

Напрямом даного винаходу частково є способи модулювання представників сімейства кіназ множинних ліній (MLK), способи ідентифікації сполук, які модулюють кіназний білок множинних ліній, і або підвищують виживаність клітин, або стимулюють загибель клітин, способи ідентифікації сполук, які можуть бути придатні для лікування нейродегенеративних захворювань і/або запалення, і способи лікування нейродегенеративних захворювань сполуками, які інгібують кіназний білок множинних ліній.

Сімейство MLK включає в себе групу білків, в яких білкові послідовності кіназних доменів представників сімейства мають близьку схожість з MAPKKK, але більш схожі один з одним, чим з іншими MAPKKK. Представники сімейства MLK охоплюють частину дуже складних кіназних каскадів, таких, наприклад, як каскад передавання сигналу при стресі, в який залучено модулювання в числі інших N-кінцевої кінази c-Jun (JNK), яка в свою чергу модулює в числі інших білків фактори транскрипції, включаючи c-Jun, ATF2 і ELK-1. Кіназа JNK описана [в патентах США 5534426, 5593884, 5605808 і заявці WO 95/03324], кожний з цих документів включений тут у вигляді посилання в повному об'ємі.

Сімейство MLK включає в себе, зокрема, наступні групи: 1) кіназу множинних ліній 1 (MLK1); 2) кіназу множинних ліній 2 (MLK2); 3) кіназу множинних ліній 3 (MLK3), 4) кіназу, що несе лейциновий "зіппер" (LZK); 5) кіназу, що несе подвійний лейциновий "зіппер" (DLK); і 6) кіназу множинних ліній 6 (MLK6). MLK1 має каталітичний домен, схожий як з кіназами, специфічними для Tyr, так і з кіназами, специфічними для Ser/Thr. [Dorow, et al., Eur. J. Biochem., 1993, 213, 701-710]. MLK2 також має каталітичний домен, схожий з обома кіназами, специфічними для Tyr або Ser/Thr. [Dorow, et al., Eur. J. Biochem., 1993, 213, 701-710]. MLK2 відома також як MBT. [Kato, et al., Oncogene, 1995, 10, 1447-1451]. MLK3 включає в себе білок, який крім кіназного домену містить два лейцинових "зіппери" з примикаючим основним районом на карбоксильному кінці і район, багатий проліном. [Ing, et al., Oncogene, 1994, 9, 1745-1750]. MLK3 також відома як SPRK [Gallo, et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 15092-15100] і PTK1 [Ezoe, et al., Oncogene, 1994, 9, 935-938]. LZK є кіназою, що несе лейциновий "зіппер". [Sakuma, et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 28622-28629]. DLK має кіназний домен і два передбачуваних мотиви лейцинового "зіппера". [Hoizman, et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 30808-30817]. DLK також відома як ZPK [Reddy, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, 202, 613-620] і MUK [Hirai, et al., Oncogene, 1996, 12, 641-650]. Представники сімейства MLK також описані, наприклад, [в патентах США 5676945, 5554523, WO 93/15201, патенті Канади 2148898, Diener, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 9687-9692, DeAizpurua, et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 16364-16373, Tung, et al., Oncogene, 1997, 14, 653-659, Sells, et al., Trends in Cell Biol., 1997, 7, 161-167, Mata, et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 16888-16896, Hirai, et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 15167-15173, Fan, et al., J. Biol. Chem., 1996, 271, 24788-24793, Blouin, et al., DNA and Cell Biol., 1996, 15, 631-642, Pombo, et al., Nature, 1995, 377, 750-754, Kiefer, et al., EMBO J., 1996, 15, 7013-7025, Hu, et al., Genes & Dev., 1996, 10, 2251-2264, Su, et al., EMBO J., 1997, 16, 1279-1290, і Dorow, et al., Eur. J. Biochem., 1995, 234, 492-500]. Недавно в базі даних EST була ідентифікована інша кіназа, споріднена з MLK. Послідовність ДНК цього клону, MLK6, описується сімома елементами, що перекриваються. Ідентифікаційні номери їх клонів: 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 і 178522, послідовності кожного з яких включені тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Кожне з посилань, цитованих в даному параграфі, включене тут у вигляді посилання в повному об'ємі.

Недавно було показано, що стабільна експресія ZPK знижує проліферативну здатність фібробластів NIH 3T3, що було виміряно за допомогою аналізу утворення колоній. [Bergeron, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1997, 231, 153-155]. Однак Bergeron з співавторами не вдалося представити будь-яких даних, які вказують на те, що ZPK модулював активність субстрату ZPK або що ZPK стимулював загибель клітин.

Було показано, що експресія конструкції, що кодує Мус-MLK2, в клітинах Swiss 3T3 приводить до апоптозу приблизно через 20 годин після ін'єкції. [Nagata, et al., EMBO J., 1998, 17, 149-158].

Заявники розробили численні індолю- і інденосполуки, які нарівні з іншими діями інгібують ріст клітин, асоційований з станом гіперпроліферації, і інгібують загибель в різних ембріональних культурах, таких як культури ганглія дорсального корінця, смугастого тіла, верхніх шийних гангліїв і мотонейронів. [Патенти США 5475110, 5591855, 5594009, 5461146, 5621100, 5621101, 5705511 і 5756494], кожний з яких поступається місцем правонаступника даній заявці, включені тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Сполуки, перераховані в [патенті США 5705511], що мають формулу G, вказані в даній заявці як сполуки, що мають формулу I. Заявники також показали, що апоптоз мотонейронів інгібують похідним K-252a, індолюкарбазолом, який також модулює каскад передавання сигналу при стресі. [Робота Maroney et al., J. Neurosci., 1998, 18, 104-111] включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі.

Внаслідок неадекватності сполук, що відбираються, які модулюють представники каскаду передавання сигналу при стресі і або стимулюють загибель клітин, або підвищують виживаність клітин, залишається необхідність в нових виборчих способах скринінгу сполук. Крім того, залишається необхідність в скринінгових дослідженнях терапевтичних засобів, які можуть бути придатні при лікуванні запалення і нейродегенеративних захворювань. Даний винахід направлений на досягнення цих, а також інших важливих цілей.

Даний винахід надає способи ідентифікації сполук, які модулюють активність кіназного білка множинних ліній і підвищують виживаність клітин, що включають в себе етапи контактування клітини, що містить кіназний білок множинних ліній, з сполукою, визначення того, чи знижує сполука активність кіназного білка множинних ліній, і визначення того, чи підвищує сполука виживаність клітин.

Даний винахід також надає способи ідентифікації сполук, які модулюють активність кіназного білка множинних ліній і стимулюють загибель клітин, які включають в себе етапи контактування клітини, що містить кіназний білок множинних ліній, із сполукою, визначення того, чи збільшує сполука активність кіназного білка множинних ліній, і визначення того, чи стимулює сполука загибель клітин.

Даний винахід також надає способи ідентифікації сполук, які можуть бути придатні для лікування нейродегенеративних захворювань, що включають в себе контактування клітини або клітинного екстракту, що містить кіназний білок множинних ліній, із сполукою і визначення того, чи знижує сполука активність кіназного білка множинних ліній.

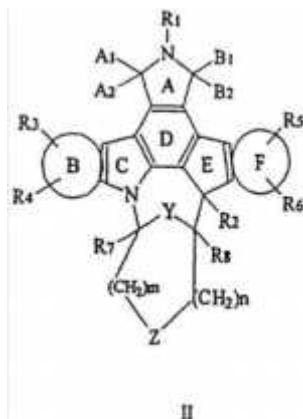
Даний винахід також надає способи ідентифікації сполук, які можуть бути придатні для лікування запалення, що включають в себе контактування клітини або клітинного екстракту, що містить кіназний білок

множинних ліній, із сполукою і визначення того, чи знижує сполука активність кіназного білка множинних ліній.

Даний винахід також надає способи лікування ссавця, що хворіє або можливо хворіє на нейродегенеративне захворювання, що включають в себе введення указаному ссавцеві сполуки, яка інгібує або знижує активність кіназного білка множинних ліній.

Даний винахід також надає способи лікування ссавця при запаленні, що включають в себе введення вказаному ссавцеві сполуки, яка інгібує або знижує активність кіназного білка множинних ліній.

Даний винахід також надає способи модулювання активності кіназного білка множинних ліній, що включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу II:



де:

кільце В і кільце F, незалежно, і кожне разом з атомами вуглецю, з якими вони зв'язані, вибираються з групи, що складається з:

ненасиченого 6-членного карбоциклічного ароматичного кільця, в якому від 1 до 3 атомів вуглецю можуть бути заміщені атомами азоту;

ненасиченого 5-членного карбоциклічного ароматичного кільця; і

ненасиченого 5-членного карбоциклічного ароматичного кільця, в якому або

один атом вуглецю заміщений атомом кисню, азоту або сірки,

два атоми вуглецю заміщені атомами сірки і азоту, атомами кисню і азоту, або двома атомами азоту;

або три атоми вуглецю заміщені трьома атомами азоту;

R<sup>1</sup> вибирається з групи, що складається з:

H, заміщеного або незаміщеного алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців, заміщеного або незаміщеного арилу, заміщеного або незаміщеного арилалкілу, заміщеного або незаміщеного гетероарила, або заміщеного або незаміщеного гетероарилалкілу;

-C(=O)R<sup>9</sup>, де R<sup>9</sup> вибирається з групи, що складається з алкілу, арилу і гетероарила;

-OR<sup>10</sup>, де R<sup>10</sup> вибирається з групи, що складається з H і алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців;

-C(=O)NH<sub>2</sub>, -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OR<sup>10</sup>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OR<sup>10</sup> і -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, де p рівне від 1 до 4;

і де або кожний з радикалів R<sup>11</sup> і R<sup>12</sup> незалежно вибирається з групи, що складається з H і алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців; або

R<sup>11</sup> і R<sup>12</sup> разом утворюють зв'язану групу формули -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>X<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, де X<sup>1</sup> вибирається з групи, що складається з -O-, -S- і -CH<sub>2</sub>-;

R<sup>2</sup> вибирається з групи, що складається з H, алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців, -OH, алкоксигрупи, що має від 1 до 4 вуглеців, -OC(=O)R<sup>9</sup>, -OC(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OR<sup>10</sup>, заміщеного або незаміщеного арилалкілу, що має від 6 до 10 вуглеців, і заміщеного або незаміщеного гетероарилалкілу;

кожний з радикалів R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> і R<sup>6</sup> незалежно вибирається з групи, що складається з:

H, арилу, гетероарила, F, Cl, Br, I, -CN, CF<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -OH, -OR<sup>9</sup>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -OC(=O)R<sup>9</sup>, -OC(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>7</sup>, OC(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OR<sup>10</sup>, -CH<sub>2</sub>OR<sup>10</sup>, -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, NR<sup>10</sup>S(=O)<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -NR<sup>10</sup>C(=O)R<sup>9</sup>,

-CH<sub>2</sub>OR<sup>14</sup>, де R<sup>14</sup> є залишком амінокислоти після видалення гідроксилу карбоксильної групи;

-NR<sup>10</sup>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, -C(=O)R<sup>2</sup>, -C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -CH-NOR<sup>2</sup>, -CH=NR<sup>9</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NHR<sup>14</sup>, або -CH=NNR<sup>2</sup>R<sup>2A</sup>, де R<sup>2A</sup> означає те, що і R<sup>2</sup>;

-S(O)<sub>y</sub>R<sup>2</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>S(O)<sub>y</sub>R<sup>14</sup>, де y рівний 0, 1 або 2;

алкілу, що має від 1 до 8 вуглеців, алкенілу, що має від 2 до 8 вуглеців, і алкінілу, що має від 2 до 8 вуглеців, де

кожна з алкільної, алкенільної або алкінільної групи незаміщена; або

кожна з алкільної, алкенільної або алкінільної групи заміщена групами в кількості від 1 до 3, вибраними з групи, що складається з арилу, що має від 6 до 10 вуглеців, гетероарила, арилалкоксигрупи, гетероциклоалкоксигрупи, гідроксиалкоксигрупи, алкілоксиалкоксигрупи, гідроксиалкіліогрупи, алкоксиалкіліогрупи, F, Cl, Br, I, -CN, -NO<sub>2</sub>, -OH, -OR<sup>9</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OC(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>S(O)<sub>y</sub>R<sup>9</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>10</sup>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -OC(=O)R<sup>9</sup>, -OC(=O)NR<sup>2</sup>, -O-тетрагідропіранілу, -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -NR<sup>10</sup>C(=O)R<sup>9</sup>, -NR<sup>10</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -NR<sup>10</sup>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, NR<sup>10</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -S(O)<sub>y</sub>R<sup>9</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, -C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -C(=O)R<sup>2</sup>, -CH<sub>2</sub>OR<sup>10</sup>, -CH=NNR<sup>2</sup>R<sup>2A</sup>, -CH=NOR<sup>2</sup>, -CH=NR<sup>9</sup>, -CH=NNHCH(N=NH)NH<sub>2</sub>, -S(=O)<sub>2</sub>NR<sup>2</sup>R<sup>2A</sup>, -P(=O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -OR<sup>14</sup> і моносахариду, що має від 5 до 7 вуглеців, де кожна гідроксильна група моносахариду незалежно або незаміщена, або заміщена H, алкілом, що має від 1 до 4 вуглеців, алкілкарбонілоксигрупою, що має від 2 до 5 вуглеців, або алкоксигрупою, що має від 1 до 4 вуглеців;

$X^2$  означає O, S або  $NR^{10}$ ,  
кожний з радикалів  $R^7$  і  $R^8$  незалежно вибирається з групи, що складається з H, алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців, алкоксигрупи, що має від 1 до 4 вуглеців, заміщеного або незаміщеного арилалкілу, що має від 6 до 10 вуглеців, заміщеного або незаміщеного гетероарилалкілу,  $-(CH_2)_pOR^{10}$ ,  $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$  і  $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$ , або  $R^7$  і  $R^8$  разом утворюють зв'язану групу формули  $-CH_2-X^3-CH_2-$ , де  $X^3$  являє собою  $X^2$  або зв'язок;

кожний з індексів m і n незалежно рівні 0, 1 або 2;

Y вибирається з групи, що складається з  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R^{10})-$ ,  $-N^+(O^-)(R^{10})-$ ,  $-N(OR^{10})-$  і  $-CH_2-$ ;

Z вибирається з групи, що складається із зв'язку,  $-O-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-CH(OR^{10})-$ ,  $-N(R^{10})-$ ,  $-N(OR^{10})-$ ,  $CH(NR^{11}R^{12})-$ ,  $-C(=O)N(R^{17})-$ ,  $-N(R^{17})C(=O)-$ ,  $-N(S(O)_yR^9)-$ ,  $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$ ,  $-N(C(=O)R^{17})-$ ,  $-C(R^{15}R^{16})-$ ,  $-N^+(O^-)(R^{10})-$ ,  $-H(OH)-(CH(OH)-)$ , і  $-CH(O(C=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$ , де  $R^{9A}$  являє собою те ж, що і  $R^9$ ,

$R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно вибираються з групи, що складається з H,  $-OH$ ,  $-C(=O)R^{10}$ ,  $-O(C=O)R^9$ , гідроксиалкілу і  $-CO_2R^{10}$ ;

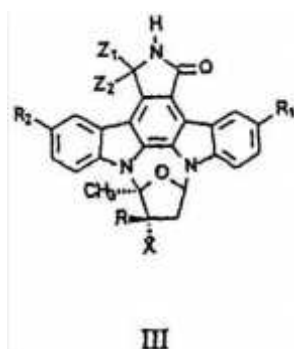
$R^{17}$  вибирається з групи, що складається з H, алкілу, арилу і гетероарилу;

$A_1$  і  $A_2$  вибираються з групи, що складається з H, H; H,  $OR^2$ ; H,  $-SR^2$ ; H,  $-N(R^2)_2$ ; і групи, в якій  $A_1$  і  $A_2$  разом утворюють фрагмент, вибраний з групи, що складається з  $=O$ ,  $=S$  і  $=NR^2$ ;

$B_1$  і  $B_2$  вибираються з групи, що складається з H, H; H,  $-OR^2$ ; H,  $-SR^2$ ; H,  $-N(R^2)_2$ ; і групи, в якій  $B_1$  і  $B_2$  разом утворюють фрагмент, вибраний з групи, що складається з  $=O$ ,  $=S$  і  $=NR^2$ ;

при умові, що, щонайменше, одна з пар  $A_1$  і  $A_2$  або  $B_1$  і  $B_2$ , утворить  $=O$ .

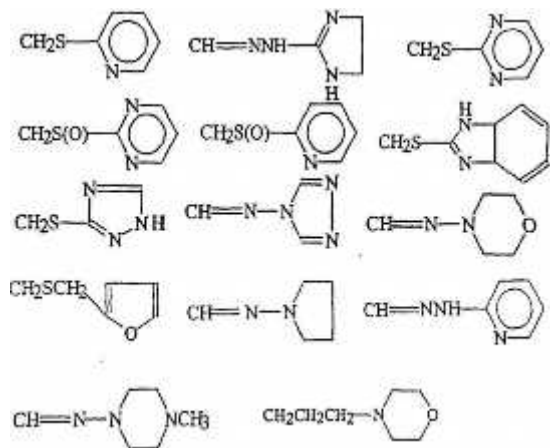
Даний винахід також надає способи модулювання активності кінзозного білка множинних ліній, що включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу III:



де

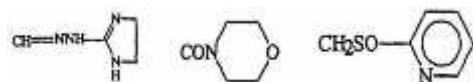
$Z_1$  являє собою H, і  $Z_2$  являє собою H, або  $Z_1$  і  $Z_2$  разом утворюють  $=O$ ;

$R_1$  вибирається з групи, що складається з H, Cl,  $CH_2SO_2C_2H_5$ , Br,  $CH_2S(CH_2)_2NH_2$ ,  $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $CH_2S(CH_2)_2NH_2$  n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>,  $NHCONHC_6H_5$ ,  $NHCONHC_2H_5$ ,  $CH_2SC_2H_5$ ,  $CH_2SC_6H_5$ ,  $N(CH_3)_2$ ,  $CH_3$ ,  $CH_2OCONHC_2H_5$ ,  $NHCO_2CH_3$ ,  $CH_2OC_2H_5$ ,  $CH_2N(CH_3)_2$ , OH, O-H-пропілу,  $CH=NNH-C(=NH)NH_2$ ,  $CH=N-N(CH_3)_2$ ,  $CH_2S(CH_2)_2NH$ -n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>,  $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$ ,  $CH_2S[3-(1,2,4\text{-триазину})]$ ,  $CH_2CH_2SCH_2$ ;



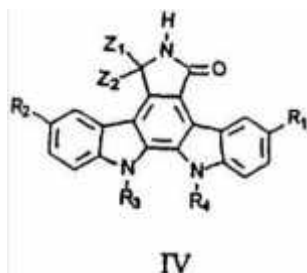
$R_2$  вибирається з групи, що складається з H, Br, Cl, I,  $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$ ,  $NHCONHC_2H_5$ ,  $CH_2SC_2H_5$ ,  $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$ ,  $CH_2S[3-(1,2,4\text{-триазину})]$ ,  $CH_2CH_2SCH_3$  і  $CH_2OH$ ;

X вибирається з групи, що складається з H,  $CH_2OH$ ,  $CH_2NH$ -серинH,  $CO_2CH_3$ ,  $CONHC_6H_5$ ,  $CH_2NHCO_2C_6H_5$ ,  $CH_2NHCO_2CH_3$ ,  $CH_2N_3$ ,  $CONHC_2H_5$ ,  $CH_2NH$ -гліцину,  $CON(CH_3)_2$ ,  $-CH_2NHCO_2-$   $CONH_2$ ,  $CONHC_3H_7$ ,  $CH_2NH$ -серину,  $CH_2SOCH_3$ ,  $CH=NOH$ ,  $CH_2NH$ -проліну,  $CH_2CH_2$ (2-піридилу),  $CH=NNHC(=NH)NH_2$ ,  $CONH(CH_2)_2OH$ ,  $CH=NNHCONH_2$ ,  $CH_2OCOCH_3$ ,  $-CH_2OC(CH_3)_2O-$ ,  $CH_2SC_6H_5$ ,  $CH_2SOC_6H_5$ ,  $CO_2H$ -гексилю,  $CONHCH_3$  і  $CO_2(CH_2)_nCH_3$ ; або однієї з наступних формул



i

R вибирається з групи, що складається з OH і OCH<sub>3</sub>. Даний винахід також надає способи модулювання активності кіназного білка множинних ліній, що включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу IV:



де

Z<sub>1</sub> означає H і Z<sub>2</sub> означає H, або Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> разом утворюють =O;

R<sub>1</sub> означає H або Br;

R<sub>2</sub> означає H;

R<sub>3</sub> означає H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, або i

R<sub>4</sub> означає H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> або CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH.

З метою ілюстрації варіантів даного винаходу деякі деталі показані на малюнках. Однак потрібно розуміти, що цей винахід не обмежений показаними певними варіантами.

Фігура 1 являє собою схематичний малюнок, на якому показано загальне одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком.

Фігура 2 являє собою схематичний малюнок, на якому показано загальне одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком.

Фігура 3 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання зв'язаних зі смолою інденопіролокарбазолів.

Фігура 4 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання захищених, розчинних інденопіролокарбазолів.

Фігура 5 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання проміжної сполуки V.

Фігура 6 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком за допомогою методу A.

Фігура 7 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком за допомогою методу B.

Фігура 8 являє собою схематичний малюнок, на якому показано одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком, заміщених в B кільці.

Фігура 9 являє собою схематичний малюнок, на якому показана дериватизація E кільця інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком.

На Фігурі 10 показана діаграма двох окремих експериментів, що представляє кількість життєздатних диференційованих за нейронним шляхом клітин PC-12, які залишаються після 5 днів культивування при відсутності NGF. Результати виражені у вигляді відсотка від контролю в присутності NGF в кожній групі (векторний контроль при відсутності NGF, n=12; всі інші групи, n=3). Відмінність між векторним контролем і стабільними пулами клітин, експресуючими домінуючий негативний мутант MLK-3, при відсутності NGF статистично значуща, що було визначено за двостороннім T-критерієм (p<0,05).

На Фігурі 11A показано фосфорилювання непрацюючої кінази («мертвої» кінази) GST-SEK-1, експресованої бакуловірусами FLAG-MLK-3 (суміш повнорозмірного білка і кіназного домену) з використанням аналізу, заснованого на визначенні радіоактивності в гелі.

На Фігурі 11B показаний <sup>32</sup>P-мічений продукт фосфорилювання основного білка мієліну, утворений внаслідок кіназної реакції, каталізованої експресованої бакуловірусами FLAG-MLK-3 (суміш повнорозмірного білка і кіназного домену) або кіназним доменом GST-MLK-3.

Фігура 12 являє собою аналіз імуноблотів, на якій показано фосфорилювання «мертвої» кінази GST-SEK-1, експресованої бакуловірусами FLAG-MLK-3 (суміш повнорозмірного білка і кіназного домену), як було визначено за допомогою антитіл, специфічних для фосфорилюваної SEK.

На Фігурі 13 показано фосфорилювання основного білка мієліну кіназним доменом експресованої бакуловірусами GST-MLK-3 з використанням (o) множинного скринінгового аналізу при осадженні трихлороцтовою кислотою, або (•) методу дослідження на фосфоцелюлозних мембранах.

На Фігурі 14 показана крива насичення скріплення [<sup>3</sup>H]K252a, інкубованого з лізатом клітин комах, інфікованих MLK-3 бакуловірусами.

На Фігурі 15A показана кількість <sup>32</sup>P-міченого c-jun при імунопреципітації/реакції з кіназою, одержаної з клітин, понадекспресуючих MLK-3, MLK-2 або DLK і оброблених або 0,025% ДМСО (контроль), або 500нМ K-252a.

На Фігурі 15B показана діаграма кількісного визначення відсотка активності, що залишається при імунопреципітації/реакції з кіназою в зразках, приведених в описі до Фіг.15A. Колонки представляють середнє для двох зразків, де величина помилки показує межі середньої.

На Фігурі 15C показана кількість <sup>32</sup>P-міченого c-jun при імунопреципітації/реакції з кіназою, одержаної з клітин, понадекспресуючих одну тільки HA-JNK1 або в поєднанні з MEKK1 при різних кількостях кДНК, як показано, і оброблених або 0,025% ДМСО (контроль), або 500нМ сполуки III-3 (дивись таблицю 3). Колонки представляють середнє для двох зразків, де величина помилки показує межі середньої.

На Фігурі 16 показано, що сполука III-3 підвищує виживаність нейронів залежним від концентрації чином. Дисоційовані нейрони з симпатичного ганглія (SG)(A), ганглія дорсального корінця (DRG) (B),

циліарного ганглія (CG) (C) і мотонейрони (MN) (D) культивували в присутності або при відсутності вказаних трофічних факторів. Через 48 годин після посіву підраховували клітини, як описано в матеріалах і методах. Дані представлені у вигляді середнього  $\pm$  стандартне відхилення з визначень в трьох або чотирьох повторях. Показаний один з трьох експериментів.

На Фігурі 17 показані фазово-контрастні мікроснімки культур E12 DRG (A, E), симпатичних E9 (B, F), циліарних E8 (C, G) і мотонейронів 35,5 (D, H) після культивування протягом 48 годин (24 години для циліарних нейронів) в присутності відповідного нейротрофічного чинника (20нг/мл NGF для симпатичних і чутливих нейронів, 10нг/мл CNTF для циліарних нейронів, 30мкг/мл м'язового екстракту (MEX) для мотонейронів (A-D), або в присутності 1мкМ сполуки III-3 (E-H). Смушка=200мкм.

На Фігурі 18 показаний мікрофотографічний експлантат гангліїв дорсальних корінців *in vitro*. Експлантати DRG курчат (E9) висівали в 96-лункові планшети в середовище, що містить 0,05% БСА. Після 2час. періоду прикріплення робили добавки: (A) контроль ДМСО; (B) 20нг/мл NGF; (C) 250нМ сполуки III-3. Через сорок вісім годин середовище видаляли, і експлантати фіксували 4% параформальдегідом в фосфатно-соловому буфері.

На Фігурі 19 показана кількість люмбальних мотонейронів курчати, що виживають на E10 після щоденної обробки (E5-9) певними дозами сполуки III-3. Представлені дані є середніми  $\pm$  стандартне відхилення для 5-6 тварин/групу обробки. Викладений експеримент повторювали два рази. Дані є даними одного типового експеримента і представляють одну сторону поперекового стовпа. \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ , за *t*-критерієм Стюдента з поправкою Бонферроні між групою, якій вводили сполуку III-3 і контрольною групою.

На Фігурі 20 показана кількість мотонейронів в спинномозговому ядрі *bulbosacrosus* самиць пацюків (SNB), що виживають на ПН10 або ПН60 після щоденної обробки (ПН1-5) сполукою III-3, або контрольним наповнювачем (5% Solutol™). На ПН10 (A, B) або ПН60 (B) пацюків забивали і робили зрізи району спинного мозку, що містять SNB, і обробляли їх для гістології; потім підраховували мотонейрони, забарвлені крезіловим фіолетовим (Cresylecht violet), в серійних зрізах поперекового 5 - крижового 1 району спинного мозку, як описано раніше [Wingfield, et al., Steroids, 1975, 26, 311-327]. Експериментальні дані являють собою середні  $\pm$  стандартне відхилення для 4-8 тварин/групу обробки.

На Фігурі 21 показана втрата ХАТ-імунореактивності після під'язикової аксотомії у дорослих пацюків після обробки сполукою III-3. Мікрофотографії під'язичного ядра після розтину під'язичного нерва і обробки (A) розчином одного наповнювача (5% Solutol™) і (B) 200мкг сполуки III-3, нанесеним в місце розтину. (C) Кількість ХАТ-імунореактивних під'язичних мотонейронів після обробок, описаних вище в пунктах (A) і (B). Результати виражені у вигляді відсоткового вмісту ХАТ-імунореактивних мотонейронів при цьому за 100% приймали кількість ХАТ-імунореактивних мотонейронів у розташованому на протилежній стороні непошкоджені під'язичному ядрі.

