), 6,77 (д, J=2,4Гц., 1Н, Н-3'), 3,22-3,31 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 2,38-2,43 (м, 6Н, 3×СН<sub>2</sub>), 2,35 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>), 1,62-1,71 (м, 6Н, 3×СН<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 456 і 458 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 7

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,16г, 0,75ммоль) конденсували з 5-форміл-4-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (0,2г, одержували за способом В) одержуючи 30мг (8%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 11,02 (с, ш, 1Н, NH), 8,40 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 8,12 (д, J=1,5Гц., 1Н, Н-4), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,30 (дд, J=1,5 & 8,2Гц., 1Н, Н-6), 6,82 (д, J=8,2Гц., 1Н,

Н-7), 6,78 (д, J=2,4Гц., 1Н, Н-3'), 3,23 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 2,38-2,45 (м, 6Н, СН<sub>2</sub> & N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,35 (с, 3Н, СН<sub>3</sub>), 1,61 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 0,93 (т, J=7,1Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 458 і 460 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 8

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (212мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (одержували з етил пірол-2-карбоксилату за способом А, Б і потім В) одержуючи 162мг (38%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,53 (с, ш, 1Н, NH), 11,06 (с, ш, 1Н, NH), 8,37 (т, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,89 (м, 2Н), 7,32 (дд, J=2,0Гц., 1Н), 6,96 (с, 1Н), 6,80-6,84 (м, 2Н), 3,3 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 2,45-2,55 (м, 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> & СН<sub>2</sub>), 0,95 (т, J=7,2Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 430 і 432 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 9

5-(2-Оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (209мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом одержуючи 182мг (42%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,56 (с, ш, 1Н, NH), 11,06 (с, ш, 1Н, NH), 8,36 (т, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,77 (с, 1Н, Н-вініл), 7,73 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,64 (д, J=7,2Гц., 2Н), 7,46 (м, 2Н), 7,32 (м, 2Н), 7,11 (с, 1Н), 6,96 (м, 1Н), 6,80 (м, 1Н), 3,31-3,32 (м, 2Н, СН<sub>2</sub>), 2,46-2,53 (м, 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> & СН<sub>2</sub>), 0,96 (т, J=6,9Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 428 [M<sup>+</sup>].

Приклад 10

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (212мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламідом одержуючи 246мг (55%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,54 (с, ш, 1Н, NH), 11,06 (с, ш, 1Н, NH), 7,90 (м, 2Н), 7,33 (дд, J=1,8 & 8,4Гц., 1Н), 6,82-6,85 (м, 3Н), 3,55 (с, ш, 2Н, СН<sub>2</sub>), 3,25 (с, ш, 3Н, NCH<sub>3</sub>), 2,57 (т, J=6,5Гц., 2Н, СН<sub>2</sub>), 2,45 (м, 4Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,91 (м, 6Н, N(CH<sub>2</sub>СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 444 і 446 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 11

5-(2-Оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (209мг, 1ммоль) конденсували з 5-форміл-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)метиламідом одержуючи 277мг (63%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,58 (с, ш, 1Н, NH), 11,04 (с, ш, 1Н, NH), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,73 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,64 (д, J=7,5Гц., 2Н), 7,46 (м, 2Н), 7,33-7,36 (м, 2Н), 7,11 (с, 1Н), 6,84 (м, 1Н), 6,78 (м, 1Н), 3,55 (с, ш, 2Н, СН<sub>2</sub>), 3,25 (с, ш, 3Н,

$\text{NCH}_3$ ), 2,58 (т, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,44 (м, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 0,92 (м, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

#### Приклад 12

3-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

Оксиіндол (66,5мг, 0,5ммоль) конденсували з 5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (одержували з 3-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти етилового естеру за способом Б потім В) одержуючи 39мг (21%) вказаної в заголовку сполуки.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,34 (с, ш, 1H, NH), 10,88 (с, ш, 1H, NH), 7,62-7,67 (м, 3H), 7,17 (м, 1H), 6,99 (м, 1H), 6,87 (д,  $J=7,6\text{Гц.}$ , 1H), 6,63 (д,  $J=1\text{Гц.}$ , 1H), 3,26-3,32 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,41-2,48 (м, 6H,  $\text{CH}_2$  &  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,29 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,63 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0,93 (т,  $J=7,2\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС-EI  $m/z$  380  $[\text{M}^+]$ .

#### Приклад 13

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (106мг, 0,5ммоль) конденсували з 5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом одержуючи 35мг (15%) вказаної в заголовку сполуки.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,35 (с, ш, 1H, NH), 11,00 (с, ш, 1H, NH), 7,89 (д,  $J=1,9\text{Гц.}$ , 1H, H-4), 7,80 (с, 1H, H-вініл), 7,74 (т,  $J=5,3\text{Гц.}$ , 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,31 (дд,  $J=1,9$  &  $8,4\text{Гц.}$ , 1H, H-6), 6,83 (д,  $J=8,4\text{Гц.}$ , 1H, H-7), 6,63 (с, 1H, H-3'), 3,26 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,41-2,48 (м, 6H,  $\text{CH}_2$  &  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,29 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,63 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0,93 (т,  $J=7,1\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС-EI  $m/z$  458 і 460  $[\text{M}^+-1$  і  $\text{M}^++1]$ .

#### Приклад 14

3-Метил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (105мг, 0,5ммоль) конденсували з 5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом одержуючи 67,8мг (30%) вказаної в заголовку сполуки.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,37 (с, ш, 1H, NH), 11,02 (с, ш, 1H, NH), 7,23-7,73 (м, 11H), 3,29 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,41-2,48 (м, 6H,  $\text{CH}_2$  &  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,29 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,64 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0,94 (т,  $J=7,0\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС-EI  $m/z$  456  $[\text{M}^+]$ .

#### Приклад 15

5-(5-Метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Метокси-1,3-дигідроіндол-2-он (82,5мг, 0,5ммоль) конденсували з 5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом одержуючи 80мг (39%) вказаної в заголовку сполуки.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,45 (с, ш, 1H, NH), 10,70 (с, ш, 1H, NH), 7,68-7,70 (м, 2H), 7,32 (д,  $J=1,8\text{Гц.}$ , 1H), 6,72-6,79 (м, 2H), 6,60 (с, 1H), 3,73 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,28 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,41-2,48 (м, 6H,

$\text{CH}_2$  &  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,29 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,63 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0,93 (т,  $J=7,0\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС  $m/z$  410  $[\text{M}^+]$ .

#### Приклад 16

5-(6-Метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

6-Метокси-1,3-дигідроіндол-2-он (82,5мг, 0,5ммоль) конденсували з 5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом одержуючи 63мг (31%) вказаної в заголовку сполуки.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,22 (с, ш, 1H, NH), 10,86 (с, ш, 1H, NH), 7,39-7,63 і 6,37-6,55 (м, 6H), 3,73 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,3 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,45 (м, 6H,  $\text{CH}_2$  &  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 2,28 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,63 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0,93 (м, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС  $m/z$  410  $[\text{M}^+]$ .

#### Приклад 17

3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

4,5,6,7-Тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти етиловий естер [May, Donald A.; Lash, Timothy D.; J. Org. Chem., 1992, 57:18, 4820-4828] формілювали використовуючи спосіб А потім Б одержуючи 3-форміл-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонову кислоту. 5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (1,43г, 6,8ммоль) конденсували з 3-форміл-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (1,97г) одержуючи 2,2г (67%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

$^1\text{H}$  ЯМР (360МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  13,47 (с, 1H, NH), 11,0 (с, 1H, NH), 8,0 (д, 1H, NH), 7,70 (с, 1H, CH), 7,28 (дд,  $J=2,1$  і  $8,2\text{Гц.}$ , 1H, ArH), 7,16 (м, 1H, ArH), 6,8 (д,  $J=8,3\text{Гц.}$ , 1H, ArH), 3,3 (с, 2H, CONH), 2,5 (м, 6H,  $3\times\text{NCH}_2$ ), 2,78 (ш м, 2H, пірол  $\text{CH}_2$ ), 2,72 (ш м, 2H, пірол  $\text{CH}_2$ ), 1,7 (ш м, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 1,74 (ш с, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 0,96 (т,  $J=7,4\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС-EI  $m/z$  484 і 486  $[\text{M}^+-1$  і  $\text{M}^++1]$ .

#### Приклад 18

3-(5-Бром-2-оксо-0,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (20мг, 0,1ммоль) конденсували з 3-форміл-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (30мг) одержуючи 33мг (46%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

$^1\text{H}$  ЯМР (360МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ )  $\delta$  10,9(с, 1H, NH), 8,0 (м, 1H, NH), 7,68 (м, 1H, ArH), 7,4 (м, 1H, ArH), 7,29 (д,  $J=1,9$  і  $8,5\text{Гц.}$ , 1H, ArH), 6,8 (д,  $J=8\text{Гц.}$ , 1H, ArH), 2,7 (ш м, 4H,  $2\times\text{NCH}_2$ ), 2,4 (м, 8H,  $4\times\text{NCH}_2$ ), 1,7 (ш м, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ), 1,6 (ш м, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 0,93 (т,  $J=7,4\text{Гц.}$ , 6H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ ).

МС-EI  $m/z$  499 і 501  $[\text{M}^+$  і  $\text{M}^++2]$ .

#### Приклад 19

3-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (80мг, 0,4ммоль) конденсували з 3-форміл-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (3-піролідин-1-

ілпропіл)амідом (120мг) одержуючи 43мг (22%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,4 (с, 1H, NH), 10,9 (с, 1H, NH), 8,0 (м, 1H, NH), 7,69 (м, 1H, ArH), 7,49 (м, 1H, ArH), 7,28 (д, J=1,7 і 7,8Гц., 1H, ArH), 6,8 (д, J=8Гц., 1H, ArH), 3,3 (ш м, 2H, 2×NCH<sub>2</sub>), 2,8 (м, 4H, 2× пірол CH<sub>2</sub>), 2,5 (ш м, 4H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,6 (ш м, 8H, 2× пірол CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> і CONHCH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 497 і 499 [M<sup>+</sup> і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 20

3-(2-Оксо-6-піридин-3-іл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

6-Піридин-3-іл-1,3-дигідроіндол-2-он (60мг, 0,4ммоль) конденсували з 3-форміл-4,5,6,7-тетрагідро-2H-ізоіндол-1-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (80мг) одержуючи 50мг (38%) вказаної в заголовку сполуки як червонувату тверду речовину.

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,4 (с, 1H, NH), 11 (с, 1H, NH), 8,9 (д, 1H, NH), 8,7 (дд, 1H, ArH), 8,1 (дд, 1H, ArH), 7,9 (д, 1H, ArH), 7,6 (с, 1H, CH), 7,5 (дд, 1H, ArH), 7,3 (дд, 1H, ArH), 7,1 (м, 2H, ArH), 3,35 (м, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 2,8 (м, 4H, 2× пірол CH<sub>2</sub>), 2,5 (ш м, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> і NCH<sub>2</sub>), 1,75 (ш с, 4H, 2× пірол CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0,9 (т, 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 484 [M<sup>+</sup>].

Приклад 21

4-Бензоіл-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

До суміші бензоїлхлориду (1еквів.) і хлориду алюмінію (1еквів.) в дихлоретані при 0°C додавали етил 3,5-диметил-2-піролкарбоксилат (1еквів.). Суміш перемішували при 80°C протягом 4 г. Суміш потім екстрагували етилацетатом (EtOAc) і H<sub>2</sub>O. Об'єднані органічні екстракти промивали насиченим бікарбонатом натрію і насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили і концентрували одержуючи (51%) 4-бензоіл-3,5-диметил-1H-пірол-2-карбонову кислоту.

Суміш 4-бензоіл-3,5-диметил-1H-пірол-2-карбонової кислоти етилового естеру (4,13г, 15,2ммоль) і церію амонію нітрату (33г, 4еквів.) в 50мл тетрагідрофуран (ТГФ):оцтова кислота (НО-Ас):H<sub>2</sub>O 1:1:1 кип'ятили протягом ночі. Реакційну суміш потім охолоджували, екстрагували EtOAc і підлговували до pH9 карбонатом натрію. Органічний шар потім промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили (MgSO<sub>4</sub>) і концентрували за допомогою колонкової хроматографії одержуючи 3,25г (75%) 4-бензоіл-5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти етилового естеру як жовту тверду речовину.

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он конденсували з 4-бензоіл-5-форміл-3-метил-1H-пірол-2-карбоною кислотою використовуючи спосіб Г одержуючи 4-бензоіл-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонову кислоту.

Згадану вище карбонову кислоту потім конденсували з N,N-діетил-1,3-пропандіаміном використовуючи спосіб В одержуючи вказаний в заголовку продукт.

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 7,96 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,76 (д, J=7,0Гц., 2H), 7,68 (т, 1H), 7,56 (м, 2H), 7,40 (с, 2H) 7,33 (дд, J=1,6 & 8,3Гц., 1H, H-6), 6,84 (д, J=8,3Гц., 1H, H-7), 3,33 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,42-2,46 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,10 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,65 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,94 (т, J=7,0Гц., 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС електронний удар m/z 564 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 22

4-Бензоіл-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-іюрфолін-4-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-cl<sub>6</sub>) δ 14,10 (с, 1H, NH), 11,14 (ш с, 1H, NH), 7,92 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,75 (м, 2H), 7,69 (т, 1H), 7,56 (м, 2H), 7,42 (м, 2H), 7,33 (дд, J=1,9 & 8,3Гц., 1H, H-6), 6,85 (д, J=8,3Гц., 1H, H-7), 3,56 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3,33 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,35 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,10 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,70 (м, 2H, CH<sub>2</sub>).

Приклад 23

4-Бензоіл-3-метил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідін-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,18 (с, 1H, NH), 11,14 (ш с, 1H, NH), 8,01 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,74 (м, 1H), 7,67 (м, 1H), 7,55 (м, 1H), 7,32 (с, 1H, H-вініл), 7,17 (м, 1H), 6,92 (м, 1H), 3,36 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,44 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,11 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,65-1,75 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>).

МС Електронний удар m/z 482 [M<sup>+</sup>].

Приклад 24

4-Бензоіл-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідін-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,01 (с, 1H, NH), 11,18 (ш с, 1H, NH), 7,98 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,75 (м, 2H), 7,68 (м, 1H), 7,55 (м, 2H), 7,40 (м, 2H), 7,33 (дд, J=2,0 & 8,2Гц., 1H, H-6), 6,84 (д, J=8,2Гц., 1H, H-7), 3,34 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,42-2,47 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,09 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,70 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,64 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

Приклад 25

4-Бензоіл-3-метил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідін-і-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,15 (с, 1H, NH), 11,16 (ш с, 1H, NH), 7,98 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,77 (д, J=7,7Гц., 2H), 7,69 (м, 1H), 7,53-7,63 (м, 4H), 7,44 (м, 2H), 7,33-7,37 (м, 2H), 7,24 (с, 2H), 7,12 (с, 1H), 3,36 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,43-2,48 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,12 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,74 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,69 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС Електронний удар m/z 558 [M<sup>+</sup>].

Приклад 26

4-Бензоіл-5-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1H-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідін-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,99 (с, 1H, NH), 11,05 (ш с, 1H, NH), 7,93 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,72 (м, 2H), 7,65 (м, 1H), 7,54 (м, 2H), 7,15 (с, 1H, H-вініл), 7,04 (д, J=8,4Гц., 1H, H-4), 6,51 (дд, J=2,3 & 8,4Гц., 1H, H-5), 6,44 (д, J=2,3Гц., 1H, H-7), 3,74 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,35 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,42-2,46 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,10 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,72 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,65 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС Електронний удар m/z 512 [M<sup>+</sup>].

## Приклад 27

4-Бензоїл-5-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,24 (с, 1H, NH), 10,90 (ш с, 1H, NH), 7,97 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,75 (д, J=7,2Гц., 2H), 7,69 (м, 1H), 7,56 (м, 2H), 7,24 (с, 1H, Н-вініл), 6,79 (м, 2H), 6,66 (м, 1H), 3,67 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,34 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,43-2,48 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,14 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,71 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,66 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС Електронний удар m/z 512 [M<sup>+</sup>].

## Приклад 28

4-Бензоїл-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,20 (с, 1H, NH), 11,14 (ш с, 1H, NH), 8,03 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,75 (м, 2H), 7,68 (м, 1H), 7,55 (м, 2H), 7,38 (с, 1H, Н-вініл), 7,08 (м, 1H), 7,01 (м, 1H), 6,87 (м, 1H), 3,34 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,42-2,48 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 2,09 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,70 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 1,65 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС Електронний удар m/z 500 [M<sup>+</sup>].

## Приклад 29

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он конденсували з 4-ацетил-5-форміл-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (одержували з 4-ацетил-5-форміл-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти етилового естеру за способом Б потім В) одержуючи вказаний в заголовку продукт.

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,19 (с, 1H, NH), 11,19 (ш с, 1H, NH), 8,15 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8,11 (с, 1H, Н-вініл), 7,72 (д, J=1,8Гц., 1H, Н-4), 7,38 (дд, J=1,8 & 8,2Гц., 1H, Н-6), 6,87 (д, J=8,2Гц., 1H, Н-7), 3,27 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,46 (м, 9H, CH<sub>3</sub> & 3×CH<sub>2</sub>), 1,64 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 0,93 (т, J=7,1Гц., 6H, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

## Приклад 30

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 8,14 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8,10 (с, 1H, Н-вініл), 7,70 (д, 1H, Н-4), 7,36 (дд, J=1,6 & 8,1Гц., 1H, Н-6), 6,85 (д, J=8,1Гц., 1H, Н-7), 3,32 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,35-2,48 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>), 1,65-1,71 (м, 6H, 3×CH<sub>2</sub>).

МС m/z 499 & 501 [M<sup>+</sup>] & [M<sup>+</sup>+2].

## Приклад 31

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-морфолін-4-ілпропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,20 (с, 1H, NH), 11,26 (ш с, 1H, NH), 8,09 (м, 2H, Н-вініл & CONHCH<sub>2</sub>), 7,73 (д, J=1,5Гц., 1H, Н-4), 7,38 (дд, J=1,5 & 8,3Гц., 1H, Н-6), 6,87 (д, J=8,3Гц., 1H, Н-7), 3,55 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3,26 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,35 (м, 6H, 3×CH<sub>3</sub>), 1,68 (м, 2H, CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 514 & 516 [M<sup>+</sup>-1] & [M<sup>+</sup>+1].

## Приклад 32

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (3-гідроксипропіл)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,17 (с, 1H, NH), 11,25 (ш с, 1H, NH), 8,10 (с, 1H, Н-вініл), 8,03 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,71 (ш с, 1H, Н-4), 7,37 (ш д, J=8,4Гц., 1H, Н-6), 6,87 (д, J=8,4Гц., 1H, Н-7), 4,51 (ш с, 1H, OH), 3,51 (ш с, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,36 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,43 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,70 (м, 2H, CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 445 & 447 [M<sup>+</sup>-1] & [M<sup>+</sup>+1].

## Приклад 34

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-морфолін-4-ілетиламід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,19 (с, 1H, NH), 11,14 (ш с, 1H, NH), 8,10 (с, 1H, Н-вініл), 7,84 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,71 (д, J=1,8Гц., 1H, Н-4), 7,38 (дд, J=1,8 & 8,2Гц., 1H, Н-6), 6,87 (д, J=8,2Гц., 1H, Н-7), 3,58 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3,40 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,49 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 2,45 (м, CH<sub>3</sub> & CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 500 & 502 [M<sup>+</sup>-1] & [M<sup>+</sup>+1].

## Приклад 35

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

<sup>1</sup>H ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,17 (с, 1H, NH), 11,23 (с, 1H, NH), 8,11 (с, 1H, Н-вініл), 7,91 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,73 (д, J=1,9Гц., 1H, Н-4), 7,39 (дд, J=1,9 & 8,3Гц., 1H, Н-6), 6,88 (д, J=8,3Гц., 1H, Н-7), 3,40 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,62 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,57 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,49 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,69 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

## Приклад 36

4-Ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-3-метил-1Н-пірол-2-карбонової кислоти [2-(4-гідроксифеніл)етил]амід

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,21 (с, 1H, NH), 11,18 (с, 1H, OH), 9,09 (с, 1H, NH), 8,06-8,10 (м, 2H), 7,73 (с, 1H), 7,38 (д, J=7,8Гц., 1H), 7,04 (д, J=7,1Гц., 2H), 6,88 (д, J=7,8Гц., 1H), 6,67 (д, J=7,1Гц., 2H), 3,42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,72 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,56 (с, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 2,37 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 507 & 509 [M<sup>+</sup>-1] & [M<sup>+</sup>+1].

## Приклад 37

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

Суміш гідрохлориду 2-аміноацетофенону (1еквів.), етилу ізобутирилацетату (1,2еквів.) і ацетату натрію (2,4еквів.) в H<sub>2</sub>O перемішували при 100°C протягом 18 годин і потім охолоджували до кімнатної температури. Водний шар декантували і масло розчиняли в етилацетаті. Його потім промивали водою і насиченим водним розчином хлориду натрію і потім сушили одержуючи (93%) 2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етилового естеру як червоно-коричнєве масло.

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,21 (с, ш, 1H, NH), 7,14-7,27 (м, 5H), 6,70 (д, J=2,7Гц., 1H), 4,02 (к, J=7,1Гц., 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,65 (м, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,22 (д, J=7,5Гц., 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,04 (т, J=7,1Гц., 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 257 [M<sup>+</sup>].



Згаданий вище пірол формілювали використовуючи спосіб А одержуючи (41%) 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер як червонувату тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,35 (с, ш, 1Н, NH), 9,14 (с, 1Н, CHO), 7,36 (с, 5Н), 3,96 (к, J=7,1Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,74 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,29 (д, J=6,9Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,90 (т, J=7,1Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 285 [M<sup>+</sup>].

Естер піролкарбонової кислоти гідролізували використовуючи спосіб Б одержуючи (57%) 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонову кислоту як бежеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,28 (с, ш, 1Н, COOH), 12,02 (с, ш, 1Н, NH), 9,10 (с, 1Н, CHO), 7,35 (с, 5Н), 3,81 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,28 (д, J=6,9Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 257 [M<sup>+</sup>].

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (120мг, 0,31ммоль) конденсували з 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (одержували за способом В) одержуючи 120мг (71%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14,23 (с, ш, 1Н, NH), 11,08 (с, ш, 1Н, NH), 7,38-7,55 (м, 7Н, Ar-H & CONHCH<sub>2</sub>), 7,30 (с, 1Н, Н-вініл), 7,26 (дд, J=1,8 & 7,8Гц., 1Н), 6,85 (д, J=8,7Гц., 1Н), 3,36 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,07 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,34 (к, J=7,1Гц., 4Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,22 (т, J=6,9Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,40 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,31 (д, J=6,9Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,86 (т, J=7,1Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС m/z 565,1 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 38

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (127мг, 0,28ммоль) конденсували з 3-піролідин-1-іл-пропіламіном (43мг, 0,336ммоль) одержуючи 140мг (66%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14,40 (с, ш, 1Н, NH), 7,38-7,47 (м, 7Н), 7,23-7,27 (м, 2Н), 6,84 (д, J=8,1Гц., 1Н), 3,36 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,08 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,30 (м, 4Н, 2xCH<sub>2</sub>), 2,20 (т, J=7,0Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,62 (м, 4Н, 2xCH<sub>2</sub>), 1,42 (т, J=7,0Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,31 (д, J=7,2Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 560 і 562 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 39

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (57г, 0,27ммоль) конденсували з 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (120мг) одержуючи 78мг (53%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14,23 (с, ш, 1Н, NH), 11,09 (с, ш, 1Н, NH), 7,38-7,51 (м, 6Н), 7,25-7,28 (м, 2Н), 7,19 (т, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 6,85 (д, J=7,8Гц., 1Н), 3,43 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,11 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,28-2,39 (м, 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> & CH<sub>2</sub>), 1,31 (д,

J=6,9Гц., CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,85 (т, J=7,0Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 548 і 550 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 40

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (53мг, 0,25ммоль) конденсували з 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]амідом (300мг) одержуючи 65мг вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14,22 (с, ш, 1Н, NH), 11,08 (с, ш, 1Н, NH), 7,23-7,50 (м, 9Н), 6,85 (д, J=8,7Гц., 1Н), 3,37 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,05 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,24 (м, 8Н, 4xCH<sub>2</sub>), 2,11 (м, 5Н, CH<sub>2</sub> & CH<sub>3</sub>), 1,42 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,31 (д, J=7,2Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 589; і 591 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 41

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-ізопропіл-4-феніл-Н-пірол-3-карбонова кислота

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (170мг, 0,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2-ізопропіл-4-феніл-1Н-пірол-3-карбоною кислоту (205мг) використовуючи спосіб Г одержуючи 210мг (58%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 14,31 (с, ш, 1Н, NH), 11,16 (с, ш, 1Н, NH), 7,26-7,44 (м, 7Н), 7,11 (с, 1Н, Н-вініл), 6,85 (д, J=7,8Гц., 1Н), 3,78 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,34 (д, J=6,9Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 452 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 42

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (44мг, 0,21ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (70мг, одержували таким же самим чином що і ізопропіловий аналог, вище) одержуючи 0,03г (27%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 13,87 (с, ш, 1Н, NH), 11,11 (с, ш, 1Н, NH), 7,36-7,51 (м, 6Н), 7,26 (дд, J=1,8 & 8,1Гц., 1Н), 7,2 (с, 1Н, Н-вініл), 7,09 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 6,83 (д, J=8,1Гц., 1Н), 3,17 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,48 (м, CH<sub>3</sub>), 2,29-2,35 (м, 6Н, 3xNCH<sub>2</sub>), 1,59 (м, 4Н, 2xCH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 518 і 520 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 43

5-[6-(2-Метоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-(2-Метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (50мг, 0,21ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (70мг) одержуючи 0,04г (35%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 13,82 (с, ш, 1Н, NH), 11,02 (с, ш, 1Н, NH), 7,48 (м, 2Н), 7,43 (м, 1Н), 7,38 (м, 2Н), 7,32 (м, 1Н), 7,24 (м, 2Н), 7,16 (с, 1Н,

H-вініл), 7,08 (м, 2H), 7,03 (м, 1H), 7,0 (м, 2H), 3,74 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,19 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,49 (м, CH<sub>3</sub>), 2,32-2,38 (м, 6H, 3×NCH<sub>2</sub>), 1,59 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 546 [M<sup>+</sup>].