На Фігурі 22 показано інгібування шляху MLK-3, яке відбувається ефективно *in vivo* і блокує наступні етапи фосфорилювання. На Фігурі 22A показане збільшення імунореактивних при аналізі на тирозингідроксилазу нейронів чорної субстанції після пошкодження МРТР при систематичному введенні сполуки III-3. Фігура 22B являє собою типовий імуноблот, що показує індуковане МРТР збільшення рівнів фосфорилюваної МКК4. На Фігурі 22С зображений типовий імуноблот і результати ELISA, що демонструють ослаблення індукованого МРТР збільшення рівня фосфорилюваної МКК4 в присутності сполуки III-3.

На Фігурі 23 показана індукція IL-2 в клітинах Jurkat. На Фігурі 23A показана тимчасова крива індукції IL-2. На Фігурі 23B показане інгібування індукції IL-2 сполукою III-3. На Фігурі 23С показане інгібування індукції IL-2 сполукою III-3 і сполукою I-4

Наступні терміни, які використані вище і протягом всієї заявки, якщо не обумовлено особливо, потрібно розуміти як терміни, що мають наступні значення.

Термін «апоптоз» стосується особливої морфологічної форми загибелі клітин, що характеризується фрагментацією клітин і їх ядер на мембрано-зв'язані частинки. Апоптоз може бути запущений, наприклад, обробкою сполуками, що індукують апоптоз, такими як етопозид, стауроспорин, фактор некрозу пухлини  $\alpha$ , церамід і їм подібні, або в таких умовах, як х-опромінення.

Термін «загибель клітин» стосується загибелі клітин шляхом апоптозу, некротичним або іншим способом, широко відомим фахівцям в даній області. «Загибель клітин» може бути охарактеризована, наприклад, у вигляді зниження загальної кількості клітин або зниження виживаності клітин в порівнянні з необробленими контрольними популяціями клітин. Сполуки, які «стимулюють загибель клітин» приводять, в результаті, до зниження кількості клітин або зниження виживаності клітин в порівнянні з контрольними популяціями. Навпаки, сполуки, які «підвищують виживаність клітин» приводять, в результаті, до збільшення кількості клітин або виживаності клітин, або ці сполуки сповільнюють або знижують швидкість загибелі клітин.

Термін «виборче реагує» або «виборче зв'язує» описує сполуки, які безпосередньо фізично або хімічно взаємодіють з білком MLK. Навпаки, сполуки, які «не виборче реагують» або «не виборче зв'язують» можуть впливати на білки нижче за течією або вище за течією білка MLK, і таким чином можуть впливати на активність білків MLK, але не взаємодіяти безпосередньо фізично або хімічно з білком MLK.

Термін «модулює» стосується підвищення або зниження активності конкретного білка або його субстрату.

Частковим напрямом даного винаходу є способи ідентифікації сполук, які модулюють активність білка MLK і або підвищують виживаність клітин, або стимулюють загибель клітин. Сполуки, які в результаті, приводять до збільшення активності білка MLK, можуть стимулювати загибель клітин, тоді як сполуки, які в результаті, приводять до зниження активності білка MLK, можуть підвищувати виживаність клітин.

MLK білком може бути будь-який білок, віднесений при ідентифікації до MLK класу білків. Переважно MLK білок вибирається з групи, що складається з MLK1, MLK2, MLK3 (SPRK, PTK1), LZK, DLK (ZPK, MUK) і MLK6, які описані вище. У переважних варіантах винаходу ці способи ідентифікують сполуки, які безпосередньо взаємодіють або зв'язуються з MLK-білком, що визначається за допомогою досліджень скріплення, досліджень кіназ або іншими рівноцінними аналізами.

Щоб ідентифікувати сполуки, які модулюють активність MLK-білка і стимулюють або виживаність клітин,

або загибель клітин, клітину або клітини, що містять MLK білок, піддають контакту із сполукою, що тестується. Контактуювання може відбуватися в буферах або середовищах, добре відомих фахівцям в даній області. В альтернативному випадку контактування може відбуватися *in vivo*, при цьому тварину, таку, наприклад, як мишу або іншу відповідну тварину, відому фахівцям в даній області, піддають контакту шляхом введення фармацевтичної композиції, що містить сполуку, що тестується і фармацевтично прийнятну сіль, носій або розріджувач. Додатково можуть бути використані варіюючи кількості клітин і концентрації сполук, що тестуються. Визначають, чи збільшує або зменшує сполука, що тестується активність білка MLK. Крім того, також визначають, чи стимулює сполука, що тестується виживаність або загибель клітин.

Клітинами, які піддають контакту із сполуками, що тестуються, можуть бути будь-які клітини ссавців. Переважно клітиною є нервова клітина. Переважно клітина залучена до нейродегенеративного захворювання. З метою даного винаходу терміни «нейродегенеративне захворювання», «нейродегенеративне порушення» і «нейродегенеративний стан» взаємозамінні і використовуються, щоб описати будь-яке захворювання або стан, в який залучаються нервові клітини або клітини, зв'язані з нервовою системою, включаючи, але не обмежуючись цим, хвороба Альцгеймера, захворювання мотонейронів, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, цереброваскулярне захворювання, ішемічні стани, деменція при СНІДі, епілепсія, хвороба Гентінгтона і пошкодження при струсі або проникаюче поранення головного або спинного мозку.

Активність MLK білка може бути визначена багатьма способами. Наприклад, активність MLK може бути визначена шляхом вимірювання активності субстрату MLK білка. Такі субстрати добре відомі і без великих зусиль відмітні фахівцями в даній області. Переважно субстрат є представником сімейства кіназ мітогеном протеїнкіназ, що активуються або сімейства мітогеном протеїнкіназ, що активуються, або субстрату, що продовжує шлях нижче, які включають в себе, але не обмежені цим, білок, вибраний з групи, що складається з JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 і гомолог AEX-3 ссавців, а також загальні субстрати Ser/Thr протеїнкіназ, такі як основний білок мієліну (MBP). Реактиви і способи вимірювання активності субстрату також добре відомі фахівцям в даній області. Присутність MLK також може бути визначена шляхом вимірювання кількості MLK білка або мРНК, що кодує MLK білок. Реактиви, включаючи антитіла і олігонуклеотидні зонди, а також способи вимірювання кількості ДНК або білка, включаючи нозерн- і вестерн-блотти, добре відомі фахівцям в даній області. Активність MLK білка також може бути визначена шляхом аналізу кінази *in vitro*. Аналізи кіназ *in vitro* добре відомі фахівцям в даній області. Інші способи вимірювання активності білка відомі фахівцям в даній області, і мається на увазі, що вони включені в даний винахід. Таким чином, фахівець в даній області може визначити, чи модулює сполука, що тестується (тобто збільшує або знижує) активність MLK-білка.

Чи стимулює або не стимулює сполука, що тестується виживання клітин або загибель клітин, може бути визначено багатьма шляхами. Переважно підвищення виживаності клітин або стимуляція загибелі клітин визначається з використанням клітин, для яких існує ризик загибелі, і при порівнянні кількості клітин, які зазнавали контакту із сполукою, що тестується і залишилися живими, з кількістю клітин, які не зазнавали контакту із сполукою, що тестується і залишилися живі. Переважно клітинами є первинні ембріональні клітини мотонейронів, які заздалегідь запрограмовані на смерть. Первинні ембріональні клітини мотонейронів описані в роботі [Maroney, et al., J. Neurosci., 1998, 18, 104-111], яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Первинні ембріональні клітини мотонейронів загинуть, якщо не будуть врятовані за допомогою сполуки, що тестується. Таким чином, більша кількість живих клітин мотонейронів в популяції клітин мотонейронів, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю клітин мотонейронів в популяції мотонейронних клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, є показником сполуки, що тестується, яка підвищує виживаність клітин. Навпаки, менша кількість живих клітин мотонейронів в популяції мотонейронних клітин, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю живих клітин мотонейронів в популяції мотонейронних клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, є показником сполуки, що тестується, яка стимулює загибель клітин.

У іншому варіанті винаходу нормальні клітини, або клітини дикого типу, перетворюють в клітини, для яких існує ризик загибелі, шляхом понадекспресії білка MLK, як описано нижче в прикладах, і потім піддають контакту із сполукою, що тестується. Клітини, понадекспресуючі білки MLK, можуть загинути, якщо не будуть врятовані за допомогою сполуки, що тестується. Понадекспресія білків MLK може бути досягнута з допомогою векторів, здатних до експресії конкретного білка всередині клітини. Експресуючі вектори добре відомі фахівцям в даній області. Крім того, способи підготовки експресуючих векторів також добре відомі фахівцям в даній області. Експресуючі вектори, які експресують будь-які білки MLK, можуть бути одержані способом, подібним тим, які описані в прикладах. Більша кількість живих клітин в популяції понадекспресуючих клітин, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю живих клітин в популяції понадекспресуючих клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, є показником сполуки, що тестується, яка підвищує виживаність клітин. Навпаки, менша кількість живих клітин в популяції понадекспресуючих клітин, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю живих клітин в популяції понадекспресуючих клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, є показником сполуки, що тестується, яка стимулює загибель клітин.

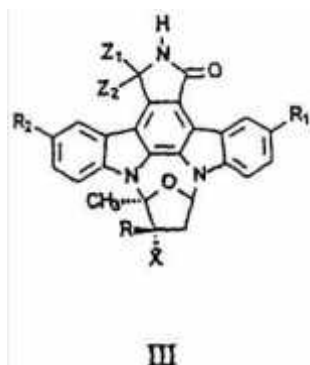
У іншому варіанті винаходу підвищення виживаності клітин визначається шляхом спостереження або вимірювання зменшення апоптозів. З апоптозом асоційоване стиснення цитоплазми і конденсація ядер. Таким чином, фахівець в даній області може виміряти зменшення апоптозу шляхом вимірювання або спостереження за зменшенням скорочення цитоплазми і/або конденсації ядер. Крім того, фахівець в даній області може виміряти апоптоз із застосуванням традиційних способів фарбування.

У іншому варіанті винаходу для ідентифікації сполук, які стимулюють загибель клітин, можуть бути використані нормальні нервові клітини дикого типу. Нормальні нервові клітини будуть виживати, якщо вони не будуть індуковані до смерті сполукою, що тестується. Менша кількість живих клітин в популяції нормальних клітин, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю живих клітин в популяції нормальних клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, є показником сполуки, що тестується,

яка стимулює загибель клітин. Навпаки, більша або рівна кількість живих клітин в популяції нормальних клітин, оброблених сполукою, що тестується, в порівнянні з кількістю живих клітин в популяції нормальних клітин, які не були оброблені сполукою, що тестується, не є показником сполуки, що тестується, яка стимулює загибель клітин.

Частково даний винахід направлений також на способи модулювання активності білка MLK, які включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу G (позначена тут як формула I), заявлену в [патенті США No. 5705511], правонаступником якого є даний винахід і який включений тут у вигляді посилання в повному об'ємі.

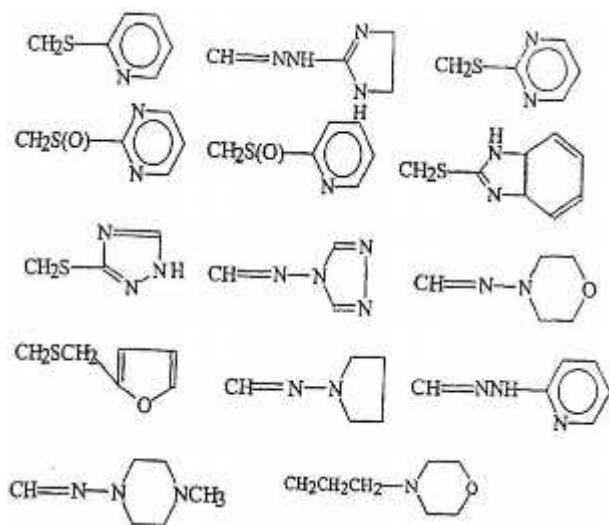
Частково даний винахід направлений також на способи модулювання активності білка MLK, що включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу III, приведену нижче:



де:

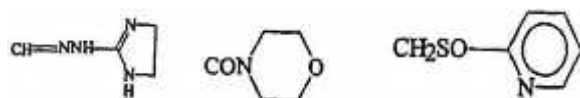
Z<sub>1</sub> являє собою H, і Z<sub>2</sub> являє собою H, або Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> разом утворюють =O;

R<sub>1</sub> вибирається з групи, що складається з H, Cl, CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, Br, CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, NHCONHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, NHCONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>SC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OCONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OH, O-n-пропілу, CH=NNH-C(=NH)NH<sub>2</sub>, CH=N-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>S[3-(1,2,4-триазину)], CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>;



R<sub>2</sub> вибирається з групи, що складається з H, Br, Cl, I, CH<sub>2</sub>S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>S[3-(1,2,4-триазину)], CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub> і CH<sub>2</sub>OH;

X вибирається з групи, що складається з H, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>NH-серинн, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CONHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, CONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>Ш-гліцину, CON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NHCO<sub>2</sub>-, CONH<sub>2</sub>, CONHC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, CH<sub>2</sub>NH-серину, CH<sub>2</sub>SOCH<sub>3</sub>, CH=NOH, CH<sub>2</sub>NH-проліну, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(2-піридилу), CH=NNHC(=NH)NH<sub>2</sub>, CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH, CH=NNHCONH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O-, CH<sub>2</sub>SC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>SOC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CO<sub>2</sub>H-гексилу, CONHCH<sub>3</sub> і CO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>; або однієї з наступних формул

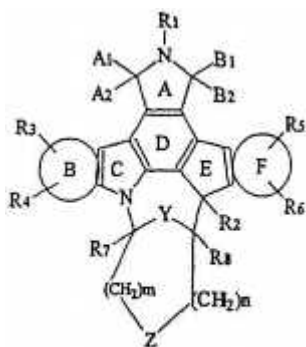


i

R вибирається з групи, що складається з OH і OCH<sub>3</sub>.

В переважних варіантах винаходу Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X являє собою CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> означає NHCONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> означає CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (2-піридил), і R означає OH. У інших переважних варіантах винаходу Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X являє собою CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> являють собою CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> і R означає OH; або Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X являє собою CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> являють собою CH<sub>3</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, і R означає OH; або Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> є H, X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, і R означає OH; або Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> є H, X означає CO<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>, і R означає OH; або Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> і R<sub>1</sub> є H, R<sub>2</sub> являє

Напрямом частини даного винаходу також є способи модулювання активності білка MLK, що включають в себе контактування білка, або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу II, приведену нижче:



## II

2) кожна з алкільної, алкенільної або алкінільної групи заміщена групами в кількості від 1 до 3, вибраними з групи, що складається з арилу, що має від 6 до 10 вуглеців, гетероарилу, арилалкоксигрупи, гетероциклоалкокси групи, гідроксиралкоксигрупи, алкілокси-алкоксигрупи, гідроксиралкіліїогрупи, алкокси-алкіліїогрупи, F, Cl, Br, I, -CN, -NO<sub>2</sub>, -OH, -OR<sup>9</sup>, -X<sup>2</sup> (CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>OC(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CO<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>S(O)<sub>y</sub>R<sup>9</sup>, X<sup>2</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sup>10</sup>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -OC(=O)R<sup>9</sup>, -OCONHR<sup>2</sup>, -O-тетрагідропіранілу, -NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -NR<sup>10</sup>C(=O)R<sup>9</sup>, -NR<sup>10</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, NR<sup>10</sup>C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -NHC(=NH)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, NR<sup>10</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>9</sup>, -S(O)<sub>y</sub>R<sup>9</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>, C(=O)NR<sup>11</sup>R<sup>12</sup>, -C(=O)R<sup>2</sup>, -CH<sub>2</sub>OR<sup>10</sup>, -CH=NNR<sup>2</sup>R<sup>2A</sup>, -CH=NOR<sup>2</sup>, -CH=NR<sup>9</sup>, -CH=NNHCH(N=NH)NH<sub>2</sub>, -S(=O)<sub>2</sub>NR<sup>2</sup>R<sup>2A</sup>, -P(=O)(OR<sup>10</sup>)<sub>2</sub>, -OR<sup>14</sup> і моносахариду, що має від 5 до 7 вуглеців, де кожна гідроксильна група моносахариду незалежно або незаміщена, або заміщена H, алкілом, що має від 1 до 4 вуглеців, алкілкарбонілоксигрупою, що має від 2 до 5 вуглеців, або алкоксигрупою, що має від 1 до 4 вуглеців;

$X^2$  означає O, S або  $NR^{10}$ ,  
кожний з радикалів  $R^7$  і  $R^8$  незалежно вибирається з групи, що складається з H, алкілу, що має від 1 до 4 вуглеців, алкоксигрупи, що має від 1 до 4 вуглеців, заміщеного або незаміщеного арилалкілу, що має від 6 до 10 вуглеців, заміщеного або незаміщеного гетероарилалкілу,  $-(CH_2)_pOR^{10}$ ,  $-(CH_2)_pOR^{10}NR^{11}R^{12}$  і  $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$ , або  $R^7$  і  $R^8$  разом утворюють зв'язану групу формули  $-CH_2-X^3-CH_2-$ , де X являє собою X або зв'язок;

кожний з індексів m і n незалежно рівні 0, 1 або 2;

Y вибирається з групи, що складається з  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-N(R^{10})-$ ,  $-N^+(O^-)(R^{10})-$ ,  $-N(OR^{10})-$  і  $-CH_2-$ ;

Z вибирається з групи, що складається із зв'язку,  $-O-$ ,  $-CH=CH-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-CH(OR^{10})-$ ,  $-N(R^{10})-$ ,  $-N(OR^{10})-$ ,  $CH(NR^{11}R^{12})-$ ,  $-C(=O)N(R^{17})-$ ,  $-N(R^{17})C(=O)-$ ,  $-N(S(O)_yR^9)-$ ,  $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$ ,  $-N(C(=O)R^{17})-$ ,  $-C(R^{15}R^{16})-$ ,  $-N^+(O^-)(R^{10})-$ ,  $-CH(OH)-CH(OH)-$ , і  $-CH(O(C=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$ , де  $R^{9A}$  являє собою те ж, що і  $R^9$ ;

$R^{15}$  і  $R^{16}$  незалежно вибираються з групи, що складається з H,  $-OH$ ,  $-C(=O)R^{10}$ ,  $-O(C=O)R^9$ , гідроксиалкілу і  $-CO_2R^{10}$ ;

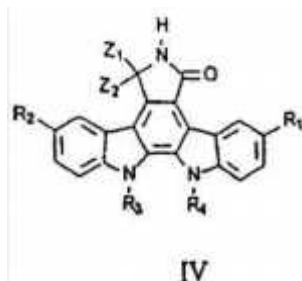
$R^{17}$  вибирається з групи, що складається з H, алкілу, арилу і гетероарилу;

$A_1$  і  $A_2$  вибираються з групи, що складається з H, H; H,  $OR^2$ ; H,  $-SR^2$ ; H,  $-N(R^2)_2$ ; і групи, в якій  $A_1$  і  $A_2$  разом утворюють фрагмент, вибраний з групи, що складається з  $=O$ ,  $=S$  і  $=NR^2$ ;

$B_1$  і  $B_2$  вибираються з групи, що складається з H, H; H,  $-OR^2$ ; H,  $-SR^2$ ; H,  $-N(R^2)_2$ ; і групи, в якій  $B_1$  і  $B_2$  разом утворюють фрагмент, вибраний з групи, що складається з  $=O$ ,  $=S$  і  $=NR^2$ ;

при умові, що, щонайменше, одна з пар  $A_1$  і  $A_2$ , або  $B_1$  і  $B_2$ , утворює  $=O$ .

Частково даний винахід направлений також на способи модулювання активності білка MLK, що включають в себе контактування білка або клітини, що містить білок, із сполукою, що має формулу IV, приведену нижче:



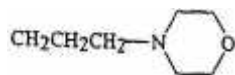
де

$Z_1$  означає H і  $Z_2$  означає H, або  $Z_1$  і  $Z_2$  разом утворюють  $=O$ ;

$R_1$  означає H або Br;

$R_2$  означає H;

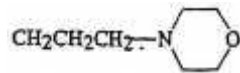
$R_3$  означає H,  $CH_2CH=CH_2$ ,  $CH_2CH_2CH_2OH$ , або



і

$R_4$  означає H,  $CH_2CH=CH_2$  або  $CH_2CH_2CH_2OH$ .

У переважних варіантах винаходу  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $Z_1$  і  $Z_2$  є H, і  $R_3$  означає  $CH_2CH=CH_2$ . У інших переважних варіантах винаходу  $R_1$  є Br і  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $Z_1$  і  $Z_2$  є H; або  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $Z_1$  і  $Z_2$  є H і  $R_3$  і  $R_4$  означають  $CH_2CH=CH_2$ ; або  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ , є H і  $R_4$  означає  $CH_2CH=CH_2$ ; або  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $Z_1$  і  $Z_2$  є H, і  $R_3$  і  $R_4$  означають  $CH_2CH_2CH_2OH$ ; або  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$ ,  $Z_1$  і  $Z_2$  є H і  $R_3$  означає



Даний винахід також надає способи ідентифікації сполук, які можуть бути придатні при лікуванні нейродегенеративних захворювань, що включають в себе контактування клітини або клітинного екстракту, що містить кіназний білок множинних ліній, із сполукою, і визначення того, чи знижує сполука активність кіназного білка множинних ліній. Клітини і їх екстракти включають в себе такі, які описані вище. Сполуки, які виявляються даними способами (тобто, ті сполуки, які інгібують, або знижують активність кіназного білка множинних ліній) можуть бути придатні для лікування нейродегенеративних захворювань. Білок переважно вибирається з групи, що складається з кінази множинних ліній 1, кінази множинних ліній 2, кінази множинних ліній 3, кінази, що несе лейциновий "зіппер", кінази, що несе подвійний лейциновий "зіппер", і кінази множинних ліній 6. Клітину піддають контакту in vitro або in vivo. Переважно активність білка визначають шляхом вимірювання активності або рівня фосфорилювання субстрату вказаного білка. Переважно субстрат вибирається з групи, що складається з JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 і гомолога AEX-3 ссавців, а також загальних Ser/Thr субстратів, таких, наприклад, як основний білок мієліну (MBP). Активність білка також може бути визначена шляхом вимірювання активності субстрату білка, кількості субстрату білка, або mPHK, що кодує субстрат білка. Активність білка також може бути визначена шляхом аналізу кінази in vitro або аналізу скріплення. Клітинами переважно є первинні ембріональні клітини мотонейронів, клітини, які понадекспресують кіназний білок множинних ліній, або нервова клітина, але може бути будь-яка

клітина або клітинний екстракт. Переважно ідентифікуються сполуки, які безпосередньо зв'язують кіназний білок множинних ліній, як описано вище.

Даний винахід також надає способи ідентифікації сполук, які можуть бути придатні при лікуванні запалення, що включають в себе контактування клітини або клітинного екстракту, що містить кіназний білок множинних ліній, із сполукою, і визначення того, чи знижує сполука активність кіназного білка множинних ліній. Клітини і їх екстракти включають в себе такі, які описані вище. Сполуки, які виявляються даними способами (тобто ті сполуки, які інгібують, або знижують активність кіназного білка множинних ліній) можуть бути придатні для лікування запалення. Білок переважно вибирається з групи, що складається з кінази множинних ліній 1, кінази множинних ліній 2, кінази множинних ліній 3, кінази, що несе лейциновий "зіппер", кінази, що несе подвійний лейциновий "зіппер" і кінази множинних ліній 6. Клітину піддають контакту in vitro або in vivo. Переважно активність білка визначають шляхом вимірювання активності або рівня фосфорилювання субстрату вказаного білка. Переважно субстрат вибирається з групи, що складається з JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$ , p38 $\delta$ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 і гомолога AEX-3 ссавців, а також загальних Ser/Thr субстратів, таких, наприклад, як основний білок мієліну (МБР). Активність білка також може бути визначена шляхом вимірювання активності субстрату білка, кількості субстрату білка або мРНК, що кодує субстрат білка. Активність білка також може бути визначена шляхом аналізу кінази in vitro або аналізу скріплення.

Клітинами переважно є первинні ембріональні клітини мотонейронів, клітини, які понадекспресують кіназний білок множинних ліній, або нервова клітина, але може бути будь-яка клітина або клітинний екстракт. Клітини також включають в себе, не обмежуючись цим, клітини, що беруть участь в запаленні, такі, наприклад, як лімфоцити, макрофаги і інші лейкоцити, добре відомі фахівцям в даній області. Переважно ідентифікуються сполуки, які безпосередньо зв'язують кіназний білок множинних ліній.

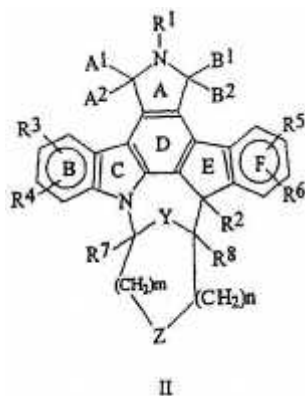
Даний винахід також надає способи лікування ссавця, що хворіє або можливо хворіє нейродегенеративним захворюванням, що включають в себе введення ссавцеві сполуки, яка інгібує або знижує активність кіназного білка множинних ліній. Сполуки, які інгібують або знижують активність кіназного білка множинних ліній, включають в себе, не обмежуючись цим, сполуки, що мають формули I, II, III і IV. Переважні сполуки включають в себе сполуки, приведені вище в описі, які стосуються способу скринінгу сполук, які модулюють активність кіназного білка множинних ліній, і або підвищують виживаність клітин, або стимулюють загибель клітин. Переважним ссавцем є людина. Можна передбачати, що у людини є нейродегенеративне захворювання, якщо у людини є симптоми конкретного нейродегенеративного захворювання, вона відноситься до групи підвищеного ризику, або є нейродегенеративне захворювання в історії сім'ї.

Даний винахід також надає способи лікування ссавця при запаленні, що включають в себе введення вказаному ссавцеві сполуки, яка інгібує або знижує активність кіназного білка множинних ліній. Сполука, яка інгібує або знижує активність кіназного білка множинних ліній, включає в себе, не обмежуючись цим, сполуки, що мають формули I, II, III і IV. Переважні сполуки включають в себе сполуки, приведені вище в описі, в зв'язку зі способом скринінгу сполук, які модулюють активність кіназного білка множинних ліній, і або підвищують виживаність клітин, або стимулюють загибель клітин. Переважним ссавцем є людина.

Контактування із сполуками, що мають формули I-IV, може відбуватися в буферах, або середовищах, які добре відомі фахівцям в даній області. У альтернативному випадку контактування може здійснюватися шляхом введення фармакологічної композиції, що містить сполуки, які тестуються і фармацевтично прийнятну сіль, носій або розріджувач, відповідній тварині або ссавцеві, такій, наприклад, як миша або інша придатна тварина, відома фахівцям в даній області. Крім того, можуть бути використані варіюючі кількості клітин і концентрації сполук. Клітинами, які зазнають контакту із сполуками, що тестуються, можуть бути будь-які клітини ссавців. Переважно клітиною є нервова клітина. Переважно клітина залучена до такого нейродегенеративного захворювання, як, наприклад, хвороба Альцгеймера, захворювання мотонейронів, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, цереброваскулярне захворювання, ішемічні стани, деменція при СНІДі, епілепсія, хвороба Гентінгтона і пошкодження при струсі або проникаюче поранення головного або спинного мозку. Сполуки, що мають формулу I, і способи їх одержання описані в [патенті США 5705511], який включений тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Сполуки, що мають формулу III, і способи їх одержання описані в [патентах США 57418098, 5621100, 5621101, 5461146 і 5756 494 і WO 97/46567], кожний з яких включений тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Сполуки, що мають формулу IV, і способи їх одержання описані в [патентах США 57418098, 5621100, 5621101, 5461146 і 5 756 494 і WO 97/46567], кожний з яких включений тут у вигляді посилання в повному об'ємі.

Сполуки, що мають формулу II, включають в себе діастереомери і енантіомери у атомів вуглецю, з якими зв'язані заступники R<sup>2</sup>, R<sup>7</sup> і R<sup>8</sup>.

Переважними іденіопіролокарбазолами з місточковим зв'язком є сполуки, представлені формулою II:



У деяких переважних варіантах сполук формули  $II\ R^1 \in H$ . В додаткових переважних варіантах  $R \in H$ , гідроксильом або заміщеним або незаміщеним алкілом.

У інших переважних варіантах  $R^3, R^4, R^5$  і  $R^6$  незалежно являють собою  $H$ , заміщений або незаміщений алкіл, галоген, заміщену або незаміщену алкоксигрупу, заміщену або незаміщену аміногрупу або заміщений або незаміщений арил. У наступних переважних варіантах  $R^7$  і  $R^8$  незалежно є  $H$  або заміщеним або незаміщеним алкілом.