Приклад 44

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (46мг, 0,22ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (65мг) одержуючи 60мг (55%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,86 (с, ш, 1H, NH), 11,09 (с, ш, 1H, NH), 7,47-7,49 (м, 2H), 7,38-7,41 (м, 4H), 7,26 (дд, J=2,2 & 8,3Гц., 1H), 7,21 (с, 1H, H-вініл), 7,04 (м, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6,77 (д, J=8,3Гц., 1H), 3,15 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,48 (м, CH<sub>3</sub>), 2,16 (т, J=6,8Гц., 2H, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,02 (с, 6H, 2×NCH<sub>3</sub>).

МС m/z 493 і 494,8 [M<sup>+</sup> і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 45

5-[6-(2-Метоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

6-(2-Метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (53мг, 0,22ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (65мг) одержуючи 0,05г (44%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву гуму.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,82 (с, ш, 1H, NH), 11,02 (с, ш, 1H, NH), 7,37-7,52 (м, 5H), 7,32 (м, 1H), 7,22-7,27 (м, 2H), 7,16 (с, 1H), 7,08 (м, 2H), 7,03 (м, 1H), 7,0 (м, 2H), 3,74 (с, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,15 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,49 (м, CH<sub>3</sub>), 2,16 (т, J=6,5Гц., 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,02 (с, 6H, 2×NCH<sub>3</sub>).

МС m/z 521 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 46

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (60мг, 0,29ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти етиловим естером (75мг) одержуючи 78мг (60%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,01 (с, ш, 1H, NH), 11,13 (с, ш, 1H, NH), 7,42-7,46 (м, 3H), 7,27-7,34 (м, 4H), 7,12 (с, 1H), 6,84 (дд, J=2,2 & 8,3Гц., 1H), 3,99-4,03 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,61 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 0,98-1,03 (м, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 450 і 452 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 47

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,47г, 2,2ммоль) конденсували з 5-форміл-2-метил-4-феніл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (0,75г) одержуючи 0,11г (42%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,86 (с, ш, 1H, NH), 7,42-7,46 (м, 3H), 7,37-7,50 (м, 7H), 7,24-7,28

(м, 2H), 6,83 (д, J=8,1Гц., 1H), 3,09 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,45 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,38 (к, J=7,1Гц., 4H, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,26 (т, J=6,9Гц., 2H, NCH<sub>2</sub>), 1,42 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 0,87 (т, J=7,1Гц., 6H, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 535,0 і 537 [M<sup>+</sup> і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 48

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

Суміш трет-бутилу 3-оксобутирату і нітриту натрію (1еквів.) в оцтовій кислоті перемішували при кімнатній температурі одержуючи трет-бутил 2-гідроксиіміно-3-оксобутират.

Етил 3-оксобутират (1еквів.), цинковий пил (3,8еквів.) і неочищений трет-бутил 2-гідроксиіміно-3-оксобутирату в оцтовій кислоті перемішували при 60°C протягом 1г. Реакційну суміш виливали в H<sub>2</sub>O і фільтрат збирали одержуючи (65%) 2-трет-бутилоксикарбоніл-3,5-диметил-4-етоксикарбонілпірол.

Суміш 2-трет-бутилоксикарбоніл-3,5-диметил-4-етоксикарбонілпіролу і триетилортоформіату (1,5еквів.) в трифтороцтовій кислоті перемішували при 15°C протягом 1 години. Реакцію концентрували і залишок очищали одержуючи (64%) 2,4-диметил-3-етоксикарбоніл-5-формілпірол як жовті голки.

2,4-диметил-3-етоксикарбоніл-5-формілпірол гідролізували використовуючи спосіб Б одержуючи (90%) 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонову кислоту.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 12 (ш с, 2H, NH і CO<sub>2</sub>H), 9,58 (с, 1H, CHO), 2,44 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3H, CH<sub>3</sub>).

МС m/z 267 [M<sup>+</sup>].

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,17г, 0,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (0,2г, одержували за способом В) використовуючи спосіб Б одержуючи 0,3г (83%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, ш, 1H, NH), 10,94 (с, ш, 1H, NH), 8,07 (д, J=1,8Гц., 1H, H-4), 7,75 (с, 1H, H-вініл), 7,44 (т, J=5,2Гц., 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,24 (дд, J=1,8 & 8,4Гц., 1H, H-6), 6,82 (д, J=8,4Гц., 1H, H-7), 3,26-3,33 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,42 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,38 (т, J=6,7Гц., 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,18 (с, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 430 і 432 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 49

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (0,17г, 0,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (0,2г) одержуючи 0,13г (36%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,59 (с, ш, 1H, NH), 10,93 (ш, 1H, NH), 7,85 (д, J=7,92Гц., 1H, H-4), 7,63-7,65 (м, 3H), 7,40-7,47 (м, 3H), 7,32-7,36 (м, 1H, Ar-H), 7,30 (дд, J=1,6 & 7,9Гц., 1H, H-5), 7,11 (д, J=1,6Гц., 1H, H-7), 3,28-3,34 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,38 (т, J=6,8Гц., 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,18 (с, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 428 [M<sup>+</sup>].

Приклад 50

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

5-Хлор-1,3-дигідроіндол-2-он (0,1г, 0,6ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (0,15г) одержуючи 0,22г (90%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 10,98 (ш, 1Н, NH), 7,96 (д, J=2,0Гц., 1Н, H-4), 7,75 (с, 1Н, H-вініл), 7,50 (т, J=5,5Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,12 (дд, J=2,0 & 8,3Гц., 1Н, H-6), 6,86 (д, J=8,3Гц., 1Н, H-7), 3,26-3,31 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,36 (т, J=6,6Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,17 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 386 [M<sup>+</sup>].

Приклад 51

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,17г, 0,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (0,2г) одержуючи 0,09г (26%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 10,98 (ш, 1Н, NH), 8,09 (д, J=1,7Гц., 1Н, H-4), 7,76 (с, 1Н, H-вініл), 7,42 (т, J=5,5Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,24 (дд, J=1,7 & 8,0Гц., 1Н, H-6), 6,82 (д, J=8,0Гц., 1Н, H-7), 3,23-3,32 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,46-2,55 (м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,96 (т, J=7,2Гц., 6Н, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 458 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 52

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,09г, 0,4ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (0,1г) одержуючи 0,14г (81%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 10,98 (ш, 1Н, NH), 8,09 (д, J=1,9Гц., 1Н, H-4), 7,76 (с, 1Н, H-вініл), 7,53 (т, J=5,5Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,24 (дд, J=1,9 & 8,5Гц., 1Н, H-6), 6,81 (д, J=8,5Гц., 1Н, H-7), 3,29-3,35 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,54 (т, J=6,9Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,47 (м, під ДМСО), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,66-1,69 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 456 і 458 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 53

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,09г, 0,4ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амідом (0,1г) одержуючи 0,1г (59%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,63 (с, ш, 1Н, NH), 10,99 (ш, 1Н, NH), 8,09 (д, J=2,2Гц., 1Н, H-4), 7,77 (с, 1Н, H-вініл), 7,71 (т, J=5,7Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,65 (с, 1Н, Ar-H), 7,25 (дд, J=2,2 &

8,4Гц., 1Н, H-6), 7,20 (с, 1Н, Ar-H), 6,89 (с, 1Н, Ar-H), 6,81 (д, J=8,4Гц., 1Н, H-7), 4,02 (т, J=6,7Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 3,18 (к, J=6,7Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1-93 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 467 і 469 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 54

5-[6-(2-Метоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

6-(2-Метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (30мг, 0,13ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (30мг) одержуючи 0,06г (100%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву гуму.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, ш, 1Н, NH), 10,89 (с, ш, 1Н, NH), 7,79 (д, J=8,4Гц., 1Н), 7,63 (с, 1Н, H-вініл), 7,46 (т, J=5,5Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,28-7,35 (м, 2Н), 6,99-7,11 (м, 4Н), 3,76 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,27-3,31 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,39 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,37 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,18 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 458 [M<sup>+</sup>].

Приклад 55

5-[6-(3-Метоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

6-(3-Метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (30мг, 0,13ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом (30мг) одержуючи 8мг (14%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,59 (с, ш, 1Н, NH), 10,92 (с, ш, 1Н, NH), 7,84 (д, J=7,6Гц., 1Н), 7,65 (с, 1Н, H-вініл), 7,42 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,36 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,29 (дд, J=1,6 & 7,6Гц., 1Н), 7,20 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,14 (д, J=2,8Гц., 1Н), 7,11 (д, J=1,6Гц., 1Н), 6,91 (дд, J=2,8 & 7,8Гц., 1Н), 3,82 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,21-3,33 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,36-2,40 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,18 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 458 [M<sup>+</sup>].

Приклад 56

2,4-Диметил-5-(2-оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (80мг, 0,4ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (0,1г) використовуючи спосіб Б одержуючи 79мг (46%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,66 (с, ш, 1Н, NH), 10,95 (ш, 1Н, NH), 8,15 (д, J=1,2Гц., 1Н), 7,81 (с, 1Н, H-вініл), 7,71 (д, J=7,5Гц., 1Н), 7,40-7,47 (м, 4Н), 7,31 (м, 1Н), 6,95 (д, J=8,1Гц., 1Н), 3,2-3,31 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,46-2,55 (м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 0,96 (т, J=7,4Гц., 6Н, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 456 [M<sup>+</sup>].

Приклад 57

2,4-Диметил-5-(2-оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

5-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (0,04г, 0,2ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-

ілетил)амідом (0,04г) одержуючи вказаний в заголовку продукт як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,65 (с, ш, 1Н, NH), 10,96 (ш, 1Н, NH), 8,15 (д, J=1,0Гц., 1Н), 7,80 (с, 1Н, Н-вініл), 7,71 (д, J=7,2Гц., 2Н), 7,49 (т, J=6,3Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,41-7,46 (м, 3Н), 7,31 (м, 1Н), 6,95 (д, J=7,8Гц., 1Н), 4,08 (м, 4Н, 2×NCH<sub>2</sub>), 3,32 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,55 (т, J=7,1Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,47 (м, під ДМСО), 2,43 (с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,66 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 454 [M<sup>+</sup>].

Приклад 58

2,4-Диметил-5-(2-оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амід

5-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (8мг, 0,04ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амідом (10мг) одержуючи 10мг (59%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,67 (с, ш, 1Н, NH), 10,96 (ш, 1Н, NH), 8,16 (д, J=1,2Гц., 1Н), 7,81 (с, 1Н, Н-вініл), 7,65-7,72 (м, 4Н), 7,44 (м, 3Н), 7,31 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,21 (с, 1Н, Ar-H), 4,02 (т, J=6,5Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 3,19 (к, J=6,5Гц., 2Н, CONHCH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,93 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 465 [M<sup>+</sup>].

Приклад 59

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (0,08г, 0,4ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (0,1г) одержуючи 65мг (38%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 10,99 (ш, 1Н, NH), 7,86 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,62-7,66 (м, 3Н), 7,40-7,47 (м, 3Н), 7,28-7,36 (м, 2Н), 7,10 (д, J=1,2Гц., 1Н), 3,26 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,46-2,55 (м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,97 (т, J=7,2Гц., 6Н, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 456 [M<sup>+</sup>].

Приклад 60

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (30мг, 0,15ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (40мг) одержуючи 5,9мг (8,5%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, ш, 1Н, NH), 10,99 (ш, 1Н, NH), 7,86 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,63-7,66 (м, 3Н), 7,51 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,45 (м, 2Н), 7,28-7,36 (м, 2Н), 7,10 (д, J=1,5Гц., 1Н), 3,31 (м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,55 (т, J=6,6Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 454 [M<sup>+</sup>].

Приклад 61

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (8мг, 0,04ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-імідазол-і-ілпропіл)амідом (10мг) одержуючи 7,3мг (43%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,62 (с, ш, 1Н, NH), 10,99 (ш, 1Н, NH), 7,86 (д, J=8,2Гц., 1Н), 7,62-7,70 (м, 5Н), 7,45 (м, 2Н), 7,35 (м, 1Н), 7,30 (дд, J=1,4 & 8,2Гц., 1Н), 7,21 (с, 1Н), 7,10 (д, J=1,4Гц., 1Н), 6,89 (с, 1Н), 4,02 (т, J=6,9Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,19 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,93 (т, J=6,9Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 465 [M<sup>+</sup>].

Приклад 62

5-[6-(3,5-Дихлорфеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

6-(3,5-Дихлорфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (64мг, 0,23ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (60мг) одержуючи 53мг (44%) вказаної в заголовку сполуки як світло-коричневу тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,62 (с, ш, 1Н, NH), 10,99 (с, 1Н, NH), 7,89 (д, J=7,9Гц., 1Н, Н-4), 7,69-7,71 (м, 3Н), 7,55 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,37 (м, 2Н), 7,14 (д, J=1,4Гц., 1Н, Н-7), 3,27 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,48-2,58 (м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,97 (т, J=6,8Гц., 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС m/z 526,9 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 63

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-піридин-3-іл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

6-Піридин-3-іл-1,3-дигідроіндол-2-он (40мг, 0,19ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (50мг) одержуючи 29мг (33%) вказаної в заголовку сполуки як світло-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,62 (с, ш, 1Н, NH), 11,05 (с, ш, 1Н, NH), 8,86 (с, ш, 1Н), 8,53 (д, J=5,8Гц., 1Н), 8,04 (м, 1Н), 7,91 (д, J=8,1Гц., 1Н), 7,70 (с, 1Н, Н-вініл), 7,40-7,48 (м, 2Н), 7,35 (д, J=7,5Гц., 1Н), 7,14 (с, 1Н), 3,26 (м, 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,48-2,55 (м, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,38 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,96 (т, J=6,9Гц., 6Н, 2×NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 457 [M<sup>+</sup>].

Приклад 64

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-піридин-3-іл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-Піридин-3-іл-1,3-дигідроіндол-2-он (60мг, 0,28ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (75мг) одержуючи 90мг (71%) вказаної в заголовку сполуки як світло-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1Н, NH), 11,05 (с, ш, 1Н, NH), 8,86 (д, J=1,5Гц., 1Н), 8,54 (дд, J=1,5 & 4,8Гц., 1Н), 8,05 (м, 1Н), 7,91 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,70 (с, 1Н, Н-вініл), 7,44-7,53 (м,

2H), 7,36 (дд, J=1,5 & 8,1Гц., 1H), 7,15 (д, J=1,2Гц., 1H), 3,33 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,47-2,57 (м, 6H, 3×NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4H, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 455 [M<sup>+</sup>].

Приклад 65

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-піридин-3-іл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-диметиламінопропіл)амід

6-Піридин-3-іл-1,3-дигідроіндол-2-он (42мг, 0,2ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-диметиламінопропіл)амідом (50мг) одержуючи 67мг (75%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-коричневу тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, ш, 1H, NH), 11,00 (с, ш, 1H, NH), 8,86 (с, ш, 1H), 8,54 (с, ш, 1H), 8,04 (м, 1H), 7,90 (д, J=8,0Гц., 1H), 7,69 (с, 1H, H-вініл), 7,63 (м, 1H), 7,45-7,48 (м, 1H), 7,35 (дд, J=1,7 & 8,0Гц., 1H), 7,15 (д, J=1,7Гц., 1H), 3,21-3,27 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,28 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,14 (с, 6H, 2×NCH<sub>3</sub>), 1,64 (м, 2H, CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 443 [M<sup>+</sup>].

Приклад 66

2,4-Диметил-5-(2-оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-диметиламінопропіл)амід

5-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (67мг, 0,32ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-диметиламінопропіл)амідом (81мг) одержуючи 40мг (28%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,66 (с, ш, 1H, NH), 10,92 (с, ш, 1H, NH), 8,14 (с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,71 (м, 2H), 7,62 (м, 1H), 7,44 (м, 3H), 7,32 (м, 1H), 6,95 (м, 1H), 3,33 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 6H, 2×CH<sub>3</sub>), 2,27 (м, 2H, NCH<sub>2</sub>), 2,13 (с, 6H, 2×NCH<sub>3</sub>), 1,63 (м, 2H, CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 442 [M<sup>+</sup>].

Приклад 67

2,4-Диметил-5-(2-оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (1,5г, 7,16ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (2г) одержуючи 1,3г (40%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,64 (с, 1H, NH), 10,91 (с, 1H, NH), 8,14 (д, J=1,4Гц., 1H, ArH), 7,8 (с, 1H, ArH), 7,7 (дд, J=1,2 і 8,5Гц., 2H, ArH), 7,6 (т, J=5,3Гц., 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7,4 (м, 3H, ArH), 7,3 (т, J=7,4Гц., 1H, ArH), 6,9 (д, J=8,0Гц., 1H, ArH), 3,2 (м, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 2,5 (м, 12H, 3×NCH<sub>2</sub> і 2×CH<sub>3</sub>), 1,61 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0,93 (т, J=6,7Гц., 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 470 [M<sup>+</sup>].

Приклад 68

2,4-Диметил-5-(2-оксо-6-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

6-Феніл-1,3-дигідроіндол-2-он (1,5г, 7,16ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-

1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (2г) одержуючи 1,9г (57%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,58 (с, 1H, NH), 10,94 (с, 1H, NH), 7,8 (д, J=7,9Гц., 1H, ArH), 7,6 (м, 4H, ArH), 7,4 (т, J=7,5Гц., 2H, ArH), 7,3 (м, 2H), 7,1 (д, J=1,4Гц., 1H, ArH), 3,2 (м, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 2,5 (м, 12H, 3×NCH<sub>2</sub> і 2×CH<sub>3</sub>), 1,61 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0,93 (т, J=6,7Гц., 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 470 [M<sup>+</sup>].

Приклад 69

3-[4-(3-Діетиламінопропілкарбамоіл)-3,5-диметил-1H-пірол-2-ілметилен]-2-оксо-2,3-дигідро-1H-індол-4-карбонової кислоти (3-хлор-4-метоксифеніл)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1H-індол-4-карбонової кислоти (3-хлор-4-метоксифеніл)амід (1г, 3,16ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (1г, 3,58ммоль) одержуючи 1,7г (85%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

МС-EI m/z 578,2 [M<sup>+</sup>].

Приклад 70

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (0,5г, 2,36ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амідом (0,51г) одержуючи 0,84г вказаної в заголовку сполуки як червоно-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,61 (с, 1H, NH), 10,99 (с, 1H, NH), 8,09 (д, J=1,8Гц., 1H, ArH), 7,7 (м, 4H), 7,2 (дд, J=1,8 і 8,3Гц., 2H, ArH), 6,8 (д, J=7,8Гц., 1H, ArH), 3,3 (ш с, 4H, 2×NCH<sub>2</sub>), 3,2 (м, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 2,6 (ш с, 2H, NCH<sub>2</sub> і 2×CH<sub>3</sub>), 2,4 (с, 6H, 2×CH<sub>3</sub>), 1,66 (м, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0,98 (т, J=7,1Гц., 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 472 і 474 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 71

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-діізопропіл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (100мг, 0,47ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-діізопропіл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (150мг) одержуючи 0,15г (62%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,97 (с, 1H, NH), 10,95 (с, 1H, NH), 8,09 (д, J=1,3Гц., 1H, ArH), 7,84 (м, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,23 (дд, J=1,3 і 8,1Гц., 1H, ArH), 6,8 (д, J=8,1Гц., 1H, ArH), 3,5 (м, 1H, CH), 3,3 (м, 3H, CH і NHCH<sub>2</sub>), 2,5 (ш м, 6H, 3×NCH<sub>2</sub>), 1,28 (д, J=6,9Гц., 6H, 2×CH<sub>3</sub>), 1,23 (д, J=6,6Гц., 6H, 2×CH<sub>3</sub>), 0,96 (м, 6H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 514 і 516 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 72

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-діізопропіл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-діетиламінопропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (90мг, 0,42ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-діізопропіл-1H-пірол-3-карбонової кислоти (3-

діетиламінопропіл)амідом (140мг) одержуючи 54мг (25%) вказаної в заголовку сполуки як червоно-коричневу тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,98 (с, 1Н, NH), 10,96 (с, 1Н, NH), 8,09 (д, J=1,7Гц., 2Н), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,23 (дд, J=1,7 і 8,1Гц., 1Н, ArH), 6,82 (д, J=8,1Гц., 1Н, ArH), 3,5 (м, 1Н, CH), 3,25 (м, 2Н, NHCH<sub>2</sub>), 3,15 (м, 1Н, CH), 2,7 (ш с, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 1,7 (ш м, 2Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,28 (д, J=6,9Гц., 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,24 (д, J=5,9Гц., 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,06 (м, 6Н, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 528 і 530 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 73

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-діізопропіл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (130мг, 0,6ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-діізопропіл-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (3-піролідин-1-ілпропіл)амідом (150мг, 0,45ммоль) одержуючи 36мг (15%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,98 (с, 1Н, NH), 10,97 (с, 1Н, NH), 8,10 (д, J=1,6Гц., 2Н), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,23 (дд, J=1,6 і 7,6Гц., 1Н, ArH), 6,82 (д, J=7,6Гц., 1Н, ArH), 3,5 (м, 1Н, CH), 3,25 (м, 2Н, NHCH<sub>2</sub>), 3,15 (м, 1Н, CH), 2,7 (ш с, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>), 1,7 (ш м, 6Н, 3×NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,28 (д, J=5,6Гц., 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,24 (д, J=5,7Гц., 6Н, 2×CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 526 і 528 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 74

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (піридин-4-ілметил)амід

5-Бром-1,3-дигідроіндол-2-он (170мг, 0,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (піридин-4-ілметил)амідом (200мг) одержуючи 14мг (4%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,67 (с, 1Н, NH), 11,01 (с, ш, 1Н, NH), 8,51 (дд, J=1,6 & 4,3Гц., 2Н), 8,23 (т, J=6,0Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 8,11 (д, J=1,9Гц., 1Н), 7,78 (с, 1Н, Н-вініл), 7,31 (д, J=6,0Гц., 2Н), 7,25 (дд, J=1,9 & 8,1Гц., 1Н), 6,82 (д, J=8,1Гц., 1Н), 4,45 (д, J=6,0Гц., 2Н, NCH<sub>2</sub>), 2,46 (с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 450 і 452 [M<sup>+</sup>-1 і M<sup>+</sup>+1].

Приклад 75

5-[6-(4-Бутилфеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

5-[6-(4-Бутилфеніл)]-1,3-дигідроіндол-2-он (50мг, 0,19ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (50мг) одержуючи 74мг (76%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,58 (с, 1Н, NH), 10,93 (с, ш, 1Н, NH), 7,82 (д, J=7,9Гц., 1Н), 7,63 (с, 1Н, Н-вініл), 7,54 (д, J=7,9Гц., 2Н), 7,46 (м, 1Н, CONH), 7,26 (м, 3Н), 7,09 (с, 1Н), 3,30 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,52-2,63 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,68 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,58 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,34 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 0,91 (т, J=7,2Гц., 3Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 510 [M<sup>+</sup>].

Приклад 76

5-[6-(5-Ізопропіл-2-метоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліден-метил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-(5-Ізопропіл-2-метоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (50мг, 0,17ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (45мг) одержуючи 67мг (75%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, 1Н, NH), 10,82 (с, ш, 1Н, NH), 7,77 (д, J=7,9Гц., 1Н), 7,61 (с, 1Н, Н-вініл), 7,45 (м, 1Н, CONH), 7,0-7,19 (м, 5Н), 3,73 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,32 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,87 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,56 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,48 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,68 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,21 (д, J=6,8Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС m/z 527,2 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 77

5-[6-(4-Етилфеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-(4-Етилфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (45мг, 0,19ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (50мг) одержуючи 60мг (65%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,59 (с, 1Н, NH), 10,96 (с, ш, 1Н, NH), 7,83 (д, J=8,4Гц., 1Н), 7,64 (с, 1Н, Н-вініл), 7,51-7,56 (м, 3Н), 7,25-7,30 (м, 3Н), 7,08 (д, J=1Гц., 1Н), 3,31 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,63 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,55 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,20 (т, J=7,5Гц., 3Н, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-EI m/z 482 [M<sup>+</sup>].

Приклад 78

5-[6-(2,4-Диметоксифеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-(2,4-Диметоксифеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (51мг, 0,19ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (50мг) одержуючи 30мг (31%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,59 (с, 1Н, NH), 10,86 (с, ш, 1Н, NH), 7,75 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,60 (с, 1Н, Н-вініл), 7,49 (м, 1Н, CONH), 7,22 (д, J=8,4Гц., 1Н), 7,03 (м, 1Н), 6,97 (с, 1Н), 6,58-6,65 (м, 2Н), 3,79 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,76 (с, 3Н, OCH<sub>3</sub>), 3,33 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,55 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,50 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,42 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,39 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 514 [M<sup>+</sup>].

Приклад 79

5-[6-(3-Ізопропілфеніл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

6-(3-Ізопропілфеніл)-1,3-дигідроіндол-2-он (48мг, 0,19ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом (50мг) одержуючи 59мг (63%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,63 (с, 1Н, NH), 10,97 (с, ш, 1Н, NH), 7,87 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,68 (с, 1Н, Н-вініл), 7,24-7,55 (м, 6Н), 7,13 (с, 1Н), 3,34 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,30 (м, 1Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,60 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,50 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,70 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,27 (д, J=6,9Гц., 6Н, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 496 [M<sup>+</sup>].