У деяких переважних варіантах  $Y$  означає  $O$ . В додаткових переважних варіантах  $Z$  означає зв'язок,  $O$ ,  $S$  або заміщений або незаміщений  $N$ . В інших додаткових переважних варіантах  $m$  і  $n$  незалежно рівні 1 або 2. В деяких особливо переважних варіантах  $Y$  означає  $O$ ,  $Z$  означає зв'язок або  $O$ , і  $m$  і  $n$  незалежно рівні 1 або 2.

У наступних переважних варіантах  $A^1A^2$  і  $B^1B^2 \in =O$  або  $H, N$ .

У деяких особливо переважних варіантах кожний з  $R^1, R^4, R^6$  і  $R^7 \in H$ ,  $Y$  означає  $=O$ .  $n$  дорівнює 1,  $A^1A^2$  і  $B^1B^2 \in =O$  або  $H, N$ ,  $R^2 \in H$ ,  $OH$  або нижчим алкілом,  $R^3 \in H$  або заміщеним алкілом, кожний з  $R^5$  і  $R^8 \in H$  або алкоксигрупою, причому метоксигрупа є переважною,  $Z$  означає зв'язок або  $O$ , і  $m$  дорівнює 1 або 2.

Деякими особливо переважними варіантами сполук формули  $II$  є сполука II-1, II-2, II-3, II-4a, II-4b, II-5, II-6, II-7a, II-7b, II-8, II-9, II-10, II-11 і II-12, представлені нижче в таблиці 1.

Сполуки, представлені формулою  $II$  надалі називаються сполуками(II).

Використаний термін «карбоциклічна» стосується циклічних груп, в яких циклічна частина складається тільки з атомів вуглецю. Терміни «гетероцикло» і «гетероциклічна» стосуються циклічних груп, в яких циклічна частина включає в себе, щонайменше, один гетероатом, такий як  $O, N$  або  $S$ .

Використаний термін «алкіл» означає алкільну групу з нерозгалуженим ланцюгом, циклічну алкільну групу або алкільну групу з розгалуженим ланцюгом, що має від 1 до 8 атомів вуглецю, таку як метил, етил, пропіл, ізопропіл, бутіл, ізобутіл, втор-бутіл, трет-бутіл, пентил, ізоаміл, неопентил, 1-етилпропіл, гексил, октил, циклопропіл і циклопентил. Алкільний фрагмент алкіл-утримуючих груп, таких як алкоксигрупи, алкоксикарбонільні групи і алкіламінокарбонільні групи, має таке ж значення, як і алкіл, визначений вище. Нижчими алкільними групами, які переважні, є алкільні групи, яким дане визначення вище і які містять від 1 до 4 вуглеців. Термін «алкеніл» означає групи, що включають в себе нерозгалужені або розгалужені вуглеводневі ланцюги, що мають, щонайменше, один подвійний зв'язок вуглець-вуглець. Приклади алкенільних груп включають в себе етенільну і пропенільну групи. Використаний термін «алкініл» означає групи, що включають в себе нерозгалужені або розгалужені вуглеводневі ланцюги, що мають, щонайменше, один потрійний зв'язок вуглець-вуглець. Приклади алкінільних груп включають в себе етинільну і пропінільну групи.

Ацильний фрагмент ацил-утримуючих груп, таких як ацилоксигрупи означає групи, що включають в себе нерозгалужену або розгалужену алканільну групу, що має від 1 до 6 атомів вуглецю, такі як форміл, ацетил, пропанойл, бутирил, валерил, півалоїл або гексанойл.

Використаний термін «арил» означає групу, що має від 6 до 12 атомів вуглецю, таку як феніл, біфеніл і нафтил. Переважні арильні групи включають в себе незаміщені або заміщені фенільні і нафтильні групи. Використаний термін «гетероарил» означає арильну групу, в якій один або більша кількість атомів вуглецю кільця заміщені гетероатомом (тобто не вуглецевим атомом), таким як  $O, N$  або  $S$ . Переважні гетероарильні групи включають в себе групи піридилу, піримідилу, піролілу, фурилу, тієнілу, імідазолілу, триазолілу, тетразолілу, хінолілу, ізохінолілу, бензоімідазолілу, тіазолілу, піразолілу і бензотіазолілу.

Термін «аралкіл» (або «арилалкіл») призначений для позначення групи, що має від 7 до 15 вуглеців, що складається з алкільної групи, несучої арильну групу. Приклади аралкільних груп включають в себе бензильну, фенетильну, бензгідрильну і нафтилметильну групи.

Алкільні групи і алкільні фрагменти, що знаходяться в заміняючих групах, таких як аралкіл, алкоксигрупа, арилалкоксигрупа, гідроксиалкоксигрупа, алкокси-алкоксигрупа, гідрокси-алкілтіогрупа, алкокси-алкілтіогрупа, алкілкарбонілоксигрупа, гідроксиалкіл і ацилоксигрупа можуть бути заміщеними або незаміщеними. Заміщена алкільна група має від 1 до 3 незалежно вибраних заступників, переважно гідрокси-групу, нижчу алкоксигрупу, нижчу алкокси-алкоксигрупу, заміщену або незаміщену арилалкокси-нижчу алкоксигрупу, заміщену або незаміщену гетероарилалкокси-нижчу алкоксигрупу, заміщену або незаміщену арилалкоксигрупу, заміщену або незаміщену гетероциклоалкоксигрупу, галоген, карбоксил, нижчий алкоксикарбоніл, нітрогрупу, аміногрупу, моно- або ди-нижчу алкіламіногрупу, діоксолан, діоксан, дитіолан, дитіон, фуран, лактон або лактам.

Кожна із заміщених арильних, заміщених гетероарильних і заміщених аралкільних груп має від 1 до 3 незалежно вибраних заступників, якими переважно є нижчий алкіл, гідроксигрупа, нижча алкоксигрупа, карбоксигрупа, нижчий алкоксикарбоніл, нітрогрупа, аміногрупа, моно-або ди-нижча алкіламіногрупа і галоген.

Гетероциклічні групи, утворені з участю атома азоту, включають в себе піролідиніл, піперидиніл, піперидиногрупу, морфолініл, морфоліногрупу, тіоморфоліногрупу, N-метилпіперазиніл, індоліл, ізоіндоліл, імідазол, імідазолін, оксазолін, оксазол, триазол, тіазолін, тіазол, піразол, піразолон і триазол. Гетероциклічні групи, утворені з участю атома кисню, включають в себе фуранову, тетрагідрофуранову, піранову і тетрагідропіранову групи.

«Гідроксиалкільними» групами є алкільні групи, які мають додатково приєднану гідроксильну групу. Галогени включають в себе фтор, хлор, бром і йод.

Використаний термін «гетероарилалкіл» означає арилалкільну групу, яка містить гетероатом. Термін «окси» означає наявність атома кисню. Таким чином, «алкокси» групами є алкільні групи, які приєднуються за допомогою атома кисню, і «карбонілокси» групами є карбонільні групи, які приєднуються за допомогою атома кисню.

Термін «гетероциклоалкокси» означає алкоксигрупу, яка має гетероциклічну групу, приєднану до її алкільного фрагмента, і термін «арилалкокси» означає алкоксигрупу, яка має арильну групу, приєднану до її алкільного фрагмента. Термін «алкілкарбонілокси» означає групу формули  $-O-C(-O)-$  алкіл.

Використаний термін «алкілокси-алкокси» означає алкоксигрупу, яка містить алкілокси заступник,

приєднаний до її алкільного фрагмента. Термін «алкокси-алкілтіо» означає алкілтіогрупу (тобто групу формули -S-алкіл), яка містить алкокси заступник, приєднаний до її шпального фрагмента. Термін «гідрокси-алкілтіо» означає алкілтіогрупу (тобто групу формули -S-алкіл), яка містить гідроксильний заступник, приєднаний до її алкільного фрагмента.

Використаний термін «моносахарид» має своє звичайне значення, як простий цукор.

Використаний термін «амінокислота» означає молекулу, що містить як аміногрупу, так і карбоксильну групу. Варіанти амінокислот включають в себе  $\alpha$ -амінокислоти тобто карбонові кислоти загальної формули  $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-$  (бічний ланцюг).

Бічні ланцюги амінокислот включають в себе фрагменти природного походження і неприродного походження. Бічні амінокислотні ланцюги неприродного походження (тобто невласиві) є фрагментами, які використовуються замість бічних ланцюгів амінокислот природного походження, наприклад, в аналогах амінокислот. Дивись, наприклад, [публікацію Lehninger, Biochemistry, Second Edition, Worth Publishers, Inc, 1975, pages 73-75], включену тут у вигляді посилання.

Переважні  $\alpha$ -амінокислоти включають в себе гліцин, аланін, пролін, глутамінову кислоту і лізин, що мають D конфігурацію, L-конфігурацію або представлені у вигляді рацемату.

Бічні ланцюги наступних типових  $\alpha$ -амінокислот показані нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

$\text{CH}_3-$	$\text{HS}-\text{CH}_2-$
$\text{HO}-\text{CH}_2-$	$\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3-$
$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-$
5. $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-$
	$\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$
	$\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{NH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-$
	$(\text{CH}_2)_7-\text{CH}-\text{CH}_2-$
	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-$
	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

У деяких переважних варіантах заміняючі групи для сполук формули II включають в себе залишок амінокислоти після видалення з неї гідроксильного фрагмента карбоксильної групи тобто групи формули - $\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NH}_2)-$  (бічний ланцюг).

Функціональні групи, присутні в сполуках формули II, можуть містити захисні групи. Наприклад, бічні ланцюги амінокислотних заступників сполук формули II можуть бути заміщені такими захисними групами, як бензилоксикарбонільна або трет-бутоксикарбонільна групи. Захисні групи по суті відомі як функціональні хімічні групи, які можна виборче приєднувати і від'єднувати від функціональних груп, таких як гідроксильні групи і карбоксильні групи. Ці групи вводяться в хімічну сполуку, щоб зробити такі функціональні групи інертними до умов хімічних реакцій, яких зазнає сполука. Однією з таких захисних груп є бензилоксикарбонільна (Cbz; Z) група. Інші переважні захисні групи згідно з винаходом можуть бути знайдені в [Greene, T.W. and Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" 2d. Ed., Wiley&Sons, 1991].

Сполуки інденопіролокарбазолів з містечковим зв'язком мають очевидну важливу функціональну фармакологічну активність, яка знаходить застосування в різних сферах, включаючи як дослідницьку, так і терапевтичну області. Ці похідні придатні як терапевтичні засоби. Активність сполук виявляє позитивні впливи на функціонування і/або виживаність клітин, що відповідають на трофічні фактори. Вплив на функціонування і/або виживаність клітин, що відповідають на трофічні фактори, наприклад, клітин нейронної лінії, показаний за допомогою кожного з наступних досліджень: (1) аналізу холинацетилтрансферази (ХАТНН) в нейронах спинного мозку, що культивуються; або (2) аналізу ХАТНН активності базальних нейронів переднього мозку, що культивуються.

Використаний термін «вплив», що застосовується для випадку модифікації процесів, що позначаються термінами «функціонування» і «виживаність», означає позитивну або негативну зміну. Вплив, який є позитивним, може називатися «підвищенням» або «посиленням», і вплив, який є негативним, може називатися «інгібуванням» або «пригніченням».

Використані терміни «підвищувати» або «підвищення», модифікації процесів, що застосовуються для випадку, що позначаються термінами «функціонування» і «виживаність», означають, що присутність сполуки інденопіролокарбазолу з містечковим зв'язком надає позитивний вплив на функціонування і/або виживаність клітини, що відповідає на трофічні фактори, в порівнянні з клітиною при відсутності сполуки.

Наприклад, але не з метою обмеження, що стосується виживаності, наприклад, холінергічного нейрона, то сполука буде сприяти підвищенню виживаності популяції холінергічних нейронів при ризику загибелі (внаслідок, наприклад, травми, хворобливого стану, дегенеративного стану або природного прогресування) в порівнянні з популяцією холінергічних нейронів, не експонованих з такою сполукою, якщо оброблена популяція буде мати порівняно більший період функціональної активності, чим необроблена популяція.

Використані терміни «інгібувати» і «інгібування» означають, що конкретна відповідь наміченого для дослідження матеріалу (наприклад, ензиматична активність) порівняно знижена в присутності інденопіролокарбазолової сполуки з місточковим зв'язком.

Використаний термін "trk" стосується сімейства нейротрофічних рецепторів з високою спорідненістю, нині включає в себе trkA, trkB і trkC, і інші асоційовані з мембраною білки, з якими може зв'язуватися нейротрофін.

Використаний термін інгібування VEGFR передбачає застосування, наприклад, при захворюваннях, в яких важливу роль відіграє ангіогенез, таких як тверді ракові пухлини, ендометріоз, діабетична ретинопатія, псоріаз, гемангіобластома, а також інші очні хвороби і ракові захворювання.

Інгібування trk передбачає, наприклад, застосування при захворюваннях простати, таких як рак простати і доброякісна гіперплазія простати, і для лікування болю при запаленні.

Інгібування рецептора фактора росту, одержаного з тромбоцитів (PDGFR), передбачає застосування, наприклад, при різних формах неоплазії, ревматоїдному артриті, фіброзі легень, мієлофіброзі, аномальному загоєнні ран, захворювань, що закінчуються серцево-судинними станами, такими як атеросклероз, рестеноз, рестеноз після пластичної операції на судинах і т.д.

Використані терміни «рак» і «канцерогенний» стосується будь-якої злоякісної проліферації клітин ссавців. Приклади включають в себе рак простати, доброякісну гіперплазію простати, рак яєчника, молочної залози, мозку, легень, підшлункової залози, товстої і прямої кишки, шлунка, черевної порожнини, твердої пухлини, рак голови і шиї, нейробластома, ниркоподібно-клітинний рак, лімфому, лейкоз, інші розпізнавані злоякісні процеси в гематопоетичних системах і інші розпізнавані ракові захворювання.

Використані терміни «нейрон», «клітина нейронної лінії» і «нейронна клітина» включають в себе, не обмежуючись цим, гетерогенну популяцію типів нейронів, що має єдиний або безліч медіаторів і/або єдину або безліч функцій; переважно це холінергічні і чутливі нейрони. Використана фраза «холінергічний нейрон» означає нейрони центральної нервової системи (ЦНС) і периферичної нервової системи (ПНС), нейромедіатором яких є ацетилхолін; типовими є базальні нейрони середнього мозку, нейрони смугастого тіла і спинного мозку. Використана фраза «чутливий нейрон» включає в себе нейрони, реагуючі на сигнали навколишнього середовища (наприклад, температуру, рух), що поступають, наприклад, від шкіри, м'яза і суглобів; типовим є нейрон ганглія дорсального корінця.

«Клітина, що відповідає на трофічні фактори» визначається тут як клітина, яка містить рецептор, з яким може специфічно зв'язуватися трофічний фактор; приклади включають в себе нейрони (наприклад, холінергічні і чутливі нейрони) і не нейронні клітини (наприклад, моноцити і неопластичні клітини).

Описані тут сполуки інденопіролокарбазолів з місточковим зв'язком знаходять застосування як в дослідницькій області, так і в області терапії, наприклад, для інгібування активності ферментів. Наприклад, в області наукових досліджень сполуки можуть застосовуватися для розробки методів аналізу і моделей для подальшого поглиблення уявлення про ті ролі, які відіграє інгібування серин/треонінової або тирозинової протеїнкінази (наприклад, PKC, trk тирозинкінази) в механістичних аспектах асоційованих розладів і захворювань. У області терапії сполуки, які інгібують ці ензиматичні активності, можуть застосовуватися для того, щоб інгібувати небезпечні наслідки дії цих ферментів, що стосуються таких захворювань як рак.

Як приклади нижче показано, що інгібування ензиматичної активності з використанням сполук інденопіролокарбазолів з місточковим зв'язком можна визначати, наприклад, за допомогою наступних аналізів:

1. Аналіз інгібування активності тирозинкінази trkA;
2. Інгібування NGF-стимульованого фосфорилювання trk в препараті цілих клітин;
3. Аналіз інгібування кінази рецептора фактора ендотеліального росту судин (VEGFR);
4. Аналіз інгібування активності PKC;
5. Аналіз інгібування PDGFR.

Заявлені сполуки інденопіролокарбазолів з місточковим зв'язком можуть бути використані для посилення функціонування і/або виживаності клітин нейронної лінії ссавців, наприклад, людини. У цьому контексті сполуки можуть бути використані окремо або з іншими конденсованими піролокарбазолами і/або індолокарбазолами, або в комбінації з іншими молекулами цілющої дії, які також виявляють здатність впливати на функціонування і/або виживаність вказаної клітини.

Численні неврологічні розлади характеризуються наявністю нейронних клітин, які являють собою вмираючі, пошкоджені клітини, клітини з функціональними порушеннями, що зазнають дегенерації аксонів, з ризиком загибелі, і т.д. Ці розлади включають в себе, не обмежуючись цим хворобу Альцгеймера; порушення мотонейронів (наприклад, бічний аміотрофічний склероз); хворобу Паркінсона, цереброваскулярні порушення (наприклад, інсульт, ішемія); хворобу Гентінгтона; деменцію при СНІДі; епілепсію; множинний склероз; периферичні невропатії (наприклад, що зачіпають DRG нейрони при периферичній невропатії, асоційованій з хіміотерапією), включаючи діабетичну невропатію; розлади, індуковані стимулюючими амінокислотами; і розлади, асоційовані з пошкодженнями при струсі або проникаючому пораненні головного або спинного мозку.

XATNH каталізує синтез нейромедіатора ацетилхоліну, і він вважається ензиматичним маркером функціонального холінергічного нейрона. Функціональний нейрон також здатний до виживання. Виживання нейронів аналізується шляхом кількісної оцінки специфічного поглинання і ферментативного перетворення барвника (наприклад, кальцеїну AM) живими нейронами.

Описані тут сполуки, включаючи сполуки, ідентифіковані описаними тут способами, завдяки своїм різноманітним застосуванням знаходять використання в різних сферах. Сполуки можуть бути використані для розробки in vitro моделей виживаності, функціонування, ідентифікації нейронних клітин, або для

скринінгу інших синтетичних сполук, які мають активність, схожу з активністю описаних тут сполук, або сполук, що ідентифікуються описаними тут способами. Описані тут сполуки, а також сполуки, ідентифіковані за допомогою описаних тут способів, можуть бути використані в області наукових досліджень, щоб вивчити, охарактеризувати і визначити молекулярні мішені, зв'язані з функціональними відповідями. Наприклад, шляхом радіоактивного мічення сполуки іденопіролокарбазолу з місточковим зв'язком, або сполуки, ідентифікованої описаними тут способами, зв'язаної зі специфічною клітинною функцією (наприклад, мітогенезом), може бути ідентифікована, виділена і очищена для характеристики мішені організму, з якою зв'язується похідне.

Сполуки, які тут описані, а також сполуки, ідентифіковані із застосуванням описаних тут способів, між іншим, придатні не тільки для посилення індукованої трофічними факторами активності клітин, що відповідає на трофічні фактори, наприклад, холінергічних нейронів, але також можуть функціонувати як засоби, що підвищують виживаність нейронних клітин інших типів, наприклад, допамінергічних або глутаматергічних. Фактор росту може регулювати виживаність нейронів за допомогою каскадів передавання сигналу вниз за течією від малих ГТФ-зв'язуючих білків, які включають в себе, не обмежуючись цим, *ras*, *gac* і *cdc42* (Denhardt, Biochem. J., 1996, 318, 729]. Зокрема, активація *ras* приводить до фосфорилування і активації, що активується позаклітинним рецептором кінази (ERK), яка пов'язана з процесами біологічного росту і диференціювання. Стимулювання *gac/cdc42* приводить до збільшення активності JNK і p38, відповіді яких пов'язані зі стресом, апоптозом і запаленням. Хоча відповіді на фактор росту, в основному здійснюються за допомогою ERK шляху, вплив на ці останні процеси може приводити до альтернативних механізмів виживаності нейронів, які можуть імітувати властивості фактора росту в підвищенні виживаності [Xia et al., Science, 1995, 270, 1326]. Сполуки також можуть функціонувати як засоби, що підвищують виживаність нейронних і не нейронних клітин за допомогою механізмів близьких, але в той же час, що відрізняються від опосередкованої фактором росту виживаності, наприклад, шляхом інгібування шляхів JNK і p38, який може приводити до виживаності за рахунок інгібування процесів апоптотичної загибелі клітин.

Дані сполуки придатні для лікування розладів, пов'язаних із зниженою активністю ХАТНН або загибеллю, пошкодженням мотонейронів спинного мозку, а також застосовні, наприклад, при захворюваннях, пов'язаних з апоптотичною загибеллю клітин центральної і периферичної нервової системи, імунної системи і при запальних захворюваннях.

Описані тут сполуки також можуть знаходити застосування при лікуванні патологічних станів, в які залучена злаякісна проліферація клітин, численних видів раку.

Фармацевтично прийнятні солі описаних тут сполук, а також сполук, ідентифікованих представленими способами, включають в себе фармацевтично прийнятні солі приєднання кислот, солі металів, солі амонію, солі приєднання органічних амінів і солей приєднання амінокислот. Прикладами солей приєднання кислот є солі приєднання неорганічних кислот, таких як гідрохлорид, сульфат і фосфат, і солі приєднання органічних кислот, таких як ацетат, малеат, фумарат, тартрат, цитрат і лактат; прикладами солей металів є солі лужних металів, такі як літєва сіль, натрієва сіль і калієва сіль, солі лужноземельних металів, така як сіль магнію і сіль кальцію, сіль алюмінію і сіль цинку; прикладами солей амонію є сіль амонію і сіль тетраметиламонію; прикладами солей приєднання органічних амінів є солі з морфоліном і піперидином; і прикладами солей приєднання амінокислот є солі з гліцином, фенілаланіном, глутаміновою кислотою і лізином.

Надані тут сполуки, включаючи сполуки, що ідентифікуються даними способами, можуть бути включені до складу фармацевтичних композицій шляхом змішування з фармацевтично прийнятними нетоксичними наповнювачами і носіями. Такі композиції можуть бути приготовані для застосування при парентеральному введенні, зокрема у вигляді рідких розчинів або суспензій; або для перорального введення, зокрема, в формі таблеток або капсул; або інтраназально, зокрема, у вигляді порошків, носових крапель або аерозолів; або дермально, наприклад, за допомогою трансдермальних пластирів.

Композицію можна зручно вводити в формі стандартних доз і можна приготувати будь-якими способами, добре відомими в області фармації, наприклад, як описано в [Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980)]. Композиції для парентерального введення можуть містити як звичайні наповнювачі стерильну воду або розчин солі, поліалкіленгліколі, такі як поліетиленгліколь, олії, що мають рослинне походження, гідрогенізовані нафталіни і їм подібні. Зокрема, біосумісний, біодеградований полімер лактиду, співполімер лактиду/гліколіду або співполімери поліоксиетилену-поліоксипропілену можуть бути придатними наповнювачами для того, щоб контролювати вивільнення активних сполук. Інші потенційно придатні системи парентеральної доставки цих активних сполук включають в себе частинки співполімера етилену-вінілацетату, осмотичні насоси, що імплантуються, інфузійні системи і ліпосоми. Композиції для введення шляхом інгаляції як наповнювачі містять, наприклад, лактозу або можуть являти собою водні розчини, що містять, наприклад, ефір поліоксиетилен-9-лаурилу, глікохолат і дезоксихолат або масляні розчини для введення у вигляді носових крапель, або у вигляді гелю, що застосовується інтраназально. Композиції для парентерального введення також можуть включати в себе глікохолат для букального введення, саліцилат для ректального введення або лимонну кислоту для вагінального введення. Композиції для трансдермальних пластирів переважно являють собою ліпофільні емульсії.

Сполуки даного винаходу можуть застосовуватися як єдиний активний засіб в фармацевтичній композиції. У альтернативному випадку вони можуть використовуватися в комбінації з іншими активними інгредієнтами, наприклад, іншими факторами росту, які сприяють виживаності нейронів або регенерації аксонів при захворюваннях або розладах.

Сполуки даного винаходу або фармацевтично прийнятні солі цих сполук можуть вводитися перорально або не перорально, наприклад, у вигляді мазі або ін'єкції. Концентрації сполук даного винаходу в терапевтичній композиції можуть варіювати. Концентрація буде залежати від таких факторів, як сумарна доза лікарського засобу, що вводиться, хімічні характеристики (наприклад, гідрофобність) сполук, що застосовуються, шлях введення, вік, вага тіла і симптоми у пацієнта і т.д. Звичайно сполуки даного винаходу надаються у вигляді водного розчину в фізіологічному буфері, що містить приблизно від 0,1 до 10% сполуки, вага/об'єм, для парентерального введення. Звичайними є межі доз приблизно від 1мкг/кг до 1г/кг ваги тіла на добу; переважна межа доз приблизно від 0,01мг/кг до 100мг/кг ваги тіла на добу, і

переважно приблизно від 0,1 до 20мг/кг від одного до чотирьох разів на добу. Переважна доза лікарського засобу, що вводиться, ймовірно, залежить від різних факторів, таких як тип і міра прогресії хвороби або розладу, загальний статус здоров'я конкретного пацієнта, відносна біологічна ефективність вибраної сполуки і введення в композицію наповнювача сполуки, і шлях його введення.

Сполуки згідно з винаходом, включаючи сполуку, що тестується і сполуку, що ідентифікується способами даного винаходу, і фармацевтично прийнятні солі цих сполук можуть вводитися окремо або у вигляді різних фармацевтичних композицій, відповідно до фармакологічної активності і цілей введення. Згідно з даним винаходом, фармацевтичні композиції можуть бути одержані шляхом змішування до однорідності ефективної кількості сполуки або фармацевтично прийнятної солі цієї сполуки як активного інгредієнта з фармацевтично прийнятним носієм. Носій може мати широкий діапазон форм, відповідно до форм композиції, придатної для введення. Бажано, щоб така фармацевтична композиція готувалася у вигляді стандартних лікарських доз, придатних для перорального і не перорального введення. Форми для не перорального введення включають в себе мазь і ін'єкційний препарат.

Таблетки можуть бути приготовані звичайним способом з використанням таких наповнювачів як лактоза, глюкоза, сахароза, маніт і метилцелюлоза, дезінтегруючих засобів, таких як крохмаль, альгінат натрію, кальцій-карбоксиметилцелюлоза і кристалічна целюлоза, мастячих засобів, таких як стеарат магнію і тальк, зв'язуючих речовин, таких як желатин, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, гідроксипропілцелюлоза і метилцелюлоза, поверхнево-активних речовин, таких як складний ефір жирної кислоти і сахарози і складний ефір жирної кислоти і сорбіту, і подібних речовин. Переважно, щоб кожна таблетка містила 15-300мг активного інгредієнта.

Гранули можна приготувати традиційним способом, використовуючи наповнювачі, такі як лактоза і сахароза, дезінтегруючі засоби, такі як крохмаль, зв'язуючі речовини, такі як желатин, і їм подібні. Порошки можна приготувати традиційним способом, використовуючи наповнювачі, такі як лактоза і маніт і їм подібні. Капсули можна приготувати традиційним способом, використовуючи желатин, воду, сахарозу, аравійську камедь, сорбіт, гліцерин, кристалічну целюлозу, стеарат магнію, тальк і їм подібні. Переважно щоб кожна капсула містила 15-300мг активного інгредієнта.

Препарати у вигляді сиропів можна приготувати звичайним способом, використовуючи цукор, такий як сахароза, воду, етанол і їм подібні.

Мазь можна приготувати звичайним способом, використовуючи мазеву основу, таку як вазелін, рідкий парафін, ланолін і макроголь, емульгатори, такий як лаурилат натрію, хлорид бензалконію, складний моноефір сорбітану і жирної кислоти, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози і аравійська камедь, і їм подібні.

Ін'єкційні препарати можна приготувати традиційним способом, використовуючи розчинники, такі як вода, фізіологічний розчин солі, рослинні олії (наприклад, оливкова олія і арахісова олія), етилолеат і пропіленгліколь, солюбілізуючі засоби, такі як бензоат натрію, саліцилат натрію і уретан, засоби, що забезпечують ізотонічність, такі як хлорид натрію і глюкоза, консерванти, такі як фенол, крезол, складний ефір парагідроксibenзойної кислоти і хлоробутанол, антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота і гіросульфат натрію, і їм подібні.