Приклад 80

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

5-Фтор-1,3-дигідроіндол-2-он (0,54г, 3,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом одержуючи 0,83г (55%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-зелену тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,66 (с, 1Н, NH), 10,83 (с, ш, 1Н, NH), 7,73 (дд, J=2,5 & 9,4Гц., 1Н), 7,69 (с, 1Н, Н-вініл), 7,37 (т, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6,91 (с, 1Н), 6,81-6,85 (м, 1Н), 3,27 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,51 (м, 6Н, 3×CH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,96 (т, J=6,9Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 398 [M<sup>+</sup>].

Приклад 80 (Альтернативний синтез)

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(32)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

Гідрат гідразину (55%, 3000мл) і 5-фторізатин (300г) нагрівали при 100°C. При перемішуванні порціями (100г) протягом 120 хвилин додавали 5-фторізатин (500г). Суміш нагрівали до 110°C і перемішували протягом 4 годин. Суміш охолоджували до кімнатної температури і тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування одержуючи неочищений гідрозид (2-аміно-5-фторфеніл)оцтової кислоти (748г). Гідрозид суспендували у воді (700мл) і рН суміші доводили до <рН 3 використовуючи 12N хлорводневу кислоту. Суміш перемішували протягом 12 годин при кімнатній температурі. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і двічі промивали водою. Продукт сушили у вакуумі одержуючи 5-фтор-1,3-дигідроіндол-2-он (600г, 73% вихід) як коричневий порошок. <sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 3,46 (с, 2Н, CH<sub>2</sub>), 6,75, 6,95, 7,05 (32хм, 3Н, ароматика), 10,35 (с, 1Н, NH). МС m/z 152 [M+1].

3,5-Диметил-1Н-пірол-2,4-дикарбонової кислоти 2-трет-бутиловий естер 4-етилловий естер (2600г) і етанол (7800мл) інтенсивно перемішували і повільно додавали 10N хлорводневу кислоту (3650мл). Температура збільшувалась від 25°C до 35°C і починав виділятися газ. Суміш нагрівали до 54°C і перемішували з наступним нагріванням протягом години, причому температура піднімалась до 67°C. Суміш охолоджували до 5°C і повільно при перемішуванні додавали 32л води і льоду. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і промивали три рази водою. Тверду речовину сушили на повітрі до постійної ваги одержуючи 2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (1418г, 87% вихід) як розувату тверду речовину. <sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 2,10, 2,35 (2хс, 2х3Н, 2хCH<sub>3</sub>), 4,13 (к, 2Н,

CH<sub>2</sub>), 6,37 (с, 1Н, CH), 10,85 (с, 1Н, NH). МС m/z 167 [M+1].

Диметилформамід (322г) і дихлорметан (3700мл) охолоджували на бані з льодом до 4°C і при перемішуванні додавали оксихлорид фосфору (684г). Повільно алікватами протягом 15 хвилин додавали твердий етиловий естер 2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (670г). Температура збільшувалась максимум до 18°C. Суміш нагрівали при температурі кипіння протягом години, охолоджували до 10°C в бані з льодом і швидко при інтенсивному перемішуванні додавали 1,6 л льодяної води. Температуру збільшували до 15°C, при інтенсивному перемішуванні додавали 10N хлорводневу кислоту (1,6л).

Температура підвищувалась до 22°C. Суміш залишали стояти протягом 30 хвилин і шари залишали розділятися. Температура підвищувалась максимум до 40°C. Водний шар доводили до рН12-13 використовуючи 10N гідроксид калію (3,8л) із швидкістю при якій температура піднімалась і залишалась під час додавання на позначці 55°C. Після завершення додавання суміш охолоджували до 10°C і перемішували протягом 1 години. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і промивали чотири рази водою одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (778г, 100% вихід) як жовту тверду речовину. <sup>1</sup>Н-ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 1,25 (т, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,44, 2,48 (2хс, 2х3Н, 2хCH<sub>3</sub>), 4,16 (к, 2Н, CH<sub>2</sub>), 9,59 (с, 1Н, CHO), 12,15 (ш с, 1Н, NH). МС m/z 195[M+1].

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (806г), гідроксид калію (548г), воду (2400мл) і метанол (300мл) кип'ятили протягом двох годин при перемішуванні і потім охолоджували до 8°C. Суміш екстрагували двічі дихлорметаном. Водний шар доводили до рН4 використовуючи 1000мл 10N хлорводневої кислоти підтримуючи температуру близько 15°C. Додавали воду для полегшення перемішування. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали три рази водою і сушили у вакуумі при 50°C одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (645г, 93,5% вихід) як жовту тверду речовину. ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,40, 2,43 (2хс, 2х3Н, 2хCH<sub>3</sub>), 9,57 (с, 1Н, CHO), 12,07 (ш с, 2Н, NH+COOH). МС m/z 168 [M+1].

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбоную кислоту (1204г) і 6020мл диметилформаміду перемішували при кімнатній температурі і в цей час додавали гідрохлорид 1-(3-диметил-амінопропіл)-3-етилкарбодііміду (2071г), гідроксибензотриазол (1460г), триетиламін (2016мл) і діетилетилендіамін (1215мл). Суміш перемішували протягом 20 годин при кімнатній температурі. Суміш розводили 3000мл води, 2000мл насиченого водного розчину хлориду натрію і 3000мл насиченого розчину бікарбонату натрію і рН збільшували до більше ніж 10 використовуючи 10N гідроксид натрію. Суміш двічі екстрагували 5000мл 10% метанолу в дихлорметані і екстракти об'єднували, сушили над безводним сульфатом магнію і випарювали на роторі до суха. Суміш розводили 1950мл толуолу і 3Нову випарювали на роторі до суха. Залишок розтирали

з 3:1 гексан:діетиловий етер (4000мл). Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування, двічі промивали 400мл етилацетату і сушили у вакуумі при 34°C протягом 21 години одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (819г, 43% вихід) як світло-коричневу тверду речовину. <sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 0,96 (т, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 2,31, 2,38 (2×с, 2×CH<sub>3</sub>), 2,51 (м, 6Н 3×CH<sub>2</sub>), 3,28 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 7,34 (м, 1Н, амід NH), 9,56 (с, 1Н, CHO), 11,86 (с, 1Н, пірол NH). МС m/z 266 [M+1].

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (809г), 5-фтор-1,3-дигідроіндол-2-он (438г), етанол (8000мл) і піролідін (13мл) нагрівали при 78°C протягом 3 годин. Суміш охолоджували до кімнатної температури і тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і промивали етанолом. Тверду речовину перемішували з етанолом (5900мл) при 72°C протягом 30 хвилин. Суміш охолоджували до кімнатної температури. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і сушили у вакуумі при 54°C протягом 130 годин одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-dihydro-1H-індол-(32)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (1013г, 88% вихід) як оранжеву тверду речовину. <sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 0,98 (т, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 2,43, 2,44 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 2,50 (м, 6Н, 3×CH<sub>2</sub>), 3,28 (к, 2Н, CH<sub>2</sub>), 6,84, 6,92, 7,42, 7,71, 7,50 (5м, 5Н, ароматика, вініл, CONH), 10,88 (с, 1Н, CONH), 13,68 (с, 1Н, пірол NH). МС m/z 397 [M-1].

#### Приклад 81

3-[4-(2-Діетиламіноетилкарбамоїл)-3,5-диметил-1Н-пірол-2-ілметилен]-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-6-карбонова кислота

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-6-карбонову кислоту (80мг, 0,45ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом одержуючи 210мг (92%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,6 (с, 1Н, NH), 7,76 (д, J=8,0Гц., 1Н), 7,66 (с, 1Н, Н-вініл), 7,57 (дд, J=1,5 & 8,0Гц., 1Н), 7,40-7,42 (м, 2Н), 3,28 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,88 (м, Н-піперидин), 2,54 (м, 6Н, 3×CH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,56 (м, Н-піперидин), 0,97 (т, J=6,98Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС m/z 424 [M<sup>+</sup>].

#### Приклад 82

5-(5-Диметилсульфамоїл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти диметиламід (90мг, 0,38ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амідом (100мг) одержуючи 100мг (54%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,65 (с, 1Н, NH), 11,30 (с, ш, 1Н, NH), 8,25 (д, 1Н), 7,92 (с, 1Н, Н-вініл), 7,48-7,53 (м, 2Н), 7,07 (д, J=8,2Гц., 1Н), 3,33 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,61 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,56 (т, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-EI m/z 485 [M<sup>+</sup>].

#### Приклад 83

5-[5-(3-Хлорфенілсульфамоїл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти (3-хлор-феніл)амід (120мг, 0,38ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амідом (100мг) одержуючи 150мг (69%) вказаної в заголовку сполуки як жовто-оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,55 (с, 1Н, NH), 11,26 (ш с, 1Н, NH), 10,30 (ш с, 1Н, NH), 8,26 (д, 1Н), 7,79 (с, 1Н, Н-вініл), 7,51-7,57 (м, 2Н), 7,22 (т, J=8,1Гц., 1Н), 7,15 (м, 1Н), 7,07 (м, 1Н), 7,0 (м, 2Н), 3,44 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,57 (т, J=7,0Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,68 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС m/z 568 [M<sup>+</sup>].

#### Приклад 84

2,4-Диметил-5-[2-оксо-5-(піридин-3-ісульфамоїл)-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти піридин-3-іламід (110мг, 0,38ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амідом (100мг) одержуючи 150мг (74%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,58 (с, 1Н, NH), 8,21 (д, J=2,0Гц., 2Н), 8,04 (м, 1Н), 7,76 (с, 1Н, Н-вініл), 7,49-7,54 (м, 2Н), 7,41 (м, 1Н), 7,14 (м, 1Н), 6,94 (д, J=8,5Гц., 1Н), 3,33 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,56 (т, J=7,06Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,43 (с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 1,68 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС m/z 535 [M<sup>+</sup>].

#### Приклад 85

3-[3,5-Диметил-4-(4-метилпіперазин-1-карбоніл)-1Н-пірол-2-ілметилен]-4-(2-гідроксиетил)-1,3-дигідроіндол-2-он

4-(2-Гідроксиетил)-1,3-дигідроіндол-2-он (71мг, 0,4ммоль) конденсували з 3,5-диметил-4-(4-метилпіперазин-1-карбоніл)-1Н-пірол-2-карбальдегідом одержуючи 90мг (55%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 14,25(с, 1Н, NH), 10,88 (с, 1Н, NH), 7,57 (с, 1Н, Н-вініл), 7,03 (м, 1Н), 6,75-6,82 (м, 2Н), 4,86 (м, 1Н, OH), 3,70 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,04 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,48 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,28 (ш с, 7Н), 2,19 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,18 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС m/z (+ve) 4,09,3 [M<sup>+</sup>].

#### Приклад 86

3-[3,5-Диметил-4-(4-метилпіперазин-1-карбоніл)-1Н-пірол-2-ілметилен]-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти феніламід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти феніламід (110мг, 0,4ммоль) конденсували з 3,5-диметил-4-(4-метилпіперазин-1-карбоніл)-1Н-пірол-2-карбальдегідом (100мг) одержуючи 50мг (24%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,52(с, 1Н, NH), 11,26 (с, 1Н, NH), 10,08 (с, 1Н, NH), 8,21 (д, J=1,6Гц., 1Н), 7,75 (с, 1Н, Н-вініл), 7,50 (дд, J=1,6 &



8,3Гц., 1Н), 7,19 (м, 2Н), 7,10 (м, 2Н), 6,97 (м, 2Н), 2,49 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,28 (м, 10Н, 2×CH<sub>3</sub> & 2×CH<sub>2</sub>), 2,18 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 519 [M<sup>+</sup>].

Приклад 87

5-(5-Диметилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти диметиламід (90мг, 0,38ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (100мг) одержуючи 80мг (43%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 11,30 (с, 1Н, NH), 8,27 (д, J=1,7Гц., 1Н), 7,94 (с, 1Н, Н-вініл), 7,49 (дд, J=1,7 & 8,0Гц., 1Н), 7,44 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7,07 (д, J=8,0Гц., 1Н), 3,26 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,60 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,53 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,45-2,50 (м, 10Н, 2×CH<sub>3</sub> & N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,96 (т, J=7,2Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 487 [M<sup>+</sup>].

Приклад 88

5-[5-(3-Хлорфенілсульфамойл)-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

2-Оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-5-сульфонової кислоти (3-хлор-феніл)амід (120мг, 3,8ммоль) конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (100мг) одержуючи 80мг (37%) вказаної в заголовку сполуки як жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,55 (с, 1Н, NH), 11,24 (с, 1Н, NH), 10,29 (с, 1Н, NH), 8,25 (д, J=1,87Гц., 1Н), 7,79 (с, 1Н, Н-вініл), 7,52 (дд, J=1,87 & 8,3Гц., 1Н), 7,42 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7,22 (т, J=8,02Гц., 1Н), 7,15 (т, J=2Гц., 1Н), 7,08 (м, 1Н), 7,0 (м, 2Н), 3,27 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,48-2,57 (м, 6Н, 3×CH<sub>2</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,97 (т, J=7,0Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС m/z 570,1 [M<sup>+</sup>].

Приклад 95

3-(2-Оксо-5-феніл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбонової кислоти етиловий естер

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,74 (с, 1Н, NH), 11,00 (с, 1Н, NH), 8,13 (д, J=1,7Гц., 1Н), 7,74 (с, 1Н, Н-вініл), 7,70 (д, J=7,7Гц., 2Н), 7,49 (дд, J=1,7 & 8,0Гц., 1Н), 7,44 (т, J=7,7Гц, 2Н), 7,32 (м, 1Н), 6,96 (д, J=8,0Гц., 1Н), 4,26 (к, J=7,0Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,79 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,72 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,73 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,30 (т, J=7,0Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 412 [M<sup>+</sup>].

Приклад 99

3-(2-Оксо-5-фенілсульфамойл-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-карбонової кислоти етиловий естер

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,64 (с, 1Н, NH), 11,33 (с, 1Н, NH), 10,07 (с, 1Н, NH), 8,24 (д, J=1,8Гц., 1Н), 7,74 (с, 1Н, Н-вініл), 7,57 (дд, J=1,8 & 8,0Гц., 1Н), 7,21 (т, J=7,6Гц., 2Н), 7,11 (д, J=7,6Гц., 2Н), 6,99 (д, J=8,0Гц., 1Н), 6,98 (д, J=7,6Гц., 1Н), 4,27 (к, J=7,0Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,80 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,73 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,73 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,30 (т, J=7,0Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 491 [M<sup>+</sup>].

Приклад 109

3-[3-(Морфолін-4-карбоніл)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилен]-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-6-карбонова кислота

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, 1Н, NH), 12,75 (ш с, 1Н, COOH), 11,08 (с, 1Н, NH), 7,85 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,71 (с, 1Н, Н-вініл), 7,62 (дд, J=1,4 & 7,8Гц., 1Н), 7,41 (д, J=1,4Гц., 1Н), 3,65 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 3,55 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,81 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,54 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,73 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 421 [M<sup>+</sup>].

Приклад 112

5-Бром-3-[3-(піролідін-1-карбоніл)-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилен]-1,3-дигідроіндол-2-он

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,56 (с, 1 Н, NH), 11,00 (с, 1Н, NH), 8,05 (д, J=1,8Гц., 1Н), 7,74 (с, 1Н, Н-вініл), 7,28 (дд, J=1,3 & 8,3Гц., 1Н), 6,83 (д, J=8,3Гц., 1Н), 3,57 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 2,79 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,65 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,88 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>), 1,71 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 439 & 441 [M<sup>+</sup>-1] & [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 114

3-(3-Диметилкарбамоїл-4,5,6,7-тетрагідро-2Н-ізоіндол-1-ілметилеп-е)-2-оксо-2,3-дигідро-1Н-індол-6-карбонова кислота

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,60 (с, 1Н, NH), 12,72 (ш с, 1Н, COOH), 11,05 (с, 1Н, NH), 7,85 (д, J=7,9Гц., 1Н), 7,72 (с, 1Н, Н-вініл), 7,62 (дд, J=1,3 & 7,9Гц., 1Н), 7,42 (д, J=1,3Гц., 1Н), 3,03 (с, 6Н, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,81 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,55 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 1,73 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС-ЕІ m/z 379 [M<sup>+</sup>].

Приклад 115

4-Метил-5-(5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонова кислота

<sup>1</sup>НЯМР (300МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) 13,56 (ш с, 1Н, NH), 8,24 (д, J=1,5Гц., 1Н), 7,86 (с, 1Н, Н-вініл), 7,74 (д, J=2,96Гц., 1Н), 7,56 (дд, J=1,5 & 8,1Гц., 1Н), 7,20 (ш м, 1Н, NHCH<sub>3</sub>), 7,03 (д, J=8,1Гц., 1Н), 2,57 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС-ЕІ m/z 361 [M<sup>+</sup>].

Приклад 116

{[4-Метил-5-(4-метил-5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбоніл]аміно}оцтової кислоти етиловий естер

4-Метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер (пос. на літ. D. O. Cheng, T. L. Bowman і E. LeGoff, J. Гетеросусіс Chem., 1976; 13; 1145-1147) формілювали використовуючи спосіб А, гідролізували використовуючи спосіб Б після чого амідували (спосіб В) одержуючи [(5-форміл-4-метил-1Н-пірол-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти етиловий естер.

4-Метил-5-метиламіносульфоніл-2-оксиіндол (50мг, 0,21ммоль) конденсували з [(5-форміл-4-метил-1Н-пірол-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти етиловим естером (100мг, 0,42ммоль) і піперидином (0,1мл) в етанолі (2мл) одержуючи 50мг (52%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>НЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,59 (с, 1Н, NH), 11,29 (д.ш. с, 1Н, NH-CO), 8,33 (т, J=5,8Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,83 (д, J=3,11Гц., 1Н), 7,80 (с, 1Н, Н-вініл), 7,71 (д, J=8,5Гц., 1Н), 7,34 (ш м, 1Н, NHCH<sub>3</sub>), 6,89 (д, J=8,5Гц., 1Н), 4,11 (к, J=7,1Гц., 2Н,

OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,92 (д, J=5,8Гц., 2H, GlyCH<sub>2</sub>), 2,86 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,48 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,42 (д, J=4,71Гц., 3H, HNCH<sub>3</sub>), 1,20 (т, J=7,1Гц., 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС EI m/z 460 [M<sup>+</sup>].

Приклад 117

{[4-Метил-5-(5-метилсульфамоїл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбоніл]аміно}оцтової кислоти етиловий естер

Суміш 5-метиламіносультоніл-2-оксиіндолу (0,06г, 0,22ммоль), [(5-форміл-4-метил-1Н-пірол-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти етилового естеру (0,075г, 0,27ммоль) і піперидину (2 краплі) в етанолі (5мл) нагрівали в закритій пробірці при 90°C протягом 12г: Після охолодження, осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом, розтирали з дихлорметан/етер і сушили одержуючи 0,035г (36%) вказаної в заголовку сполуки як жовтувато-коричневу тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,6 (с, 1Н, NH), 11 (д.ш. с, 1Н, NH-CO), 8,30 (т, J=5,7Гц., 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 8,25 (д, J=1,2Гц., 1Н), 7,88 (с, 1Н, Н-вініл), 7,84 (д, J=3,3Гц., 1Н), 7,57 (дд, J=1,9 & 8,5Гц., 1Н), 7,14 (ш м, 1Н, HNCH<sub>3</sub>), 7,04 (д, J=8,5Гц., 1Н), 4,11 (к, J=6,7Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,92 (д, J=5,7Гц., 2Н, GlyCH<sub>2</sub>), 2,55 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (м, 3Н, NCH<sub>3</sub>), 1,20 (т, J=6,7Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС m/z 446 [M<sup>+</sup>].

Приклад 118

{[4-Метил-5-(5-метилсульфамоїл-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбоніл]аміно}оцтова кислота

Суміш [(5-форміл-4-метил-1Н-пірол-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти етилового естеру (0,142г, 0,59ммоль) і 1N NaOH (1,2мл) в метанолі (10мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 1г. Реакцію концентрували і залишок конденсували з 5-метиламіносультоніл-2-оксиіндолом (0,13г, 0,48ммоль) і піперидином (0,12мл) в етанолі (12мл) одержуючи 0,11г (52%) вказаної в заголовку сполуки.

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,98 (ш с, 1Н, NH), 8,17 (с, 1Н), 7,80 (с, 1Н), 7,75 (д, J=3,1Гц., 1Н), 7,51 (дд, J=2 & 8,2Гц., 1Н), 7,21 (м на ш с, 2Н), 6,97 (д, J=8,1Гц., 1Н), 3,41 (д, J=4,2Гц., 2Н, CH<sub>2</sub>NH), 2,54 (с, 3Н, пірол-CH<sub>3</sub>), 2,39 (с, 3Н, ArCH<sub>3</sub>).

МС m/z 417 [M-1]<sup>+</sup>.

Приклад 120

5-Метил-2-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонова кислота

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,77 (ш с, 1Н, NH), 12,49 (с, 1Н, COOH), 11,07 (с, 1Н, NH), 8,39 (с, 1Н, Н-вініл), 7,43 (д, J=7,47Гц., 1Н), 7,20 (т, J=7,47Гц., 1Н), 7,03 (т, J=7,47Гц., 1Н), 6,91 (д, J=7,47Гц., 1Н), 6,49 (д, J=1,53Гц., 1Н), 2,34 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС m/z 269 [M+H]<sup>+</sup>.

Приклад 121

5-Метил-2-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,79 (с, 1Н, NH), 11,08 (с, 1Н, NH), 8,31 (с, 1Н, Н-вініл), 7,45 (д, J=7,52Гц., 1Н), 7,20 (т, J=7,52Гц., 1Н), 7,03 (т, J=7,52Гц., 1Н), 6,91 (д, J=7,52Гц., 1Н), 6,50 (д, J=2,1Гц., 1Н), 4,26 (к, J=7,2Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,33 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,32 (т, J=7,2Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС m/z 297,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Приклад 122

2-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти етиловий естер

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,72 (с, 1Н, NH), 11,16 (с, 1Н, NH), 8,29 (с, 1Н, Н-вініл), 7,53 (д, J=2,0Гц., 1Н), 7,35 (дд, J=2,0 & 8,05Гц., 1Н), 6,87 (т, J=8,05Гц., 1Н), 6,53 (д, J=2,4Гц., 1Н), 4,28 (к, J=7,03Гц., 2Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,35 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,33 (т, J=7,03Гц., 3Н, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

МС m/z 375 & 377 [M+H]<sup>+</sup>.

Приклад 123

2-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-5-метил-1Н-пірол-3-карбонова кислота

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,72 (с, 1Н, NH), 12,57 (с, 1Н, COOH), 11,19 (с, 1Н, NH), 8,36 (с, 1Н, Н-вініл), 7,51 (д, J=1,4Гц., 1Н), 7,34 (дд, J=1,4 & 8,17Гц., 1Н), 6,87 (т, J=8,17Гц., 1Н), 6,52 (д, J=2,5Гц., 1Н), 2,35 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>).

МС m/z 347 & 349 [M+H]<sup>+</sup>.

Приклад 124

2-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

До розчину 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (250мг, 1,63ммоль) в диметилформаміді (3мл) додавали 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіімід (376мг, 1,2еквів.), 1-гідроксибензотриазол (265мг, 1,2еквів.), триетиламін (0,45мл, 2еквів.) і 1-(2-аміноетил)піролідин (0,23мл, 1,1еквів.). Після перемішування при кімнатній температурі протягом ночі, реакцію розводили насиченим бікарбонатом натрію і насиченим водним розчином хлориду натрію і екстрагували 10% метанолом в дихлорметані. Об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували одержуючи 130мг 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)аміду.

Суміш 5-бром-2-оксиіндолу (106мг, 0,5ммоль), 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)аміду (125мг, 1еквів.) і піперидину (0,2мл) в етанолі (2мл) нагрівали в закритій пробірці при 80°C протягом 1 г і потім охолоджували. Осад, що утворився, збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і етилацетатом і сушили одержуючи вказаний в заголовку продукт як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (300МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13,62 (с, 1Н, NH), 11,06 (ш с, 1Н, NH), 8,56 (с, 1Н, Н-вініл), 8,15 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,48 (д, J=1,8Гц., 1Н), 7,31 (дд, J=1,8 & 7,9Гц., 1Н), 6,86 (д, J=7,9Гц., 1Н), 6,60 (д, J=2,3Гц., 1Н), 3,35 (м, 2Н, HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,56 (т, J=6,91Гц., 2Н, HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,35 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,67 (м, 4Н, 2×CH<sub>2</sub>).

МС m/z 443/445 [M<sup>+</sup> і M<sup>+</sup>+2].

Приклад 125

2-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

До розчину 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (320мг, 2,1ммоль) в диметилформаміді (3мл) додавали 1-етил-3-(3-

диметиламінопропіл)карбодіімід (483мг, 1,2еквів.), 1-гідроксибензотриазол (340мг, 1,2еквів.), триетиламін (0,59мл, 2еквів.) і N,N-діетилетилендіамін (0,32мл, 1,1еквів.). Після перемішування при кімнатній температурі протягом ночі, реакцію розводили насиченим бікарбонатом натрію і насиченим водним розчином хлориду натрію і екстрагували 10% метанолом в дихлорметані. Об'єднані органічні шари промивали насиченим водним розчином хлориду натрію, сушили над безводним сульфатом натрію і концентрували одержуючи 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід.

Суміш 5-бром-2-оксиіндолу (106мг, 0,5ммоль), 2-форміл-5-метил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (126мг, 1еквів.) і піперидині (0,2мл) в етанолі (2мл) нагрівали в закритій пробірці при 80°C протягом 1 г і потім охолоджували. Осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і етилацетатом і сушили одержуючи вказаний в заголовку продукт як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (360МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,62 (с, 1Н, NH), 11,11 (ш с, 1 Н, NH), 8,54 (с, 1Н, Н-вініл), 8,1 (м, 1Н, CONHCH<sub>2</sub>), 7,49 (д, J=2,2Гц., 1Н), 7,31 (дд, J=2,2 & 8,3Гц., 1Н), 6,86 (д, J=8,3Гц., 1Н), 6,58 (д, J=2,24Гц., 1Н), 3,31 (м, 2Н, HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,59 (м, 6Н, 3×CH<sub>2</sub>), 2,36 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,99 (т, J=6,8Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС m/z 445/447 [M<sup>+</sup> + M<sup>+</sup>+2].