Далі винахід ілюструється шляхом наступних прикладів, які призначені для роз'яснення винаходу. Ці приклади не призначені, і не розглядаються, як приклади, лімітуючі рамки заявки.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1: Загальний опис процесів синтезу і приклади

Загальний шлях синтезу, що застосовується для одержання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком даного винаходу, що мають формулу II, показаний на фігурах 1 і 2. Загальні процедури синтезу інденопіролокарбазолів (III)/(VIII) можуть бути виконані, як описано в [патенті США No. 5705511], публікація якого включена таким чином у вигляді посилання в повному об'ємі. У тому випадку, коли R<sup>1</sup> є H, азот лактаму інденопіролокарбазолів (III)/(VIII) захищають відповідною захисною групою, що приводить до (IV)/(IX). Захищені сполуки обробляють відповідною основою в безводному органічному розчиннику (ах), внаслідок чого утвориться темно-червоний розчин, який, мабуть, є карбаніоном. Результатом реакції карбаніону з біфункціональним реагентом (V) є електрофільне приєднання до C=Y зв'язку сполуки (V), що приводить до первинної проміжної сполуки (VI)/(X). Обробка проміжної сполуки(ук) (VI) (X) і/або (VII)/(XI) або сульфокислотою, або кислотою Льюїса, наприклад, ефіратом трьохфтористого бору, дає інденопіролокарбазолі з містчковим зв'язком (1)/(H).

Стратегія захисту азоту лактаму (показана на Фігурах 3 і 4) може бути здійснена за допомогою процесу, каталізованого або кислотою, або основою. Реакцію, каталізовану кислотою, можна провести з реагентом, зв'язаним з смолою, що дозволяє імібілізувати інденопіролокарбазол (III)/(VIII) на полімерному носії, такому як, заснована на полістиролі, кисла смола Рінка (XII) (Фігура 3), одержуючи при цьому (XIII). У альтернативному випадку каталізована кислотою реакція може бути проведена з розчинним реагентом, щоб одержати сполуку (XIV) (Фігура 4). В умовах основного каталізу одержують захищену сілілом сполуку (XV) (Фігура 4).

На Фігурі 5 описано декілька способів одержання проміжної сполуки (V). Процедура (а) описує перетворення різних ацеталей (XVI) в (XVII, Z=зв'язок). Наприклад, складний ефір-ацеталь/кеталь (XVI, D=COOR) повністю відновлюють до відповідного спирту і потім окисляють (наприклад, окислення за Сверном або Десс-Мартіном) до альдегід-ацеталю/кеталю (XVII, R<sup>8</sup>=H). У альтернативному випадку складний ефір-ацеталь/кеталь (XVI, D=COOR) частково відновлюють за допомогою DIBAL, щоб безпосередньо одержати альдегід (XVII, R<sup>8</sup>=H). Схожим чином відновлення нітрil-ацеталю (XVI, D=CN) за допомогою DIBAL дає альдегід (XVII, R<sup>8</sup>=H). Кето-ацеталь/кеталь одержують доданням реактивів Грін'єра до амиду Вейнреба-ацеталю/кеталю (XVI, D=CON(OMe)Me).

Проміжна сполука (XVII, Z=зв'язок) також може бути одержана за допомогою двостадійної процедури, короткий зміст якої даний в описі процедури (b). Додання металоорганічного реагенту (XIX) до ацеталю/кеталю (XVIII) дає алкен (XX), який при озонолізі з подальшою поновлюючою обробкою дає кетоацеталь/кеталь (XVII). Одержання проміжної сполуки (XVII, Z=гетероатом) за допомогою двостадійного оброблення стисло описано в процедурі (c). Поєднання ацеталю (XXII) з алкеном (XXI) з подальшим

озонолізом (з поновлюючою обробкою) одержаного в результаті алкену дає кето-ацеталь/кеталь (XVII). У альтернативному випадку проміжну сполуку (XVII, Z=тетероатом) одержують за допомогою двостадійної процедури, стисло описаної в процедурі (d). Реакція сполуки (XXIV) з ацеталем/кеталем (XVIII) дає (XXV), яку перетворюють в кето-ацеталь/кеталь (XVII) за допомогою методів, описаних в процедурі (a). Конденсація кето-ацеталю/кеталю (XVII) з гідроксилами, гідразинами, N-алкіл-N-алкоксиаминами і амінами дає проміжну сполуку (XXVI), що має електрофільну C=N функціональність.

Зв'язаний зі смолою інденопіролокарбазол (XIII) (фігура 6, спосіб A) обробляють надлишком реактиву Грін'єра як основи, результатом чого є утворення темно-червоного розчину карбаніону. Подальша реакція з (V) приводить до продуктів, одержаних завдяки електрофільному приєднанню до C=Y групи. Обробка водою і відщеплення продукту(тів) від смоли розбавленою кислотою (1% ТФУ в метиленхлориді) в результаті приводить до виділення сполуки(ук) (XXVII) і/або (XXVIII). Обробка проміжної сполуки(ук) (XXVII) і/або (XXVIII) або сульфокислотою, або кислотою Льюїса, наприклад, ефіратом трьохфтористого бору, дає інденопіролокарбазолі з містчковим зв'язком (II).

Схожа стратегія застосовується для реакції розчинної проміжної сполуки із захищеним лактамом, наприклад, (XV) (фігура 7, спосіб B). Однак в цьому випадку проміжну сполуку (XV) обробляють тритомом B в піридині як основи, замість реактиву Грін'єра. Проміжна сполука(ки) (XXIX) і/або (XXX) може бути виділена інтактно із захисною групою лактаму, яка піддається хроматографічному очищенню. Так само, як в способі A (фігура 6), обробка кислотою Льюїса (такої як ефірат трьохфтористого бору) дає інденопіролокарбазолі з містчковим зв'язком (II), де  $R^1=H$ .

Введення груп  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  і  $R^6$  може бути виконано, як описано в [патентах США No. 5705511 і 4923986], публікації яких включені у вигляді посилання в повному об'ємі. Заступник  $R^3$  інакше може бути введений після конструювання інденопіролокарбазолів з містчковим зв'язком, як показано на Фігурі 8. Положення 3 В кільця бромують NBS, одержуючи сполуку (XXXI). Потім вводять вуглецевий фрагмент, використовуючи каталізовані паладієм реакції Стілла, Сузукі, Хека, Кумали або Кастро-Стефенса, щоб одержати сполуки типу (XXXII), (XXXIII) і т.д. Крім того, сполука (XXXI) може надати доступ до сполук, в яких група бромів заміщена гетероатомом, наприклад, заснованої на аміні групою із застосуванням хімії каталізованого паладієм амінування Бухвальда.

За допомогою окислювального процесу зв'язана з киснем група може бути введена при вуглеці індену в Е кільці, як показано на Фігурі 9, в сполуці (XXXIV). Цей хімічний процес також приводить в результаті до окислення метиленової групи лактаму (А кільце) даючи, як показано, імідне похідне.

Приклад 2: Одержання проміжних сполук, зв'язаних зі смолою Рінка: (XIII-A), (XIII-B) і (XIII-C), (Фігура 3)

Приклад 2-A

У три вузькогорлих круглодонних посудини, оснащених верхньою механічною мішалкою і пасткою Діна Старка послідовно завантажували кислоту смоли Рінка XII (10,00г, 0,64ммоль/г), 1-метил-2-піролідинон (80мл), бензол (350мл), VIII-A ( $A^1, A^2=H_2$ ,  $B^1, B^2=O$ ,  $R^3=R^4=R^5=R^6=H$ ) (3,00г) і пара-толуолсульфокислоту (1,00г). Реакційну суміш нагрівали із зворотним холодильником протягом 20 годин, і потім фільтрували. Полімер промивали ТГФ (5×175мл) і фільтрат відставляли. Потім полімер послідовно промивали ДМСО (4×100мл), 2% водним  $NaHCO_3$  (4×100мл), водою (4×100мл), ДМСО (2×200мл), ТГФ (4×100мл) і етилацетатом (4×100мл). Смоли сушили у вакуумі (24 години), одержуючи 11,70 (0,47ммоль/г) зв'язаного зі смолою VIII-A, (XIII-A).

Первинне ТГФ промивання випаровували, залишок розбавляли водою (750мл), і одержаний в результаті осад відфільтровували і послідовно промивали водою, 2% водним  $NaHCO_3$  (4×100мл) і водою (4×100мл). Після сушіння у вакуумі одержували VIII-A (1,28г).

Приклад 2-B

Схожим чином VIII-B ( $A^1, A^2=O$ ,  $B^1, B^2=H_2$ ,  $R^3=R^4=R^5=R^6=H$ ), (0,5г) зв'язували з кислотою смолою Рінка XII (1,52г), одержуючи 1,58г зв'язаного зі смолою VIII-B, (XIII-B).

Приклад 2-C

Схожим чином VIII-C ( $A^1, A^2=H_2$ ,  $B^1, B^2=O$ ,  $R^3=R^4=R^5=H$ ,  $R^6=110-OMe$ ), (1,02г) зв'язували з кислотою смолою Рінка XII (3,12г), одержуючи 3,70 (0,46ммоль/г) зв'язаної зі смолою сполуки VIII-C, (XIII-C), разом з початковою сполукою VIII-C (0,44г).

Приклад 3: Одержання сполуки (II-1), сполуки (II-2), сполуки (II-3), сполуки (II-4a), сполуки (II-4b), сполуки (II-6) і сполуки (II-8) (спосіб A, Фігура 6)

Приклад 3-A

До суспензії (XIII-A) (1,25г) в ТГФ (24мл) додавали 1,0М розчин  $EtMgBr$  (6,25мл в ТГФ), і реакційну суміш перемішували протягом 1 години перед доданням HMPA (5,0мл). Після 10-хвилинного перемішування додавали діетоксибутиральдегід (3,0г) [який був одержаний відповідно до описаної в літературі процедури - Raquette, et al., J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 9662-71], і реакційну суміш перемішували протягом 20 годин. Реакцію гасили 10% водним  $NI-UCI$  (5мл) і фільтрували. Смоли послідовно промивали 10% водним  $NI-UCI$  (3×10мл), водою (3×10мл), ТГФ (3×10мл), ДМФ (3×10мл), водою (3×10мл), ТГФ (3×10мл) і ефіром (3×10мл). Смоли сушили у вакуумі, переносили в хлористий метилен (15мл) і обробляли трифтороцтовою кислотою (0,15мл). Після перемішування протягом 1 години реакційну суміш фільтрували, і фільтрат випаровували. Одержаний в результаті залишок переносили в хлористий метилен (20мл) і обробляли тозилатом піридинію (50мг), і одержаний в результаті розчин перемішували протягом 4 годин. У цей час реакцію промивали насиченим водним  $NaHCO_3$  і розчином солі, і сушили над  $MgSO_4$ .

Після фільтрування і випаровування розчинника залишок очищали з допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 4×25см, елюювали 60%  $MeCN$ /вода w/o, 1% трифтороцтовою кислотою). Відповідні фракції нейтралізували  $NaHCO_3$  і екстрагували хлористим метиленом (3×50мл), і сушили над  $MgSO_4$ . Після фільтрування і випаровування розчинника було одержано 70,2мг сполуки II-1 у вигляді білого порошку, які мали наступні характеристики:  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  171,8; 143,3; 142,4; 141,4; 140,1; 140,0; 136,6; 129,2; 127,9; 127,4; 127,1; 126,8; 124,1 (2C), 122,7; 121,6; 121,5; 118,3; 112,1; 88,1; 79,2; 56,6; 45,6; 33,4; 24,8;  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  9,21 (д, J=7,5, 1H), 8,62 (с, 1H), 7,98 (д, J=7,7, 1H), 7,86 (д, J=8,3, 1H), 7,71 (д, J=7,3, 1H), 7,49 (дд, J=7,9, 7,4, 1H), 7,41 (дд, J=7,5, 7,4, 1H), 7,36-7,27 (м, 2H), 6,86 (д, J=6,0, 1H), 5,63-5,58 (м, 1H), 4,91

(с, 2H), 4,53 (д, J=3,3, 1H), 2,23-2,14 (м, 1H), 1,96-1,92 (м, 1H), 0,96-0,88 (м, 1H), 0,60-0,57 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 379, виміряно 379.

За допомогою препаративної ВЕРХ цієї суміші продуктів реакції також було виділено сполуку II-2 (0,5мг), яка мала наступні характеристики: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,17 (д, J=8,1, 1H), 8,62 (с, 1H), 7,98 (д, J=7,0, 1H), 7,85 (д, J=6,8, 1H), 7,57 (д, J=6,8, 1H), 7,49 (дд, J=7,9, 7,4, 1H), 7,44-7,26 (м, 3H), 6,81 (д, J=6,0, 1H), 5,43-5,33 (м, 1H), 4,43 (с, 2H), 2,23-2,14 (м, 1H), 1,96-1,92 (м, 1H), 1,45-1,55 (м, 2H), 0,96-0,88 (м, 1H), 0,60-0,57 (м, 1H), 0,29 (т, J=7,0, 3H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 407, виміряно 407.

#### Приклад 3-В

Подібним чином, як описано вище для сполуки II-1, смолу (XIII-A) (70,3мг) обробляли 1,1-діетокси-2-пентаном (0,75мл) [який готували відповідно до описаної в літературі процедури Sworin, et al., J. Org. Chem., 1988, 53, 4894-6], щоб одержати сполуку II-3 (3,5мг), яка була виділена за допомогою препаративної ТШХ (силікагель, елюювали 50% EtOAc/ толуолом) і мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,42 (д, J=8,2, 1H), 8,58 (с, 1H), 7,95 (д, J=7,4, 1H), 7,79 (д, J=8,3, 1H), 7,71 (д, J=7,1, 1H), 7,50-7,20 (м, 4H), 6,81 (д, J=5,9, 1H), 4,90 (с, 2H), 4,46 (с, 1H), 2,35-2,20 (м, 1H), 1,98 (с, 3H), 1,75-1,60 (м, 1H), 1,25-1,00 (м, 1H), 0,35-0,15 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 393, виміряно 393.

#### Приклад 3-С

Подібним чином, (XIII-A) (74,3мг) обробляли 1,1-діетокси-2-гексаном [який готували відповідно до описаної в літературі процедури Brenner, J. Org. Chem., 1961, 26, 22-7] (0,75мл), щоб одержати сполуку II-4a (2,10мг) і сполуку II-4b (1,06мг), які були виділені окремо за допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 4×25см, елюювали 65% MeCN/вода w/o, 1% трифтороцтовою кислотою). Сполука II-4a мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,30 (д, J=8,3, 1H), 8,55 (с, 1H), 7,97 (д, J=7,2, 1H), 7,65 (д, J=8,5, 1H), 7,59 (д, J=7,5, 1H), 7,48 (дд, J=7,8, 7,2, 1H), 7,39-7,15 (м, 3H), 6,31 (дд, J=5,9, 5,5, 1H), 5,02 (с, 2H), 4,88 (с, 2H), 0,88 (с, 3H), інші аліфатичні сигнали втрачалися під піками розчинника; Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 407, виміряно 407. Сполука II-4b мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,43 (д, J=8,1, 1H), 8,59 (с, 1H), 7,99 (д, J=7,3, 1H), 7,75-7,65 (м, 2H), 7,49 (дд, J=7,0, 6,4, 1H), 7,43 (дд, J=8,2, 8,1, 1H), 7,36-7,25 (м, 2H), 6,75 (с, 1H), 4,91 (с, 2H), 4,50 (с, 1H), 1,95 (с, 3H), інші аліфатичні сигнали втрачалися під піками розчинника; Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 407, виміряно 407.

#### Приклад 3-Д

Подібним чином (XIII-C) (1,00г) обробляли діетоксибутиральдегідом (3,65г), щоб одержати сполуку II-6 (87,8мг), яка було виділена за допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 2,5×25см, 65% MeCN/вода w/o, 1% трифтороцтова кислота) і мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,09 (д, J=8,6, 1H), 8,60 (с, 1H), 7,95 (д, J=7,4, 1H), 7,84 (д, J=8,3, 1H), 7,47 (дд, J=7,2, 7,0, 1H), 7,35 (с, 1H), 7,29 (дд, J=7,0, 7,0, 1H), 6,98 (дд, J=8,6, 1,9, 1H), 6,83 (д, J=6,0, 1H), 5,65-5,55 (м, 1H), 4,88 (с, 2H), 4,48 (д, J=3, 9, 1H), 3,82 (с, 3H), 2,25-2,10 (м, 1H), 2,08-1,85 (м, 1H), 0,96-0,75 (м, 1H), 0,65-0,50 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+Na) обчислено 431, виміряно 431.

#### Приклад 3-Е

Подібним чином полімер (XIII-B) (153,2мг) обробляли діетоксибутиральдегідом (1,5мл), щоб одержати сполуку II-8 (3,6мг), яка була виділена за допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 2,5×25см, 65% MeCN/вода w/o, 1% трифтороцтова кислота) і мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ 9,09 (д, J=7,9, 1H), 8,81 (с, 1H), 7,81-7,73 (м, 3H), 7,48-7,35 (м, 3H), 7,24 (дд, J=7,6, 7,5, 1H), 6,85 (д, J=6,2, 1H), 5,63-5,59 (м, 1H), 4,86 (с, 2H), 4,61 (д, J=3,6, 1H), 3,82 (с, 3H), 2,21-2,13 (м, 1H), 1,96-1,90 (м, 1H), 0,87-0,79 (м, 1H), 0,61-0,56 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 379, виміряно 379.

#### Приклад 4: Одержання сполуки II-7a і сполуки II-7b (спосіб А, Фігура 6)

##### Приклад 4-А Одержання (1,3-діетоксиетокси) ацетону

До холодної (0°C) суспензії NaH (2,68г, 60%) в ТГФ (150мл) додавали розчин 1,1-діетоксиетанолу [який був одержаний відповідно до описаної в літературі процедури Zirkle, et al., J. Org. Chem., 1961, 26, 395-407] (9,00г) в ТГФ (20мл), і реакційну суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години перед доданням хлористого метилалілу (8,0мл): Реакційну суміш кип'ятили із зворотним холодильником протягом ночі, охолоджували і фільтрували через прошарок целюлі. Розчинник видаляли випаровуванням в роторному випарнику, і залишок очищали за допомогою хроматографії на колонці (силікагель, 20% ефір/гексан), щоб одержати 1,1-діетоксиетилметилаліловий ефір (11,5г, 90%). Озоноліз охолодженого (-30°C) розчину цього ефіру (6,00г) в EtOAc (80мл) проводили доти, поки початковий матеріал вже не реєструвався з допомогою ТШХ (1 година). У цей час реакційну суміш продували киснем, обробляли Pd(OH)<sub>2</sub> (150мг) і перемішували в атмосфері водню протягом ночі. Каталізатор відфільтровували, і фільтрат концентрували за допомогою випаровування в роторному випарнику. Одержаний в результаті залишок очищали хроматографією на колонці (силікагель, 20% EtOAc/гексан), одержуючи вказану в заголовку сполуку (4,53г, 82%).

##### Приклад 4-В

Згідно з способом А (фігура 6), смолу (XIII-A) (230,2мг) обробляли EtMgBr (1,25мл), після чого (1,1-діетоксиетокси)ацетоном (приклад 3-А) (1,2мл). Після обробки і відщеплення від смоли частину грубої суміші реакційних продуктів (10,5мг) переносили в хлористий метилен (20мл) і обробляли ефіратом BF<sub>3</sub> (20мкл). Після перемішування протягом 2,5 годин розчин промивали насиченим водним NaHCO<sub>3</sub> і розчином солі, потім сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і видалення розчинника одержаний в результаті залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 4×25см, 65% MeCN/вода w/o, 1% трифтороцтова кислота), щоб одержати сполуку II-7a (2,34мг) і сполуку II-7b (1,34мг). Сполука (II-7a) мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,35-9,20 (м, 1H), 7,87 (д, J=7,6, 1H), 7,62 (д, J=7,0, 1H), 7,60-7,45 (м, 1H), 7,49, (1H), 7,40 (д, J=8,1, 1H), 7,37-7,26 (м, 3H), 6,22 (с, 1H), 5,20-4,85 (м, 1H), 4,47 (с, 1H), 3,67 (д, J=12,7, 1H), 3,52 (д, J=11,8, 1H), 3,40 (д, J=12,7, 1H), 3,38 (д, J=11,8, 1H), 1,91 (с, 3H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 409, виміряно 409. Сполука II-7b мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 9,58-9,22 (м, 1H), 7,82 (д, J=7,4, 1H), 7,60-7,40 (м, 3H), 7,37-7,27 (м, 3H), 7,21 (д, J=8,1, 1H), 5,81 (с, 1H), 5,21 (с, 1H), 5,10-4,80 (м, 1H), 4,59 (д, J=13,5, 1H), 4,38 (дд, J=13,5, 5,3, 1H), 4,21 (д, J=13,1, 1H), 3,82 (д, J=13,2, 1H), 1,13 (с, 3H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 409, виміряно 409.

Приклад 5: Одержання сполуки II-5 (Фігура 8)

До розчину сполуки II-1 (8,1мг) в ТГФ (2мл) додавали NBS (4,6мг) і реакційну суміш перемішували протягом ночі. Додавали додаткову кількість NBS (4,5мг) і реакцію перемішували протягом 2,5 годин. Нерозчинний матеріал відфільтровували, і фільтрат концентрували в роторному випарнику. Одержаний в результаті залишок очищали хроматографією на колонці (C-18, 65% MeCN/вода w/0,1% трифтороцтова кислота). Відповідні фракції нейтралізували NaHCO<sub>3</sub> і екстрагували хлористим метиленом (3×20мл), і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника було одержана сполука II-5 (5,1мг) у вигляді білого порошку, яка мала наступні характеристики: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 9,22 (д, J=7,4, 1H), 8,67 (с, 1H), 8,14 (с, 1H), 7,86 (д, J=8,7, 1H), 7,72 (д, J=7,0, 1H), 7,63 (д, J=7,8, 1H), 7,42 (дд, J=7,5, 7,3, 1H), 7,35 (дд, J=7,3, 7,2, 1H), 6,86 (д, J=6,0, 1H), 5,63-5,58 (м, 1H), 4,94 (с, 2H), 4,54 (д, J=3,1, 1H), 2,30-2,14 (м, 1H), 2,00-1,82 (м, 1H), 0,96-0,88 (м, 1H), 0,62-0,50 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 457/9 (1:1), виміряно 457/9(1:1).

Приклад 6: Одержання проміжної сполуки XV (Фігура 4)

До розчину (XIII-A) [A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup>=H<sub>2</sub>, B<sup>1</sup>, B<sup>2</sup>=O, R<sup>3</sup>=R<sup>4</sup>=R<sup>5</sup>=R<sup>6</sup>=H] (1,05г) в ДМФ (25мл) додавали триетиламін (0,75мл) і трет-бутилдиметилсілілхлорид (TBS-Cl) (0,65г). Після перемішування протягом 3 годин реакцію гасили насиченим водним NaHCO<sub>3</sub> і екстрагували EtOAc. Органічний шар промивали водою і розчином солі і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника одержаний в результаті залишок розтирали в ефірі, одержуючи сполуку XV (848мг). Промивку випаровували, щоб виділити залишок, який очищали хроматографією на колонці (кремнезем, 1% EtOAc/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) і одержували додаткову кількість продукту (502мг, сумарний вихід 94%), який мав наступні спектральні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 11,94 (с, 1H), 9,32 (д, J=7,6, 1H), 8,03 (д, J=7,7, 1H), 7,64 (д, J=7,2, 1H), 7,58 (д, J=8,1, 1H), 7,44 (дд, J=7,7, 7,6, 1H), 7,39 (дд, J=7,7, 7,6, 1H), 7,32 (д, J=7,3, 1H), 7,25 (дд, J=7,6, 7,3, 1H), 5,00 (с, 2H), 4,14 (с, 2H), 0,99 (с, 9H), 0,46 (с, 6H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 425, виміряно 425.

Приклад 7: Одержання сполуки II-1 за допомогою способу В (Фігура 7)

Розчин тритону В в піридині (0,45М) готували шляхом розчинення 40% розчину тритону В в метанолі (10мл) в піридині (10мл). Розчинник видаляли при зниженому тиску (20мм Hg) до кінцевого об'єму ~8мл. Залишок розводили піридином до 50мл, фільтрували і зберігали в азоті. Розчин XV (20,3мг) в піридині (2,0мл) вносили в струмінь аргону і обробляли 300мкл тритону В (0,45М в піридині) і діетоксибутиральдегідом (50мкл). Після 2 годинного перемішування реакційну суміш екстрагували EtOAc, промивали 1N водним HCl, розчином солі і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника адукт переносили в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10мл) і обробляли ефіратом BF<sub>3</sub> (10мкл). Після 2,0-годинного перемішування розчин промивали насиченим водним NaHCO<sub>3</sub> і розчином солі, потім сушили над MgSO<sub>4</sub>. Видалення розчинника при випаровуванні в роторі давало залишок, який очищали препаративною ВЕРХ (Zorbax RX-8, 2,5×25см, 65% MeCN/вода w/0,1% трифтороцтова кислота). Відповідні фракції нейтралізували NaHCO<sub>3</sub> і екстрагували хлористим метиленом (3×20мл) і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника одержували II-1 (11,8мг, вихід 65%), спектр <sup>1</sup>H ЯМР і мас-спектр якого і час утримання якого при ВЕРХ були ідентичними матеріалу, одержаному і виділеному способом А, описаним в прикладі 3-А.

Приклад 8: Одержання сполуки II-9 (Фігура 8)

До суспензії бромосполуки II-5 (6,2мг) в 1-пропанолі (4,0мл) додавали 3-амінофенілборну кислоту (3,8мг). Після перемішування протягом 0,25 години послідовно додавали Pd(OAc)<sub>2</sub> (2,0мг), Ph<sub>3</sub>P (4,8мг), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,8мг) і воду (2,0мл). Суміш кип'ятили із зворотним холодильником протягом 0,75 години, охолоджували, екстрагували CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> і промивали водою і розчином солі. Органічний шар сушили над MgSO<sub>4</sub>, і розчинник видаляли випаровуванням в роторному випарнику, одержуючи залишок, який очищали препаративною ВЕРХ (Zorbax RX-8, 2,5×25см, 50% MeCN/вода w/0,1% трифтороцтова кислота). Відповідні фракції нейтралізували NaHCO<sub>3</sub> і екстрагували хлористим метиленом (3×20мл) і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника одержували сполуку II-9 (3,1мг, вихід 49%), яка мала наступні спектральні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 9,22 (д, J=7,5, 1H), 8,66 (с, 1H), 8,00-7,25 (м, 8H), 7,12 (дд, J=7,1, 7,0, 1H), 6,95-6,80 (м, 3H), 6,53 (д, J=6,0, 1H), 5,63-5,58 (м, 1H), 4,99 (с, 2H), 4,55 (с, 1H). 2,25-2,10 (м, 1H), 1,95-1,90 (м, 1H), 0,98-0,88 (м, 1H), 0,65-0,57 (м, 1H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 470, виміряно 470.

Приклад 9: Одержання сполуки II-10 (Фігура 9)

До розчину сполуки II-1 (5,0мг) в ДМСО (1мл) додавали NaCN (4,3мг), і суміш нагрівали до 145°C протягом 1 години. Суміш охолоджували, екстрагували EtOAc і промивали водою (3×20мл) і розчином солі. Органічний шар сушили над MgSO<sub>4</sub>, фільтрували і випаровували, одержуючи залишок, який очищали препаративною ВЕРХ (Zorbax RX-8, 2,5×25см, 55% MeCN/вода w/0,1% трифтороцтова кислота). Відповідні фракції нейтралізували NaHCO<sub>3</sub> і екстрагували хлористим метиленом (3×20мл), і сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і випаровування розчинника одержували сполуку II-10 (2,7мг, вихід 50%), яка мала наступні спектральні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 11,4 (с, 1H), 8,86 (д, J=7,9, 1H), 8,79 (д, J=1,6, 1H), 7,90 (д, J=8,3, 1H), 7,62-7,55 (м, 2H), 7,49 (дд, J=7,6, 7,4, 3H), 7,40 (дд, J=7,4, 7,3, 1H), 7,35 (дд, J=7,5, 7,4, 1H), 6,86 (д, J=6,0, 1H), 6,03 (с, 1H), 5,40-5,30 (м, 1H), 2,25-2,14 (м, 1H), 2,03-1,90 (м, 1H), 1,10-0,98 (м, 1H), 0,82-0, 77 (м, 1H).

Приклад 10. Одержання сполуки II-11 (спосіб А, Фігура 6)

Згідно з способом А, смола (XIIIa) (150,2мг) піддавали реакції з EtMgBr (1,00мл), після чого - з етил-2,5-діоксопентаноем [Schmidt, et al., Synthesis, 1993, 809] (1,5мл). Після обробки і відщеплення від смоли грубу суміш реакційних продуктів переносили в хлористий метилен (20мл) і обробляли ефіратом BF<sub>3</sub> (20мкл). Після перемішування протягом 2,5 годин розчин промивали насиченим водним NaHCO<sub>3</sub> і розчином солі, потім сушили над MgSO<sub>4</sub>. Після фільтрування і видалення розчинника одержаний в результаті залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ (Zorbax RX-8, 4×25см, 55%-75% градієнт MeCN/вода w/0,1% трифтороцтова кислота), щоб одержати сполуку II-11 (6,4мг), яка мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 9,36 (д, J=7,7, 1H), 8,68 (с, 1H), 8,00 (д, J=7,7, 1H), 7,83 (д, J=8,3, 1H), 7,58-7,15 (м, 5H), 6,97 (д, J=5,9, 1H), 4,93 (с, 2H), 4,82 (с, 1H), 4,48 (д, J=7,1, 2H), 2,42-1,91 (м, 2H), 1,37 (т, 3H, J=7,1), 1,25-0,63 (м, 2H).

#### Приклад 11: Одержання сполуки II-12

Розчин сполуки II-11 (3,4мг) в ТГФ (2мл) обробляли 2М розчином LiBH<sub>4</sub> (1,0мл в ТГФ), і реакцію перемішували протягом 1,5 годин. Реакцію гасили додаванням 1N водного HCl (4мл). Після перемішування протягом 20 хвилин додавали 10% водний NaOH (15мл), і суміш екстрагували хлористим метиленом (3×10мл). Після висушування над MgSO<sub>4</sub>, суміш фільтрували і розчинник випаровували, щоб одержати сполуку II-12 (0,32мг), яка мала наступні властивості: <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 9,35 (д, J=7,7, 1H), 8,62 (с, 1H), 7,98 (д, J=7,7, 1H), 7,83 (д, J=8,2, 1H), 7,75 (д, J=8,2, 1H), 7,50-7,25 (м, 4H), 6,84 (д, J= 7,7, 1H), 6,11 (с, 1H), 4,91 (с, 2H), 4,71 (с, 1H), 4,50-4,40 (м, 1H), 4,30-4,20 (м, 1H), 2,42-1,91 (м, 2H), 1,25-0,63 (м, 2H); Мас-спектр m/z (M+H) обчислено 409, виміряно 409.

#### Приклад 12: Підвищення ХАТНН-активності спинного мозку

ХАТНН є специфічним біохімічним маркером функціональних холінергічних нейронів. Холінергічні нейрони являють собою основний холінергічний вхід в формацію гіпокампу, нюхове ядро, ядро, розташоване між ніжками мозку, кору головного мозку, мигдалевидне тіло і частину таламусу. Мотонейрони в спинному мозку є холінергічними нейронами, які містять ХАТНН [Phepels, et al., J. Contr. Neurol., 1988, 273, 459-472]. ХАТНН активність була використана для вивчення впливів нейротрофінів (наприклад, NGF або NT-3) на виживаність і/або функціонування холінергічних нейронів. Аналіз ХАТНН також служить для індикації регуляції рівнів ХАТНН в холінергічних нейронах.

Способи: Клітини спинного мозку зародків пацюків дисоціювали, і експерименти виконували, як описано [Smith, et al., J. Cell Biology, 1985, 101, 1608-1621; Glicksman, et al., J. Neurochem., 1993, 61, 210-221]. Дисоційовані клітини одержували з спинного мозку розтятих пацюків (на 14-15 ембріональний день) за допомогою стандартної технології дисоціації трипсином [Smith et al., вище]. Клітини висівали при щільності 6×10клітин/см<sup>2</sup> в покриті полі-L-орнітином лунку планшетів для культивування тканин в безсировоточне середовище N<sub>2</sub> з додаванням 0,05% бичачого сировоточного альбуміну (БСА) [Bottenstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 514-517]. Культури інкубували при 37°C у вологій атмосфері, що складається з 5% CO<sub>2</sub>/95% повітря, протягом 48 годин. ХАТНН активність вимірювали через 2 дні in vitro, використовуючи модифікацію процедури Fonnum [Fonnum, Neurochem., 1975, 24, 407-409] у відповідності з [McManaman et al. і Glicksman, et al. (McManaman, et al., Develop. Biol., 1988, 125, 311-320; Glicksman, et al., J. Neurochem., вище)].

Сполуки, що мають формулу II, описані в прикладах, приведені в списку в таблиці 2. R<sup>1</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>6</sup> і R<sup>7</sup> означають H; Y означає O; і η дорівнює 1.

Таблиця 2

Сп. №	A <sub>1</sub> A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>g</sub>	Z	m
II-1	O	H, H	H	H	H	H	зв'язок	1
II-2	O	H, H	Et	H	H	H	зв'язок	1
II-3	O	H, H	H	H	H	Me	зв'язок	1
II-4a	O	H, H	H	H	H	Me	зв'язок	2
II-4b	O	H, H	H	H	H	Me	зв'язок	2
II-5	O	H, H	H	Br	H	Me	зв'язок	1
II-6	O	H, H	H	H	10-OMe	H	зв'язок	1
II-7a	O	H, H	H	H	H	Me	O	1
II-7b	O	H, H	H	H	H	Me	O	1
II-8	H, H	O	H	H	H	H	зв'язок	1
II-9	O	H, H	H	3'-NH <sub>2</sub> -Ph	H	H	зв'язок	1
II-10	O	O	он	H	H	H	зв'язок	1
II-11	O	H, H	H	H	H	CO <sub>2</sub> -Ht	зв'язок	1
II-12	O	H, H	H	H	H	CH <sub>2</sub> -OH	зв'язок	1

#### Приклад 13: pCDNA3-EE-MLK3, peDNA3-EE-MLK3 (K144R)

MLK3 клонували, як описано [Lee, et al., (Oncogene, 1993, 8, 3403-3410; Ezoe, et al., Oncogene, 1994, 9, 935-938)]. кДНК одержували з 200нг поліаденілованої мРНК меланоцитів, і 5% реакційної суміші використали як матрицю, щоб ампліфікувати набір кДНК РТК, використовуючи суміші або двох, або чотирьох високо вироджених олігонуклеотидних праймерів, одержаних з консенсусних послідовностей консервативних субдоменів VIb і IX відомих РТК: РТК1, 5'-CGGATCCACMGIGAYT-3' (SEQ ID NO: 1); РТК2, 5'-GGAATTCCAWAGGACCASACRTC-3' (SEQ ID NO: 2); РТК3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYTIGCIGCIMGIAA-3' (SEQ ID NO: 3); РТК4, 5'-GGAATTIAYIGGAWAIGWCCAIACRTCISW-3' (SEQ ID NO: 4). Було виконано сорок циклів ПЛР з використанням ДНК полімерази Taq (Ampli-Taq; Perkin-Elmer/Cetus) і автоматизованого термоциклера ДНК; кожний цикл складався з 40сек. при 94°C, 2хв. при 37°C і 3хв. при 63°C. Об'єднували продукти восьми ПЛР, обробляли ДНК-полімеразою (Кленова), розщеплювали BamHI плюс EcoRI і піддавали електрофорезу в 5% поліакриламідному гелі. При фарбуванні бромідом етидію ідентифікували переважачу смугу, відповідну 200-230п.н., яку вирізали, елювали і клонували в M13mp18. У одному експерименті частину кДНК, ампліфікованої за допомогою ПЛР, не розщеплювали, а замість цього клонували тупими кінцями в M13mp18, розщеплений SmaI. Нуклеотидні послідовності визначали за допомогою методу секвенування з термінацією ланцюга.

Одна кДНК, ідентифікована як РТК1, була використана як проба для скринінгу бібліотек кДНК меланоми і меланоцитів людини. Клон, позначений РТК 1-3.2, включав в себе повну відкриту рамку зчитування довжиною 2541н., що кодує білок з 847 амінокислот. Цю кДНК розрізали NcoI, затупляли кінці ДНК-полімеразою (Кленова), знову розрізали EcoRI і лігували у вектор pCDNA3-EE, який був розрізаний BamHI, кінці якого були затуплені і який потім був розрізаний EcoRI. Вектор pCDNA3-EE був сконструйований

шляхом вбудування в HindIII/BamHI-сайт олігонуклеотиду, який кодує стартовий кодон, після якого слідує епітоп EE, MEEEEYMPME (SEQ ID NO: 5) [Grussenmeyer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 7952-7954]. Неактивна, як кіназа, версія («мертва» кіназа) MLK3 була одержана шляхом створення мутації K144R за допомогою ПЛР, із застосуванням технології, опублікованої раніше [Chen, et al., Biotechniques, 1994, 17, 657-659]. Першим мутагенним олігонуклеотидом був 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCGCCAG-3' (SEQ ID NO: 6) і другим олігонуклеотидом був 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (SEQ ID NO: 7). Ці олігонуклеотиди були використані в ПЛР, де як матриці використали MLK3, щоб утворити фрагмент довжиною 806п.н., і застосовували у другій ПЛР-реакції, використовуючи праймер T7 як іншого амплімеру і MLK3 як матриці, щоб утворити фрагмент довжиною 1285п.н. Фрагмент відділяли шляхом електрофорезу в агарозному гелі, виділяли, клонували в pGEM-5 (Promega) і секвенували. Фрагмент розрізали HindIII і HpaI, і вбудовували в pCDNA3-EE-MLK3, розрізану HindIII і HpaI. Була виявлена додаткова крапкова мутація в нуклеотиді 1342. Щоб її виправити, з MLK3 дикого типу вирізали Pf1M1 фрагмент (н. 1093-1418) і використали, щоб замінити ідентичний фрагмент в MLK3, що має мутацію K144R.

#### Приклад 14: pFB-FLAG-MLK3

Щоб одержати білок MLK3, кДНК була клонована в бакуловірусний експресуючий вектор pFB-FLAG. MLK3 була вирізана з РТК1-3.2 шляхом переварення NcoI, затуплена ДНК полімеразою (Кленова), знову розрізана NotI і лігвана в pFB-FLAG, переварений StuI і NotI. pFB-FLAG одержаний з pFB (Life Technologies) і має послідовність, що кодує епітоп FLAG [Hopp, et al., Biotechnology, 1988, 6, 1205-1210] зі стартовим кодом, MDYKDDDDK (SEQ ID NO: 8), доданим до полілінкера в BamHI сайті.

#### Приклад 15: pFB-GST-MLK3(KD)

Бакуловірусна експресія кіназного домену MLK3 була досягнута шляхом вирізання фрагмента MLK3 з pGEXKG-MLK3(KD) з використанням EcoRI і XhoI, і його лігування у вектор pFB, розрізаний EcoRI і XhoI, в якому вище за течією була клонована кодуєча послідовність глутатіон-3-трансферази (GST). Це було досягнуто завдяки одержанню послідовності, що кодує GST, і полілінкера з вектора pGEXKG за допомогою ПЛР з використанням вектора як матриці [Guan, et al., Anal. Biochem., 1991, 192, 262-267]. 5'-олігонуклеотид для ПЛР створював сайт рестрикції Bgl2 на 5'-кінці фрагмента. Цей виділений фрагмент потім переварювали Bgl2 і Hind3 і лігували в pFB, переварений BamHI і Hind3.

#### Приклад 16: pGEXKG-MLK3 (KD)

Фрагмент ДНК, який включав в себе як кіназний домен MLK3, так і частину лейцинового "зіппера" (н. 736-1791), був одержаний ПЛР з використанням РТК1 кДНК. Виділений фрагмент переварювали ферментами рестрикції EcoRI і XhoI, сайти для яких були включені в олігонуклеотиди для ПЛР, і клонували в pGEX-KG, перевареному EcoRI і XhoI. Потім цей фрагмент в pGEXKG був укорочений за допомогою ПЛР, щоб він включав тільки кіназний домен (н. 736-1638).

#### Приклад 17: pKH3-MLK2, pKH3-MLK2(KA)

MLK2 клонували з використанням виродженої ПЛР [Dorow, et al., Eur. J. Biochem. 1993, 213, 701-710; Dorow, et al., Eur. J. Biochem., 1995, 234, 492-500]. Сегменти кДНК, що кодують каталітичні субдомени протеїнкіназ в лінії епітеліальних пухлинних клітин Colo 16, ампліфікували на РНК за допомогою ПЛР із зворотною транскриптазою. Вироджені праймери ПЛР були створені на основі послідовностей, що кодують консервативні мотиви в субдоменах VIb і VIII каталітичних кіназних доменів сімейства рецепторів епідермального фактора росту. Праймери мали наступні послідовності: прямий праймер, 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G(A)ACC(T)T-3' (SEQ ID NO: 9), зворотний праймер, 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTCCAG(C)ACATC-3' (SEQ ID NO: 10). Декілька продуктів ПЛР було клоновано в M13 і секвеновано за допомогою набору для секвенування T7 Super-Base (Bresatec). Один продукт ПЛР довжиною 216п.н. був використаний як проба-для скринінгу  $\lambda$ gt11 бібліотеки кДНК товстого кишечника людини (Clontech, номер за каталогом HL10346). Фрагмент мітили з випадковим праймером, гібридизацію проводили при 65°C, і фільтри промивали в умовах жорсткості 0,2 X NaCl/цитрат (150мМ хлорид натрію, 15мМ цитрат натрію, pH 7,0) і 0,5% SDS при 65°C. Авторадіографію фільтрів проводили протягом 16 годин при -70°C на плівці Kodak XAR-5. Були виділені чотири клони, і самий довгий з них, довжиною 1,2т.п. н., був використаний як повторний зонд для тієї ж бібліотеки при тих же самих умовах. Були відібрані ще чотири клони, і один з цих клонів являв собою фрагмент MLK2 довжиною 1034п.н. Цей клон був використаний як проба для  $\lambda$ gt10-бібліотеки мозку людини. Перевірено приблизно 500000 клонів, і виділений один клон довжиною 3454п.н., що являє собою повний кодуєчий район MLK2.

MLK2 була клонована від ATG до поліА-хвоста у вектор pKH3 між сайтами BamHI і EcoRI в два етапи, оскільки в середині послідовності MLK2 є BamHI сайт. Вектор pKH3 був сконструйований шляхом вбудування трьох піків HA епітопа tag і наступним далі BamHI сайтом між сайтами XbaI і EcoRI полілінкера pRK7. Щоб одержати мутантну версію, K125A, 5' BamHI фрагмент MLK2 був клонований у векторі Promega pAlter і підданий мутації, як рекомендовано виготовлювачем. Потім фрагмент був клонований назад у вектор MLK2 pKH3.

#### Приклад 18: pCDNA3-HA-JNK1

JNK1 кДНК була одержана як описано [Coso, et al. (Cell, 1995, 81, 1137-1146)]. кДНК була одержана ПЛР з використанням як матриці кДНК скелетного м'яза людини (Invitrogen), і була клонована в Bgl2/Sal1 сайти pCDNA3-HA, модифікованої pCDNA3 експресуючої плазміди, що кодує епітоп HA [Wilson et al., Cell, 1984, 37, 767-778]. Потім вона була вирізана з pCDNA3, включаючи епітоп HA, і лігвана в pGEX-4T3 (Pharmacia). JNK1 кДНК була вирізана з конструкції pGEX-4T3 у вигляді Bgl2/Sal1 фрагмента і лігвана в pCDNA3-HA, вектор з епітопом HA, доданим в Hind3/BamHI сайт pCDNA3.

#### Приклад 19: pFLAG-DLK

DLK була клонована в експресуючий вектор pCDNA3 з епітопом FLAG, приєднаним як описано [Hoizman, et al. (J. Biol. Chem., 1994, 269, 30808-30817)]. Фрагмент кДНК для DLK був виділений з допомогою ПЛР клонування, заснованого на використанні вироджених олігонуклеотидів. Сумарну РНК екстрагували з нирок (32 органи) на 13,5 ембріональний день і з нирок (16 органів) на 17,5 ембріональний день, використовуючи спосіб на основі фенол/гуанідин-ізотіоціанатного реагенту, що серійно проводиться, відповідно до інструкцій виготовлювача [TRIzol Reagent, Life Technologies, Inc.]. Після переварення вільною

від РНКазы ДНКазою I РНК піддавали зворотній транскрипції РНКазою H - зворотною транскриптазою [Superscript, Life Technologies, Inc.] з синтетичного оліго(dT) олігонуклеотидного праймера до однострочної кДНК. Вироджені олігонуклеотидні праймери, що відповідають каталітичним субдоменам Vib і IX тирозинової протеїнази, початково розроблені Wilks [Wilks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1989, 86, 1603-1607], були модифіковані для 5'-EcoRI і HindIII-сайтів, відповідно (5'-ATAATTC(GT)GC(TAGC)GCCA(GA)GTC(TAGC)CGGTG-3' (SEQ ID NO: 11), 5'-ATAAGCTTCC(TC)(AG)T(GC)AAGTGGA(TC)(GC) GC(AGC)CC(CT)GA-37 (SEQ ID NO: 12). Проводили сорок циклів ПЛР протягом 1,5хв. при 94°C, 2хв. при 37°C і 3хв. при 63°C. Додавали свіжі реактиви, і виконували ще 40 циклів перед останньою 10-хвилинною елонгацією при 72°C. Одержаний в результаті продукт ампліфікації ДНК довжиною 200-210п.н. виділяли в гелі, субклонували в готову плазмиду рGEM7zf(+) (Promega) і трансформували в *Escherichia coli*. Плазмідна ДНК була одержана з трансформованих бактерій з використанням набору Miniprep, і частина була переварена ендонуклеазами рестрикції EcoRI і HindIII; клони, що містять вставки, були секвеновані.

Фрагмент кДНК DLK довжиною 195п.н., одержаний за допомогою виродженої ПЛР, радіоактивно мітили і використали для скринінгу приблизно  $1 \times 10^6$  рекомбінантів Uni-ZAP II [Stratagene, La Jolla, CA], бібліотеки кДНК мозку дорослої миші, одержаної з допомогою Оліго(dT)-праймерів [Hoizman, et al., Mol. Cell Biol., 1990, 10, 5830-5838]. Фільтри гібридизували в буфері, що складається з 50% формаміду, 5 x SSC, 3 x розчину Денхардта, 0,25% SDS, 1мг/мл поліаденілової кислоти, і 200мг/мл ДНК сперми лосося, при 42°C. Фільтри промивали один раз при кімнатній температурі в 2 x SSC, 0,2% SDS і двічі - при 65°C протягом 30хв. Було ідентифіковано двадцять п'ять унікальних клонів; 10 клонів були очищені до гомогенності, проведена екзизія *in vivo* відповідно до протоколу виготовлювача, і проведене рестрикційне картирування. Два самих довгих клони (3401 і 3397п.н., відповідно, відрізняються тільки своїми 5' кінцями) були секвеновані вздовж обох ниток по всій довжині.

Фрагмент повнорозмірної NotI-XhoI DLK кДНК (3401п.н.) субклонували в еукаріотичний експресуючий вектор pcDNA3 з промотором цитомегаловірусу (Invitrogen, San Diego, CA) (конструкція названа pcDNA3-DLK). Потім була створена мічена NH4-Met FLAG епітопом (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 13) конструкція (pFLAG-DLK). Щоб ампліфікувати фрагменти кДНК, які кодують 5' HindIII сайт, консенсусну послідовність Козака в DLK, що включає кодон ініціації ATG, епітоп FLAG, і послідовність відкритої рамки зчитування кДНК DLK, що тягнеться від нуклеотиду 88 до внутрішнього EcoRI сайту біля нуклеотиду 758, використали ПЛР. (Очищені з допомогою BEXX синтетичні олігонуклеотиди використали в еквімолярних кількостях: 5'-ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACATACAAGACGACGATGACAAGGCCTGCCTCCA T-GAAACCCGAACA-3' (SEQ ID NO: 14) для смислового праймера конструкції FLAG і 5'-GACAGGGCGGCCGGCTCT-3' (SEQ ID NO: 15) для антисмислового праймера). Очищені в гелі, переварені HindIII і EcoRI ампліфіковані фрагменти були субклонувані в *Hin*-dIII-EcoRI, щоб одержати плазмиду pcDNA3-DLK. Конструкції секвенували вздовж обох ниток, щоб пересвідчитися в точності Taq полімерази і збереженні рамки зчитування.

#### Приклад 20: pcDNAS-MLK1

5' частина MLK1 була одержана з баз даних EST (інвентарний номер AA160611). Цей клон являв собою лиття між MLK1 і іншою кДНК невідомої природи. Він містив раніше не опубліковану 5' послідовність MLK1 разом з частиною раніше опублікованого кіназного домену MLK1 xDorow, et al., Eur. J. Biochem., 1993, 213, 701-710. Послідовність кДНК MLK1 клону EST являє собою наступну послідовність:

```

GAATTCGGCA CGAGAGGACT
CGCAAGTGTTC CGGCAAGAG GCTGTGTGA CCGGCGAGCT GAACCAAGCG
GTGGGCATCT TCCGAGCAA CTACGTGAC CCGGCGAGCG CTTCTCCAG
CCGCTGCGAG CCGGCGGCG AGGACCCAG TTGCTACCG CCAATTCAGT
TGTAGAAAT TGATTTTGG GAGCTCAGCT TGAAGAGAT TATTGCGATC
GGGGGCTTTG CGAAGGTCTA TGTGCTTTC TGGATAGGGG ATGAGGTTGC
TGTGAAAGCA GCTCGCCAGC ACGCTGATGA GGACATCAGC CAGACCATAF
AGAATGTTGG CCAAGAGGCC AAGCTCTTCG CCATGCTGAA GCACCCCAAC
ATCATTTGCC TAAGAGGGGT ATGCTTGAAG GAGGCCAACC TCTGCTTGGT
CATGAGTTT GCTCGTGGAG GACCTTTGAA TAGAATTGTA TCTGGGAAAA
GGATTCGCCG AGACATCTTG GTGAATTGGG CTGTCCAGAT TCCAGAGGG
ATGAATCTACT TACATGATGA GGCAATTTT CCCATCATCC ACCCGGACCT
TAAGTTCAGC AAC (SEQ ID NO:16)

```

Вона трансклюється в послідовність:

```

NSAREDSQVS
GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTFSAFSS RCQPGGEDPS CYFPIQLLEI
DFAELTLEH IGIGGFGKVY RAFWIGDEVA VKAARHDPDE DISQTIENVR
QEAKLFAMLK HPNIALRGV CLKIPNLCLV MEFARGGFLN RVLGKREPP
DILVNWAVQI ARGMMNYLIDE AIVPIHIDL KSSN (SEQ ID NO:17)

```

3' частина MLK1 на початку була клонувана з допомогою виродженої ПЛР, як опубліковано раніше [Dorow, et al., Eur. J. Biochem., 1993, 213, 701-710]. Протокол клонування 3' частини MLK1 був таким, як описано вище для MLK2, з наступними виключеннями. З чотирьох клонів, одержаних при повторному скринінгу бібліотеки за допомогою клону довжиною 1,2т.п. н., три клони являли собою MLK1. Жоден з клонів не містив повного кіназного домену, який був одержаний з допомогою ПЛР.

Фаг з аліквотних проб ампліфікованих бібліотек (кДНК нормального епітелію товстої кишки людини і кДНК лінії клітин карциноми товстої кишки людини T84 в 1 Uni-ZAPXR (Stratagene, номер за каталогом 937204) об'ємом 1мл лізували шляхом суспендування в 20мл води і вмиють заморожували. Зразок об'ємом 5мл лізованого фага використали як ПЛР матрицю в двох реакціях для кожної бібліотеки. Праймери, що представляють вектори, були взяті з нуклеотидних послідовностей, фланкуючих сайти клонування. У разі

бібліотеки лінії клітин товстого кишечника T 84 були використані праймери для секвенування T3 і T7 (Promega). В кожній реакції один праймер був з 3'-5' нитки гена MLK1, приблизно 100п.н. 5' кінці відомої послідовності. Другим праймером був один з двох векторних праймерів. Реакційна суміш ПЛР містила IX буфер для ПЛР, 2,5мМ хлорид магнію, 1ед. полімерази Taq (всі реактиви з Bresatec), 0,2мМ дНТФ і 0,4мМ кожного праймера в загальному об'ємі 50мл. Умови реакцій були наступними: 60сек. при 95°C, 90сек. при 52°C, 90сек. при 72°C в ході 30 циклів, з 15 хвилинним часом елонгації в останньому циклі. Продукти ПЛР були клоновані і секвеновані як описано вище. Самий довгий клон з відібраних в бібліотеці і фрагмент ПЛР, який включав в себе додаткову послідовність MLK1, були лігovanі один з одним, щоб одержати кДНК MLK1 довжиною 1,08т.п.н. в pUC18.

Клон MLK1 з бази даних EST був представлений у векторі pBluescript (Stratagene). кДНК MLK1 з бібліотеки товстого кишечника була лігovaná в клон EST за допомогою переварення вищезазначеної кДНК EcoRI, затуплення кінців фрагментом Кленова, потім розрізанням AflII. Цей виділений фрагмент був клонований в кДНК MLK1 з бази даних EST, яку розрізали XhoI, кінці якої затуплювали фрагментом Кленова і розрізали AflII. Потім ця нова конструкція була вирізана з pBluescript шляхом переварення NotI і ApaI, і лігovaná в pCDNA3-EE, також розрізаний NotI і ApaI. Послідовності всіх сполук при клонуванні перевірялися.

Приклад 21: Експресія GST-MLK3<sub>KD</sub> в E. coli

E. coli лінії BL21 трансформували pGEXKG-MLK3(KD) шляхом електропорації. Бактерії, що містять плазмиду, інокулювали в 15 літровий ферментер Applikon в 10 літрів наступного багатого середовища: 1,95г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1г/л ампіциліну, 0,3г/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,92г/л MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 42,7мг/л цитрату Na, 21,8мг/л FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5мл мікроелементів металів Pichia [Higgins, et al., Methods Molecular Biology, 1998, 103, 149-177], 20г/л казамінових кислот, 40г/л гліцерину, 25,5мг/л Cads. Бактерії вирощували протягом ночі при 800об/хв/68% розчиненого кисню/30°C доти, поки культура не досягне OD<sub>600</sub>=4,4. Продукцію рекомбінантного білка індукували доданням 1мМ ізопропіл-β-D-тіогалактозиду, при безперервній ферментації при 25°C тривалістю до 6 годин. Потім бактерії витягували центрифугуванням, і клітинну пасту зберігали в замороженому вигляді при -20°C до очищення.

Приклад 22: Очищення бактерійної GST-MLK3<sub>KD</sub>

Частково очищену GST-MLK3<sub>KD</sub> одержували шляхом озвучення 100г пасти бактерійних клітин в 100мМ трис-HCl, 150мМ HCl, 1мМ EDTA, 5мМ дитіотреїтолу (DTT), pH 7,5 (буфер А). У розчин додавали тритон X-100 до 1%, потім розчин перемішували на льоду протягом 1 години. Надосадовий розчин після центрифугування протягом 45хв. при 20000 x g перемішували протягом 1 години на льоду з 10мл смоли глутатіон-сефарози 4B (Pharmacia), урівноваженої буфером А. Осаджену смолу двічі промивали 12,5 x об'ємом буфера А, потім елюювали 20мл 10мМ трис-HCl, 150мМ NaI, 5мМ DTT (буфер В), що містить 20мМ глутатіону, pH 7,5. Білок діалізували протягом ночі проти буфера В, і зберігали в аліквотних пробах при -80°C.