Приклад 126

2,4-Диметил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

Суміш 1,3-дигідроіндол-2-ону (266мг, 2ммоль), 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (530мг, 2ммоль) і піперидину (1 крапля) в етанолі нагрівали при 90°C протягом 2 годин. Реакцію охолоджували до кімнатної температури, Одержаний осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і сушили одержуючи 422мг (55%) вказаної в заголовку сполуки як світло-жовту тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,7 (с, 1Н, NH), 10,9 (с, 1Н, NH), 7,88 (д, J=7,6Гц., 1Н), 7,64 (с, 1Н, Н-вініл), 7,41 (т, J=5,4Гц., 1Н, NH), 7,13 (дт, J=1,2 & 7,6Гц., 1Н), 6,99 (дт, J=1,2 & 7,6Гц., 1Н), 6,88 (д, J=7,6Гц., 1Н), 3,28 (м, 2Н), 2,48-2,55 (м, 6Н), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,97 (т, J=7,2Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

МС+ХІАТ 381 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 127

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід

Суміш 5-хлор-1,3-дигідроіндол-2-ону (335мг, 2ммоль), 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (530мг, 2ммоль) і піперидину (1 крапля) в етанолі нагрівали при 90°C протягом 2 годин. Реакцію охолоджували до кімнатної температури, одержаний осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і сушили одержуючи 565мг (68%) вказаної в заголовку сполуки як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н ЯМР (400МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 13,65 (с, 1Н, NH), 11,0 (с, 1Н, NH), 7,98 (д, J=2,1Гц., 1Н) 7,77 (с, 1Н Н-вініл), 7,44 (т, NH), 7,13 (дд, J=2,1 & 8,4Гц., 1Н) 6,87 (д, J=8,4Гц., 1Н), 3,28 (д, 2Н), 2,48-2,53 (м, 6Н), 2,44 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 0,97 (т, J=7,0Гц., 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

МС+ХІАТ 415 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 128

2,4-Диметил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-етил)амід

1,3-Дигідроіндол-2-он конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амідом одержуючи вказаний в заголовку продукт.

МС+ХІАТ 379 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 129

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амід

5-Фтор-1,3-дигідроіндол-2-он конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амідом одержуючи вказаний в заголовку продукт.

МС+ХІАТ 397 [M<sup>+</sup>+1].

Детальна методика:

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (61г), 5-фтор-1,3-дигідроіндол-2-он (79г), етанол (300мл) і піролідін (32мл) кип'ятили протягом 4,5 годин. До суміші додавали оцтову кислоту (24мл) і кип'ятили протягом 30 хвилин. Суміш охолоджували до кімнатної температури і тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і двічі промивали етанолом. Тверду речовину перемішували протягом 130 хвилин в 40% ацетоні в воді (400мл), що містив 12N хлорводневу кислоту (6,5мл). Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування і двічі промивали 40% ацетон в воді. Тверду речовину сушили у вакуумі одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (86г, 79% вихід) як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d<sub>6</sub>) δ 2,48, 2,50 (2×с, 6Н, 2×CH<sub>3</sub>), 6,80, 6,88, 7,68, 7,72 (4м, 4Н, ароматика і вініл), 10,88 (с, 1Н, CONH), 12,12 (с, 1Н, COOH), 13,82 (с, 1Н, пірол NH). МС m/z 299 [M-1].

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (100г) і диметилформамід (500мл) перемішували і додавали бензотриазол-1-ілокситрис(диметиламіно)фосфонію гексафторфосфат (221г), 1-(2-аміноетил)піролідін (45,6г) і триетиламін (93мл). Суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. Твердий продукт збирали за допомогою вакуумного фільтрування і промивали етанолом. Тверду речовину суспендували в етанолі (500мл) і перемішували протягом години при 64°C і охолоджували до кімнатної температури. Тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етанолом і сушили у вакуумі одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідін-1-ілетил)амід (101,5г, 77% вихід). <sup>1</sup>Н-ЯМР (диметил-

сульфоксид- $d_6$ )  $\delta$  1,60 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2,40, 2,44 ( $2 \times$ с, 6Н,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2,50 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2,57, 3,35 ( $2 \times$ м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 7,53, 7,70, 7,73, 7,76 ( $4 \times$ м, 4Н, ароматика і вініл), 10,88 (с, 1Н, CONH), 13,67 (с, 1Н, пірол NH). МС m/z 396 [M+1].

Приклад 130

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амід

5-Хлор-1,3-дигідроіндол-2-он конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-піролідин-1-ілетил)амідом одержуючи вказаний в заголовку продукт.

МС+ХІАТ 413 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 131

2,4-Диметил-5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

1,3-Дигідроіндол-2-он конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом одержуючи вказаний в заголовку продукт.

<sup>1</sup>Н ЯМР (400МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  13,63 (с, 1Н, NH), 10,90 (с, 1Н, NH), 7,78 (д, J=7,8Гц., 1Н), 7,63 (с, 1Н Н-вініл), 7,48 (т, 1Н, NH), 7,13 (дт, 1Н), 6,98 (дт, 1Н), 6,88 (д, J=7,7Гц., 1Н), 3,31 (к, J=6,6Гц., 2Н), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,40 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,38 (т, J=6,6Гц., 2Н), 2,19 (с, 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

МС+ХІАТ353[M<sup>+</sup>+1].

Приклад 132

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амід

5-Фтор-1,3-дигідроіндол-2-он конденсували з 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-диметиламіноетил)амідом одержуючи вказаний в заголовку продукт.

<sup>1</sup>Н ЯМР (400МГц, ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  13,68 (с, 1Н, NH), 10,90 (с, 1Н, NH), 7,76 (дд, J=2,4 & 9,4Гц., 1Н), 7,71 (с, 1Н Н-вініл), 7,51 (т, 1Н, NH), 6,93 (м, 1Н), 6,84 (дд, J=4,6 & 8,4Гц., 1Н), 3,31 (к, J=6,6Гц., 2Н), 2,43 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,41 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,38 (т, J=6,6Гц., 2Н), 2,19 (с, 6Н, N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

МС+ХІАТ 371 [M<sup>+</sup>+1].

Приклад 193

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

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-етиламіноетил)амід (99г), етанол (400мл), 5-фтор-2-оксиіндол (32г) і піролідин (1,5г) кип'ятили протягом 3 годин при перемішуванні. Суміш охолоджували до кімнатної температури і тверду речовину збирали за допомогою вакуумного фільтрування. Тверду речовину перемішували в етанолі при 60°C, охолоджували до кімнатної температури і збирали за допомогою вакуумного фільтрування. Продукт сушили у вакуумі одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової

кислоти (2-етиламіноетил)амід (75г, 95% вихід).

<sup>1</sup>Н-ЯМР (диметилсульфоксид- $d_6$ )  $\delta$  1,03 (т, 3Н, CH<sub>3</sub>), 2,42, 2,44 ( $2 \times$ с, 6Н,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2,56 (к, 2Н, CH<sub>2</sub>), 2,70, 3,30 ( $2 \times$ т, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 6,85, 6,92, 7,58, 7,72, 7,76 ( $5 \times$ м, SH, ароматика, вініл і CONH), 10,90 (ш

с, 1Н, CONH), 13,65 (ш с, 1Н, пірол NH). МС m/z 369 [M-1].

Приклад 195

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід

Спосіб А:

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (598мг) і дихлорметан (60мл) в бані з льодом обробляли 3-хлорпербензойною кислотою (336мг) і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинник випарювали на роторі і залишок суспендували в метанолі (20мл). Додавали воду (20мл), що містить гідроксид натрію (240мг), і суміш перемішували протягом однієї години. Осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали 5мл води і сушили у вакуумі одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід (510мг, 82% вихід) як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н-ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  13,72 (ш с, 1Н, NH), 11,02 (ш с, 1Н, CONH), 9,81 (ш с, 1Н, CONH), 7,75 (дд, 1Н, ароматика), 7,70 (с, 1Н, ароматика), 6,93 (тд, 1Н, ароматика), 6,84 (м, 1Н, ароматика), 3,63 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,29 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,14 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2,47 (с, 1Н, CH<sub>3</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,64 (т, 6Н,  $2 \times \text{CH}_3$ ). МС m/z 415 [M+1].

Спосіб Б:

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (10г) суспендували в дихлорметані (100мл) і охолоджували в бані з льодом. При перемішуванні додавали 3-хлорпероксибензойну кислоту (13,1г) і суміш залишали нагріватись до кімнатної температури і потім перемішували протягом ночі. Суміш випарювали на роторі до суха і хроматографували на колонці з силікагелем використовуючи як елюент 20% метанол в дихлорметан. Фракції, що містили продукт, об'єднували і випарювали на роторі до суха одержуючи 5-форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід (9г, 83% вихід).

5-Форміл-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід (9г), 5-фтор-1,3-дигідроіндол-2-он (9г, 83% вихід) і піролідин ((9г, 83% вихід (0,1г)) кип'ятили в етанолі (30мл) протягом 4 годин. Суміш охолоджували в бані з льодом і осад збирали за допомогою вакуумного фільтрування і промивали етанолом. Тверду речовину перемішували в етилацетаті (30мл), збирали за допомогою вакуумного фільтрування, промивали етилацетатом і сушили у вакуумі одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетил-N-оксоаміноетил)амід (10,3г 80% вихід) як оранжеву тверду речовину.

<sup>1</sup>Н-ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  13,72 (ш с, 1Н, NH), 11,02 (ш с, 1Н, CONH), 9,81 (ш с, 1Н, CONH), 7,75 (дд, 1Н, ароматика), 7,70 (с, 1Н, ароматика), 6,93 (тд, 1Н, ароматика), 6,84 (м, 1Н, ароматика), 3,63 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,29 (м, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,14 (м, 4Н,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2,47 (с, 1Н, CH<sub>3</sub>), 2,45 (с, 3Н, CH<sub>3</sub>), 1,64 (т, 6Н,  $2 \times \text{CH}_3$ ). МС m/z415 [M+1].

## Приклад 190

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (120мг, 0,4ммоль) збовтували з EDC, HCl (96мг, 0,5ммоль), безводним 1-гідроксибензтриазолом (68мг, 0,5ммоль) і 2-(2-аміноетил)піридином, одержаним від Aldrich в безводному ДМФА (3мл) протягом 2-3 днів при кімнатній температурі. Реакційну суміш розводили 1М NaHCO<sub>3</sub> (1,5мл), потім 8мл води. Неочищений осад збирали фільтруванням, промивали водою, сушили і очищали за допомогою кристалізації або хроматографії одержуючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

## Приклад 189

5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

Використовували методику описану в попередньому прикладі, але замінюючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (127мг) одержуючи 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

## Приклад 192

5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

Використовували методику Прикладу 190 вище, але замінюючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (145мг) одержуючи 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

## Приклад 191

5-[2-Оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід

Використовували методику Прикладу 190 вище, але замінюючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (113мг) одержуючи 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

## Приклад 203

5-[5-Ціано-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід

Використовували методику Приклад 190 вище, але замінюючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-[5-ціано-2-оксо-1,2-

дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (123мг) одержуючи 5-[5-ціано-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(піридин-1-іл)етил]амід.

## Приклади 142,186,187,188 і 204

Використовували методику Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 1-(2-аміноетил)піролідін, одержували від Aldrich Chemical Company, Inc., одержуючи бажані сполуки.

## Приклади 143-147

Використовували методику Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 1-(2-аміноетил)імідазолін-2-он (одержували нагріванням диметилкарбонату з біс(2-аміноетил)аміном (2 еквіваленти) в закритій колбі при 150°C протягом 30хв., слідує методиці [описаній в патенті US 2,613,212 (1950), Rohm & Haas Co]. Неочищений продукт очищали силікагелі використовуючи як елюент суміш хлороформ-метанол-водний аміак 80:25:2) одержуючи бажані сполуки.

## Приклади 148-151 і 184

Використовували методику Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 4-(2-аміноетил)піперазин-1-оцтової кислоти етиловий естер (одержували наступним чином: Піперазин-1-оцтової кислоти етиловий естер (11,22г) обробляли йодацетонітрилом (5,0мл) в присутності карбонату калію (6,9г) в етилацетаті (260мл) при 0°C. Після завершення додавання йодацетонітрилу (45хв.), реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 11 годин. Реакційна суміш фільтрували і фільтрати випарювали. Залишок гідрували в присутності бориду кобальту (одержували з CoCl<sub>2</sub> і боргідриду натрію) при кімнатній температурі при 50 псі протягом 2 днів в етанолі. Фільтрували, випарювали і хроматографічно очищали використовуючи як елюент суміш хлороформ-метанол-водний аміак 80:25:2 одержуючи бажаний амін (3,306г) як блідо-жовте масло) одержуючи бажані сполуки.

## Приклад 152-153

Використовували методику Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 2-[(2-аміноетиламіно)]ацетонітрил (одержували наступним чином: Розчин йодацетонітрилу (50ммоль) в етиловому спирті (80мл) додавали до розчину етилендіаміну (150мл) в етиловому спирті (60мл) при 0°C протягом 30 хвилин. Перемішували ще протягом 1г при 0°C, потім при кімнатній температурі протягом 14 годин. Додавали 55ммоль карбонату калію, перемішували протягом 30 хвилин, фільтрували і фільтрат концентрували при кімнатній температурі. Залишок очищали силікагелі використовуючи як елюент суміш хлороформ-метанол-водний аміак 80:15:1,5 одержуючи 2-[(2-аміноетиламіно)]ацетонітрил (3,550г), який егацно використовували) одержуючи бажані сполуки.

## Приклад 154-158

Використовували методику Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 1-(3-амінопропіл)азепін-2-он (одержували згідно методиці Kraft A.: J. Chem. Soc.

Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14, за винятком того, що гідроліз DBU проводили чітко при 145°C в присутності гідроксиду літію (1г, 5мл DBU, 2мл води, 420мг гідрату гідроксиду літію). Очищали неочищений продукт на силікагелі використовуючи як елюент суміш хлороформ-метанол-водний аміак 80:40:4 одержуючи 1-(3-амінопропіл)азепін-2-он (4,973г, 87% вихід).

Приклади 133-135, 159 і 200

Використовували методики Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на N-ацетилетилендіамін, (одержували нагріваючи суміш етилацетату з етилендіаміном (1,5 еквівалентів) при 160°C протягом 1г в закритій колбі. Вакуумною перегонкою одержували бажаний продукт з 56% виходом. N-ацетилетилендіамін також можна одержати від Aldrich.

Приклади 146-140

Використовували методики Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 1-(3-амінопропіл)тетрагідропіримідин-2-он (одержували тим же самим шляхом, що і 1-(3-амінопропіл)азепін-2-он згідно з методикою Kraft A.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 6, 1999, 705-14: Briefly, 1,3,4,6,7,8-гексагідро-2H-піримідо[1,2-a]піримідин (4,939г), гідрат гідроксиду літію (918мг) і 2мл вода нагрівали без розчинника в закритій колбі при 145°C протягом 1г. Неочищений продукт очищали на колонці з силікагелем з хлороформ-метанол-водний аміак 80:40:4 одержуючи чистий амін (5,265г, 94% вихід).

Приклади 141, 160-162 і 185

Використовували методики Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 1-(2-аміноетил)піперазин-2-он (одержували наступним чином: Чистий трет-бутилдифенілсилілхлорид (25мл, 97,7ммоль) додавали краплями до розчину DBU (19,5мл, 130ммоль) і біс(2-аміноетил)аміну (4,32мл, 40ммоль) в безводному диметилацетаміді (80мл) при кімнатній температурі з охолодженням на водяній бані протягом 5 хвилин. Суміш перемішували протягом 5 годин. Додавали чистий етиловий естер бромцтової кислоти (6,70мл, 60ммоль) охолоджуючи до кімнатної температури. Реакцію перемішували протягом 25 хвилин, потім випарювали при високому вакуумі. Залишок розчиняли в метанолі (200мл),  $\text{KHCO}_3$  (10г) і додавали KF (12г, 200ммоль) і суміш перемішували при 60°C протягом 5 годин. Додавали 10г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , перемішували протягом 10 хвилин, охолоджували і фільтрували. Фільтрати випарювали. Залишок екстрагували гексанами (2x250мл). Гексаннерзчинний матеріал розчиняли в етанолі (60мл), фільтрували і випарювали. Залишок очищали на колонці з силікагелем в хлороформ-метанол-водний аміак 80:40:4 одержуючи чистий амін (4,245г, 74% вихід).

Приклади 163-167

Використовували методики Прикладів 190, 189, 191, 192, і 203 вище, але замінюючи 2-(2-аміноетил)піридин на 3-[(2-аміноетил)аміно]пропіонітрил (одержували з етилендіаміну (150ммоль) і акрилонітрилу (50ммоль) в ТГФ при кімнатній температурі, [як описано

Israel, M. et al: J. Med Chem. 7, 1964, 710-16.], одержуючи бажаний амін (4,294г).

Приклад 168

5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти [2-(4-метилпіперазин-1-іл)етил]амід

До перемішуваної жовтої неочищеної суміші 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (90мг), ДМФА (0,8мл) і ТЕА (0,084мл) в 20мл реакцій колбі додавали ВОР реагент (199мг). Суміш ставала прозорою через 5хв. Додавали 2-(4-Метилпіперазин-1-іл)етиламін (51мг) до прозорої суміші. Одержаний розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. З реакційної системи випадав жовтий осад. Тонкошарова хроматографія (10% метанолу в метиленхлориді) показала, що всі вихідні матеріали перетворились у продукт. Тверду речовину виділяли за допомогою вакуумного фільтрування і промивали один раз етанолом (1мл). Тверду речовину сонікували в діетиловому етері (2мл) протягом 20хв. і збирали за допомогою вакуумного фільтрування. Після висушування у вакуумі одержували 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід (79мг, 62% вихід).

$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,13 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,40, 2,42 (2xс, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2,41 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,47 (м, 8H,  $4 \times \text{CH}_2$ ), 3,30 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,82 (дд, J=4,5, 8,7Гц., 1H), 6,91 (тд, J=2,4,  $^3J=8,8$ Гц., 1H), 7,43 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,70 (с, 1H), 7,75 (дд, J=2,8, 9,6Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1H, CONH), 13,67 (с, 1H, NH). PX-MC (m/z) 424,4 (M-1).

Приклад 169

5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1-Н-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід

Використовували методику Прикладу 168 вище, але замінюючи 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту (95мг, 0,3ммоль) одержуючи 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід (76мг, 58%).

$^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  2,13 (с, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,41, 2,42 (2xс, 6H,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 2,42 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,48 (м, 8H,  $4 \times \text{CH}_2$ ), 3,30 (м, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6,84 (д, J=8,0Гц., 1H), 7,11 (дд, J=2,0, 8,0Гц., 1H), 7,44 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,76 (с, 1H), 7,97 (д, J=2,0Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,98 (с, 1H, CONH), 13,62 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 440,2 (M-1).

Приклад 170

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід

Використовували методику описану в Прикладі 168, але замінюючи 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту на 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонову кислоту одержуючи 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-

пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід (39мг, 54%) одержували SU011670 (54мг, 0,15ммоль).

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,14 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,41, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,48 (м, 8H, 4хCH<sub>2</sub>), 3,31 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,80 (д, J=8,0Гц., 1H), 7,23 (дд, J=2,0, 8,0Гц., 1H), 7,44 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,76 (с, 1H), 8,09 (д, J=2,0Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,99 (с, 1H, CONH), 13,61 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 486,6 (M).

Приклад 172

5-(2-Оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід

Використовували методику описану в Прикладі 168 вище, але замінюючи 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонову кислоту SU014900 на 5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонову кислоту одержуючи 5-(2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (4-метилпіперазин-1-ілетил)амід, (136мг, 84%) одержували (112,8мг, 0,4ммоль).

<sup>1</sup>H-ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 2,13 (с, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,39, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,42 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,48 (м, 8H, 4хCH<sub>2</sub>), 3,30 (т, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,86 (д, J=8,0Гц., 1H), 6,96 (т, J=7,4Гц., 1H), 7,10 (т, J=7,8Гц., 1H), 7,41 (т, J=5,4Гц., 1H), 7,62 (с, 1H), 7,76 (д, J=7,6Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1H, CONH), 13,61 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 406,6 (M-1).

Приклад 171

5-[2-Оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід

До перемішуваної неочищеної суміші 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (112,8мг, 0,4ммоль), ДМФА (0,5мл) і триетиламіну (0,111мл) в 20мл реакційній колбі, додавали ВОР реагент (265мг). Суміш ставала прозорою через 5хв. До прозорої суміші додавали 2-(2,6-диметилпіперазин-1-іл)етиламін (68,6мг) [дивіться, Tapia, L. Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L. Labeaga, A. Innerarity, A. Odales, J. Med. Chem., 1999, 42, 2870-2880]. Одержаний розчин перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Тонкошарова хроматографія (10% метанолу в метилхлориді) показала, що весь вихідний матеріал перетворився у продукт. Реакційну суміш випарювали до суха і потім очищали за допомогою флеш хроматографії (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH=20/1-15/1) після чого перекристалізували одержуючи 5-[2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід (83мг, 50% вихід).

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) 61,15, 1,16 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 1,95 (т, J=11,6Гц., 2H, CH<sub>2</sub>), 2,41,2,47 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,50 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,03 (д, J=10Гц., 2H), 3,19 (м, 2H), 3,30 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,86 (д, J=8,0Гц., 1H), 6,97 (т, J=7,2Гц., 1H), 7,11 (т, J=7,8Гц., 1H), 7,48 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,61 (с, 1H), 7,75 (д, J=7,6Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1H, CONH), 13,62 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 422,2 (M+1).

Приклад 173

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-

іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід

Використовуючи методику описану в Прикладі 168 вище одержували бажану сполуку (60мг, 0,2ммоль).

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 0,891, 0,907 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 1,49 (т, J=10,4Гц., 2H), 2,40, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,41 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 2,74 (м, 4H), 3,30 (м, 2H), 6,82 (дд, J=4,5, 8,7Гц., 1H), 6,90 (тд, <sup>2</sup>J=2,4, <sup>3</sup>J=8,4Гц., 1H), 7,42 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,70 (с, 1H), 7,74 (дд, J=4,6, 8,4Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,88 (с, 1H, CONH), 13,65 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 438,4 (M-1).

Приклад 174

5-[5-Хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-

іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід

Використовуючи методику Прикладу 171 вище одержували бажану сполуку (31,2мг, 34%) з 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (63мг, 0,2ммоль).

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 1,15, 1,16 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 1,95 (т, J=11,6Гц., 2H, CH<sub>2</sub>), 2,40,2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,50 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,03 (д, J=11,2Гц., 2H), 3,19 (м, 2H), 3,30 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,85 (д, J=8,4Гц., 1H), 7,11 (дд, J=2,0, 8,0Гц., 1H), 7,52 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,76 (с, 1H), 7,97 (д, J=2,0Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,99 (с, 1H, CONH), 13,63 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 456,2 (M+1)

Приклад 175

5-[5-Бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-

іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти [2-(3,5-диметилпіперазин-1-іл)етил]амід

Використовуючи методику описану в Прикладі 171 одержували бажану сполуку (40мг, 40%) з 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигідроіндол-(3Z)-іліденметил]-2,4-диметил-1H-пірол-3-карбонової кислоти (74мг, 0,2ммоль).

<sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 1,15, 1,16 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 1,95 (т, J=11,6Гц., 2H, CH<sub>2</sub>), 2,40, 2,42 (2хс, 6H, 2хCH<sub>3</sub>), 2,50 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 3,03 (д, J=10,4Гц., 2H), 3,19 (м, 2H), 3,30 (м, 2H, CH<sub>2</sub>), 6,81 (д, J=8,4Гц., 1H), 7,24 (дд, J=2,0, 8,4Гц., 1H), 7,51 (т, J=5,6Гц., 1H), 7,76 (с, 1H), 8,10 (д, J=2,0Гц., 1H) (ароматика і вініл), 10,99 (с, 1H, CONH), 13,62 (с, 1H, NH).

PX-MC (m/z) 498,4 (M-1).

Приклад 205

(3Z)-3-[(3,5-диметил-1H-пірол-2-іл)-метиліден]-1-[1-(4-метилпіперазиніл)метил]-1,3-дигідро-2H-індол-2-он

N-Метилпіперазин (10г, 100ммоль) додавали до розчину, що перемішується, водного формальдегіду (10г 38% розчину, 100ммоль) і 3-(3,5-диметил-1H-пірол-2-ілметиліден)-1,3-дигідроіндол-2-ону (2,38г, 10ммоль) в метанолі (100мл). Розчин нагрівали при 60°C протягом 1г, концентрували до меншого об'єму і осад відфільтровували, промивали метанолом і сушили одержуючи 2,38г вказаної в заголовку сполуки, Тпл. 160-164°C. ВЕРХ Rt

4,72хв.  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2,26 (с, 3H), 2,33 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 2,43 (ш с, 4H), 2,70 (ш с, 4H), 4,59 (с, 2H), 5,96 (д, 1H), 7,02-7,08 (м, 2H), 7,15 (дд, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,48 (дд, 1H) і 13,0 (ш с, 1H). Елементний аналіз розраховано для  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ : С, 71,97; Н, 7,48; N, 15,99. Знайдено: С, 71,75; Н, 7,46; N, 15,87.

(3Z)-3-[(3,5-диметил-1H-пірол-2-іл)метиліден]-1-[1-(4-метилпіперазиніл)метил]-1,3-дигідро-2H-індол-2-он перетворювали у дигідрохлоридну сіль.