Приклад 23: Бакуловірусна експресія FLAG-MLK3 і GST-MLK3<sub>KD</sub>

Рекомбінантні бакуловіруси, експресуючі FLAG-MLK3 і GST-MLK3<sub>KD</sub> були одержані з відповідних векторів перенесення, pFB-FLAG-MLK3 і pFB-GST-MLK3<sub>KD</sub> використовуючи систему BAC-TO-BAC (Life Technologies), відповідно з інструкцією виготовлювача. Суспензійні культури клітин Sf21 [Vaughn, et al., In Vitro, 1977, 13, 213-217] вирощували при 27°C/120 об/хв в доповненому середовищі Грейса (Hink, Nature. 1970, 226, 466-467) з 10% інактивованою нагріванням фетальної сироватки теляти (FBS). Для одержання рекомбінантної FLAG-MLK3 клітини Sf21 при щільності 1,5×10<sup>6</sup>клітин/мл доповненого середовища Грейса, що містить 5% FBS, інфікували багаторазовими зараженнями (MOI) 3,1 і збирали через 39 годин після зараження. Для одержання рекомбінантної GST-MLK3<sub>KD</sub> клітини Sf21 при щільності 1,5×10<sup>6</sup>клітин/мл доповненого середовища Грейса, що містить 5% FBS, інфікували MOI 2 і збирали через 41 годину після зараження. У обох випадках осад клітин ресуспендували в буфері, що містить 10мМ HEPES, 50мМ NaCl, 0,5мМ Pefabloc SC, 5мкМ пепстатину, 10мкг/мл апротиніну, 10мкг/мл лейпептину, pH 7,4. Надосадовий розчин, одержаний після центрифугування протягом 1 години при 147000 x g, повторно доводили до pH 7,4 за допомогою 3М основного трису і потім перед очищенням зберігали при -70°C.

Приклад 24: Очищення бакуловірусної GST-MLK3<sub>KD</sub>

Частково очищену бакуловірусну GST-MLK3<sub>KD</sub> одержували з допомогою глутатіон-специфічної афінної хроматографії. До 10мл екстракту клітин (26,6мг сумарного білка) додавали 1мл смоли глутатіон-сефарози 4B (Pharmacia) урівноваженої в 10мМ HEPES, 150мМ NaCl, pH 7,4 (буфер С), і білку давали можливість зв'язатися протягом 45хв. при 4°C. Потім смолу промивали в колонці буфером С, об'ємом, рівним 30 об'ємам колонки, потім елюювали буфером С, що містить 20мМ глутатіону, об'ємом, рівним 5 об'ємам колонки. Об'єднаний кінцевий продукт діалізували протягом ночі проти буфера С і зберігали в аліквотних пробах при -70°C.

Приклад 25: Очищення бакуловірусної FLAG-MLK3

Частково очищену бакуловірусну FLAG-MLK3 одержували за допомогою антитіло-специфічної афінної хроматографії. Білок з 15мл екстракту (19,5мг сумарного білка) з доданням 0,1М NaCl зв'язували на 0,25мл колонці з моноклональним антитілом M2 проти пептиду FLAG, зв'язаним з агарозною смолою (Sigma), внаслідок багаторазових завантажень (усього три рази). Перед хроматографією смолу заздалегідь врівноважували промиванням 5 колонковими об'ємами 50мМ трис-HCl, 150мМ NaCl, pH 7,4 (TBS), промиванням 3 колонковими об'ємами 0,1М гліцину, pH 3,5, після чого ще одним промиванням 5 колонковими об'ємами TBS. Рекомбінантний білок спочатку елюювали 5 колонковими об'ємами 0,2мМ FLAG пептиду (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (SEQ ID NO:18) в TBS. Білок зберігали в аліквотних пробах при -80°C до аналізу.

Приклад 26: Домінантний негативний мутант: доміантний негативний мутант сімейства MLK блокує загибель диференційованих клітин PC12, викликану видаленням фактора росту нервів

Лінію клітин PC-12, одержану з пухлини феохромоцитом пацюків, широко використали як моделі нервових клітин для вивчення молекулярних подій, що приводять до загибелі нейронів [для огляду, дивись Troy, et al., Adv. Neurology, 1997, 103-111]. Фактор росту нервів (NGF) індукує клітини PC-12 до

диференціювання в клітини з фенотипом симпатичних нейронів [Greene, Cell Biol., 1978, 78, 747-755]. Вживаність диференційованих під дією NGF клітин PC-12 залежить від NGF, і вони зазнають морфологічно описаної апоптозної загибелі при видаленні NGF з культурального середовища. Була розроблена клітинна система для визначення впливу представників сімейства кіназ змішаних ліній на загибель клітин PC-12 внаслідок видалення NGF. Клітини PC-12 трансфекували кДНК, що кодує домінуючий негативний (DN) мутант MLK-3, використовуючи систему перенесення на основі ліпідів Pfx, як рекомендовано виготовлювачем [Invitrogen, Carlsbad, CA]. Стабільний пул трансфектантів, експресуючих DN-MLK-3 відбирали, використовуючи сульфат G418 [Mediatech Inc., Herndon, VA]. Приблизно 30% клітин в цих пулах експресують DN-MLK3, як було визначено з допомогою імуногістохімії. Пули клітин, стабільно експресуючих мутантну кіназу, висівали на покриті поліорнітином/ламініном (10мкг/мл кожного в фосфатно-сольовому буфері) планшети 96-лункової форми для культур тканин при щільності  $2 \times 10^4$  клітин/лунка, і обробляли 100нг/мл NGF протягом 7 днів. Середовище, що містить NGF, видаляли, моношари клітин промивали фосфатно-сольовим буфером, і на 1-5 днів вносили в середовище, що містить антитіла, нейтралізуючі NGF [номер за каталогом 6655; Sigma, St. Louis, MO] в кінцевому розведенні 1:1000. Вживаність клітин визначали кількісно за допомогою аналізу виживаності клітин на основі перетворення солі тетразолію, MTS, в забарвлений формазан, який реєстрували за поглинанням при 570нм на CytoFluor 2350 [Millipore, Bedford, MA] як рекомендовано виготовлювачем [Promega, Madison, WI]. Пули стабільно експресуючі DN-MLK-3 частково були врятовані від загибелі клітин, викликаної видаленням NGF (Фігура 10).

Приклад 27: Аналіз ензиматичної активності рекомбінантного MLK білка

Щоб показати, що MLK білок, експресований або в бакуловірській, або в бактерійній системі експресії, є ензиматично активним білком, може бути використано декілька видів аналізу. MLK білок може бути повнорозмірною конструкцією або кіназним доменом, експресованими або в бакуловірській, або в бактерійній системі експресії. Аналіз може бути заснований на антитілах, наприклад твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA), флюоресценція з тимчасовим дозволом (TRF), або поляризація флюоресценції (FP). Антитілом може бути моноклональне або поліклональне антитіло, реактивне проти фосфосерину, фосфотreonіну або фосфорилюваного специфічного субстрату. У альтернативному випадку може бути використаний метод, не заснований на антитілах, такий як аналіз радіоактивності в гелі (дивись Фігуру 11), множинний скринінговий аналіз на основі преципітації трихлороцтовою кислотою (TXO) (Фігура 13), виявлення схожості при сцинтиляційному аналізі (SPA), спосіб скринінгу з використанням flashplate, або різновид аналізу на нітроцелюлозних фільтрах (Фігура 13).

Метою аналізу може бути контроль безпосереднього фосфорилювання субстрату або зв'язаної системи, що аналізується, що використовує кінази сигнального шляху нижче за течією. Субстрат може бути специфічним субстратом, таким як SEK-1, або відносно неспецифічним субстратом, таким як основний білок мієліну (МБР).

Приклад 28: Аналіз кіназ:

(1) Аналіз кіназ на основі вимірювання радіоактивності в гелі.

Кіназну активність MLK-3 досліджували, контролюючи включення  $^{32}\text{P}$  з  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  в субстрат MLK (наприклад, «мертву» кіназу SEK-1; основний білок мієліну). 50мкл суміші для аналізу містила буфер А (20мМ MOPS, pH 7,2, 25мМ  $\beta$ -гліцеринфосфату, 5мМ EGTA, 1мМ ортованадату натрію, 1мМ дитіотреїтолу), 15мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100мкМ ATP, 10мккюри  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ , і 0,1мкг субстрату - «мертвої» кінази SEK-1 (Stressgen, Inc; зв'язану з глутатіон-S-трансферазою SEK-1 (GST-SEK-1) вивільняли з глутатіон-агарозних кульок з допомогою 10мМ глутатіону, pH 8,0 або 25мкг MBP (Sigma Chemical Co.). Реакцію ініціювали додаванням MLK білка (кіназний домен або препарат, що містить як повнорозмірний білок, так і кіназний домен) або контрольного білка. Суміш інкубували протягом 30хв. при 30°C. У кінці реакції додавали 2х поновлюючих буфери для зразка. Суміш кип'ятили протягом 5хв., наносили або на 12% SDS-ПААГ гель (при використанні як субстрату MBP) або на 8% гель (при використанні як субстрату SEK-1). Після електрофорезу гель сушили. Кількісне визначення включення фосфату в субстрат, SEK-1, виконували на приладі для реєстрації динаміки молекулярного фосфорилювання (Molecular Dynamics Phosphorimager, Sunnyvale, CA). Результати експериментів, призначених для того, щоб показати ензиматичні активності, експресованої бакуловірусами MLK-3 (мічена FLAG повнорозмірна, або мічений GST кіназний домен) з використанням як субстрату «мертвої» кінази GST-SEK-1 або MBP, показані на Фігурах 11А і 11В.

(2) Вестерн-блот аналіз.

Кіназну активність експресованої бакуловірусами MLK-3 оцінювали за допомогою імуноблот аналізу. Суміш для аналізу об'ємом 20мкл містила буфер А, 15мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100мкМ ATP, і 0,1мкг субстрату - «мертвої» кінази SEK-1. Реакції дозволяли продовжуватися протягом 30хв. при 30°C, потім гасили 10мкл 4х поновлюючого буферу для зразків. Білки розділяли в 8% трисгліциновому гелі, і з допомогою електрофорезу переносили на мембрану Immobilon PVDF. Мембрану інкубували з антитілом, специфічним, для фосфорилюваного SEK-1 (Thr223) (New England Biolabs, Inc.), після чого з міченим пероксидазою хрину антикролячим IgG кози (Bio-Rad). Реєстрацію імунореактивних смуг виконували за допомогою посиленої хемілюмінесценції (Amersham). Фосфорилювання «мертвої» кінази GST-SEK-1 білком FLAG-MLK-3 (бакуловірський препарат, що містить як повнорозмірний білок, так і кіназний домен) показано на Фігурі 12.

(3) Множинний скринінговий аналіз на основі преципітації трихлороцтовою кислотою (TXO).

Кіназну активність кіназного домену GST-MLK-3, експресованого бактеріями, оцінювали з використанням множинного скринінгового аналізу «в планшетах» Millipore з трихлороцтовою кислотою (TXO), який описаний [Pitt, et al., J. Biomol. Screening, 1996, 1, 47-51]. Аналізи виконували в 96-лункових планшетах Durapore для множинного скринінгу (Millipore). Кожна суміш для аналізу, об'ємом 50мкл, містила 20мМ Hepes, pH 7,4, 20мМ  $\text{MgCl}_2$ , 20мМ  $\text{MnCl}_2$ , 2мМ ДТТ, 0,1мМ  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , 1мккюри  $[\gamma\text{-P}^{32}]$  ATP і 30мкг МБР субстрату. Реакцію ініціювали додаванням MLK білка і дозволяли продовжуватися протягом 15хв. при 37°C. Реакцію зупиняли 25мкл 50% TXO. Планшети залишали для встановлення рівноваги на 30хв. при 4°C, потім промивали крижаною 25% TXO. У планшети додавали сцинтиляційну суміш, і радіоактивність визначали, використовуючи сцинтиляційний лічильник Wallac MicroBeta 1450 PLUS. Залежність утворення  $^{32}\text{P}$ -міченого МБР від дози білка показана на Фігурі 13.

#### (4) Аналіз на фосфоцелюлозних фільтрах.

Аналіз кінази виконували в 50мкл реакційній суміші, що містить 20мМ Hepes, pH 7,4, 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 20мМ MnCl<sub>2</sub>, 2мМ ДТТ, 0,1мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мккюри [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] АТФ і 30мкг МБР. Реакцію ініціювали додаванням MLK білка і дозволяли продовжуватися протягом 15хв. при 37°C. Реакцію зупиняли 75мкл 75мМ фосфornoї кислоти. Аліквоти погашеного розчину наносили безпосередньо на фосфоцелюлозну мембрану (Pierce). У альтернативному випадку можуть бути використані 96-лункові фосфоцелюлозні планшети для множинного скринінгу (Millipore). Мембрани промивали 75мМ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Зв'язаний <sup>32</sup>P-мічений фосфорилований МБР елюювали в пробірки для збору додаванням 1М гідроокису натрію. Радіоактивність визначали методом рахунку Чоренкова в сцинтиляційному лічильнику Beckman (Somerset, NJ). Утворення фосфорилизованого МБР із збільшенням концентрації, експресованого бактеріями кіназного домену GST-MLK-3 показано на Фігурі 13.

Приклад 29: Аналіз з метою визначення скріплення сполук з рекомбінантними білками сімейства MLK

K-252a (сполуки III-3; дивись таблицю 4), метаболіт індокарбазолу видів *Nocardia*, зв'язується з різними серин/треоніновими і тирозіновими кіназами [Angeles, et al., Anal. Biochem., 1996, 236, 49-55; Knight, et al., Anal. Biochem., 1997, 247, 376-381]. Мічений тритієм K-252a ліганд був використаний для оцінки скріплення з повнорозмірною рекомбінантною MLK-3 людини з неочищеного препарату інфікованих бакуловірусами клітин. [<sup>3</sup>H]K-252a специфічно мітили тритієм в 3 і 9 положеннях, завдяки контракту з NEN Research products (Billerica, MA), і він мав питому активність 40кюри/ммоль. Реакцію скріплення проводили в 1мл в 96-лунковому планшеті. Реакційна суміш містила 50мМ буфера MOPS, pH 7, 150мМ NaCl, 5мМ MnCl<sub>2</sub>, 1мг/мл БСА, 1% ДМСО і 0,25нМ [<sup>3</sup>H]K252a. Зразки готували в трьох повторях при концентрації 5мкг/мл неочищеної одержаної на основі бакуловірусів MLK-3. Неспецифічне скріплення визначали за скріпленням в присутності не міченого 1,2мкМ K252a, і віднімали з сумарного скріплення, щоб одержати специфічне скріплення. При такому розведенні 12-15% загальної кількості імпульсів було неспецифічно зв'язані з білком, і 75-85% цих імпульсів були специфічно зв'язані з MLK-3 (Фігура 14). Всі експерименти виконували протягом 2 годин при 4°C. Комплекси [<sup>3</sup>H]K252a/MLK-3 збирали на фільтри Whatman GF/C, використовуючи складальник Brandel, промивали холодним MOPS/NaCl буфером і рахували в бета - лічильнику Wallac Micro. Проводили експеримент за насиченням скріплення, щоб одержати K<sub>d</sub> для K252a. Показаний зразковий результат одного з таких експериментів (Фігура 14). Було отримане значення K<sub>d</sub> рівне 0,89нМ (кордону довірливого інтервалу: від 0,2 до 1,5нМ).

Приклад 30: Аналіз інтактних клітин

(A) Система понадекспресії Cos 7.

Матеріали.

K-252a і похідні цієї сполуки були надані [Kyowa-Hakko Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) (Kaneko et al., 1997)]. Сполуки розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО), за рівнем якості, призначеної для культур клітин, і зберігали в темряві при 4°C. Всі розведення сполук проводили в середовищі Ігла модифікації Дульбекко (DMEM), що містить 1% бичачого сировоточного альбуміну. Гемаглютининові (HA) антитіла були придбані в BabCO (Richmond, CA). AP-1 (c-jun) субстрат був придбаний в Promega (Madison, WI). [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ (6000кюри/ммоль) придбали в Amersham (Arlington Heights, IL).

Культура клітин Cos7.

Клітини нирки зеленої мавпи Cos7 одержували з ATCC, Rockville, Maryland (CRL 1651) і підтримували в DMEM, що містить 10% бичачої сироватки, 2мМ глутаміну, 1мМ ттірувату. 500од/мл пеніциліну/стрептоміцину при 37°C в атмосфері з 10% CO<sub>2</sub>, 90% повітря. Клітини Cos7 відділяли для пересівання додаванням 0,25% трипсину.

(1) Понадекспресія представників MLK сімейства і JNK1 в клітинах Cos7.

Клітини Cos7 пасирували при 80% конфлюентності, і трансфекували 2мкг кожної з конструкцій кДНК, використовуючи ліпофектамін, як рекомендовано постачальником [Gibco BRL, Gaithersburg, MD]. Повнорозмірна кДНК MLK-3, MLK-2 людини або DLK миші, або неповна кДНК MLK-1 людини, які описані вище, і повнорозмірна кДНК міченої гемаглютиніном А JNK1 людини, люб'язно надана J. Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD), були субклоновані в векторі pcDNA3 (Invitrogene, San Diego, CA). Через 48 годин після трансфекції клітини обробляли 0,025% ДМСО або 500нМ вказаних сполук протягом 2 годин, після чого лізували в 0,4мл буфера з тритоном (1% тритон X-100, 50мМ хлорид натрію, 10мМ трис (pH 7,6), 0,1% бичачий сировоточний альбумін, 30мкМ пірофосфат натрію, 50мМ фторид натрію, 20мкг/мл апротиніну, 1мМ фенілметилсульфонілфторид, 1мМ ванадат натрію). Активність JNK лізату аналізували за допомогою імунопреципітації/кіназного аналізу, як описано нижче.

(2) Імунопреципітація і кіназний аналіз на цілих клітинах.

У лізаті клітин Cos7 вимірювали концентрацію білка, використовуючи набір Micro BCA Pierce (Rockford, IL), і рівні кількості білка піддавали імунопреципітації з HA антитілами протягом 1 години при 4°C. Імунопреципітати осаджали шляхом центрифугування в мікроцентрифузі протягом 20сек. або ресуспендували в тритоновому буфері, промивали центрифугуванням ще 2 рази, після чого робили останнє промивання в кіназному буфері (20мМ Hepes, pH 7,4, 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ дитіотреїтол, 0,1мМ ванадат натрію). Імунопреципітат ресуспендували в кіназному буфері, що містить 1мкМ АТФ і 5 мккюри [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ і субстрату (1мкг/зразок AP-1) і інкубували протягом 15хв. при 30°C. Кіназну реакцію зупиняли додаванням поновлюючого буфера для зразка (Laemmli, Nature 1970: 227; 680-685). Зразки нагрівали до 80°C протягом 5хв. і наносили на 10% SDS-поліакриламідні гелі. Білки розділяли за допомогою електрофорезу. Гель сушили, і кількісне визначення радіоактивності в AP-1 субстраті проводили на приладі для реєстрації динаміки молекулярного фосфорилювання (Sunnyvale, CA). Результати експериментів, в яких MLK-3, MLK-2 і DLK експресувалися спільно з HA-JNK1 і були інкубовані при відсутності або в присутності сполуки K-252a показані на Фігурах 15A і 15B. Навпаки, похідне початкової сполуки K-252a, назване сполукою III-3 (дивись таблицю 4), яка є більш виборчим інгібітором кінази, не впливала на JNK шлях, що активується іншим, ніж JNK, MEKK1 MAPKKK вище за течією, (Фігура 15C).

(B) Аналіз JNK, активованої MLK, в цілих клітинах з використанням, репортера.

Спроби одержання клонів, конститутивно експресуючих сімейство MLK, виявилися невдалими, що

свідчить про те, що понадекспресія MLK може впливати на виживаність клітин [Bergeron et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 231, 153-155; Nagata, et al., EMBO J., 1998, 17, 149-158]. Тому при розробці аналізу на цілих клітинах для стеження за біохімічними подіями, що індукуються MLK, може бути необхідна лінія клітин, що містить одержану генно-інженерним шляхом систему експресії, яка індукується, цікавлячої кінази. Наприклад, лінія клітин PC-12, трансфікована регульованим тетрацикліном трансактиватором. У тому випадку, коли надалі клітини трансфікують цікавлячим геном, керованим промотором, що індукується *teto*, експресія цього гена безпосередньо контролюється тетрацикліном в середовищі [Shockett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 6522].

Щоб кількісно оцінити активацію MLK, можна виміряти фосфорилювання розташованих нижче за течією субстратів, таких як MEK4, JNK або c-jun за допомогою багатьох видів аналізу, які описані вище. Іншим підходом до кількісної оцінки активації MLK в цілих клітинах є використання активності репортерного ферменту, такого як c-jun - люциферазна репортерна система, доступна для придбання завдяки Path-Detect™ системі (Stratagene, LaJolla, CA). У цій системі лінія клітин, що індукується тетрацикліном трансфікується двома плазмідами. Одна плазміда конститутивно експресує NH<sub>2</sub>-кінцевий трансактивуючий домен cJun, злитий з ДНК-зв'язуючим доменом GAL4 дріжджів (cJun-DBD гібридний білок). Інша плазміда несе кодуючі послідовності люцифери світляка, керовані п'ятьма тандемними повторами сайта скріплення GAL4. При активації MLK розташований нижче за течією субстрат JNK, cJun-DBD гібридний білок, фосфорилюється, зв'язується з сайтами скріплення GAL4 і індукує транскрипцію гена люцифери. Люциферазу легко аналізувати в лізатах клітин шляхом додавання її субстрату (Promega, Madison, WI) і вимірювання хемілюмінесценції.

Приклад 31: Зв'язок інгібування представників сімейства MLK і виживаності мотонейронів і кортикальних нейронів

Виживаність культур спинного мозку пацюків, збагачених мотонейронами.

Розкривали спинний мозок ембріонів пацюків Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) в ембріональному віці (E) 14,5-15. Клітини тільки з вентральної частини спинного мозку дисоціювали, і потім збагачували мотонейронами шляхом центрифугування на 6,5% ступінчастому градієнті метризаміду, як описано раніше [Henderson, et al., 1993], і аналізували їх чистоту шляхом фарбування антитілом проти рецептора нейротрофіну з низькою спорідненістю (IgG-192, Boehringer-Mannheim) (дані не показані). Клітини висівали в 96-лункові планшети, заздалегідь покриті полі-1-орнітином і ламініном (5мкг/мл кожного) при щільності  $6 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup> в хімічно певному безсировоточному середовищі N<sub>2</sub> [Bottenstein, et. al., 1979, вище]. Щоб розділити вплив на прикріплення і виживаність, додавання сполук до культур проводили після початкового періоду прикріплення тривалістю 1-3 години. Виживаність нейронів визначали через 4 дні, використовуючи кальцеїн АМ (Molecular Probes, Eugene, OR) при флуориметричному аналізі виживаності [Bozyczko-Cooyne, et al., 1993, вище]. Підрахування нейронів за допомогою мікроскопа прямо корелював з відносними значеннями флуоресценції. Коротко, культуральне середовище серійно розводили в DPBS (фосфатно-сольовий буфер Дульбекко) і потім в кожну з 96 лунок додавали маточний розчин кальцеїну АМ до кінцевої концентрації 6мкМ. Планшети інкубували протягом 30хв. при 37°C, з подальшими промиваннями серійного розведення в DPBS. Сигнал флуоресценції реєстрували, використовуючи зчитуючий планшет флуориметр Millipore (Cytofluor 2350) при довжині хвилі збудження =485нм і емісії =538нм. Для кожного планшета середнє фонове значення, одержане для лунки, в яку вводили кальцеїн АМ, але в яких не було клітин, віднімали від усіх значень. У цих експериментах контролювали лінійність сигналу флуоресценції для концентрації і час інкубації для певних меж щільності клітин. Приклад виживаності мотонейронів, вираженої в відсотках від контролю, в присутності 250нМ сполук, що тестуються показаний в таблиці 3. Виживаність кортикальних нейронів.

Кору головного мозку плоду пацюків розтинали на 18 ембріональний день і переварювали ферментом, щоб одержати суспензію окремих клітин. Клітини висівали при щільності  $1,56 \times 10^5$ /см<sup>2</sup> в покриті полі-орнітином/ламініном 96-лункові планшети для культур тканин в безсировоточному основному середовищі для нейронів (Neural Basal Medium), що містить B27 добавки. Планшети покривали розчином полі-орнітину/ламініну (8мкг/мл кожного), приготованого в PBS, протягом, щонайменше, 2 годин при 37°C. На 5-7 день культивування *in vitro* кортикальні нейрони піддавали впливу Ab25-35 (20мкМ) або в присутності, або у відсутності сполук, що тестуються. Маточні розчини Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) (і мМ) готували в деіонізованій дистильованій стерильній H-20. Відносно виживаність нейронів визначали через 48 годин після додавання пептиду, використовуючи вивільнення лактатдегідрогенази (LDH) як показника цілісності плазматичної мембрани/виживаності клітин. LDH вимірювали, використовуючи набір для реєстрації цитотоксичності (Boehringer-Marmheim, Indianapolis, IN) відповідно до інструкцій виготовлювача. Дані виражали у вигляді відсотка інгібування вивільнення LDH відносно культур, оброблених тільки одним Ab25-35.

Таблиця 3

	Кортикальні нейрони	Мотонейрони		Cos-7 клітини	Cos-7 клітини	Cos-7 клітини	Cos-7 клітини
Формула	Виживаність % від контролю при 250 нМ	Виживаність % від контролю при 250нМ	%JNK інгіб. при 500нМ	DLK %JNK інгіб.@ 500нМ	MLK-3 %JNK інгіб.@ 500нМ	MLK-2 %JNK інгіб.@ 500нМ	MLK-1 %JNK інгіб.@ 500нМ
III <sup>1</sup>	46,56	300%	65%	63,73	99,98	89,67	97,96
III <sup>2</sup>	47,80	315%	88%	36,22, 42	94,94	69,44	92,64
I <sup>3</sup>	22,54	177%	88%	20,25	94,93	0	79,29
I <sup>4</sup>	29,39	165%	97%	58,13, 52,8	84,92, 90	0	63,38

<sup>1</sup>Сполука має формулу III, де Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> являють собою H; X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; і R означає OH.

<sup>2</sup>Сполука має формулу III, де Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H; X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> означають CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; і R означає OH.

<sup>3</sup>Сполука має формулу I, де A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> і R<sub>6</sub> є H; B<sub>1</sub> і B<sub>2</sub> разом являють собою O; R<sub>2</sub> є CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OAc; R<sub>4</sub> означає CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (2-піридил); і X означає CH<sub>2</sub>.

<sup>4</sup>Сполука має формулу I, де A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> і R<sub>6</sub> є H; B<sub>1</sub> і B<sub>2</sub> разом являють собою O; R<sub>2</sub> є H; R<sub>2</sub> означає CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> (2-піримідиніл); і X означає CH<sub>2</sub>.

Приклад 32: Імунопреципітація ендогенної активності JNK культур мотонейронів при відсутності або в присутності індолокарбазолів або конденсованих піролокарбазолів

Очищені мотонейрони висівали при щільності  $6 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup> на лунку діаметром 16мм. Клітинам перед обробкою давали можливість прикріпитися протягом 2 годин. Клітини обробляли або 0,0125% ДМСО, або 500нМ сполуки протягом 2 годин в певному середовищі N<sub>2</sub>. Потім клітини промивали крижаним фосфатно-сольовим буфером, після чого лізували в 0,4мл буфера з тритоном, як описано вище в прикладі 30. Лізат культур мотонейронів нормували за кількістю клітин і імунопреципітували за допомогою антитіла JNK1 (номер за каталогом sc-474), придбаного від Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). JNK активність імунопреципітатів аналізували в присутності <sup>32</sup>P-АТФ і субстрату c-jun, як описано вище. Профіль інгібувальної активності 4 сполук, що тестуються порівнювали в мотонейронах і клітинах Cos7, понадекспресуючих або DLK, MLK-1, MLK-2, або MLK-3 (таблиця 3).

Приклад 33: Кореляція між інгібуванням MLK3-індукованої активності JNK в клітинах Cos7 і холінацетил-трансферазною активністю в первинних ембріональних культурах

Щоб визначити, чи існує кореляція між інгібуванням JNK шляху, регульованого цими кіназами, з нейротрофічними сполуками, автори оцінили вплив сполук на активність JNK в клітинах Cos7, понадекспресуючих HA-JNK і MLK3. Після 48 годинного періоду трансфекції клітини інкубували із сполуками в концентрації 500нМ протягом 2 годин, після чого клітини лізували. Лізат імунопреципітували, і вимірювали кіназну активність як описано раніше. Результати представлені у вигляді відсотка інгібування відносно контрольного зразка, причому контролем є активність JNK в присутності ДМСО. Як можна побачити в таблиці 4, більшість сполук, які були активними відносно ХАТНН активності в спинному мозку і/або базальних відділах переднього мозку, були потенційними інгібіторами активації JNK за допомогою MLK-3.