#### Приклад 206

Синтез (3Z)-3-[(3,5-диметил-1H-пірол-2-іл)метиліден]-1-(1-піролідинілметил)-1,3-дигідро-2H-індол-2-ону

Піролідін (450мг, 6,3ммоль) додавали до розчину, що перемішується, водного формальдегіду (500мг 38% розчину, 6,0ммоль) і 3-(3,5-диметил-1H-пірол-2-ілметиліден)-1,3-дигідроіндол-2-ону, (900мг, 3,8ммоль) в метанолі (50мл). Через 15хв., розчин охолоджували до  $0^\circ\text{C}$  і осад відфільтровували, промивали водою і сушили одержуючи 1,08г вказаної в заголовку сполуки, Тпл.  $129-132^\circ\text{C}$ . ВЕРХ Rt 4,87 хв.  $^1\text{H}$  ЯМР [ $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ]  $\delta$  1,65 (м, 4H), 2,32 (с, 3H), 2,34 (с, 3H), 2,62 (м, 4H), 4,72 (с, 2H) 6,07 (д, 1H), 7,00 (м, 1H), 7,15 (м, 2H), 7,61 (с, 1H), 7,76 (д, 2H) і 13,1 (ш с, 1H). Елементний аналіз розраховано для  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$ : С, 74,74; Н, 7,21; N, 13,07. Знайдено: С, 74,61; Н, 7,25; N, 13,03.

Біологічні приклади Інгібітори протеїнкінази формули (I):

Наступні дослідження можуть бути використані для визначення ступеня активності і ефективності сполук Формули (I) по відношенню до однієї або більшої кількості протеїнкіназ (тут далі ПК). Подібні дослідження можуть бути використані для тих же самих ліній будь-яких ПК використовуючи методики добре відомі в цій галузі.

#### А. Методики дослідження.

Деякі дослідження описані тут проводять в форматі ELISA (твердофазний імуносорбентний аналіз Сендвіча) [Voller, et al, 1980, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay," Manual of Clinical Immunology, 2d ed., Rose and Friedman, Am. Soc. Of Microbiology, Washington, D.C., pp.359-371]. Загальна методика є наступною: сполуку формули (I) вводять в клітини, що експресують тестовану кіназу, або природну, або рекомбінантну, для вибраного проміжку часу після якого, якщо тестована кіназа є рецептором, додають ліганд, що відомий як такий що активує рецептор. Клітини лізують і лізат переносять до лунок планшету ELISA, що попередньо був оброблений специфічним антитілом, що розпізнає субстрат реакції ензиматичного фосфорилування. Несубстратні компоненти лізату клітин вимивають і визначають кількість фосфорилування субстрату за допомогою антитіла, що специфічно розпізнає фосфотирозин, порівняно з контрольними клітинами, що не контактували з сполукою, що тестується.

Представлені переважні протоколи проведення експериментів ELISA для специфічних ПК приведені нижче. Тим не менше, адаптування цих протоколів для визначення активності сполук по відношенню до інших рецепторів протеїнкіназ (RTK), також як і цитоплазмів тірозинкіназ (CTK) і серинтреонін тірозинкіназ (STK), 3Находиться в

межах знань середнього спеціаліста в цій галузі. Інші дослідження описані тут вимірюють кількість продукованої ДНК у відповідь на активування кінази, що тестується, яка зазвичай вимірюється проліферативною відповіддю. Загальна методика цього дослідження є наступною: сполуку вводять в клітини, що експресують кіназу, що тестується, або природну, або рекомбінантну, для вибраного проміжку часу після якого, якщо тестована кіназа є рецептором, додають ліганд, що відомий як такий що активує рецептор. Після інкубування, принаймні, протягом ночі, додають реагент, що містить ДНК, такий як 5-бромдеоксиуридин (BrdU) або  $\text{H}^3$ -тімидин. Визначають кількість міченої ДНК або з кількості анти-BrdU антитіла або вимірюючи радіоактивність і порівнюють з контрольними клітинами, що не контактують з сполукою, що тестується. GST-FLK-1 біодослідження

Це дослідження визначає активність тірозинкінази GST-Flk1 на полі(glu.tyr) пептидах.

#### Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Cominga (Corning Catalog No.5805-96).

2. полі(glu.tyr) 4:1, ліофілізат (Sigma Catalog #PO275).

3. Одержували полі(glu.tyr)(pEY) покриті планшети для дослідження: Покриття 2мг/лунку полі(glu.tyr)(pEY) в 100мкл СЗФ, витримують при кімнатній температурі протягом 2 годин або при  $4^\circ\text{C}$  протягом ночі. Лунки планшетів накривають для попередження випарювання.

4. СЗФ буфер: для 1л, суміш 0,2г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,15г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2г  $\text{KCl}$  і 8г  $\text{NaCl}$  в приблизно 900мл  $\text{dH}_2\text{O}$ . Коли всі реагенти розчинялись, Доводять рН до 7,2 використовуючи  $\text{HCl}$ . Доводять загальний об'єм до 1л використовуючи  $\text{dH}_2\text{O}$ .

5. СЗФТ Буфер: до 1л СЗФ Буферу, додають 1,0мл Tween-20.

6. ТВВ-Блокувальний Буфер: для 1л, суміш 1,21г TRIS, 8,77г  $\text{NaCl}$ , 1мл TWEEN-20 в приблизно 900мл  $\text{dH}_2\text{O}$ . Доводять рН до 7,2 використовуючи  $\text{HCl}$ . Додають 10г БСА, перемішують для розчинення. Доводять загальний об'єм до 1л використовуючи  $\text{dH}_2\text{O}$ . Фільтрують для видалення осаду.

7. 1% БСА в СЗФ: Одержують 1х обробкою розчину, додають 10г БСА до приблизно 990мл СЗФ буферу, перемішують для розчинення. Доводять загальний об'єм до 1л використовуючи СЗФ буфер, фільтрують для видалення осаду.

8. 50mM Hepes pH7,5.

9. GST-Flk1cd виділяли з sf9 рекомбінантної трансформації бациловірусу (SUGEN, Inc.).

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

11. 10mMATФвд $\text{H}_2\text{O}$ .

12. 40mM  $\text{MnCl}_2$

13. Буфер для розведення кінази (БРК): суміш 10мл Hepes (pH7,5), 1мл 5M  $\text{NaCl}$ , 40мкл 100 mM ортованадату натрію і 0,4мл 5% БСА в  $\text{dH}_2\text{O}$  з 88,56мл  $\text{dH}_2\text{O}$ .

14. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC, Applied Scientific Catalog #AS-72092

15. ЕДТА: суміш 14,12г етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) до приблизно 70мл  $\text{dH}_2\text{O}$ . Додають 10N  $\text{NaOH}$  до розчинення ЕДТА. Дово-



дять рН до 8,0. Доводять загальний об'єм до 100мл використовуючи  $\text{dH}_2\text{O}$ .

16. 1° Буфер для розведення антитіла: суміш 10мл 5% BCA в СЗФ буфері з 89,5мл TBST.

17. Антифосфотирозин моноклональне анти-тіло кон'юговане з пероксидазою хрину (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).

18. 2,2'-Азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABTS, Moss, Cat. No. ABST).

19. 10%SDS.

Методика:

1. Наносять на 96-луночні планшети ELISA Corninga 2мкг поліЕУ пептиду в стерильному СЗФ як описано на стадії 3 розділу Матеріали і Реагенти.

2. Видаляють незв'язану рідину з лунок шляхом перевертання планшету. Промивають один раз TBST. Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини.

3. Додають 100мкл 1% BCA в СЗФ до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, протягом 1 г при кімнатній температурі.

4. Повторюють стадію 2.

5. Просочують лунки 50мМ HEPES (рН7,5) (150мкл/лунку).

6. Розводять сполуку, що тестується,  $\text{dH}_2\text{O}/4\%$  ДМСО до 4 разів бажаної кінцевої концентрації дослідження в 96-луночних поліпропіленових планшетах.

7. Додають 25мкл розведеної сполуки, що тестується, до планшету ELISA. В контрольні лунки поміщають 25мкл  $\text{dH}_2\text{O}/4\%$  ДМСО.

8. Додають 25мкл 40мМ  $\text{MnCl}_2$  з 4хАТФ (2 мкМ) до кожної лунки.

9. Додають 25мкл 0,5М ЕДТА до негативних контрольних лунок.

10. Розводять GST-FIk1 до 0,005мкг (5нг)/лунку використовуючи KDB.

11. Додають 50мкл розведеного ферменту до кожної лунки.

12. Інкують, при збовтуванні, протягом 15 хвилин при кімнатній температурі.

13. Зупиняють реакцію додаючи 50мкл 250мМ ЕДТА (рН8,0).

14. Промивають 3х використовуючи TBST і хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини.

15. Додають 100мкл на лунку антифосфотирозин HRP кон'югату, 1:5000 розведення в антитілі розведеному буфером. Інкують, при збовтуванні, протягом 90хв. при кімнатній температурі.

16. Промивають як на стадії 14.

17. Додають 100мкл ABTS розчину кімнатної температури до кожної лунки.

18. Інкують, при збовтуванні, протягом 10-15 хвилин. Видаляють будь-які бульбашки.

19. Зупиняють реакцію додаючи 20мкл 10% SDS до кожної лунки.

20. Знімають результати на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000 з тестувальним фільтром при 410нм і фільтром посилення при 630нм.

РҮК2 біодослідження

Це дослідження використовують для вимірювання *in vitro* активності кінази HA епітопу-міченого

повнодовжинним рук2 (FL.рук2-HA) в дослідженні ELISA.

Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning.

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

3. СЗФ (салін забуферений фосфатом Дульбекко (Gibco Catalog #450-1300EB))

4. TBST Буфер: для 1л, суміш 8,766г NaCl, 6,057г TRIS і 1мл of 0,1% Triton X-100 в приблизно 900мл  $\text{dH}_2\text{O}$ . Доводять рН до 7,2, доводять об'єм до 1л.

5. Блокувальний Буфер: для 1л, суміш 100г 10% BCA, 12,1г 100мМ TRIS, 58,44г 1М NaCl і 10мл of 1% TWEEN-20.

6. FL.рук2-HA з лізатів sf9 клітин (SUGEN, Inc.).

7. 4% ДМСО в MilliQue  $\text{H}_2\text{O}$ .

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

9. 1М  $\text{MnCl}_2$ .

10. 1М  $\text{MgCl}_2$ .

11. 1М Дитіотреїтол (DTT).

12. 10х буфер фосфорилювання кінази: суміш 5,0мл 1М Hepes (рН7,5), 0,2мл 1М  $\text{MnCl}_2$ , 1,0мл 1М  $\text{MgCl}_2$ , 1,0мл 10% Triton X-100 в 2,8мл  $\text{dH}_2\text{O}$ . Тільки перед використанням додають 0,1мл 1М ДТТ.

13. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC.

14. 500мМ ЕДТА в  $\text{dH}_2\text{O}$ .

15. Буфер для розведення антитіла: для 100мл, 1мл 5% BCA/СЗФ і 1мл 10% Tween-20 в 88мл TBS.

16. HRP-кон'юговані анти-Ptyr PY99), Santa Cruz Biotech Cat. No. SC-7020.

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

18. 10%SDS. Методика:

1. Наносили на 96 луночні планшети ELISA Corninga 0,5мкг на лунку 12CA5 анти- HA антитіла в 100мкл СЗФ. Зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Видаляють незв'язане HA антитіло з лунок шляхом перевертання планшету. Промивають планшет  $\text{dH}_2\text{O}$ . Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини.

3. Додають 150мкл блокувального буферу до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, протягом 30хв. при кімнатній температурі.

4. Промивають планшет 4х TBS-T.

5. Розводять лізат в СЗФ (1,5мкг лізату/100мкл СЗФ).

6. Додають 100мкл розведеного лізату до кожної лунки. Збовтують при кімнатній температурі протягом 1г

7. Промивають як на стадії 4.

8. Додають 50мкл 2х буферу кінази до планшету ELISA, що містить захоплений рук2-HA.

9. Додають 25мкл 400мкМ сполуки, що тестується, в 4% ДМСО до кожної лунки. Для контрольних лунок використовують тільки 4% ДМСО.

10. Додають 25мкл 0,5 М ЕДТА до негативних контрольних лунок.

11. Додають 25мкл 20мкМ АТФ до всіх лунок. Інкують, при збовтуванні, протягом 10 хвилин.

12. Зупиняють реакцію додаючи 25мкл 500мМ ЕДТА (рН8,0) до всіх лунок.

13. Промивають як на стадії 4.

14. Додають 100мкл HRP кон'югованого анти-Ртг розведеного 1:6000 в антитіло розведене буфером до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, протягом 1г при кімнатній температурі.

15. Промивають планшет 3× TBST і 1× СЗФ.

16. Додають 100мкл ABST розчину до кожної лунки.

17. Якщо необхідно, зупиняють реакцію додаючи 20мкл 10% SDS до кожної лунки.

18. Зчитують планшет на зчитувальному пристрої ELISA з тестувальним фільтром при 410нМ і фільтром посилення при 630нМ.

FGFR1 Біодослідження

Це дослідження використовують для вимірювання *in vitro* активності кінази FGF1-R в дослідженні ELISA.

Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Costar (Corning Catalog #3369).

2. Полі(біи-Тг) (Sigma Catalog #PO275).

3. СЗФ (Gibco Catalog #450-1300EB)

4. 50мМ забуференого розчину Hepes.

5. Блокувальний Буфер (5% BCA/СЗФ).

6. Очищений GST-FGFR1 (SUGEN, Inc.)

7. Буфер для розведення кінази. Суміш 500мкл 1М Hepes (GIBCO), 20мкл 5% BCA/СЗФ, 10мкл 100мМ ортованадату натрію і 50мкл 5М NaCl.

8. 10м МАТФ

9. АТФ/МnCl<sub>2</sub> фосфорилувальна суміш: суміш 20мкл АТФ, 400мкл 1М MnCl<sub>2</sub> і 9,56мл дН<sub>2</sub>O.

10. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC (Applied Scientific Catalog #AS-72092).

11. 0,5М ЕДТА.

12. 0,05% TBST

Додають 500мкл TWEEN до 1 літра TBS.

13. Поліклональна анти-фосфотирозина сироватки кроликів (SUGEN, Inc.).

14. Козлиний анти-кролячий кон'югат IgG пероксидази (Biosource, Catalog #ALI0404).

15. ABTS розчин.

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

Методика:

1. 96-луночні планшети ELISA Costar з 1мкг на лунку Полі(glu,tyr) в 100мкл СЗФ. Зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Промивають покриті планшети один раз СЗФ.

3. Додають 150мкл 5%BCA/СЗФ блокувально-го буферу до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, протягом 1г при кімнатній температурі.

4. Промивають планшет 2× СЗФ, потім один раз 50мМ Hepes. Вибивають планшети на паперовий рушник для видалення надлишку рідини і бульбашок.

5. Додають 25мкл 0,4мМ сполуки, що тестується, в 4% ДМСО або тільки 4% ДМСО (контролі) до планшету.

6. Розводять очищену GST-FGFR1 в кіназі розведеної буфером (5нг кінази/50мкл KDB/лунку).

7. Додають 50мкл розведеної кінази до кожної лунки.

8. Для початку реакції кінази додають 25мкл/лунку свіжеодержаного АТФ/Мn++ (0,4мл 1М MnCl<sub>2</sub>, 40мкл 10мМ АТФ, 9,56мл дН<sub>2</sub>O), свіжеодержаний).

9. Це швидка реакція кінази і повинна бути зупинена 25мкл 0,5М ЕДТА за способом подібним до додавання АТФ.

10. Промивають планшет 4× свіжим TBST.

11. Одержують антитіло розведене буфером: на 50мл: суміш 5мл 5% BCA, 250мкл 5% молока і 50мкл 100мМ ванадату натрію, доводять до кінцевого об'єму 0,05% TBST.

12. Додають 100мкл на лунку анти-фосфотирозину (1:10000 розведення в ADB). Інкують при збовтуванні протягом 1 г при кімнатній температурі.

13. Промивають як на стадії 10.

14. Додають 100мкл на лунку козлиного анти-кролячого кон'югат IgG пероксидази Biosource (1:6000 розведення в ADB). Інкують, при збовтуванні протягом 1 г при кімнатній температурі.

15. Промивають як на стадії 10 і потім СЗФ для видалення бульбашок і надлишку TWEEN.

16. Додають 100мкл ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчин до кожної лунки.

17. Інкують, при збовтуванні, протягом 10-20 хвилин. Видаляють будь-які бульбашки.

18. Знімають результати на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000: тестувальний фільтр при 410нМ, фільтрат посилення 630нМ.

EGFR Біодослідження

Це дослідження використовують для визначення *in vitro* активності кінази FGF1-R в дослідженні ELISA.

Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Corninga.

2. SUMOL1 моноклональне анти-EGFR антитіло (SUGEN, Inc.).

3. СЗФ

4. TBST Буфер

5. Блокувальний Буфер: для 100мл, суміш 5,0г Carnation Instant Non-fat Milk® з 100мл СЗФ.

6. Лізат A431 клітин (SUGEN, Inc.).

7. TBS Буфер:

8. TBS+10% ДМСО: для 1л, суміш 1,514г TRIS, 2,192г NaCl і 25мл ДМСО; доводили до 1 літру загального об'єму дН<sub>2</sub>O.

9. АТФ (аденозин-5'-трифосфат, з м'язів коняки, Sigma Cat. No. A-5394), 1,0мМ розчин в дН<sub>2</sub>O. Цей реагент повинен одержуватись тільки перед використанням і триматись на льоду.

10. 1,0мМ MnCl<sub>2</sub>.

11. АТФ/МnCl<sub>2</sub> фосфорилувальна суміш: одержують 10мл, суміш 300мкл 1мМ АТФ, 500мкл MnCl<sub>2</sub> і 9,2мл дН<sub>2</sub>O. Одержують тільки перед використанням, тримають на льоду.

12. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC .

13. ЕДТА.

14. Поліклональна анти-фосфотирозина сироватка кроля (SUGEN, Inc.).

15. Козлиний анти-кролячий кон'югат IgG пероксидази (Biosource Cat. No. ALI0404).

16. ABTS.

17. 30% Пероксид водню.

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

19. 0,2М HCl.

Методика:

1. 96-луночні планшети ELISA Coorning з 0,5мкг SUMO1 в 100мкл СЗФ на лунку, зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Видаляють незв'язане SUMO1 з лунок шляхом перевертання планшету видаляючи рідину. Промивають 1× дН<sub>2</sub>O. Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини.

3. Додають 150мкл блокувального буферу до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, протягом 30хв. при кімнатній температурі.

4. Промивають планшет 3× деіонізованою водою, потім один раз TBST. Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини і бульбашок.

5. Розводять лізат в СЗФ (7мкг лізат/100мкл СЗФ).

6. Додають 100мкл розведеного лізату до кожної лунки. Збовтують при кімнатній температурі протягом 1г

7. Промивають планшети як в 4, вище.

8. Додають 120мкл TBS до планшету ELISA, що містить захоплений EGFR.

9. Розводять сполуки, що тестується, 1:10 в TBS, вносять у лунки

10. Додають 13,5мкл розведеної сполуки, що тестується, до планшету ELISA. До контрольних лунок, додають 13,5мкл TBS в 10% ДМСО.

11. Інкують, при збовтуванні, протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

12. Додають 15мкл фосфорилуючої суміші до всіх лунок, за винятком лунок негативного контролю. Кінцевий об'єм лунок повинен бути приблизно 150мкл з 3мкМ АТФ/5мМ MnCl<sub>2</sub> кінцевої концентрації в кожній лунці. Інкують при збовтуванні протягом 5 хвилин.

13. Зупиняють реакцію додаючи 16,5мкл розчину ЕДТА при збовтуванні. Збовтують ще 1хв.

14. Промивають 4× деіонізованою водою, 2× TBST.

15. Додають 100мкл анти-фосфотирозину (1:3000 розведення в TBST) на лунку. Інкують, при збовтуванні, протягом 30-45хв. при кімнатній температурі.

16. Промивають як в 4, вище.

17. Додають 100мкл козлиного анти-кролячого кон'югату IgG пероксидази Biosource (1:2000 розведення в TBST) до кожної лунки. Інкують при збовтуванні протягом 30хв. при кімнатній температурі.

18. Промивають як в 4, вище.

19. Додають 100мкл ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчину до кожної лунки.

20. Інкують 5-10 хвилин при збовтуванні. Видаляють будь-які бульбашки.

21. Якщо необхідно, зупиняють реакцію додаючи 100мкл 0,2М HCl на лунку.

22. Зчитують результати на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000: тестувальний фільтр при 410нМ, фільтр посилення при 630нМ.

POGFR Біодослідження

Це дослідження використовують для визначення in vitro активності кінази FGF1-R в дослідженні ELISA.

Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning

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

3. СЗФ.

4. TBST Буфер.

5. Блокувальний буфер (такий же самий як для EGFR біодослідження).

6. Лізат клітин NIH 3T3, що експресують PDGFR-β (SUGEN, Inc.).

7. TBS Буфер.

8. TBS+10%ДМСО.

9. АТФ.

10. MnCl<sub>2</sub>.

11. Фосфорилувальна суміш буферу кінази: для 10мл, суміш 250мкл 1М TRIS, 200мкл 5М NaCl, 100мкл 1М MnCl<sub>2</sub> і 50мкл 100мМ Triton X-100 доводили дН<sub>2</sub>O до необхідних 10мл.

12. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC.

13. ЕДТА.

14. Поліклональна анти-фосфотирозина сироватка кроля (SUGEN, Inc.).

15. Козлиний анти-кролячий кон'югат IgG пероксидази (Biosource Cat. No. ALI0404).

16. ABTS.

17. Пероксид водню, 30% розчин.

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

19. 0,2 М HCl. Методика:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning з 0,5мкг 28D4C10 в 100мкл СЗФ на лунку, зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Видаляють незв'язане 28D4C10 з лунок шляхом перевертання планшету для видалення рідини. Промивають 1× дН<sub>2</sub>O. Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини.

3. Додають 150мкл блокувального буферу до кожної лунки. Інкують протягом 30хв. при кімнатній температурі при збовтуванні.

4. Промивають планшет 3× деіонізованою водою, потім один раз TBST. Хлопають планшетом над паперовим рушником для видалення надлишку рідини і бульбашок.

5. Розводять лізат в HNTG (10мкг лізат/100мкл HNTG).

6. Додають 100мкл розведеного лізату до кожної лунки. Збовтують при кімнатній температурі протягом 60хв.

7. Промивають планшети як описано на стадії 4.

8. Додають 80мкл робочої суміші буферу кінази до планшету ELISA, що містить захоплений PDGFR.

9. Розводять сполуки, що тестується, 1:10 в TBS в 96-луночних поліпропіленових планшетах.

10. Додають 10мкл розведеної сполуки, що тестується, до планшету ELISA. До контрольних лунок, додають 10мкл TBS+10% ДМСО. Інкують при збовтуванні протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

11. Додають 10мкл АТФ безпосередньо до всіх лунок, за винятком лунки негативного контролю (кінцевий об'єм в лунках повинен бути приблизно 100мкл з 20мкМ АТФ в кожній лунці). Інкують 30 хвилин при збовтуванні.

12. Зупиняють реакцію додаючи 10мкл розчину ЕДТА до кожної лунки.

13. Промивають 4х деіонізованою водою, двічі TBST.

14. Додають 100мкл анти-фосфотирозину (1:3000 розведення в TBST) на лунку. Інкують при збовтуванні протягом 30-45хв. при кімнатній температурі.

15. Промивають як на стадії 4.

16. Додають 100мкл козлиного анти-кролячого кон'югату IgG пероксидази Biosource (1:2000 розведення в TBST) до кожної лунки. Інкують при збовтуванні протягом 30хв. при кімнатній температурі.

17. Промивають як на стадії 4.

18. Додають 100мкл розчину ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кожної лунки.

19. Інкують 10-30 хвилин при збовтуванні. Видаляють будь-які бульбашки.

20. Якщо необхідно зупиняють реакцію додаючи 100мкл 0,2М HCl на лунку.

21. Зчитують результати на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000 з тестувальним фільтром при 410нм і фільтром посилення при 630нм.

Дослідження клітинної HER-2 Кінази

Це дослідження використовують для вимірювання активності HER-2 кінази в цілих клітинах в форматі ELISA.

Матеріали і Реагенти:

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

2. Сироватка ембріону теляти (CET, GIBCO Catalog #16000-044), ін активували нагріванням у водяній бані протягом 30хв. при 56°C.

3. Трипсин (GIBCO Catalog #25200-056).

4. L-Глутамін (GIBCO Catalog #25030-081)

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

6. Середовище росту. Суміш 500мл DMEM, 55мл інактивованого нагріванням CET, 10мл HEPES і 5,5мл L-Глутаміну.

7. Виснаженого середовища. Суміш 500мл DMEM, 2,5мл інактивованого нагріванням CET, 10мл HEPES і 5,5мл L-глутаміну.

8. СЗФ.

9. Пласкодонні 96-луночні тканино-культуральні мікротитровані планшети (Corning Catalog #25860).

10. 15см тканино-культуральні чашки (Corning Catalog #08757148).

11. 96-луночні планшети ELISA Corning.

12. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC.

13. картриджі для переносу Costar для Transtar 96 (Costar Catalog #7610).

14. SUMO 1: моноклональне анти-EGFR анти-тіло (SUGEN, Inc.).

15. TBST Буфер.

16. Блокувальний Буфер: 5% Carnation Instant Milk® в СЗФ.

17. EGF ліганд: EGF-201, Shinko American, Japan. Суспендований порошок в 100мкл 10мМ HCl. Додають 100мкл 10мМ NaOH. Додають 800мкл СЗФ і переносять до пробірки Еппендорфа, зберігають при -20°C до готовності до використання.