Таблиця 4

Вплив індоло- і інденокарбазолів на активність JNK в клітинах Cos7, понадекспресуючих MLK3

Сполука	Активність холінацетилтрансферази		% Інгібування активності JNK (середнє значення)
	Спинний мозок	Базальні відділи переднього мозку	MLK3 в клітинах Cos7
III-1 <sup>1</sup>	+	4-	84
III-2 <sup>2</sup>	+	+	96
III-3 <sup>3</sup>	+	+	94
I-1 <sup>4</sup>	+	+	93
I-2 <sup>b</sup>	+	+	85
I-3 <sup>b</sup>	+	+	93,5
I-4 <sup>c</sup>	-	+	95
I-5 <sup>8</sup>	-	+	97
I-6 <sup>9</sup>	-	+	58
I-7 <sup>10</sup>	-	+	85,5
III-4 <sup>11</sup>	-	+	66
III-5 <sup>12</sup>	-	+	96
III-7 <sup>13</sup>	-	+	54
I-8 <sup>14</sup>	+	-	89
III-8 <sup>15</sup>	+	-	94
III-9 <sup>16</sup>	+	+	98/5
III-10 <sup>17</sup>	+	-	78
I-9 <sup>18</sup>	+	-	88
I-10 <sup>19</sup>	4-	-	94
III-11 <sup>20</sup>	-	-	92,5
I-II <sup>21</sup>	-	+	33
I-12 <sup>22</sup>	-	-	11
I-13 <sup>23</sup>	-	-	1

<sup>1</sup>Сполука, що має формулу III, де Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> означає NHCONHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; R<sub>2</sub> означає CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(2-піридил); і R означає OH.

<sup>2</sup>Сполука, що має формулу III, де Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> означають CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; і R означає OH.

<sup>3</sup>Сполука, що має формулу III, де Z<sub>1</sub> і Z<sub>2</sub> є H, X означає CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sub>1</sub> і R<sub>2</sub> означають CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; і R означає OH.

<sup>4</sup>Сполука, що має формулу I, де A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> і R<sub>4</sub> є H; B<sub>1</sub> і B<sub>2</sub> разом являють собою O; R<sub>2</sub> означає CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; R<sub>5</sub> і R<sub>6</sub> означають OCH<sub>3</sub>; і X означає CH<sub>2</sub>.

<sup>5</sup>Сполука, що має формулу I, де A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub> і R<sub>6</sub> є H; B<sub>1</sub> і B<sub>2</sub> разом являють собою O; R<sub>2</sub> означає

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ ; R, i є Br; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>6</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$ ;  $R_4$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  (2-піридил); i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>7</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>8</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_3$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>9</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O; i X означає S.

<sup>10</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}(4-(\text{OH})\text{Ph})$ ; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>11</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1, Z_2, R_1$  i  $R_2$  є H; X означає  $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>12</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1, Z_2$  i  $R_1$  є H;  $R_2$  означає  $\text{CH}_2\text{OH}$ ; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>13</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1$  i  $Z_2$  разом утворюють  $=\text{O}$ ;  $R_1$  i  $R_2$  є Br; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>14</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає H;  $R_4$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  (2-піримідиніл); i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>15</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1$  i  $Z_2$  є H;  $R_1$  є Br;  $R_2$  є I; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>16</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1, Z_2, R_1$  i  $R_2$  є H; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>17</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1$  i  $Z_2$  є H;  $R_1$  i  $R_2$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає OH.

<sup>18</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_4$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  (2-піридазиніл); i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>19</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає H;  $R_4$  означає  $\text{CH}_2\text{CH}_3$  (2-піридил); i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>20</sup>Сполука, що має формулу III, де  $Z_1, Z_2, R_1$  i  $R_2$  є H; X означає  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ; i R означає  $\text{OCH}_3$ .

<sup>21</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  означає  $(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C(=O)-3,5-дигідроксифеніл}$ ; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>22</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_2$  є бензоїлом; i X означає  $\text{CH}_2$ .

<sup>23</sup>Сполука, що має формулу I, де  $A_1, A_2, R_1, R_3, R_5$  i  $R_6$  є H;  $B_1$  i  $B_2$  разом являють собою O;  $R_4$  означає  $\text{CH=CH-C=N}$ ; i X означає  $\text{CH}_2$ .

#### Приклад 34: Аналіз активації MLK за зміною рухливості в гелі:

Активация MLK може приводити до індукції транскрипції c-jun, і в результаті до збільшення кількості білка c-Jun. Збільшена кількість білка c-Jun може бути виміряна за допомогою стандартного аналізу, відомого як аналіз зміни рухливості в гелі. Робота [Garner, et al., Nucleic Acids Res., 1981, 9, 3047-3060], яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Радіоактивно мічені олігомери двониткової ДНК, які кодують ДНК-зв'язуючий сайт c-Jun, інкубують з екстрактом клітинних ядер, після чого проводять електрофорез в акриламідному гелі, і кількісно оцінюють радіоактивно мічену ДНК, смуги якої зсунені у бік більш повільної рухливості. Ця ДНК являє собою частину ДНК, яка зв'язана з білком c-Jun, і її кількість прямо пропорційна кількості білка c-Jun в екстракті.

Активация MLK також може індукувати фосфорилувані c-Jun. Це можна виявити, використовуючи антитіла, які специфічно пізнають фосфорилувану форму білка в таких системах детекції, як, наприклад, Вестерн блот або ELISA.

#### Приклад 35: Виживаність нейронів ембріонів курчат

##### Матеріали

Середовища Лейбовіца L15, глюкоза, бікарбонат натрію, трипсин і антибіотики були від Gibco. М'язовий екстракт був приготований як описано [Henderson, et al., Nature, 1983, 302, 609-611, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Всі інші реактиви були від фірми Sigma, якщо не обумовлено особливо.

##### Культура клітин

Мотонейрони (5,5 ембріональний день) були виділені імунологічним методом відповідно до процедури, представленої в роботі [Bloch-Gallego, et al., Development, 1991, 111, 221-232], яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі, з модифікаціями, описаними в роботі [Weng, et al., NeuroReport, 1996, 1, 1077-1081], яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Очищені мотонейрони висівали в чашки для культур тканин діаметром 35мм (Nunc), заздалегідь покриті полі-DL-орнітином і ламініном (1мкг/мл. Upstate Biotech). Була використана культуральне середовище L15 з бікарбонатом натрію (22,5мМ), глюкозою (20мМ), прогестероном ( $2 \times 10^{-8}$ М), селенітом натрію ( $3 \times 10^{-8}$ М), кональбаїном (0,1мг/мл), інсуліном (5мкг/мл), пеніциліном-стрептоміцином, і 10% інактивованої нагріванням сироватки коня. М'язовий екстракт додавали до концентрації 30мкг/мл. Сполуку III-3 готували у вигляді 4мМ маточного розчину в ДМСО і зберігали в захищеному від світла місці при 4°C. Кінцева концентрація ДМСО в культурах, що обробляються і контрольних культурах становила 0,125%.

Паравертебральні симпатичні ганглії (SG; 12 ембріональний день (E12)), ганглії дорсальних корінців (DRG; E9) і циліарні ганглії (CG; E8) вирізали з ембріонів пацюків у вказані дні ембріонального розвитку, як описано в роботі [Lyndsey, et al., Dev. Biol., 1985, 112, 319-328], яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі. Після обробки трипсином і дисоціації суспензії нервових клітин висівали в покриті поліорнітином-ламініном чашки для культивування в культуральне середовище Хама F14 з доданням 10% сироватки коня. Відразу ж після посіву додавали фактори виживання в наступних концентраціях: фактор росту нервів (NGF), 20нг/мл; циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), 10нг/мл. Культури зберігали при 37°C і 5%  $\text{CO}_2$  в зволоженому навколишньому середовищі.

##### Підрахунок клітин

Нейрони висівали в чашки для культивування діаметром 35мм з нанесеною сіткою (Nunc). Вибрані

площі кожної чашки, що складають приблизно 10% поверхні, сканували з метою виявлення присутності яскравих при фазово-контрастній мікроскопії клітин відразу після посіву і ще раз через 48 годин, щоб оцінити виживаність в відсотках. Виживаність клітин підтверджували вітальним фарбуванням трипановим синім (не показано).

#### Інтактні DRG

Ганглії висівали в 96-лункові планшети, заздалегідь покриті полі- $\gamma$ -орнітином і ламініном (5мкг кожних/мл фосфатно-сольового буфера) в безсировоточному середовищі N2 [Bottenstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 514-517, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі], що містить 0,05% бичачого сировоточного атібуміну (BCA). і підтримували протягом 48 годин при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> в зволоженому навколишньому середовищі. Ганглії, що обробляються одержували впливом або 250nM сполуки III-3, або 20нг/мл NGF через 2 години після посіву.

Сполука III-3 сприяє виживаності периферичних нейронів ембріонів курчат залежно від концентрації.

Видалення NGF з культур дисоційованих чутливих нейронів гангліїв дорсальних корінців E9 (DRG) і нейронів симпатичних гангліїв E12 (SG) приводило до того, що вони зазнавали PCD (запрограмована загибель клітин) протягом 48 годин. Цього запобігали додаванням сполуки III-3 в культуральне середовище під час видалення NGF. При концентрації. 1мкМ сполука III-3 зберігала 94% живих SG нейронів і 89% живих DRG нейронів через 48 годин (в обробленому NGF контролі: SG 65%; DRG 66%). Схожим чином сполука III-3 сприяла виживанню 76% залежних від CNTF нейронів циліарних гангліїв (CG) через 24 годин (в CNTF-обробленому контролі 67%). При присутності 10% сироватки вплив сполуки III-3 на виживаність залежав від концентрації, при цьому плато досягалося приблизно при 1мкМ для всіх трьох популяцій нейронів (Фіг.16A-C). У нейронів, що вижили виявляли широке розростання нейритів, при цьому нейрити були більш товстими і зігненими, в порівнянні з контрольними культурами (Фіг.17E-H). Через чотири дні стимулююча виживаність активність ще зберігалася без зміни: DRG: сполука III-3 52%, оброблена фактором росту контроль 41%; SG: сполука III-3 83%, NGF-оброблений контроль 55%; CG: сполука III-3 58%, CNTF-оброблений контроль 50%. При оптимальних умовах культури можуть підтримуватися із сполукою III-3 протягом одного тижня і довше (не показано).

Сполука III-3 сприяє виживаності ембріональних мотонейронів курчат залежно від концентрації.

Мотонейрони курчат, що культивуються можуть зберігатися і продовжувати розвиватися в присутності м'язового екстракту, тоді як при відсутності екстракту вони швидко гинуть. У експериментах авторів через 48 годин в присутності м'язового екстракту виживало 65% мотонейронів, проти 14% в необробленому контролі. У умовах відсутності сироватки максимальний ефект сполуки III-3 був при 300nM, і він був трохи вищим за (79%), ніж ефект, що індукується м'язовим екстрактом. Концентраційна залежність впливу сполуки III-3 на виживаність в цій системі відрізняється від такої для периферичних нейронів, оскільки концентрації сполуки III-3 вищі за 300nM надавали поступову понижувальну дію (Фіг.16A). Це могло свідчити про особливу чутливість мотонейронів до однієї з сторін активності сполуки III-3. Морфологічно мотонейрони, врятовані за допомогою сполуки III-3, виглядали яскравими клітинними тільцями при фачотному контрасті, і були платні розповсюджувати довгі нейрити, які виглядали трохи товстішими, ніж нейрити, індуковані м'язовим екстрактом (Фіг.17). Після чотирьох днів культивування 56% мотонейронів виживали в присутності сполуки III-3, в порівнянні з 42% в присутності м'язового екстракту. При 300nM оброблені сполукою III нейрони виживали *in vitro*, щонайменше, тиждень (не показано).

Сполука III-3 стимулює відростання нейритів від інтактних гангліїв дорсальних корінців.

Результати описаних вище експериментів свідчать про те, що сполука III-3 не тільки підвищує виживаність ембріональних нейронів периферичної і центральної нервових систем, але також приводить до могутнього відростання нейритів. Численні з цих паростків виглядають більш товстими, ніж ті паростки, що виявляються в присутності факторів росту (порівняй Фіг.17A-D з Фіг.17E-H). Цей ефект також спостерігався при відростанні нейритів, що виявляється в інтактних ембріональних гангліях дорсальних корінців, що культивуються в присутності 250nM сполуки III-3 (Фіг.18C). Нейрити відростали як у відповідь на NGF (Фіг.18У), так і у відповідь на сполуки III-3; нейрити, що витягуються при дії NGF, були набагато тоншими і більш розгалуженими, ніж нейрити, що відростають в присутності сполуки III-3, які виглядали товстими і могли бути у вигляді пучка.

#### Приклад 36: Обробка *in vivo*

Регульована в ході розвитку загибелі мотонейронів в ембріонах курчат.

Даний експеримент детально описаний в роботі [Glicksman, et al., J. Neurobiol., 1998, 35, 361-370, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. На E6 робили вікно в шкаралупі курячих яєць (Spafas, Preston, CT), і безпосередньо в оболонку хоріоалантоїсу, пронизану кровоносними судинами, вводили або наповнювач (5% Soluto<sup>TM</sup> HS 15, поліетиленгліколь 660 гідроксистеарат; BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany) в фосфатно-сольовому буфері, pH 7,2), або певну дозу сполуки III-3 в наповнювачі один раз на добу з E6 по 39, як описано в роботі [Oppenheim, et al., Science, 1991, 251, 1616-1617, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Ембріони умертвляли на E10 і витягували їх спинний мозок, фіксували в розчині Сапоу (10% крижана оцтова кислота, 60% абсолютний етанол, 30% хлороформ), обробляли для одержання серійних парафінових зрізів, і фарбували тіоніном. У кожному 20-му зрізі поперекових сегментів 1-8 проводили підрахунок відповідно до раніше описаних критеріїв [Clarke, et al., Methods In Cell Biology: Cell Death, 1995, Schwart & Osborne, Eds., Academic Press, New York, pp. 277-321, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі].

Регульована в ході розвитку загибелі мотонейронів у пацюків в неонатальному періоді.

Пацюків Sprague-Dawley з різним терміном вагітності одержували від Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Крият жіночої статі щодня ін'єкували підшкірно (SC) над перинеальними м'язами, що є мішенню, сполукою III-3 в 5% Soluto<sup>TM</sup> HS 15 або одним наповнювачем, починаючи з дня народження (P1) і продовжуючи протягом 5 днів (P5). На P10 або P60 крият декапітували, збирали кров в капілярні пробірки з гепарином, і після перфузії тварин розчином солі/формаліну вирізали область спинного мозку, що містить спинальні ядра bulbo cavernosus (SNB), за якими спостерігається статевий диморфізм, і перинеальну область, що містить м'язи bulbo cavernosus (BC) і levator ani (LA). Район спинного мозку, що містить SNB,

повторно фіксували, заливали в парапласт, робили зрізи товщиною 10мкм, і фарбували крезіловим фіолетовим (Cresylecht violet) [Nordeen, et al., Science, 1985, 229, 671-673, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Мотонейрони підраховували при x500 збільшенні в серійних зрізах спинного мозку від поперекового району 5 до крижового району 1, як описано раніше [Nordeen, et al., вище]. Підрахунок під мікроскопом дослідник робив на закодованих зрізах наосліп, не знаючи оброблені групи. Підрахунок мотонейронів коректували з урахуванням розміру клітин і товщини зрізів [робота Konisgsmark, Contemporary Research Methods in Neuroanatomy, Nauta & Ebbesson, Eds., 1970, Springer-Verlag, New York, pp.315-340, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі] і статистичний аналіз проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Перинеальну мускулатуру повторно фіксували, декальцинували, заливали в парапласт, нарізали на секції по 10мкм, і фарбували трихромом за Мілліганом. Використовуючи світло-польну мікроскопію (X250) з упевненістю ідентифікували м'язи BP і LA нормальних самиць і самиць, оброблених сполукою III-3, (405 тварин/групи), як за їх положенням, так і за наявністю смугастих волокон. Обкреслювали контур м'язової тканини, відділяючи від суміжних секцій, використовуючи проєкційний мікроскоп (62,5), і площу поперечного перетину вимірювали, використовуючи планшетний цифратор і комп'ютеризовану морфометричну систему (Sigmascan, Jan-del Scientific). Об'єм м'яза розраховували, визначаючи загальну площу поперечного перетину помножену на товщину зрізу, і коректуючи за відсотковою часткою структури, відібраної як зразок.

Зібрану кров центрифугували протягом 5хв. при кімнатній температурі; потім витягували плазму і зберігали при -20°C. Рівні тестостерону в сироватці (6-7 тварин/групу) вимірювали з допомогою радіоімунаналізу, слідуючи процедурі, представленої в роботі [Wingfield, et al., Steroids, 1975, 26, 311-327, включеної тут у вигляді посилання в повному об'ємі].

Індуковане аксотомією диференціювання мотонейронів у дорослих пацюків.

Лівий під'язичний нерв був перерізаний в шії дорослих самиць пацюків Sprague-Dawley (120-180г) при анестезії неймбутолом (Neumbutol), і 50мкл сполуки III-3 або його наповнювача (5% Solutol™ HS 15) наносили на шматочок Gelfoam™ (A.I. Buck, Owings Mills, MD), потім обмотували навколо проксимального кінця перерізаного нерва. Через 7 днів тварин анестезували і перфузували 4% параформальдегідом в буфері Соренсона, 0,07М фосфат, pH 7,2. Стовбур мозку витягували і в кріостаті нарізували коронарні зрізи товщиною 40мкм [робота Chiu, et al., NeuroReport, 1994, 5, 693-696, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Кожний п'ятий зріз обробляли для імуногістохімічного аналізу ХАТНН, як описано раніше [робота Chiu, et al., J. Comp. Neurol., 1993, 328, 351-363, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі], використовуючи анти-ХАТНН моноклональне антитіло, одержане від Chemicon, в розведенні 1:350. Підраховували клітини, які були забарвлені явно інтенсивніше за фон на забарвлених зрізах; кількість підрахованих клітин виражали у вигляді відношення кількості ХАТ-імунореактивних клітин з боку під'язичного ядра, де проводили аксотомію, до кількості імунореактивних клітин на контрольному (непошкодженому) боці.

Сполука III-3 спасала мотонейрони ембріонів пацюків від загибелі в результаті апоптозу *in vitro*, і інгібувала сигнальний шлях, що приводить до активації JNK1 в цих клітинах [робота Maroney, et al., J. Neurosci., 1998, 18, 104-111, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Для визначення потенційної активності *in vivo* сполуки III-3 оцінювали в двох моделях регульованої в ході розвитку запрограмованої загибелі мотонейронів і в моделі індукованого аксотомією дедиференціювання мотонейронів дорослого організму. У курчат приблизно 50% спинномозкових мотонейронів зазнає PCD протягом 35-10 [Hamburger, et al., J. Neurosci., 1982, 1 38-55; Purves, et al., Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections, 1988, Harvard University Press, Cambridge, MA, обидві роботи включені тут у вигляді посилань в повному об'ємі]. Внесення сполуки III-3 в оболонку хоріоалантоїсу під час цього періоду запобігало загибелі мотонейронів дозозалежним чином (Фіг.19). Сорок відсотків мотонейронів, які в звичайних умовах загинули б, були врятовані при двох самих високих тестованих дозах (2,3 і 7мкг/доба), в той час як при більш низьких дозах (1,2 і 1,8мкг/доба) було врятовано 25% мотонейронів (Фіг.19).

Під час раннього перинатального періоду життя самиць пацюків (від пізньої ембріональної стадії до 4 дня постнатального розвитку (ПН)), більше за 50% мотонейронів в SNB елімінують в результаті PCD [робота Breedlove, J. Neurobiol., 1986, 17, 157-176, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. У самців мотонейрони в цьому ядрі інервують поперечно-смугасті м'язи статевого органу, залучені до копулятивних рефлексів. Секреція андрогенних стероїдів сім'яниками знижує загибель мотонейронів SNB у самців і запобігає обширній атрофії BP і LA м'язів, інервованих нейронами. Введення тестостерону у крисат жіночої статі приводило до повної схожості з чоловічими особинами кількості мотонейронів SNB [Nordeen, et al., вище] і запобігало атрофії BP і LA м'язів [робота Waiman, et al., Endocrinology, 1941, 29, 955-978, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Щоденне підшкірне введення сполуки III-3 (ПН 1-5) самицям пацюків значно ослабляло загибель мотонейронів (Фіг.20А). Порятунком мотонейронів SNB від загибелі за допомогою сполуки III-3 відбувався при двох дозах (0,5 і 1мг/кг на добу). При максимальності ефективних дозах 0,5 і 1мг/кг на добу введення сполуки III-3 приводило до підвищення виживаності мотонейронів на 70%, що еквівалентне дії тестостерону (Фіг.20А). Сполука III-3 не змінювала рівні тестостерону в плазмі оброблених самиць. Радіоімунологічне вимірювання рівнів тестостерону в плазмі в групі тварин, яким вводили 1мг/кг на добу, не давало значної різниці в порівнянні з контрольною групою, якій вводили наповнювач (0,016±0,008нг/мл і 0,029±0,015нг/мл стандартна помилка середньої (S.F.M). відповідно).

Щоб визначити, чи ефективна обробка сполукою III-3 для довготривалої підтримки виживаності мотонейронів, самиць обробляли сполукою III-3 (0,5 і 1мг/кг на добу) протягом того ж періоду часу ПН (1-5). Половину тварин, яким вводили наповнювач, і половину тварин з обох оброблених груп забивали на ПН10. Тварин, що залишилися підтримували потім без додаткової обробки сполукою III-3 до забою на ПН60. Як відмічено раніше (Фіг.20А) обробка сполукою III-3 приводила до підвищення виживаності мотонейронів на 70% (Фіг.20В). Більш того 100% цих врятованих мотонейронів можна було ідентифікувати морфологічно через 55 днів після останньої обробки сполукою III-3 (Фіг.20В). Ігібування загибелі мотонейронів сполукою III-3 під час неонатального періоду давало можливість мотонейронам дожити до дорослого стану.

Незважаючи на чітко виявлені і руйнівні впливи втрат мотонейронів при захворюваннях у дорослих людей, таких як бічний аміотрофічний склероз, мотонейрони дорослого організму в більшості моделей пошкодження мотонейронів у тварин резистентні до загибелі. Однак пошкодження аксонів приводить до морфологічних [Oppenheim, et al., вище], а також біохімічних змін [роботи Oppenheim, et al., вище; Rende et al., J. Comp. Neurol., 1992, 319, 285-298, які включені тут у вигляді посилань в повному об'ємі; робота Chie, et al., J. Comp. Neurol., 1993, 328, 351-363, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі] в мотонейронах дорослого організму, які можуть імітувати дегенеративну зміну, що передують загибелі дегенерованих мотонейронів у хворих. Один з прикладів такого типу змін є слідством аксотомії під'язичного нерва, яка інervує язик. Одностороннє перерізання цього нерва у дорослого пацієнта приводило через 7 днів до втрати 95% ХАТ-імунореактивних під'язикових мотонейронів з того ж боку ядра [робота Chiu, et al., NeuroReport, 1994, 5, 693-696, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. Втрата ХАТ-імунореактивності не була постійною. Через чотири тижні після аксотомії 100% мотонейронів відновлювали контрольні рівні ХАТНН імунореактивності [робота Borke, et al., J. Neurocytol., 1993, 22, 141-153, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі]. ХАТ-імунореактивність під'язикових мотонейронів на протилежному боці не зазнавала впливу [Chiu, et al., вище] (Фіг.21 і таблиця 5).

У тому випадку, коли накладали Gelfoam™ на проксимальний кінець під'язичного нерва, сполука III-3 дозозалежним чином ослабляла зниження ХАТ-імунореактивності в мотонейронах на тому ж боці, що аналізуються через 7 днів після аксотомії. Максимальна ефективна доза (50мкг) приводила до збільшення на 40% кількості ХАТ-імунореактивних мотонейронів, в порівнянні з необробленим контролем, де проводилася аксотомія (Фіг.21В і таблиця 5). Малася колоколоподібна дозова залежність як при більш низьких, так і при більш високих дозах, що приводить в результаті до більш високої виживаності, ніж в необробленому контролі, але більш низької, ніж досягалася при 50мкг. Як підтверджено в моделі SNB, у цих тварин, що тестуються ні при яких дозах не було пов'язаної з ними втрати ваги, смертності, або грубого пошкодження тканини.

Сполука III-3 виявляла нейропротекторну активність в трьох окремих моделях дегенерації мотонейронів *in vivo*: регульованої в ході розвитку PCD мотонейронів поперекового відділу спинного мозку у ембріонів (Фіг.19), чутлива до андрогенів загибель постнатальних мотонейронів SNB (Фіг.20) і індукована аксотомією втрата функціонального маркера, ХАТНН, в під'язичних мотонейронах дорослого організму (Фіг.21 і таблиця 5). Сполука III-3 була ефективною при периферичному введенні за допомогою підшкірної ін'єкції, при локальному нанесенні на розрізаний кінець нерва, або при безпосередньому нанесенні на хоріоалантоїсний оболонку ембріонів курчат. У протилежність початковій молекулі K-252a, сполука III-3 була приблизно в п'ять разів більш сильнодіючою в опосередкованій виживаності культур, збагачених мотонейронами (дані не показані), і не виявляла інгібуючої активності, направленої проти тирозин-кінази trkA і декількох серин-треонінових кіназ [Maroney et al., вище; Kaneko, et al., J. Med. Chem., 1997, 40, 1863-1869, яка включена тут у вигляді посилання в повному об'ємі].

Таблиця 5

Вплив сполуки III-3 на холінацетилтрансферазну імунореактивність під'язикових мотонейронів після аксотомії

Обробка	n	ХАТНН-позитивні мотонейрони		
		Експериментальне/ Контрольне	%	Середнє/Група
наповнювач	2	20/544	3,68	4,01
		19/437	4,35	
3,6мкг III-3	2	55/420	13,10	12,84*
		72/572	12,59	
25мкг III-3	2	95/597	15,91	19,01*
		142/642	22,12	
50мкг III-3	2	188/484	38,84	41,34*
		278/637	43,85	
100мкг III-3	4	465/920	50,54	32,61*
		235/784	29,98	
		178/770	23,12	
		182/679	26,80	
200мкг III-3	2	99/461	21,48	24,96*
		159/559	28,44	
імітація операції	2	350/335	104,48	101,24
		292/298	98,00	

Сполуку III-3 або наповнювач додавали в гелеподібній піні до проксимального кінця під'язичного нерва відразу ж після його перерізання. Через 7 днів тварин забивали і робили серійні зрізи під'язичного ядра, і кожний п'ятий зріз піддавали імуноному фарбуванню анти-ХАТНН антитілами. Підрахунок ХАТНН-позитивних нейронів проводили на тому ж боці (експериментальному) і на протилежному (контрольному) боці ядра.

\* $p < 0,05$ , статистично значуще в порівнянні з контрольним обробленим наповнювачем тваринами.

Інгібітор MLK-3 шляху виявляє ефективність *in vivo* і блокує події фосфорилування нижче за течією MLK-3 в MPTP моделі.

MPTP вводили в дозі (40мг/мл), яка приводить до втрати допамінергічних закінчень смугастого тіла і клітинних тіл в чорній субстанції. Як маркер допамінергічних нервових закінчень в чорній субстанції використали тирозингідроксилазу. Сполука III-3 при систематичному введенні знижувала втрату

імунореактивних за тирозингідроксилазою нейронів чорної субстанції після пошкодження MPTP (Fig.22a; Saporito et al., 1999). Оскільки сполука III-3 відома як інгібітор MLK3, вимірювали активацію розташованого нижче за течією субстрату MLK3 у оброблених MPTP мишей. Рівні фосфорилірованого MKK4 вимірювали з використанням специфічного для фосфо-MKK4 антитіла (New England Biolabs, Beverly, MA), яке пізнає монофосфорилізовану форму MKK4, або іл допомогою імуноблота (Fig.22b), або методом ELISA (Fig.22c). Введення MPTP підвищувало рівні фосфорилірованого MKK4 в чорній субстанції більш ніж 5 разів в порівнянні з рівнями в контролі (Fig.22b). Піки підвищення мали місце через 4 години після введення MPTP і співпадали за часом з списками рівнів  $MPP^+$  в ЦНС. Опосередковане MPTP фосфорилування MKK4 знижувалося внаслідок попередньої обробки 1-депренілом, що свідчить про те, що ці процеси фосфорилування були опосередковані  $MPP^+$  (Fig.22c). Більш того фосфорилування MKK4 частково пригнічувалося попередньою обробкою сполуки III-3 в дозі (1мг/кг), яка забезпечує захист від індукованої MPTP втрати допамінергічної ланки чорної субстанції смугастого тіла (Fig.22c). Ці дані служать доказом того, що MPTP ( $MPP^+$ ) активує MKK4, розташований нижче за течією субстрат MLK3. Більш того ці дані свідчать про те, що відомий інгібітор MLK3 інгібує активацію цього кіназного шляху *in vivo*.