18. HNTG буфер лізису

Для готового 5xHNTG, суміш 23,83г Hepes, 43,83г NaCl, 500мл гліцерин і 100мл Triton X-100 і

достатня кількість дН<sub>2</sub>O для одержання 1л розчину.

Для 1xHNTG\*, суміш 2мл HNTG, 100мкл 0,1М Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 250мкл 0,2М Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> і 100мкл EDTA.

19. EDTA.

20. Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Одержують готовий розчин, суміш 1,84г Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> з 90мл дН<sub>2</sub>O. Доводять рН до 10. Кип'ятять в мікрохвильовій печі протягом однієї години (розчин стає прозорим). Охолоджують до кімнатної температури. Доводять рН до 10, повторюють цикл нагрівання/охолодження до рН10.

21. 200мМ Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

22. Поліклональна антисироватка кролика специфічна до фосфотирозину (анти-Ptyr антитіло, SUGEN, Inc.).

23. Споріднено очищена антисироватка, козлине антитіло анти-кролик IgG, кон'югат пероксидази (Biosource Cat #ALI0404).

24. ABTS розчин.

25. 30% розчин пероксиду водню.

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

27. 0,2М HCl.

Методика:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning з SUMO1 з 1,0мкг на лунку в СЗФ, 100мкл кінцевого об'єму/лунку. Зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Через один день, видаляють буфер і промивають планшет 3 рази дН<sub>2</sub>O і один раз TBST буфером. Всі промивання в цьому дослідженні повинні робитись таким способом, якщо не вказано інше.

3. Додають 100мкл блокувального буферу до кожної лунки. Інкують планшет, при збовтуванні, протягом 30хв. при кімнатній температурі. Тільки перед використанням, промивають планшет.

4. Використовують EGF/HER-2 хімера/3T3-C7 клітинну лінію для цього дослідження.

5. Вибирають чашки, що мають 80-90% злиття. Збирають клітини за допомогою трипсинізації і центрифугують при 1000об./хв.. при кімнатній температурі протягом 5хв.

6. Ресуспендують клітини у виснаженому середовищі і оцінюють використовуючи трипан блакитний. Необхідна життєздатність вище 90%. Вносять клітини у виснаженому середовищі з густиною 2500 клітин на лунку, 90мкл на лунку, в 96 луночному мікротитрованому планшеті. Інкують внесені клітини протягом ночі при 37° в атмосфері 5% CO<sub>2</sub>.

7. Дослідження починають через два дні після внесення.

8. Сполуку, що тестується, розчиняють в 4% ДМСО. Зразки потім розводять безпосередньо на планшетах виснажене-DMEM. Зазвичай, це розведення було 1:10 або більше. Всі лунки потім переносили до клітин планшету з наступним 1:10 розведенням (10мкл зразка і середовища в 90мкл виснаженого середовища. Кінцева концентрація ДМСО повинна бути 1% або нижче. Також можна використати стандартне серійне розведення.

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

10. Одержані EGF ліганди розводять готовим EGF (16,5мкМ) в нагрітому DMEM до 150нМ.

11. Одержують свіжий IINTG\* достатній для 100мкл на лунку; поміщають на лід.

12. Через 2 години інкубування з сполукою, що тестується, додають одержаний EGF ліганд до клітин, 50мкл на лунку, з кінцевою концентрацією 50нМ. Лунки позитивного контролю одержують ту ж саму кількість EGF. Негативний контроль не одержує EGF. Інкують при 37°C протягом 10хв.

13. Видаляють сполуки, що тестується, EGF і DMEM. Промивають клітини один раз СЗФ.

14. Переносять HNTG\* до клітин, 100мкл на лунку. Поміщають на лід на 5 хвилин. Тим часом, видаляють блокувальний буфер з планшету ELISA і промивають.

15. Вискрібають клітини з планшету мікропіпетором і гомогенізують клітинний матеріал неодноразово видаляючи рідину і додаючи HNTG\* лізисний буфер. Переносять лізат до покриття, блокують, промивають планшет ELISA. Або, використовують картридж для переносу Costar для переносу лізату до планшету.

16. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі протягом 1г

17. Видаляють лізат, промивають. Переносять свіжорозведене анти-Ptyr антитіло (1:3000 в TBST) до планшету ELISA, 100мкл на лунку.

18. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі, протягом 30хв.

19. Видаляють анти-Ptyr антитіло, промивають. Переносять свіжорозведене BIOSOURCE антитіло до планшету ELISA (1:8000 в TBST, 100мкл на лунку).

20. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі протягом 30хв.

21. Видаляють BIOSOURCE антитіло, промивають. Переносять свіжорозведений ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> розчин до планшету ELISA, 100мкл на лунку.

22. Інкують, при збовтуванні, протягом 5-10 хвилин. Видаляють будь-які бульбашки.

23. Зупиняють реакцію додаючи 100мкл 0,2М HCl на лунку.

24. Зчитують результати на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000 з тесту вальним фільтрувальним набором при 410нМ і фільтром посилення при 630нМ.

#### CDK2/CYCLIN Дослідження

Це дослідження використовують для вимірювання *in vitro* активності серін/треонін кінази людини cdk2/циклін А в дослідженні схожості сцинтиляції (ДСС).

#### Матеріали і Реагенти.

1. Поліетилентерефталатні 96-луночні планшети Wallac (гнучкі) (Wallac Catalog #1450-401).

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

3. Стрептавидін Amersham покривали полівінілтолуольними кульками ДСС (Amersham catalog #RPNQ0007). Кульки повинні бути відновлені в СЗФ без магнію або кальцію, з 20мг/мл.

4. Активованій cdk2/циклін А ферментний комплекс виділяли з Sf9 клітин (SUGEN, Inc.).

5. Біотинильований субстрат пептиду (Debtide). Пептиду біотин-Х-РКТРККАKKL розчиняли в дН<sub>2</sub>О з концентрацією 5мг/мл.

6. Суміш Пептид/АТФ: для 10мл, суміш 9,979мл дН<sub>2</sub>О, 0,00125мл "холодного" АТФ, 0,010мл Debtide і 0,010мл  $\gamma^{33}$ P АТФ. Остання кон-

центрація на лунку була 0,5мкМ "холодного" АТФ, 0,1мкг Debtide і 0,2мкСі  $\gamma^{33}$ P АТФ.

7. Буфер кінази: для 10мл, суміш 8,85мл дН<sub>2</sub>О, 0,625мл TRIS (РН 7,4), 0,25мл 1М MgCl<sub>2</sub>, 0,25мл 10% NP40 і 0,025мл 1М ДТТ, додають свіжий тільки перед використанням.

8. 10мМ АТФ в дН<sub>2</sub>О.

9. 1М Tris, рН доводили до 7,4 використовуючи HCl.

10. 1М МдCl<sub>2</sub>.

11. 1М ДТТ.

12. СЗФ (Gibco Catalog #14190-144).

13. 0,5М ЕДТА.

14. Розчин зупинення: для 10мл, суміш 9,25мл СЗФ, 0,005мл 100мМ АТФ, 0,1мл 0,5М ЕДТА, 0,1мл 10% Triton X-100 і 1,25мл 20мг/мл ДСС кульок.

#### Методика:

1. Одержують розчини сполуки, що тестується, з 5х бажаною кінцевою концентрацією в 5% ДМСО. Додають 10мкл до кожної лунки. Для негативного контролю, використовують тільки 10мкл 5% ДМСО на лунку.

2. Розводять 5мкл cdk2/cyclin А розчину 2,1мл 2х буферу кінази.

3. Додають 20мкл ферменту до кожної лунки.

4. Додають 10мкл 0,5М ЕДТА до негативних контрольних лунок.

5. Починають реакцію кінази, додають 20мкл суміші пептиду/АТФ до кожної лунки. Інкують протягом 1г без збовтування.

6. Додають 200мкл розчину зупинення до кожної лунки.

7. Витримують, принаймні, 10хв.

8. Обертають планшет приблизно при 2300об./хв. протягом 3-5хв.

9. Аналізують планшет використовуючи Trilux або подібний зчитувальний пристрій.

#### МЕТ Трансфосфорильяційне дослідження

Це дослідження використовують для вимірювання рівнів фосфотирозину на полі(глутамінова кислота:тірозин (4:1)) субстраті, як засоби для визначення агоністів/антагоністів мет трансфосфорильовання субстрату.

#### Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning, Corning Catalog #25805-96.

2. Полі(glu, tyr) 4:1, Sigma, Cat. No; P 0275.

3. СЗФ, Gibco Catalog #450-1300EB

4. 50мМ HEPES

5. Блокувальний буфер: розчиняють 25г бичачого сироваткового альбуміну, Sigma Cat. No A-7888, в 500мл СЗФ, фільтрують крізь 4мкм фільтр.

6. Очищений GST злитий протеїн, що містить домен Met кінази, Sugen, Inc.

7. TBST Буфер.

8. 10% водний (MilliQue H<sub>2</sub>O) ДМСО.

9. 10мМ водний (дН<sub>2</sub>О) Аденозин-5'-трифосфат, Sigma Cat. No. A-5394.

10. 2х буфер для розведення кінази: для 100мл, суміш 10мл 1М HEPES з рН7,5 з 0,4мл 5% БСА/СЗФ, 0,2мл 0,1М ортованадату натрію і 1мл 5М хлориду натрію в 88,4мл дН<sub>2</sub>О.

11. 4х АТФ реакційна суміш: для 10мл, суміш 0,4мл 1М хлориду магнію і 0,02мл 0,1М АТФ в 9,56мл дН<sub>2</sub>О.

12. 4× суміш негативного контролю: для 10мл, суміш 0,4мл 1М хлориду магнію в 9,6мл дН<sub>2</sub>O.

13. 96-луночні V-подібні поліпропіленові планшети NUNC, Applied Scientific Catalog #S-72092

14. 500мМ ЕДТА.

15. Буфер для розведення антитіла: для 100мл, суміш 10мл 5% БСА/СЗФ, 0,5мл 5% Carnation Instant Milk® в СЗФ і 0,1мл 0,1М ортованадату натрію в 88,4мл TBST.

16. Поліклональне антифосфотирозинове антитіло кроля, Sugen, Inc.

17. Козлине анти-кроляче антитіло кон'юговане з пероксидазою хрину, Biosource, Inc.

18. ABTS Розчин: для 1л, суміш 19,21г лимонної кислоти, 35,49г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> і 500мг ABTS достатньою кількістю дН<sub>2</sub>O доводили до 1л.

19. ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: змішують 15мл ABST розчину з 2мл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за п'ять хвилин до використання.

20. 0,2М HCl

Методика:

1. Наносять на планшети ELISA 2мкг Полі(Glu-Tyr) в 100мкл СЗФ, зберігають протягом ночі при 4°C.

2. Блокують планшет 150мкл 5% БСА/СЗФ на 60хв.

3. Промивають планшет двічі СЗФ, один раз 50мМ буфером Hepes з pH7,4.

4. Додають 50мкл розведеної кінази до всіх лунок. (Очищену кіназу розводять буфером для розведення кінази. Кінцева концентрація повинна бути 10нг/лунку.)

5. Додають 25мкл сполуки, що тестується, (в 4% ДМСО) або тільки ДМСО (4% в дН<sub>2</sub>O) для контрольних.

6. Інкують суміш кіназа/сполука протягом 15 хвилин.

7. Додають 25мл 40мМ MnCl<sub>2</sub> до негативних контрольних лунок.

8. Додають 25мкл суміші АТФ/MnCl<sub>2</sub> до всіх інших лунок (за винятком негативного контролю). Інкують протягом 5хв.

9. Додають 25мкл 500мМ ЕДТА для зупинення реакції.

10. Промивають планшет 3× TBST.

11. Додають 100мкл поліклонального анти-Ртиг кролика розведеного 1:10000 в буфері для розведення антитіла до кожної лунки. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі протягом однієї години.

12. Промивають планшет 3× TBST.

13. Розводять Biosource HRP кон'югованим з анти-кролячим антитілом 1:6000 в буфері для розведення антитіла. Додають 100мкл на лунку і інкують при кімнатній температурі, при збовтуванні, протягом однієї години.

14. Промивають планшет 1× СЗФ.

15. Додають 100мкл розчину ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кожної лунки.

16. Якщо необхідно, зупиняють реакцію додаючи 100мкл 0,2М HCl на лунку.

17. Зчитують планшет на зчитувальному пристрої ELISA Dynatech MR7000 з тестувальним фільтром при 410нм і фільтром посилення при 630нм.

IGF-1 Трансфосфориляційне дослідження

Це дослідження використовують для вимірювання рівню фосфотирозину в полі(глутамінова кислота:тірозин)(4:1) для визначення агоністів/антагоністів *gst*-IGF-1 трансфосфорилюючого субстрату.

Матеріали і Реагенти:

1. 96-луночні планшети ELISA Corning.

1. На планшет ELISA наносили 2,0мкг/лунку Пол(Glu, Tyr) 4:1 (Sigma PO275) в 100мкл СЗФ, зберігають планшет протягом ночі при 4°C.

2. Промивають планшет один раз СЗФ.

3. Додають 100мкл TBB блокувального буферу до кожної лунки. Інкують планшет протягом 1 години при збовтуванні при кімнатній температурі.

4. Промивають планшет один раз СЗФ, потім двічі 50мМ буферу Hepes з pH7,5.

5. Додають 25мкл сполуки, що тестується, в 4% ДМСО (одержують шляхом розведення готового розчину 10мМ сполуки, що тестується, в 100% ДМСО з дН<sub>2</sub>O) до планшету.

6. Додають 10,0нг *gst*-IGF-1 кінази в 50мкл буферу для розведення кінази) до всіх лунок.

7. Починають реакцію кінази додаючи 25мкл 4× реакційної суміші АТФ до всіх лунок тестування і лунок позитивного контролю. Додають 25мкл 4× суміші негативного контролю до всіх лунок негативного контролю. Інкують протягом 10 хвилин при збовтуванні при кімнатній температурі.

8. Додають 25мкл 0,5М ЕДТА (pH8,0) до всіх лунок.

9. Промивають планшет 4× TBST буфером.

10. Додають поліклональну антифосфотирозинову анти сироватку кроля з розведенням 1:10000 в 100мкл буфер для розведення антитіла до всіх лунок. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі протягом 1 години.

11. Промивають планшет як на стадії 9.

12. Додають 100мкл антикролячої HRP Biosource з розведенням 1:10000 в буфері для розведення антитіла до всіх лунок. Інкують, при збовтуванні, при кімнатній температурі протягом 1 години.

13. Промивають планшет як на стадії 9, після чого один раз промивають СЗФ для зменшення кількості бульбашок і надлишку Tween-20.

14. Розвивають реакцію додаючи 100мкл/лунку ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до кожної лунки.

15. Через приблизно 5 хвилин, зчитують на зчитувальному пристрої ELISA з тестувальним фільтром при 410нм і фільтром посилення при 630нм.

Дослідження включення BRDU

Наступні дослідження використовують клітини створені генетично для експресування вибраного рецептору і подальшого визначення ефективності сполуки, що цікава, на активність ліганд-індукованого синтезу ДНК для визначення включення BrdU в ДНК.

Зазвичай для кожного з наступних досліджень включення BrdU використовують наступні матеріали, реагенти і методику. Відмічені відміни окремих досліджень.

Матеріали і реагенти:

1. Прийнятий ліганд.

2. Прийняті сконструйовані клітини.

3. BrdU мічений реагент: 10мМ, в СЗФ (рН7,4)(Boehringer Mannheim, Germany).

4. FixDenat: фіксувальний розчин (готовий до використання)(Boehringer Mannheim, Germany).

5. Анти-BrdU-POD: мишаче моноклональне антитіло кон'юговане з пероксидазою (Boehringer Mannheim, Germany).

6. TMB субстратний розчин: тетраметилбензидин (TMB, Boehringer Mannheim, Germany).

7. СЗФ промивальний Розчин: 1×СЗФ, рН7,4.

8. Альбумін, телячий (БСА), фракція V, порошок (Sigma Chemical Co., USA). Загальна Методика:

1. Клітини вносять в концентрації 8000 клітин/лунку в 10% CS, 2мМ Gln в DMEM, на 96 лунковий планшет. Клітини інкубують протягом ночі при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

2. Через 24 години, клітини промивають СЗФ і потім сироватко-виснаженням в середовищі вільним від сироватки (0% CS DMEM з 0,1% БСА) протягом 24 годин.

3. На 3 день, до клітин одночасно додають прийнятний ліганд і сполуку, що тестується. Негативні контрольні лунки одержують тільки DMEM з 0,1% БСА вільним від сироватки; клітини позитивного контролю одержували ліганд без сполуки, що тестується. Сполуки, що тестуються, одержували в DMEM вільному від сироватки з лігандом в 96 луночному планшеті, і серійно розводили до 7 концентрацій тестування.

4. Через 18 годин активації ліганду, додають розведений BrdU маркувальним реагентом (1:100 в DMEM, 0,1% БСА) і клітини інкубують з BrdU (кінцева концентрація = 10мкМ) протягом 1,5 годин.

5. Після інкубування з маркувальним реагентом, середовище видаляють десантуванням і витрушують перевернутий планшет на паперовий рушник. Додають розчин FixDenat (50мкл/лунку) і планшети інкубують при кімнатній температурі протягом 45 хвилин на планшетному шейкері.

6. Розчин FixDenat повністю видаляють десантуванням і витрушують перевернутий планшет на паперовий рушник. Додають молоко (5% де гідратоване молоко в СЗФ, 200мкл/лунку) як блокувальний розчин і планшет інкубують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на планшетному шейкері.

7. Блокувальний розчин видаляють десантуванням і лунки промивають один раз СЗФ. Додають Анти-BrdU-POD розчин (1:200 розведення в СЗФ, 1%, БСА) (50мкл/лунку) і планшет інкубують протягом 90 хвилин при кімнатній температурі на планшетному шейкері.

8. Кон'югат антитіла повністю видаляють десантуванням і промиванням лунок 5 разів СЗФ, і планшет висушують перевертаючи і витрушуючи на паперовий рушник.

9. Додають розчин TMB субстрат (100мкл/лунку) і інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі на планшетному шейкері для достатнього для фотометричного детектування розвитку забарвлення.

10. Абсорбцію зразків вимірюють при 410нм (в "двоканальному" способі з фільтром зчитування 490нм, як довжина хвилі відгулу) на зчитувальному пристрої планшеті ELISA Dynatech.

EGF-індуковане дослідження включення BrdU  
Матеріали і Реагенти:

1. Миші EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).

2. 3T3/EGFRc7.

EGF-індуковане дослідження включення Her-2-Driven BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. Миші EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).

2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr(EGFr з доменом Her-2 кінази).

EGF-індуковане дослідження включення Her-4-Driven BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. Миші EGF, 201 (Toyobo Co., Ltd., Japan).

2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr з доменом Her-4 кінази).

PDGF-індуковане дослідження включення BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. FGF2/BFGF людини (Boehringer Mannheim, Germany).

2. 3T3/EGFRc7.

FGF-індуковане дослідження включення BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. FGF2/bFGF людини (Gnco BRL, USA).

2. 3T3c7/EGFr

IGF1-індуковане дослідження включення BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. Людський, рекомбіантний (G511, PromegaCorp., USA)

2. 3T3/IGF1r.

Інсулін-індуковане дослідження включення BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. Інсулін, кристалічний, телячий, Цинк (13007, Gibco BRL, USA).

2. 3T3/H<sub>25</sub>.

HGF-індуковане дослідження включення BrdU

Матеріали і Реагенти:

1. Рекombінантний HGF людини (Cat. No. 249-HG, R&D Systems, Inc. USA).

2. BxPC-3 клітини (ATCC CRL-1687).

Методика:

1. Наносять клітини 9000клітин/лунку в RPMI 10% CET на 96 лунковий планшет. Клітини інкубують протягом ночі при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>.

2. Через 24 годин, клітини промивають СЗФ і потім виснажують в 100мкл сироватковільного середовища (RPMI з 0,1% БСА) протягом 24 годин.

3. На 3 день, до клітин додають 25мкл суміші, що містить ліганд (одержували 1мкг/мл в RPMI з 0,1% БСА; кінцева концентрація HGF становить 200нг/мл) і сполуки, що тестується. Негативні контрольні лунки одержують 25мкл сироватковільного RPMI тільки з 0,1% БСА; клітини позитивного контролю одержують ліганд (HGF), але не сполуку, що тестується. Сполуки, що тестуються, одержують в 5 їх кінцевих концентраціях в сироватковільному RPMI з лігандом в 96 луночному планшеті, і серійно розводять одержуючи 7 концентрацій тестування. Зазвичай, найвища кінцева концентрація сполуки, що тестується, становить 100мкМ, і використовують 1:3 розведення (тобто, інтервал концентрації кінцевої сполуки, що тестується, становить 0,137-100мкМ).

4. Через 18 годин ліганд активують, 12,5мкл розведеного BrdU маркувального реагенту (1:100 в RPMI, 0,1% БСА) додають до кожної лунки і клітини інкубують з BrdU (кінцева концентрація становить 10мкМ) протягом 1 години.

5. Теж сама як і в Загальній Методиці.

6. Теж сама як і в Загальній Методиці.

7. Блокувальний розчин видаляють десантуванням і лунки промивають один раз СЗФ. Додають анти-BrdU-POD розчин (1:100 розведення в СЗФ, 1% БСА) (100мкл/лунку) і планшет інкубують протягом 90 хвилин при кімнатній температурі на планшетному шейкері.

8. Теж сама як і в Загальній Методиці.

9. Теж сама як і в Загальній Методиці.

10. Теж сама як і в Загальній Методиці.

Дослідження HUV-EC-C

Це дослідження використовують для вимірювання активності сполуки по відношенню до PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF або Flk-1/KDR, всі з яких природно експресуються HUV-EC клітинами.

День 0

1. Промивають і трипсинізують HV-EC-C клітини (ендоцеліальні клітини пупочної вени людини, (American Type Culture Collection, номер в каталозі 1730 CRL). Промивають саліном забуференим фосфатом Dulbecco (D-CЗФ, одержували від Gibco BRL, номер в каталозі 14190-029) 2× приблизно 1мл/10см<sup>2</sup> культуральної тканини. Трипсинізують 0,05% трипсин-ЕДТА в неферментному розчині дисоціації клітин (Sigma Chemical Company, номер в каталозі C-1544). Одержують 0,05% трипсин розводячи 0,25% трипсин/1мМ ЕДТА (Gibco, номер в каталозі 25200-049) в розчині дисоціації клітин. Трипсинізують приблизно 1мл/25-30см<sup>2</sup> культуральної тканини протягом приблизно 5 хвилин при 37°C. Після виділення клітин з колби, додають еквівалентну кількість середовища дослідження і переносять до 50мл стерильної пробірки для центрифугування (Fisher Scientific, номер в каталозі 05-539-6).

2. Промивають клітини приблизно 35мл середовища дослідження в 50мл стерильну пробірку для центрифугування додаючи середовище дослідження, центрифугують протягом 10 хвилин приблизно при 200об./хв., видаляють надосадкову рідину і ресуспендують з 35мл D-CЗФ. Повторюють промивання два рази D-CЗФ, ре-суспендують клітини в приблизно 1мл середовищі дослідження/15см<sup>2</sup> культуральної тканини. Середовищі дослідження містить F12K середовища (Gibco BRL, номер в каталозі 21127-014) і 0,5% ін активованої нагріванням сироватки ембріону теляти. Підраховують клітини використовуючи Coulter Counter® (Coulter Electronics, Inc.) і додають середовище дослідження до клітин одержуючи концентрацію 0,8-1,0×10<sup>5</sup> клітин/мл.

3. Додають клітини до 96-луночних планшетів з плоским дном в кількості 100мкл/лунку або 0,8-1,0×10<sup>4</sup> клітин/лунку, інкубують приблизно 24г при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

День 1

1. Одержують подвійно титровані сполуки, що тестується, в окремих 96-луночних планшетах, зазвичай 50мкМ до 0мкМ. Використовують теж саме середовище дослідження як згадано в Дні 0,

стадія 2 вище. Титрування проводять додаючи 90мкл/лунку сполуки, що тестується, при 200мкМ (4× кінцева концентрація на лунку) до верхньої лунки окремої колонки планшета. Оскільки готова сполук, що тестується, зазвичай має концентрацію 20мМ в ДМСО, 200мкМ лікарського засобу відповідає концентрації 2% ДМСО.

Розведення проводять до 2% ДМСО в середовищі дослідження (F12K+0,5% сироватки ембріону теляти) використовуючи як розчинник для сполуки, що тестується, для того щоб розвести сполуки, що тестується, але підтримуючи концентрацію ДМСО постійною. Додають цей розріджувач до лунок, що залишились, в колонці в концентрації 60мкл/лунку. Відбирали 60мкл від 120мкл 200мкМ розведення сполуки, що тестується, з верхньої лунки колонки і змішували з 60мкл в другій лунці колонки. Відбирали 60мкл з цієї лунки і змішували з 60мкл в третій лунці колонки, і так до завершення двократного титрування. Коли остання з кінця лунка змішується, відбирають 60мкл з 120мкл в цій лунці і відкидають її. Залишають останню лунку з 60мкл ДМСО/середовище розведення як таку, що не містить сполуки, що тестується, - контроль. Одержують 9 колонок титрованої сполуки, що тестується, достатньо для набору з трьох лунок кожного: (1) VEGF (одержували від Perigo Tech Inc., номер в каталозі 100-200, (2) фактор ендотеліального росту клітин (ECGF) (також відомий як фактор росту кислого фібробласту або aFGF) (одержували від Boehringer Mannheim Biochemica, номер в каталозі 1439 600), або, (3) PDGF B/B людини (1276-956, Boehringer Mannheim, Germany) і контрольне середовище дослідження. ECGF надається як рецептура з гепарином натрію.

2. Переносять розведення 50мкл/лунку сполуки, що тестується, до 96-луночних планшетів для дослідження, що містять 0,8-1,0×10<sup>4</sup> клітин/100мкл/лунку HUV-EC-C клітин з Дня 0 і інкубують приблизно 2г при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

3. В трьох екземплярах, додають 50мкл/лунку 80мкг/мл VEGF, 20нг/мл ECGF або контрольного середовища до кожної сполуки, що тестується. Як з сполуками, що тестуються, концентрації гормону росту є 4× бажаної кінцевої концентрації. Використовується середовище дослідження з Дня 0 стадія 2 для одержання концентрацій факторів росту. Інкубують приблизно 24 годин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Кожна лунка повинна мати 50мкл розведеної сполуки, що тестується, 50мкл фактору росту або середовища, і 100мкл клітин, з розрахунку загалом до 200мкл/лунку. Таким чином 4× концентрації сполуки, що тестується, і факторів росту стає 1× як тільки додаються до всіх лунок.

День 2

1. Додають <sup>3</sup>H-тимидин (Amersham, номер в каталозі TRK-686) в кількості 1мкCi/лунку (10мкл/лунку 100мкCi/мл розчину одержаного в RPMI середовищі+10% інактивованої нагріванням сироватки ембріону теляти) і інкубують приблизно 24г при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. RPMI одержують від Gibco BRL, номер в каталозі 11875-051.

День 3

1. Планшети зберігають в холодильнику протягом ночі при -20°C.

День 4



Відтоплюють планшети і збирають харвестером з 96-луночних планшетів (Tomtec HarvestЕrр 96®) на фільтрувальні папірці (Wallac, номер в каталозі 1205-401), ЗНімали результати на рідинному сцинтиляційному лічильнику Wallac Betaplate™.

Таблиця 2 показує результати біологічних досліджень деяких прикладів сполук формули (I). Результати приведені в значеннях IC<sub>50</sub>, мікромо-

лярна (мкМ) концентрація сполуки, що тестується, яка викликає 50% зміну активності цільової РКТ порівняно з активністю РТК в контрольній, в якій відсутня сполука, що тестується, особливо, показані результати вказують концентрацію сполуки, що тестується, необхідну для 50% ЗНижження активності цільової РТК. Біодослідження, які були або можуть бути використані для оцінки сполук описані більш детально нижче.

Таблиця 2

| Приклад | біо flkGST<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо FGFR1<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо PDGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо EGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | клітинна EGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | Her2 кінзаза<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | cdk2spa<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо pyk2<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1       | 57,68                                | 15,16                               | >100                               | >100                              | >100                                   |  |                                   | >100                               |
| 2       | >100                                 |                                     | >100                               | >100                              | >100                                   |  |                                   |                                    |
| 3       | 9,85                                 | 9,62                                | >100                               | >100                              | >100                                   |  |                                   | >100                               |
| 4       | 3,57                                 | >20                                 | >100                               | >100                              | >100                                   | >100                                   |                                   |                                    |
| 5       | 8,3                                  | 16,06                               | >100                               | >100                              | >100                                   | >100                                   |                                   |                                    |
| 6       | 4,04                                 |                                     | >100                               | 3,26                              | 7,82                                   | 2,43                                   |                                   |                                    |
| 7       | 7,74                                 |                                     | >100                               | 5,07                              | 9,8                                    | 4,24                                   |                                   |                                    |
| 8       | 12,1                                 |                                     | >100                               | 51,34                             | 20,08                                  | 5,5                                    |                                   |                                    |
| 9       | 0,96                                 |                                     | >100                               | >100                              | >100                                   | 16,38                                  |                                   |                                    |
| 10      | 5,72                                 |                                     | >100                               | 94,04                             | 15,86                                  | 8,06                                   |                                   |                                    |
| 11      | 9,77                                 |                                     | >100                               | >100                              | >100                                   | >100                                   |                                   |                                    |
| 12      | >20                                  |                                     | 21,46                              | >100                              |  | 27,73                                  |                                   |                                    |
| 13      | >20                                  |                                     | 81,92                              | 8,17                              |  | 2,66                                   |                                   |                                    |
| 14      | 13,01                                |                                     | 42,41                              | >100                              |  | 66,02                                  |                                   |                                    |
| 15      | >20                                  |                                     | >100                               | >100                              |  | 98,61                                  |                                   |                                    |
| 16      | >20                                  |                                     | 98,06                              | >100                              |  | 23,32                                  |                                   |                                    |
| 17      | 8,25                                 | 2,47                                | 94,35                              | 0,83                              | 11,47                                  | 15,94                                  | >10                               |                                    |
| 18      | 2,67                                 |                                     |                                    | 2,57                              | 9,23                                   | 4,99                                   |                                   |                                    |
| 19      | 7,5                                  |                                     |                                    | 6,86                              | 34,18                                  | 8,37                                   |                                   |                                    |
| 20      | 11,53                                |                                     |                                    | >100                              | 41,16                                  | 8                                      |                                   |                                    |
| 21      | 7,18                                 |                                     | >100                               | 40,34                             |  | 27,69                                  |                                   |                                    |
| 22      | >20                                  |                                     | >100                               | >100                              |  | 87,67                                  |                                   |                                    |
| 23      | >20                                  |                                     | >100                               | 36,64                             |  | 4,05                                   |                                   |                                    |
| 24      |                                      |                                     | >100                               | 16,84                             |  | 5,31                                   |                                   |                                    |
| 25      | 12,55                                |                                     | >100                               | 23,48                             |  | 7,9                                    |                                   |                                    |
| 26      | 16,03                                |                                     | 66,87                              | 34,67                             |  | 10,04                                  |                                   |                                    |
| 27      |                                      |                                     | >100                               | 26,5                              |  | 3,91                                   |                                   |                                    |
| 28      | 4,5                                  |                                     | 71,27                              | 53,66                             |  | 2,67                                   |                                   |                                    |
| 29      | 10,12                                |                                     | >100                               | 26,72                             |  | 1 3,98                                 |                                   |                                    |
| 30      | 9,4                                  |                                     | >100                               | 18,69                             |  | 4,1                                    |                                   |                                    |
| 31      | >50                                  |                                     | >100                               | 9,83                              |  | 47,19                                  |                                   |                                    |
| 32      | 45,74                                |                                     | 5,94                               | >100                              |  | >100                                   |                                   |                                    |
| 34      | >50                                  |                                     | >100                               | >100                              |  | >100                                   |                                   |                                    |
| 35      | >20                                  |                                     | >100                               | 80,4                              |  | 54,14                                  |                                   |                                    |
| 36      | >20                                  |                                     | >100                               | >100                              |  | >100                                   |                                   |                                    |
| 37      | 0,22                                 |                                     | 3,06                               | 10,78                             | 9,84                                   | 1,4                                    |                                   |                                    |
| 38      | 4,17                                 |                                     | 3,06                               | 6,04                              | 8,97                                   | 2,16                                   |                                   |                                    |
| 39      | 3,38                                 |                                     | 4,69                               | 3,67                              | 14,54                                  | 3,53                                   |                                   |                                    |
| 40      | 4,5                                  |                                     | 7,9                                | 6,52                              |  | 6,27                                   |                                   |                                    |
| 42      | 0,1                                  |                                     | 0,12                               | 11,95                             | 74,55                                  | 20,43                                  |                                   |                                    |
| 43      | 1,12                                 |                                     | 8,38                               | >100                              | 37,33                                  | 53,37                                  |                                   |                                    |
| 44      | <0,05                                |                                     | 0,02                               | 20,73                             | 67,46                                  | 6,99                                   |                                   |                                    |
| 45      | 1,71                                 |                                     | >100                               | >100                              | 29,95                                  | >100                                   |                                   |                                    |
| 46      | 30,62                                |                                     | 6,18                               | >100                              | >100,                                  | >100                                   |                                   |                                    |
| 47      | 0,08                                 | 1,56                                | 0,06                               | 11,42                             | 41,54                                  | 8,4                                    | >20                               | 1,05                               |
| 48      | 0,006                                | 0,3                                 | <0,78                              | 17,88                             | 21,58                                  | 7,93                                   |                                   | 0,09                               |
| 49      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | 43,86                                  | >100                                   |                                   |                                    |
| 50      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | 20,34                                  | >100                                   |                                   |                                    |
| 51      | 0,006                                | 1,66                                | 0,01                               | 18,1                              | 21,61                                  | 23,24                                  | 16,69                             | 0,35                               |

| Приклад | біо flkGST<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо FGFR1<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо PDGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо EGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | клітинна EGF<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | Her2 кіназа<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | cdk2spa<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) | біо pyk2<br>IC <sub>50</sub> (мкМ) |
|---------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 52      | 0,08                                 | 1,26                                | <0,78                              | 12,53                             | >100                                   | >100                                  | 10,66                             | 0,45                               |
| 53      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 54      | 1,98                                 |                                     | <0,78                              | 23,88                             | 9,76                                   | 7,02                                  |                                   |                                    |
| 55      | 0,27                                 |                                     | 0,53                               | 6,03                              | 35,99                                  | 77,82                                 |                                   |                                    |
| 56      | 2,32                                 |                                     | 3,19                               | >100                              | 10,03                                  | 7,11                                  |                                   |                                    |
| 57      | 0,06                                 |                                     | 7,98                               | >100                              | 9,97                                   | 6,94                                  |                                   |                                    |
| 58      |                                      |                                     | 21,14                              | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 59      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 60      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 61      |                                      |                                     | <0,78                              | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 62      | 8,00                                 |                                     | 8,32                               | >100                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 63      | 0,21                                 |                                     | <0,78                              | 8,59                              | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 64      | 0,55                                 |                                     | <0,78                              | 30,49                             | >100                                   | >100                                  |                                   |                                    |
| 65      | 0,37                                 |                                     | <0,05                              | >100                              | 74,36                                  | 15,97                                 |                                   |                                    |
| 66      | <0,05                                |                                     |                                    | >100                              | 11,84                                  | 2,76                                  |                                   |                                    |
| 67      | 0,39                                 |                                     | 24,77                              | 31,38                             | 19,79                                  | 2,56                                  |                                   |                                    |
| 68      | 1,16                                 |                                     | 0,03                               | >100                              | 23,52                                  | 34,13                                 |                                   |                                    |
| 69      | 0,3                                  |                                     | 56,55                              | >100                              | 97,54                                  | >100                                  |                                   |                                    |
| 70      | 0,09                                 | 1,50                                | 0,0030                             | 10,57                             | 6,42                                   | 7,99                                  | 12,62                             | 0,63                               |
| 71      | 15,21                                |                                     | 22,5                               | >100                              |  | 9,91                                  |                                   |                                    |
| 72      | 6,06                                 |                                     | 10,54                              | >100                              | 39,94                                  | 9,65                                  |                                   |                                    |
| 73      | 595                                  |                                     | 14,12                              | >100                              | 39,5                                   | 8,59                                  |                                   |                                    |
| 74      | 1,2                                  |                                     | 0,09                               | 46,75                             |  | >100                                  |                                   |                                    |
| 75      | 2,7                                  |                                     | 61,55                              | >100                              |  | >100                                  |                                   |                                    |
| 76      | 3,33                                 |                                     | 19,18                              | 5,11                              |  | 3,01                                  |                                   |                                    |
| 77      | 0,49                                 |                                     | 25,01                              | >100                              |  | >100                                  |                                   |                                    |
| 78      | 1,94                                 |                                     | 70,62                              | 9,33                              |  | 4,25                                  |                                   |                                    |
| 79      | 1,49                                 |                                     | >100                               | 27,39                             |  | >100                                  |                                   |                                    |
| 80      | 0,13                                 | 4,29                                | 0,001                              | >100                              |  | 50,19                                 | 17,19                             | 0,28                               |
| 81      | 0,21                                 |                                     | 0,18                               | >100                              |  | >100                                  |                                   |                                    |
| 82      | 2,03                                 | 7,69                                | 6,88                               | >100                              |  | >100                                  |                                   | 0,31                               |
| 83      | 0,34                                 | 0,41                                | 9,46                               | 2,18                              |  | 86,9                                  |                                   | 0,008                              |
| 84      | 1,38                                 |                                     | 12,51                              | 67,2                              |  | 5,86                                  |                                   | 0,006                              |
| 85      | 0,2                                  | 0,8                                 | 2,59                               | >100                              |  | 3,76                                  |                                   |                                    |
| 86      | 1,45                                 | 1,3                                 | 19,6                               | 41,8                              |  | >100                                  |                                   | 3,58                               |
| 87      | 3,27                                 | -7,56                               | 6,46                               | >100                              |  | 9,1                                   |                                   | 0,17                               |
| 88      | 0,35                                 | 1,18                                | 8,06                               | 2,36                              |  | >100                                  |                                   | 0,09                               |
| 89      | 7,84                                 |                                     | 47,58                              | 8,53                              | 9,67                                   | 15,97                                 |                                   |                                    |
| 115     | 7,3                                  |                                     | 7,48                               | >100                              |  | >100                                  | 0,006                             |                                    |
| 116     | >20                                  |                                     | >100                               | >100                              |  | >100                                  | <0,0005                           |                                    |
| 117     | 0,91                                 |                                     | 12,9                               | >100                              |  | >100                                  | 0,006                             |                                    |
| 118     | 1,93                                 |                                     | 1,2                                | >100                              |  | >100                                  | 0,002                             |                                    |
| 119     | 1,38                                 |                                     | 61,63                              | >100                              |  | >100                                  | <0,0005                           |                                    |

## IN VIVO тваринні моделі

## Тваринні моделі ксенотрансплантатів

Здатність пухлин людини рости як ксенотрансплантат в атимічних мишах (наприклад, Balb/c, nu/nu) забезпечує корисність in vivo моделі для дослідження біологічної відповіді на терапію пухлин людини. Починаючи з першої успішної ксенотрансплантації пухлини людини в атимічну мишу, [Ryggard i Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbial. Scand. 77:758-760], було трансплантовано і успішно вирощено в голих мишах багато різних ліній ракових клітин людини (наприклад, грудей, легенів, генітоуренарних, гастроінтестинальних, голови і шиї, гіобластом, кісток і злоякісних меланом). Наступні дослідження можуть бути використані

для визначення рівнів активності, специфічності і дії різних сполук формули (I).

Для оцінки сполук формули (I) корисні три загальні типи досліджень: клітинно/каталітичний, клітинно/біологічний і in vivo. Об'єктом клітинно/каталітичних досліджень є визначення дії сполуки формули (I) на здатність ТК до фосфорилювання тірозинів на відомому субстраті в клітині. Об'єктом клітинно/біологічних досліджень є визначення дії сполуки формули (I) на біологічну відповідь стимульовану ТК в клітині. Об'єктом in vivo досліджень є визначення дії сполуки формули (I) в тваринній моделі певного розладу, такого як рак.

Придатними лініями клітин для експериментів з підшкірною ксенотрансплантацією є C6 клітини (гліома, ATCC #CCL 107), A375 клітини (меланома,

ATCC #CRL 1619), A431 клітини (епідермоїдна карцинома, ATCC #CRL 1555), Calu 6 клітини (легеня, ATCC #HTB 56), PC3 клітини (простата, ATCC #CRL 1435), SKOV3TP5 клітини і NIH 3T3 фібробласти генетично модифіковані для надмірної експресії EGFR, PDGFR, IGF-1R або будь-яка інша кіназа, що тестується. Наступний протокол може бути використаний для проведення експериментів з ксенотрансплантацією:

Самиць атимічних мишей (BALB/c, nu/nu) одержували від Simonsen Laboratories (Gilroy, Calif.). Всіх тварин витримували за умов кімнати проведення дослідів у клітках Microisolator з підстилкою Альфадрай. Вони вільно одержують стерильну їжу гризунів і воду.

Лінії клітин вирощували в прийнятному середовищі (наприклад, MEM, DMEM, Ham's F10 або Ham's F12 плюс 5%-10% сироватка ембріону теляти (CET) і 2мМ глутамін (GLN)). Всі культуральні середовища клітин, глутамін і сироватку ембріону теляти одержували від Gibco Life Technologies (Grand Island, N.Y.), якщо не вказано інше. Всі клітини вирощували у вологому повітрі 90-95% і 5-10% CO<sub>2</sub> при 37°C. Всі лінії клітин зазвичай підкультивували двічі на тиждень і є негативними для мікоплазми за методом Mycotect (Gibco).

Клітини віджимали або об'єднували з 0,05% Трипсин-ЕДТА і осаджували при 450об./хв. протягом 10хв. Осад ресуспендованого в стерильному СЗФ або середовищі (без CET) до специфічної концентрації і клітини імплантували в задній бік миші (8-10 мишей на групу, 2-10×10<sup>6</sup> клітин/тварині). Вимірювали ріст пухлини через 3-6 тижнів використовуючи кронциркуль Венієра. Об'єм пухлин розраховували як продукт множення довжина×ширина×висота, якщо не вказано інше. Р значення розраховували використовуючи t-тест Стюдента. Сполуки, що тестуються, формули (I) в 50-100мкл експерименту (ДМСО або VPD:D5W) можна вводити за допомогою ІП ін'єкції різних концентрацій зазвичай починаючи з дня першого після імплантації.

#### Модель інвазії пухлини

Була розроблена наступна модель інвазії пухлини і вона може бути використана для оцінки терапевтичної цінності і ефективності сполук формули (I), що ідентифікуються для селективного інгібування рецептору KDR/FLK-1.

#### Методика

Голий мишей віком вісім тижнів (самиці) (Simonsen Inc.) використовували як експериментальні тварини. Імплантацію клітин пухлини можна провести у витяжній шафі з ламінарним потоком. Для анестезії інтраперітонеально вводять суміш ксилазину/кетаміну (100мг/кг кетамін і 5мг/кг ксилазину). Роблять середній розріз розкриваючи черевину порожнину (приблизно 1,5 см за довжиною) для введення 10<sup>7</sup> клітин пухлини в 100мкл середовища. Клітини ін'єктували або в дуаденальну долю підшлункової залози або під серозну оболонку кишечника. Черевину і м'язи закривали 6-0 шовковими нитками з безперервним швом і шкіру закривали використовуючи зажими. Тварин обстежували щоденно.

#### Аналіз

Через 2-6 тижні, в залежності від росту, що спостерігається у тварин, мишей умертвляють, і вирізають і аналізують (вимірюючи розмір пухлини, ступінь інвазії, імунохімію, in situ гібридаційне визначення і т.і.) метастази локальної пухлини до різних органів (легеня, печінка, мозок, шлунок, селезінка, серце, м'язи).

#### Дослідження С-КІТ

Ці дослідження використовували для визначення рівню фосфорилування с-кіт тіроzinу.

МО7Е (гостра мієлоїдна лейкемія людини) клітини виснажували на сироватку протягом ночі в 0,1% сироватці. Клітини попередньо обробляли сполукою формули (I) (конкурент з сироваткою виснаження), перед стимулюванням ліганду. Клітини стимулювали 250нг/мл rh-SCF протягом 15 хвилин. Після стимулювання, клітини лізували і імунопреципітували з анти-с-кіт антитілом. Визначали рівні фосфотіроzinу і протеїну за допомогою вестерн-блотингу.

#### Дослідження МТТ Проліферації

МО7Е клітини виснажували сироваткою і попередньо обробляли сполукою формули (I) як описано для експерименту фосфорилування. Клітини вносили в кількості 4×10<sup>5</sup> клітин/лунку на 96 лунковий планшет, в 100мкл RPMI+10% сироватки. Додавали rh-SCF (100нг/мл) і планшет інкубували протягом 48 годин. Через 48 годин, додавали 10мкл 5мг/мл МТТ [3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію бромід] і залишали інкубуватися протягом 4 годин. Додавали кислий ізопропанол (100мкл 0,04N HCl в ізопропанолі) і вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 550nm.

#### Дослідження апоптозу

МО7Е клітини інкубували +/-SCF і +/- сполукою формули (I) в 10% CET з rh-GM-CSF (10нг/мл) і rh-IL-3 (10нг/мл). Зразки досліджували на 24 і 48 годині. Для вимірювання активованого каспас-3, зразки промивали СЗФ і пермеабілізували охолодженим льодом 70% етанолом. Клітини потім мітили РЕ-кон'югованим поліклональним кролячим антиактивним каспас-3 і аналізували за допомогою FACS. Для вимірювання розщеплення PARP, зразки лізували і аналізували за допомогою вестерн-блотингу з анти-PARP антитілом.

#### Додаткові дослідження

Додаткові дослідження, які можуть бути використані для оцінки сполук формули (I) включають, без обмеження, біс-flk-1 дослідження, дослідження хімерного рецептору EGF рецептор-HEI=12 в цільних клітинах, біо-src дослідження, біо-lck дослідження і дослідження по вимірюванню фосфорилування raf. Протоколи для кожного з цих досліджень можна знайти в заявці US з серійним №09/099,842, яка включена сюди як посилання, включають будь-які малюнки, тут.

#### Вимірювання клітинної токсичності

Терапевтичні сполуки повинні бути більш активними у інгібуванні активності рецептору тіроzinкінази, ніж викликана ними цитотоксична дія. Вимірювання ефективності і клітинної токсичності сполук можна провести шляхом визначення терапевтичного індексу, тобто, IC<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>. IC<sub>50</sub>, доза, що необхідна для досягнення 50% інгібування, може бути виміряна використовуючи стандартні методики, такі як ті що були описані тут. LD<sub>50</sub>, доза, що

призводить до 50% токсичності, також може бути виміряна з використанням стандартних методик [Mossman, 1983, J. Immunol. Methods, 65:55-63], шляхом вимірювання кількості вивільненої LDH [Korzeniewski and Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods, 64:313, Decker i Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods, 115:61], або шляхом вимірювання летальної дози для тваринних моделей. Сполуки з великим терапевтичним індексом є переважними. Терапевтичний індекс повинен бути більшим 2, переважно, принаймні 10, більш переважно, принаймні 50.

Б. Приклад результатів клітинного дослідження використовуючи 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80).

Підтвердження активності 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) визначали в біохімічних дослідженнях (vide infra), здатність згаданої сполуки інгібувати ліганд-залежне РТК фосфорилювання оцінювали в дослідженнях на клітинах використовуючи клітини мишей NIH-3T3 сконструйовані для надмірної експресії Flk-1 або людського PDGFRP. 5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) інгібувала VEGF-залежне фосфорилювання Flk-1 тірозину із значенням  $IC_{50}$  приблизно 0,03мкМ. Це значення є подібним до 0,009мкМ К, значення визначеного для інгібування Flk-1 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом (Сполука 80), що визначали в біохімічних дослідженнях. Це показує, що 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) легко проникає у клітини. Стійкі біохімічні дані (vide infra) вказують,

що 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) мають порівнювану активність по відношенню до Flk-1 і PDGFR3, також було встановлено, що вона інгібує PDGF-залежне фосфорилювання рецептору в клітині із значенням  $IC_{50}$  приблизно 0,03мкМ. Здатність 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) інгібувати c-kit, близькі РТК, що зв'язує фактор стоволових клітин (SCF), визначали використовуючи MO7E клітини, що експресують цей рецептор. В цих клітинах, 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) інгібує SCF-залежне c-kit фосфорилювання із значенням  $IC_{50}$  0,01-0,1мкМ. Ця сполука також інгібує SCF-стимульоване фосфорилювання c-kit при гострій мієлоїдній лейкемії (AML) бластів виділених з периферійної крові пацієнтів.

На додаток до тестування здатності 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) інгібувати лігандзалежне фосфорилювання рецептору в клітинах, також визначали дію на лігандзалежну проліферативну відповідь клітин in vitro (дивіться Таблицю 4). В цих дослідженнях, клітини заморожували протягом ночі у виснаженому середовищі викликаючи ДНК синтез після додавання прийнятного мітогенетичного ліганду. Як показано в Таблиці 3, 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) проявляє PDGF-індуковану проліферацію NIH-3T3 клітин, що надмірно експресують PDGFRP або PDGFRcc із значенням  $IC_{50}$  0,031 і 0,069 мкМ, відповідно, і SCF-індуковану проліферацію MO7E клітин із значенням  $IC_{50}$  0,007мкМ.

Таблиця 3

| Рецептор       | Біохімічна    | Клітинна $IC_{50}$             |                                   |
|----------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|
|                | $K_i^1$ (мкМ) | Фосфорилювання рецептору (мкМ) | Ліганд залежна проліферація (мкМ) |
| Flk-1/KDR      | 0,009         | 0,03 <sup>2</sup>              | 0,004 <sup>3</sup>                |
| PDGFR $\alpha$ | 0,008         | 0,03 <sup>4</sup>              | 0,031 <sup>4</sup>                |
| PDGFR $\beta$  | HB            | HB                             | 0,069 <sup>5</sup>                |
| FGFR           | 0,83          | HB                             | 0,7 <sup>3</sup>                  |
| c-kit          | HB            | 0,01-0,1 <sup>6</sup>          | 0,007 <sup>6</sup>                |

HB = не визначали

<sup>1</sup>Визначали використовуючи рекомбінантний фермент

<sup>2</sup>Визначали використовуючи сироватко-виснажені NIH-3T3 клітини, що експресують Flk-1

<sup>3</sup>Визначали використовуючи сироватко-виснажені HUVEC

<sup>4</sup>Визначали використовуючи сироватко-виснажені NIH-3T3 клітини, що експресують PDGFR $\alpha$

<sup>5</sup>Визначали використовуючи сироватко-виснажені NIH-3T3 клітини, що експресують PDGFR $\beta$

<sup>6</sup>Визначали використовуючи сироватко-виснажені MO7E клітини

Як показано в Таблиці 3, спостерігається узгоджуваність між біохімічною і клітинною активністю 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-

діетиламіноетил)аміду (Сполука 80), що підтверджує висновок, що ця сполука перетинає мембрани клітини. Крім того, можна зробити ти висновок, що клітинна відповідь є результатом активності

Сполуки 80 по відношенню до вказаної цілі. На противагу, при тестуванні в присутності повного живильного середовища *in vitro*, необхідні, по суті, вищі концентрації 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) (>10мкМ) для інгібування росту різних пухлинних клітин людини (дивіться Таблицю 4). Це вказує, що сполука не безпосередньо інгібує ріст цих клітин при концентрації необхідній для інгібування ліганд залежного фосфорилування рецептору і клітинної проліферації.

Таблиця 4

| Лінія клітин | Джерело                 | IC <sub>50</sub> (мкМ) | LD <sub>50</sub> (мкМ) |
|--------------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| HT29         | Карцинома товстої кишки | 10                     | 22                     |
| A549         | Карцинома легені        | 9,5                    | 22                     |
| NCI-H460     | NSC карцинома легені    | 8,9                    | 20                     |
| SF767T       | Гліома                  | 7,9                    | 14                     |
| A431         | Епідермоїдна карцинома  | 6,0                    | 18                     |

Коротко, результати показані в Таблиці 4 одержували шляхом інкубування клітин протягом 48г в повному живильному середовищі в присутності ряду розведень 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду. В кінці періоду вирощування, визначали відносну кількість клітин. IC<sub>50</sub> значення розраховували як концентрація сполуки, що інгібує ріст клітин на 50% порівняно з необробленими клітинами. значення LD<sub>50</sub> розраховували як концентрацію сполуки, що призводить до 50% зменшення кількості клітин порівняно з клітинами, що починали експеримент.

Більш релевантним дослідженням на основі клітин, в якому оцінюють анти-ангіогенну активність 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) є *in vitro* дослідження мітогенезу використовуючи ендотеліальні клітини пуп очної вени людини (HUVEC) як модель критичної проліферації ендотеліальних клітин в ангіогенному процесі. В цьому дослідженні, мітогенну відповідь, вимірюють як збільшення ДНК синтезу, індукують сироватко-виснаженому HUVEC при додаванні VEGF або FGF. В цих клітинах, 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) інгібує VEGF- і FGF-індуковану мітогенну відповідь з дозозалежним профілем із значенням IC<sub>50</sub> 0,004мкМ і 0,7мкМ, відповідно, коли сполука була присутня протягом 48 годин дослідження.

Коротко, приведені вище результати одержували використовуючи сироватко-виснажені HUVEC, що інкубували з мітогенними концентраціями VEGF (100нг/мл) або FGF (30нг/мл) в присутності ряду розведень 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) протягом 24г. Мітогенну відповідь під час наступних 24г в присутності ліганду і інгібітору

була кількісною шляхом ДНК синтезу ґрунтуючись на включенні бромдеоксиурідину в клітинну ДНК.

В окремих експериментах, Сполука 80 інгібує VEGF-залежне фосфорилування ERK 1/2 (p42/44MAP кінза), раньо спадаючої цілі Fik-1/KDR, дозозалежним чином. Інгібуюча активність Сполуки 80 також показала довгу тривалість цієї системи; інгібування VEGF-залежного фосфорилування ERK 1/2 триває ще через 48 годин після видалення 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) з середовища з наступною короткою (2г) витримкою з мікромолярними концентраціями сполуки.

Стало зрозуміло, що VEGF є важливим фактором виживання ендотеліальних клітин. Оскільки 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) інгібує VEGF-залежну мітогенну відповідь HUVEC, досліджували дії сполуки на виживання HUVEC. В цих експериментах, розщеплювали каспас 3 субстрат полі-АОР-рібозилполімерази (PARP) використовуючи як зчитувач даних апоптозу. HUVEC культивували в сироватко-вільних умовах протягом 24 годин, що показує значні рівні PARP розщеплення, як визначено за допомогою акумулювання 23кДа фрагменту розщеплення PARP. Це в значній ступені було попереджено шляхом додавання VEGF до середовища клітини, що вказує що VEGF діє як фактор виживання в цьому дослідженні. 5-(5-Фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) показав інгібування KDR сигналювання. Відповідно, 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) інгібує VEGF-медійоване виживання HUVEC до залежним чином. Таким чином, ці дані показують, що Сполука 80 індукує апоптоз в культурі ендотеліальних клітин в присутності VEGF.

В. Дослідження *in vivo* ефективності

і. Ефективність проти прийнятих ксенотрансплантатів пухлин

*In vivo* ефективність 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) досліджували на моделях підшкірного (ПШ) ксенотрансплантату використовуючи клітини пухлини людини імплантовані в задній бік атимічної миші. Після імплантації, пухлини залишали розвиватись до розміру 100-550мм<sup>3</sup> перед початком перорального лікування сполукою.

Щоденно перорально вводили Сполуку 80 виликаючи дозозалежне інгібування росту A431 пухлини, починаючого після того як пухлини досягали розміру 400мм<sup>3</sup>. Статистично значне (P<0,05) інгібування росту пухлини спостерігалось при дозі 40мг/кг/день (74% інгібування) і 80мг/кг/день (84% інгібування) (дивіться Таблицю 6). В підготовчих експериментах, вища (160мг/кг/день) доза сполуки не була більш ефективною проти прийнятих A431 пухлин, ніж доза в 80мг/кг/день. Крім того, миша, що лікували дозою в 160мг/кг/день сполуки, втра-

чала вагу, що вказує на те що вища доза не була досить толерантною. Подібні результати були одержані в експерименті, в якому пухлини A431 вирощували до розміру 100мм<sup>3</sup> (дивіться Таблиця 4). В цьому другому експерименті, повна регресія пухлин спостерігається у шести з восьми тварин, що лікують дозою 80мг/кг/день протягом 21 день. У цих шести тварин, пухлини не починали рости протягом 110 днів спостереження після закінчення лікування. У двох тварин, у яких пухлини вирощували до великого розміру (2000-3000мм<sup>3</sup>), пухлини регресували у відповідь на другий цикл лікування Сполукою 80. Важливо, в всіх ефективних експериментах, 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) при 80мг/кг/день була добре толерантною, навіть коли вводилась більше ніж 100 днів.

Таблиця 5

| Початковий об'єм пухлини (мм <sup>3</sup> ) | Сполука <sup>1</sup> (мг/кг/день) | % Інгібування (день) | Р-значення |
|---|-----------------------------------|----------------------|------------|
| 400   | 80                                | 84 (36)              | 0,001      |
|   | 40                                | 74 (36)              | 0,003      |
|   | 20                                | 51 (36)              | 0,130      |
| 100   | 80                                | 93 (40)              | 0,002      |
|   | 40                                | 75 (40)              | 0,015      |
|   | 10                                | 61,(40)              | 0,059      |

<sup>1</sup> Сполука 80

Коротко, результати показані в Таблиці 5 одержували використовуючи A431 клітини (0,5×10<sup>6</sup>клітини/миші), які імплантували ПШ і задній бік атимічної миші. Щоденне пероральне введення 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)аміду (Сполука 80) в розчиннику на основі Cremophor або контрольного розчинника починали, коли пухлини досягали вказаного середнього об'єму. Пухлини вимірювали використовуючи кронциркуль верн'є і об'єм пухлин розраховували як результат довжинахширинависота. Р-значення розраховували порівнюючи розміри пухлин тварин, що лікували Сполукою 80 (n=8) з тими тваринами, що лікували розчинником (n=16) в останній день експерименту, використовуючи тест з подвійною вибіркою Стюдента.

Ефективність Сполуки 80 проти привитих пухлин людини різних джерел визначали використовуючи ксенотрансплантати Colo25 (карцинома товстої кишки), SF763T (гліома) і NCI-H460 (немаленькоклітинна карцинома легені) (дивіться Таблицю 6). Ці експерименти проводили використовуючи 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80), що вводили перорально 80мг/кг/день; доза, що була ефективною і добре толерантною.

Таблиця 6

|                   | Тип пухлини  | Початковий об'єм пухлини (мм <sup>3</sup> ) | % Інгібування (день) | Р-значення |
|-------------------|--------------|---|----------------------|------------|
| A431 <sup>1</sup> | Епідермоїдна | 100   | 93 (40)              | 0,002      |
| A431 <sup>1</sup> | Епідермоїдна | 400   | 84 (36)              | 0,001      |
| Colo205           | Товста кишка | 370   | 77 (54)              | 0,028      |
| NCI-H460          | Легеня       | 300   | 61 (54)              | 0,003      |
| SF763T            | Гліома       | 550   | 53 (30)              | 0,001      |

<sup>1</sup> Дані експерименту приведені в Таблиці 5

В описаних вище експериментах, Сполуку 80 вводили один раз на день 80мг/кг в розчиннику на основі Cremophor в пухлини, що досягли вказаного об'єму. Відсоток інгібування порівнювали з контрольною групою, якій вводили розчинник, розраховували в кінці експерименту. Р-значення розраховували порівнюючи розміри пухлин тварин, що лікували сполукою з тими тваринами, що лікували розчинником, використовуючи тест з подвійною вибіркою Стюдента.

Хоча 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амід (Сполука 80) інгібує ріст всіх типів пухлин показаних в Таблиці 7, існує відмінність у відповіді різних моделей ксенотрансплантатів. Специфічно, ріст NCI-H460 і SF763T пухлин затримувався або значно уповільнювався у випадку Colo205 пухлин, аналогів A431 пухлин, регресував коли обробляли 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом.

Для того щоб визначити молекулярну основу різної відповіді у різних моделей ксенотрансплантатів, досліджували пухлини SF763T. Відповідно, SF763T пухлини, які були менш чутливими до обробки 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигідроіндол-3-іліденметил)-2,4-диметил-1Н-пірол-3-карбонової кислоти (2-діетиламіноетил)амідом, оцінювали на молекулярному рівні використовуючи імуногістологічну техніку визначення дії лікування сполукою. Ці дослідження спочатку проводять на цьому типі пухлини, оскільки SF763T пухлини є високоваскуляризованими мікросудинами, що сильно експресують ендотеліальний клітинний маркер CD31 і відповідно добре підходящими для дослідження мікрокапілярної густини пухлини (МГП). Імуногістологічна оцінка SF763T пухлин, вказую на те, що в пухлинах оброблених тварин зменшується МГП порівняно з контролем обробленим розчинником, що є сумісним анти-ангіогенним механізмом дії сполуки 80; МГП був 24,2±4,1 у тварин, що обробляли сполукою 80, порівняно з 39,3±5,7 у тварин яких обробляли тільки розчинником. Як очікується з пов'язаної затримки росту пухлини, спостерігається чітке інгібування проліферації ракової пухлини, яку обробляли сполукою 80. Ці пухлини мали половинний мітотичний індекс порівняно з тими пухлинами що обробляли розчинником (дані не показані). Дія сполуки 80 на МГП і проліфера-

цію клітин пухлини вказує на те, що сполука має сильну анти-ангіогенну і антиракову дію, навіть за умов, при яких пухлини не регресують.

Здатність сполуки 80 інгібувати PDGFR фосфорилування і наступним сигналізуванням *in vivo* також було досліджено в пухлинах SF763T, які експресують високі рівні PDGFR $\beta$ . Обробка SF763T пухлин сполукою 80 значно інгібує PDGFR $\beta$  фосфорилування тірозину в прийнятих SF763T пухлинах. Сполука 80 також зменшує рівні фосфорилуваної (активованої) фосфоліпази С гамма (PLC- $\gamma$ ), негайне падіння індикатору PDGFR активації. Ці дані показують, що пероральне введення сполуки 80 викликає безпосередню дію на цільову (PDGFR) активність в пухлинах *in vivo*.

Виходячи з продемонстрованої здатності сполуки 80 інгібувати VEGF-залежне сигналювання в HUVEC *in vitro* було довготривалим (*vide supra*), ефективність сполуки оцінювали, коли сполука вводилась не часто в модель пухлини Colo205. Як показано в Таблиці 7, 80мг/кг (91% інгібування) і 40мг/кг (84% інгібування) ефективні, коли починаються щоденно, але не коли вводяться двічі на день. На противагу, вища доза сполуки 80 (160мг/кг) інгібувала (52% інгібування) ріст прийнятих пухлин Colo205, коли вводиться двічі на тиждень, що наводить на думку, що ця сполука може демонструвати активність, коли вводиться рідко в вищій дозі. Слід відзначити, що режим дозування може бути визначений середнім спеціалістом в цій галузі без надмірних експериментів.

Таблиця 7

| Доза (мг/кг) | Частота             | % інгібування | P-значення |
|--------------|---------------------|---------------|------------|
| 160          | Двічі на тиждень    | 52            | 0,085      |
|              | Один раз на тиждень | 17            | НЗ         |
| 80           | Щоденно             | 91            | 0,039      |
|              | Двічі на тиждень    | 19            | НЗ         |
|              | Один раз на тиждень | 0             | НЗ         |
| 40           | Щоденно             | 84            | 0,028      |
|              | Двічі на тиждень    | 36            | НЗ         |

НЗ: не значне (P>0,05)

Коротко, результати показні в Таблиці 7 одержували використовуючи Colo205 клітини ( $0,5 \times 10^6$  клітини/миші), що імплантували ПШ в задній бік атимічної миші. Пероральне введення сполуки 80, згідно з вказаним прописом, починали, коли пухлина досягала 400мм<sup>3</sup>. Пухлини вимірювали використовуючи кронціркуль верн'є і об'єм пухлин розраховували як продукт довжина $\times$ ширина $\times$ висота. P-значення розраховували шляхом порівняння розмірів пухлин у тварин, що обробляли сполукою 80, з тими тваринами що обробляли розчинником, в останній день експерименту, використовуючи тест з подвійною вибіркою Стюдента.

ii. Ефективність сполуки 80 на моделі розсіяного захворювання

На додаток до підтримання тривалого росту первинних солідних пухлин, інгіоногенез також є сут-

тєвим компонентом, що підтримується розвитком розсіяного захворювання завдяки метастазам з первинної пухлини. Дію сполуки 80 на розвиток розсіяного захворювання досліджували на моделі колонізації легені B16-F1 меланомою у миші. В цій моделі, B16-F1 клітини інокулювали внутрішньовенно через хвостову вену атимічної миші колонізуючі легені і одержуючи пухлини. Як показано в Таблиці 7, пероральне введення сполуки 80 в кількості 80мг/кг/день ефективно зменшує кількість B16-F1 клітин в легені, що оцінювали вимірюючи загальну вагу легені. Ці дані показують, що сполука 80 може інгібувати розсіяного хворобу *in vivo*.

Таблиця 8

|                      | Вага легені (г) | % Інгібування | P-значення |
|----------------------|-----------------|---------------|------------|
| Розчинник            | 0,83 $\pm$ 0,07 | -             | -          |
| Сполука <sup>1</sup> | 0,41 $\pm$ 0,04 | 50            | <0,001     |

<sup>1</sup>Сполука 80

Коротко, результати показані в Таблиці 8 одержували використовуючи атимічних мишей, яким інокулювали B16-F1 пухлинні клітини ( $5 \times 10^5$  клітин/миша) через хвостову вену. Мишам щоденно перорально вводили сполуку 80 в кількості 80мг/кг/день (n=10) або розчинник (n=18) протягом 24 днів після інокуляції клітин пухлини, в кінці лікування, мишей умертвляли і їх легені видаляли і зважували. Розраховували відсоток інгібування шляхом порівняння ваги легені тварин, що обробляли сполукою 80, з вагою легені тварин, яких вводили тільки розчинник. P-значення визначали використовуючи тест з подвійною вибіркою Стюдента.

## II. COX-2 інгібітори

Здатність інгібіторів COX-2 затримувати ріст пухлин досліджували використовуючи модель легені Левіса описану нижче.

Мишам підшкірно в ліву лапу ін'єктували ( $1 \times 10^6$  пухлинних клітин суспендованих в 30% Матригелі) і оцінювали об'єм пухлини використовуючи флетісмометр двічі на тиждень протягом 30-60 днів. Кров відбирали двічі під час експерименту в 24г протоколі для дослідження концентрації в плазмі і загального аналізу за допомогою AUC аналізу. Дані виражали як значення  $\pm$  SEM. Тести Стюдента і Мана-Уїтні використовували для виявлення відмінностей між значеннями використовуючи пакет програмного забезпечення InStat. Целекосиб дають під час їжі в дозах в межах 160-3200м.ч. уповільнюючи ріст цих пухлин. Інгібуюча активність целекосибу була дозозалежною і змінювалась в інтервалі від 48% - 85% порівняно з контрольними пухлинами. Аналіз метастазування легені проводили у всіх тварин підраховуючи метастази в стереомікроскопі і за допомогою гістохімічного аналізу сусідніх частин легені. Целекосиб не діє на метастазування легені при низьких дозах 160м.ч., однак поверхня метастазування зменшується більше ніж на 50%, коли вводиться доза в 480-3200м.ч.. На додаток, гістопатологічний аналіз показав, що целекосиб дозозалежним чином зменшує розмір метастатичних ушкоджень легені.

## 2. Модель НТ-29:

Мишам підшкірно в ліву лапу ін'єктували ( $1 \times 10^6$  пухлинних клітин суспендованих в 30% Матригелі) і оцінювали об'єм пухлини використовуючи флетісмометр двічі на тиждень протягом 30-60 днів. Імплантація клітин раку товстої кишки людини (НТ-29) голим мишам призводить до утворення пухлин, що будуть збільшуватись до розмірів 0,6-2мл на 30-50 день. Кров відбирали двічі під час експерименту в 24г протоколі для дослідження концентрації в плазмі і загального аналізу за допомогою АУС аналізу. Дані виражали як значення  $\pm$ SEM. Тести Стюдента і Мана-Уїтні використовували для виявлення відмінностей між значеннями використовуючи пакет програмного забезпечення InStat.

А. Мишей ін'єктованих НТ-29 пухлинними клітинами обробляли цитокином і.п. в дозі 50мг/кг на 5, 7 і 9 день в присутності або у відсутності целекоксиб в дієті. Визначали ефективність обох агентів шляхом вимірювання об'єму пухлини. Лікування з використанням целекоксиб подібного інгібітору COX-2 (SC-58236) зменшує об'єм пухлини на 89%. В тому ж самому дослідженні, введення індометацину в максимально толерантній дозі 2мг/кг/день в питній воді інгібує утворення пухлини на 77%. Однак, селективний інгібітор COX-2 повністю інгібує утворення метастазування легені в той час як неселективний NSAID індометацин був неефективним. Результати цих досліджень показують, що введення целекоксибу в дієту миші з пухлиною може затримувати ріст пухлин і метастазування, коли вводиться як єдина терапія. Однак, спостерігаються позитивні моменти, коли целекоксиб вводиться в комбінації з цитотоксичним агентом, таким як циклофосфамід.

В. В другому дослідженні, мишей з ін'єктованими клітинами НТ-29 раку товстої кишки обробляли целекоксибом (10, 40 або 160м.ч.) в дієті починаючи на 10 день. Спостерігалась приблизно дозо-залежна дія. (Таблиця 9).

Таблиця 9

Інібування целекоксибом  
карциноми НТ-29 товстої кишки людини

| День | Розчинник | 10м.ч. | 40м.ч. | 160м.ч. |
|------|-----------|--------|--------|---------|
| 14   | 0,114     | 0,124  | 0,125  | 0,120   |
| 22   | 0,25      | 0,25   | 0,19   | 0,14    |
| 28   | 0,45      | 0,36   | 0,27   | 0,21    |
| 35   | 0,79      | 0,57   | 0,4    | 0,3     |
| 42   | 1,38      | 0,89   | 0,68   | 0,49    |
| 50   | 1,9       | 1,49   | 1,04   | 0,8     |

Об'єм (мл)

III. In vivo дослідження використовуючи протеїнкази в комбінації з селективним інгібітором циклооксигенази-2 для лікування раку.

Здатність інгібітору протеїнкази уповільнювати ріст в комбінації з селективним інгібітором COX-2 можна дослідити на моделі ксенотрансплантату 1483, що писана нижче.

Ксенотрансплантат 1483 є тваринним ксенотрансплантатом, що є моделлю епітеліального раку

людини, що експресують циклооксигеназу-2 (COX-2) в пухлинних клітинах і в васкуляризованій тканині.

Модель голої миші з ксенотрансплантатом пухлини карциноми сквамозних клітин людини голови і шиї (лінія клітин 1483), що експресує COX-2 в пухлинних клітинах і в васкуляризованій тканині, подібна епітеліальному раку людини. При припусканні, що ця модель представляє епітеліальний рак людини і буде доброю моделлю для корелювання ефективності протираківих лікарських засобів, включаючи COX-2 інгібітори, до ефективности на людях.

Матеріали і методи:

Культура клітин:

Сквамозні клітин карциноми 1483 голови і шиї (HNSCC) людини зберігають в замороженій пляшечці, що містить  $3 \times 10^6$  клітин, 90% сироватки ембріону теляти (CET) і 10% диметилсульфоксиду (ДМСО). Брали заморожену пляшечку і швидко підтаювали при 37°C і поміщали в колбу T-162см<sup>2</sup> (Корнінг), що містить D-MEM/F12 середовище (GibcoBRL) з 15мМ буфером Hepes, L-глутаміну, гідрохлориду піридоксину і 10% CET. Клітини вирощують в інкубаторі з 5% CO<sub>2</sub> і температурі 37°C. Середовище змінюють кожен другий день і клітини придатні, коли досягають 80-90% злиття. Для пропуску клітин, промивають колбу 10мл саліну забуференого фосфатом (СЗФ), видаляють рідину і додають 2мл трипсин/ЕДТА (0,25% 1мМ, GibcoBRL) поміщають назад в інкубатор, через 5хв., клітини будуть відокремлюватись. Додають 8мл згаданого вище середовища до промитої колби і переносять до стерильної 50мл пробірки для центрифугування. Додають 30мл середовища і змішують і підраховують кількість клітин використовуючи гемацитометр, клітин на планшеті в T-162см<sup>2</sup>-3-4 $\times 10^6$  клітин.

Тваринна модель 1483:

Змінюють середовище за 24 години до подрібнення 1483 клітин перед ін'єкцією в голий мишей. Трипсинізують 1483 клітини як описано вище в розділі культура клітин. Підраховують кількість клітин і визначають кількість клітин. Центрифугують клітини при 1000об./хв. протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. Ресуспендують клітинні залишки і об'єднують їх (якщо використовують декілька 50мл пробірок для центрифугування) в одній 50мл пробірці для центрифугування з забуференому розчині саліну Ханка (HBSS, GibcoBRL) і центрифугують як раніше. Ви повинні одержати приблизно більше 25% клітин, що потім ви дійсно ін'єктуєте для одержання екстраклітин. Якщо ви ін'єктуєте 72 мишей і ви маєте 100 $\times 10^6$  клітин, готуйте всі клітини для ін'єкування мишам. Ін'єкуйте 1483 клітини в кількості 1 $\times 10^6$  клітин в 0,03мл/миші.

Ін'єктують клітини з 30% Матригелем (Collaborative Biomedical Products) і 70% HBSS. Ресуспендований об'єднаний залишок з 2,1мл (70%) холодного HBSS з 0,9мл (30%) відтаювали холодним Матригелем і суміш поміщали на лід. Тримали ці одержані клітини на льоду весь час до ін'єкування мишам. Самиць голих мишей віком 4-6 тижнів використовували в цих дослідженнях (Harlen). Для анестезії використовували CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> газ



і потім робили їм ін'єкцію в середній правий бік лапи використовуючи 0,5 cc туберкуліновий шприць (Beckerson & Dickerson). Зважували мишей в день ін'єкції (День 0) для початку дослідження базелінової ваги. Зважували мишей на 7 день і вимірювали об'єм пухлини правої задньої лапи використовуючи плетисмометр (Stoelting Co.). Плетисмометр є пристроєм, що вимірює об'єм лапи зануреної у воду. Вимірювали декілька лівих неін'єктованих лап і виводили середнє число для фонового вимірювання для віднімання від значення для правої лапи з пухлиною.

Вводили тваринам сполуки, що тестуються, в подрібненій їжі, коли пухлини досягали розміру 100-200 і продовжували давати сполуку протягом дослідження. Деяких тваринам давали тільки інгібітор протеїнкінази або селективний інгібітор циклооксигенази-2. Деяким мишам давали і інгібітор протеїнкінази і селективний інгібітор циклооксигенази-2 щоденно в придатній дозі, що визначали на основі результатів *in vitro* дослідження.

Зважували і вимірювали мишей протягом дослідження на 7, 10, 14, 17, 21, 24 і 28 день. Тваринам починали давати сполуку з 0 дня (профілактика) або починаючи з дня встановлення пухлини, приблизно 7 день (терапія). Приблизно на 30 день введення розчинника (контроль) миші мали великі пухлини (-1,0-1,5мл) і починали втрачати вагу, і в

цей час завершували введення розчинника тваринам. Якщо помічено інгібування пухлини в групах, що лікуються, і вони мають добрий стан, умертвляють половину тварин з груп, що лікуються, визначаючи затримку росту пухлини.

Спеціаліст в цій галузі повинен також легко зрозуміти, що представлений винахід є добре адаптованим для здійснення об'єктами і одержання кінцевих і згаданих переваг, також як і особливостей приведених тут. Молекулярні комплекси і способи, методики, способи лікування, молекули, специфічні сполуки описані тут приведені як приклади переважних втілень, і є прикладами, і не повинні розглядатись як такі що обмежують рамки винаходу. Зміни і інші використання будуть мати місце і будуть очевидні для спеціаліста в цій галузі і вони охоплюються межами цього винаходу і є визначеними в пунктах формули.

Для спеціаліста в цій галузі повинно бути зрозуміло, що різні заміни і модифікації можуть бути зроблені у винаході описаному тут без відходу від рамок і сутності винаходу.

Всі патенти і публікації згадані в описі є показовим рівнем техніки до якого відноситься винахід. Всі патенти і публікації включені сюди як посилання в тій самій ступені, як кожна окрема публікація була специфічно і окремо вказана для включення як посилання.