#### Приклад 37: Запалення

Індукція IL-1 і TNF- $\alpha$  при дії ЛПС в клітинах THP-1 і вплив індолокарбазолів і піроларкарбазолів на індукцію цих факторів.

Були вибрані клітини імунної системи, оскільки численні кінази залучені до регуляції численних імунологічних функцій, наприклад, індукції синтезу цитокінів і індукції біологічної відповіді цитокінів. У недавньому повідомленні [Hambleton, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 2774-2778, яке включене тут у вигляді посилання в повному об'ємі] показано, що обробка ЛПС одержаної на основі моноцитів лінії клітин викликає швидку активацію JNK активності. Коли моноцити вступають в контакт з бактерійними ендотоксинами, такими як ліпополісахарид (ЛПС), вони продукують цитокіни запалення, IL-1 і TNF- $\alpha$ . Інгібування продукції цих двох цитокінів може бути корисним при лікуванні деяких запальних захворювань імунної системи. Ці цитокіни можна легко виміряти за допомогою комерційних наборів для ELISA. Автори розробили експерименти, щоб визначити (1) чи можуть індоло- і конденсовані піроларкарбазоли інгібувати синтез IL-1 і TNF- $\alpha$  в лінії клітин моноцитів THP-1, (2) чи активується JNK при дії ЛПС в клітинах THP-1, і (3) чи можна інгібувати активацію JNK при дії ЛПС за допомогою індоло- і конденсованих піроларкарбазолів.

#### Експериментальні процедури

Клітини THP-1 вирощували в середовищі RPMI 1640 з доданням 10% фетальної бичачої сироватки. ЛПС (E. coli серотип 0111.B4, екстрагований TXO) придбали у Sigma і розчиняли в PBS. Набори ELISA для аналізу IL-1 і TNF- $\alpha$  придбали у Boehringer-Mannheim, і аналізи в культуральному середовищі THP-1 виконували згідно з вказівками виготовлювача. Відповідно до вказівок при кожному аналізі одержували стандартні криві.

Експерименти проводили в 12-лунокових планшетах для культивування або з 1, або з 2 мл клітин THP-1 при щільності  $4 \times 10^5$  клітин/мл. IL-1 і TNF- $\alpha$  індукували доданням ЛПС в культуральне середовище, і після цього середовище збирали в різні інтервали часу для аналізу цитокінів. Клітини видаляли центрифугуванням, і надосади заморожували при -70°C до проведення аналізу. Щоб мінімізувати витрати, експерименти виконували в двох повторях культур і супернатанти з двох повторів об'єднували після центрифугування. Кожний об'єднаний надосад аналізували двічі. Маточні розчини індоло- і конденсованих піроларкарбазолів в 100% ДМСО розбавляли до потрібних концентрацій або середовищем, що містить 10% фетальної бичачої сироватки, або середовищем, що містить 0,5мг/мл БСА. Якщо не обумовлено особливо, сполуки додавали до клітин THP-1 за 1 годину перед доданням ЛПС.

Аналізи активності JNK проводили після імунопреципітації білка JNK з екстракту лізованих клітин THP-1. Осаджені THP-1 клітини лізували на льоду протягом 15хв. в 500мкл буфера Frac (10мМ трис-HCl, pH 7,5, 50мМ NaCl, 30мМ пірофосфату натрію, 1мг/мл БСА, 1% X-100). Екстракт центрифугували протягом 10хв. при 14K, і до надосаду додавали 5мкл JNK антитіла (Santa Cruz). Екстракт центрифугували в роторній центрифугі протягом 60хв. при 4°C, додавали 75мкл промитого білок А-сефарози (20% вага/об'єм в буфері Frac), і екстракт центрифугували ще 30хв., щоб зв'язати комплекс, утворений антитілом з білок А-сефарозою. Білок А-сефарозу двічі промивали буфером Frac, один раз 20мМ Hepes, pH 7,6, 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ ДТТ, потім інкубували протягом 15хв. при 30°C в 30мкл буфера для кіназ (20мМ Hepes, 20мМ MgCl<sub>2</sub>, 2мМ ДТТ, 1мкг рекомбінантного c-jun, і 2мкМ АТФ- $\gamma$ -<sup>32</sup>P, 2мккюри). Реакцію зупиняли доданням 10мкл 4 x SDS буфера для нанесення на гель, нагрівали протягом 3хв. при 80°C, і білки аналізували в 10% SDS-гелі. Гель сушили, експонували з пластиною для приладу, реєструючого радіоактивний фосфор (Phosphorimager), і радіоактивні смуги аналізували з допомогою Phosphorimager.

Результати первинних експериментів показали, що ЛПС при концентрації 2мкг/мл дає максимальний вихід IL-1, і ця концентрація ЛПС була використана у всіх подальших експериментах. Мінімальний час після додання ЛПС для максимального виходу цитокінів визначали шляхом відбору аліквот середовища для аналізу в різні інтервали часу після додання ЛПС. Перший експеримент показав, що максимальний вихід і IL-1 і TNF- $\alpha$  досягається менш ніж чим, через 5 годин після додання ЛПС. Оскільки саме ранній час збору в першому експерименті становив 2,4 години, другий експеримент проводили, починаючи відбір середовища через 15хв. після додання ЛПС. Результати цього експерименту, в якому аналізували тільки TNF- $\alpha$ , показали, що його максимальний вихід досягається через 3 години після додання ЛПС. Не виявлено істотних кількостей TNF- $\alpha$  в середовищі до 90хв. після додання ЛПС.

Швидке досягнення максимального виходу свідчило про дуже тісну регуляцію синтезу 2 цитокінів - швидкого синтезу і швидкої понижувальної регуляції. За 30хв. перед доданням ЛПС культури клітин обробляли або актиноміцином Д, інгібітором синтезу РНК, або циклогексимідом, інгібітором синтезу білка. Середовище збирали через 3 години після додання ЛПС, і аналізували TNF- $\alpha$ . Для індукції TNF- $\alpha$  потрібно і синтез нової РНК, і синтез нового білка, оскільки в середовищі клітин, оброблених і тим і іншим інгібітором, не виявлено TNF- $\alpha$ . Наступні експерименти були виконані для того, щоб визначити, чи буде сполука III-3 інгібувати індукцію IL-1 і TNF- $\alpha$ . Сполука III-3 інгібувала індукцію і IL-1, і TNF- $\alpha$ , при цьому значення IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) становили 267нМ і 139нМ, відповідно. Результати цих експериментів були одержані на клітинах в

середовищі, що містить 10% фетальної бичачої сироватки. Оскільки аналізи нейротрофічної активності сполук в тканині спинного мозку і тканині базального відділу переднього мозку були виконані в безсировоточному середовищі (500мкг/мл БСА), було цікаво визначити значення IC<sub>50</sub> для інгібування IL-1 і TNF- $\alpha$  в безсировоточному середовищі. Коли клітини THP-1 обробляли сполукою III-3 в безсировоточному середовищі (500мкг/мл БСА) IC<sub>50</sub> було знижено в 10 раз з 269нМ до 23нМ. Якщо не обумовлено особливо, всі експерименти, виконані далі, проводили в безсировоточному середовищі. Ігібовані індукції IL-1 і TNF- $\alpha$  в клітинах THP-1 сполукою III-3 свідчить про те, що сполука III-3 може бути придатна як терапевтичний засіб при лікуванні патологічних станів, викликаних перевищуючою норму продукцією цих цитокінів. Таким станом є септичний шок. Септичний шок викликаний ростом грам-негативних бактерій в циркулюючій крові, які послідовно вивільняють великі кількості ендотоксину, ЛПС. Потім ЛПС спочатку стимулює моноцити і макрофаги для продукції великих кількостей IL-1 і TNF- $\alpha$ , які потім викликають важке пошкодження тканини і у багатьох випадках смерть.

Тестували декілька сполук за їх здатністю інгібувати TNF- $\alpha$ , і порівнювали зі здатністю інгібувати ЖК. Результати показані в таблиці 6.

Таблиця 6

Сполука	THP-1 клітини		MLK3, понадекспресована в клітинах Cos7
	TNF- $\alpha$ IC <sub>50</sub> нМ	JNK % інгіб. 500нМ	JNK % інгіб. 500нМ
III-1	49,5	93,5	83,8
III-3	29	93	94
I-2	>5000	78,5	85
I-3	366	80,5	93,7
I-4	75,5	79,5	95
I-5	514	89	97,2
I-6	817,5	77,5	57,8
I-7	1009	74	85,5
III-4	462,5	81	66
III-5	4	84,5	96
III-7	590,5	11,5	54
III-8	11,5	51	94
III-10	4298	48	78
I-10	4500	62	94
III-11	686	51	92,5

Вплив сполуки III-3 на індукцію IL-2 в клітинах Jurkat

Були проведені експерименти, щоб визначити, чи інгібує сполука III-3 індукцію IL-2 в клітинах Jurkat.

Експериментальні процедури

Клітини Jurkat вирощували в середовищі RPMI 1640 з доданням 10% фетальної бичачої сироватки. TNF- $\alpha$  одержували від Promega, і анти CD3 і анти CD28 антитіла від Pharmigen. Експерименти з клітинами Jurkat проводили в 200мкл в 96-лунковому планшеті. IL-2 вимірювали за допомогою набору для ELISA, придбаного в Boehringer Mannheim. Антитілам до CD3 і CD28 давали можливість зв'язатися з пластиком 96-лункового планшета (18 годин в PBS) перед доданням клітин Jurkat. Клітини обробляли сполуками за 1 годину до додання в покритий антитілами планшет. Щоб активувати рецептор Т-клітин і індукувати IL-2 використали антитіла до CD3 і CD28. IL-2 вивільнявся клітинами Jurkat між 6 годинию і 24 годинию після ініціації індукції (Фіг.23А). Не було конститутивної продукції IL-2 (Фіг.23А, інтактний контроль (CNT)). Потім оцінювали вплив сполуки III-3 (1 годинию обробка сполукою III-3 перед індукцією) на індукцію IL-2 (Фіг.23В). Сполука III-3 в концентрації 500нМ інгібувала індукцію IL-2 більш ніж на 80% (Фіг.23В). Більш широкий експеримент за визначенням лозової залежності був виконаний з використанням сполуки III-3 і сполуки I-4, які давали значення IC<sub>50</sub> 139нМ для сполуки III-3 і 207нМ для сполуки I-4 (Фіг.23С).

Мається на увазі, що кожний з патентів, заявок і опублікованих видань, що згадуються в даному патентному документі, є, таким чином, включеним у вигляді посилання в повному об'ємі.

Як буде зрозуміло фахівцям в даній області, можуть бути зроблені численні зміни і модифікації переважних варіантів винаходу без відступу від суті винаходу. Мається на увазі, що всі такі варіації входять в рамки винаходу.

Список послідовностей

<110> Maroney, Anna

Walton, Kevin Knight,

Ernest Glicksman,

Marcie Dionne. Craig

Neff, Nicola

<120> Способи модулювання кіназних білків множинних ліній і скринінгу сполук, які модулюють кіназні білки множинних ліній

<130> CERH0431

<140>

<141>

<160> 18

<170> Патент, версія 2.0

<210> 1  
 <211> 17  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 1

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

Thr

<210> 2  
 <211> 23  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 2

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

Ala Ser Ala Cys Arg Thr Cys  
 20

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 3

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

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

Ala

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 4

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

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

<210> 5  
 <211> 10  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 5

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

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 6

gtggtgtgc ggcagctcg ccag

24

<210> 7

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 7

gagacctgg atctcgcct t

21

<210> 8

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 9

<211> 27

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 9

eggatcgtg acaccagtcg gaacctt

27

<210> 10

<211> 28

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 10

ggaattcacc agtaagctcc agcacatc

28

<210> 11

<211> 33

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 11

ataattcgtg ctagegccag agtctagccg gtc

33

<210> 12

<211> 39

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 12

aaagctcc tcagtccaag tggatcgccg agccccga

39

<210> 13

<211> 8

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність

<400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 14  
<211> 69  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
<400> 14

ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa 60  
accggaaca 69

<210> 15  
<211> 18  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
<400> 15

gacagggcgg ccggtctt 18

<210> 16  
<211> 583  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
<400> 16

gaattcgcca cgagaggact cgcaggtgtc cggcgacgag ggctgggtga ccgggcagct 60  
gaaccagcgg gtgggcactt tcccagcaa ctactgacc ccgcgcagcg cctctccag 120  
ccgtgccag ccgcggcg aggaccacag ttgtaccg ccattcagt tgttagaat 180  
tgatttgcg gactcaact tgaagagat tatggcacc gggggcttg ggaaggcta 240  
tcgtgttc tggataggg atgaggtgc tgtgaangca gtcgcacg accctgatga 300  
ggacacagc cagaccatag agaatttcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctga 360  
gcacccaac atcattgcc taagaggggt atgtctgaag gagcccaacc tcgtcttgg 420  
cattgagtti gctcgtggag gaccttga tagagtgtta tcgggaaa ggattcccc 480  
agacatctg gtgaattggg ctgtcagat tgccagagg atgaactact tacatgatga 540  
ggcaattgt ccatcacc accgcacct taagtccagc aac 583

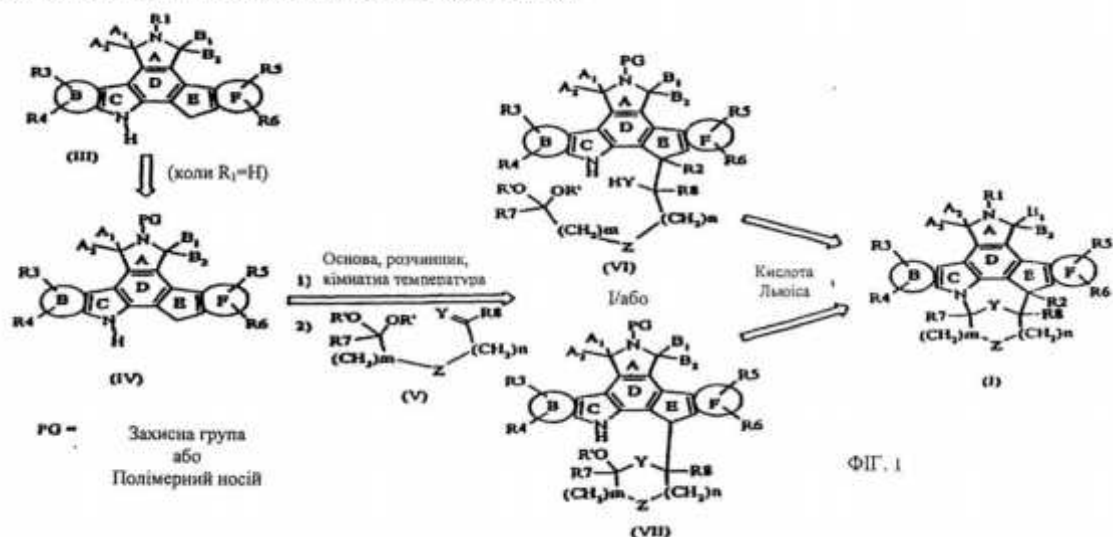
<210> 17  
<211> 94  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
<400> 17

Asn Ser Ala Arg Glu Asp Ser Gln Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Gln Leu Asn Gln Arg Val Gly Ile Phe Pro Ser Asn Tyr Val  
 20 25 30  
 Thr Pro Arg Ser Ala Phe Ser Ser Arg Cys Gln Pro Gly Gly Glu Asp  
 35 40 45  
 Pro Ser Cys Tyr Pro Pro Ile Gln Leu Leu Glu Ile Asp Phe Ala Glu  
 50 55 60  
 Leu Thr Leu Glu Glu Ile Ile Gly Ile Gly Gly Phe Gly Lys Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Ala Phe Trp Ile Gly Asp Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg His  
 85 90 95  
 Asp Pro Asp Glu Asp Ile Ser Gln Thr Ile Glu Asn Val Arg Gln Glu  
 100 105 110  
 Ala Lys Leu Phe Ala Met Leu Lys His Pro Asn Ile Ile Ala Leu Arg  
 115 120 125  
 Gly Val Cys Leu Lys Glu Pro Asn Leu Cys Leu Val Met Glu Phe Ala  
 130 135 140  
 Arg Gly Gly Pro Leu Asn Arg Val Leu Ser Gly Lys Arg Ile Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Asp Ile Leu Val Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Asn Tyr  
 165 170 175  
 Leu His Asp Glu Ala Ile Val Pro Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser  
 180 185 190  
 Ser Asn

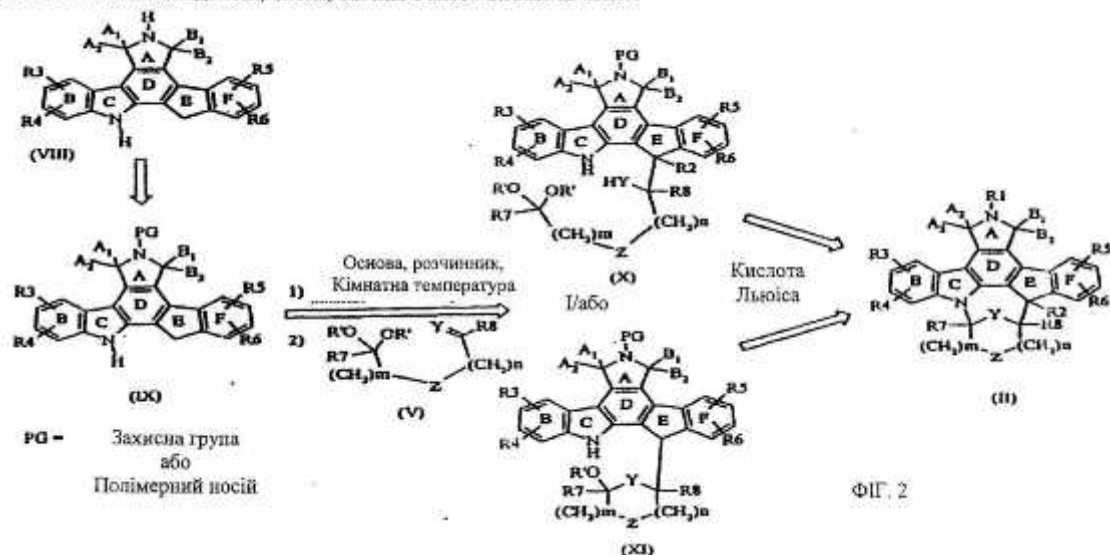
<210> 18  
 <211> 8  
 <212> Білок  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Опис штучної послідовності: нова послідовність  
 <400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys  
 1 5

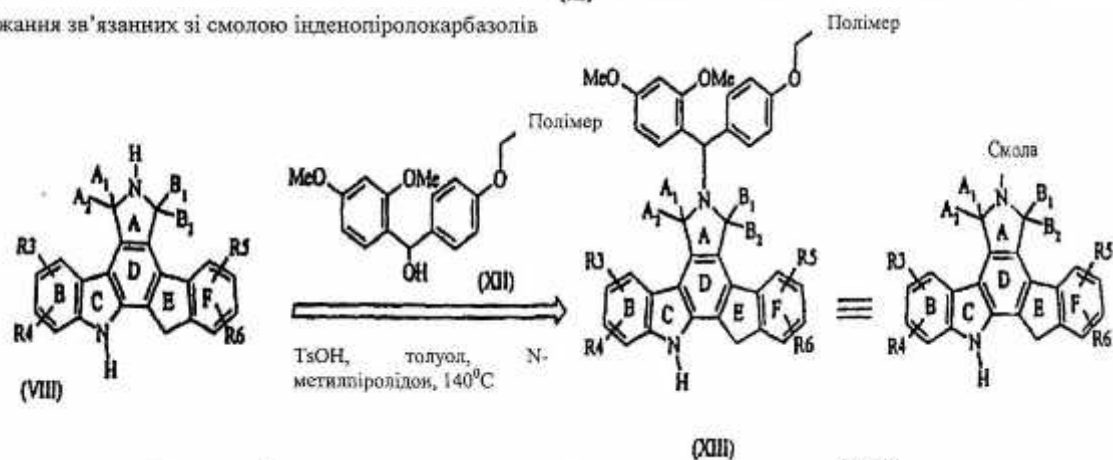
Загальний синтез інденопіролокарбазолів з місточковим зв'язком



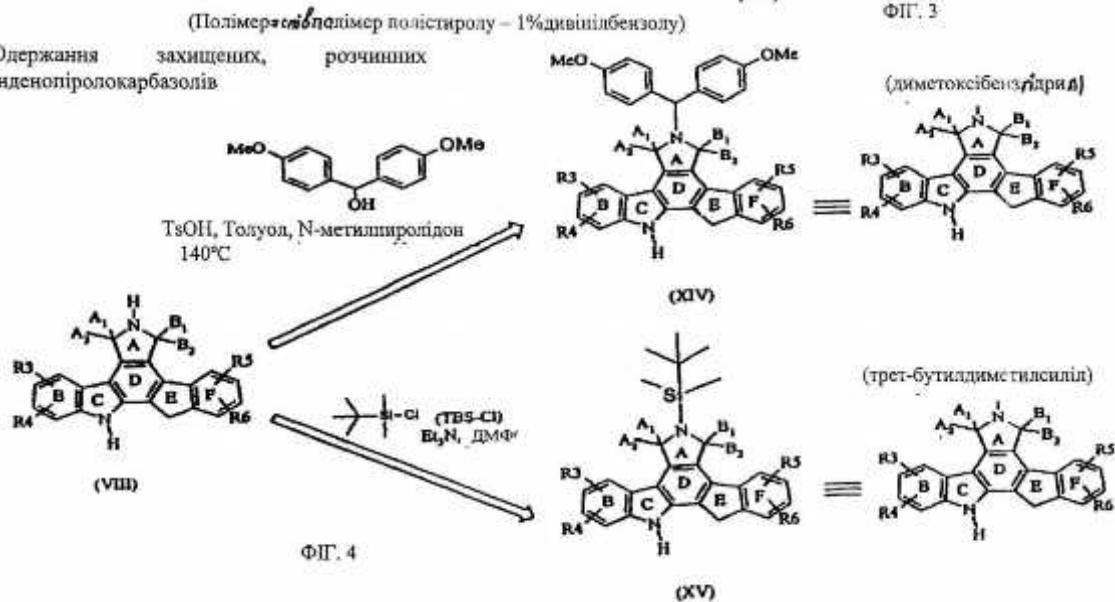
# Загальний синтез інденопіролокарбазолів з місточковим зв'язком

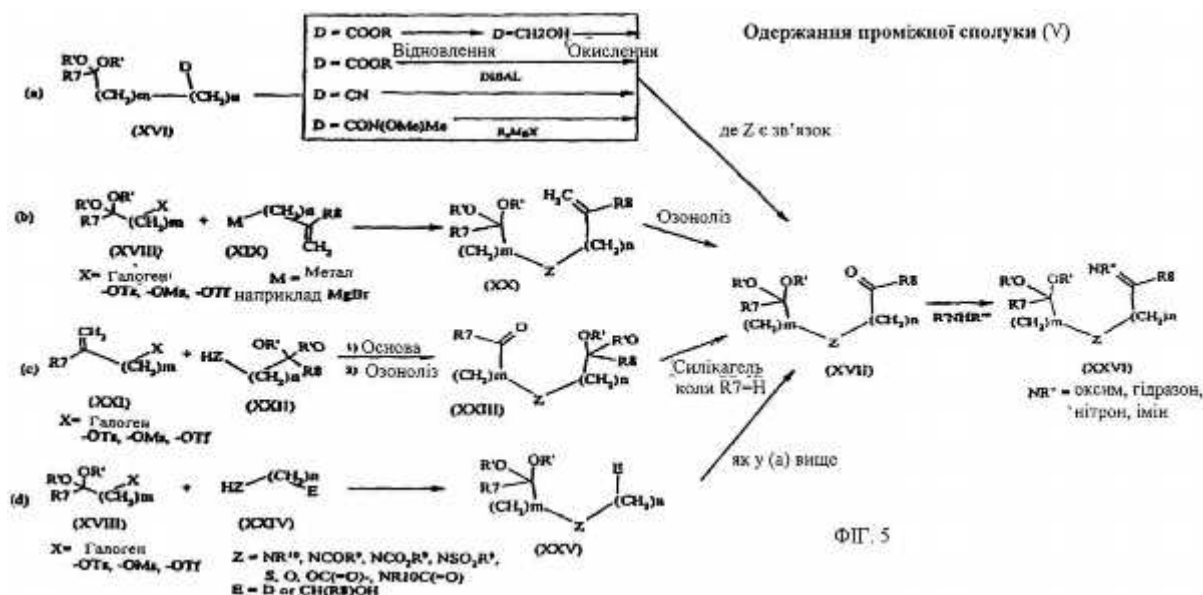


## Одержання зв'язаних зі смолою інденопіролокарбазолів



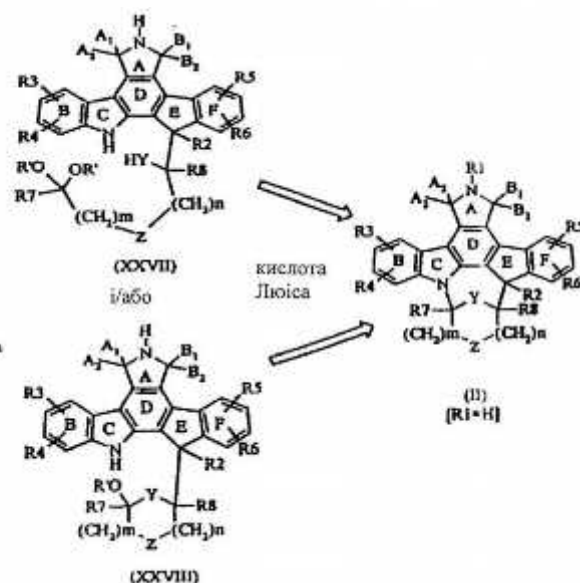
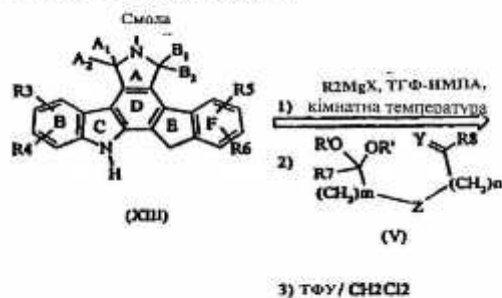
## Одержання захищених, розчинних інденопіролокарбазолів





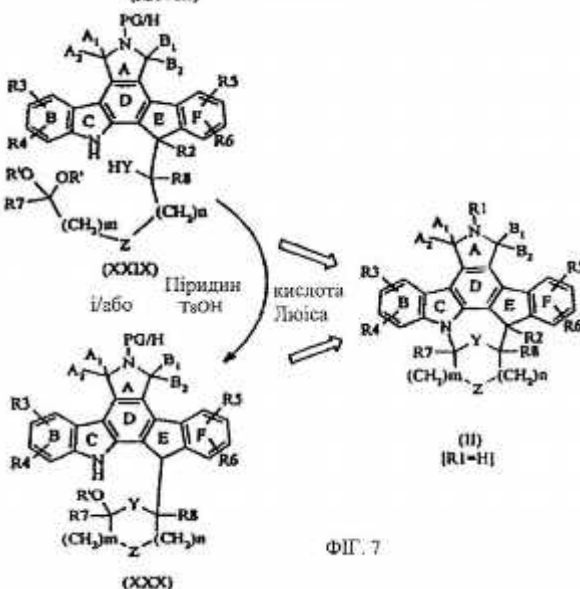
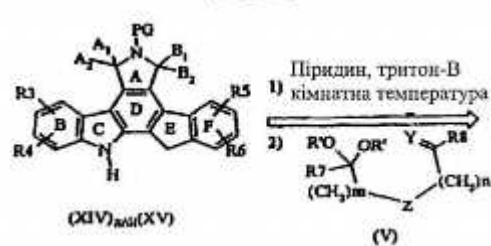
Одержання іденопіролокарбазолів з

місточковим зв'язком – спосіб А



Одержання іденопіролокарбазолів з

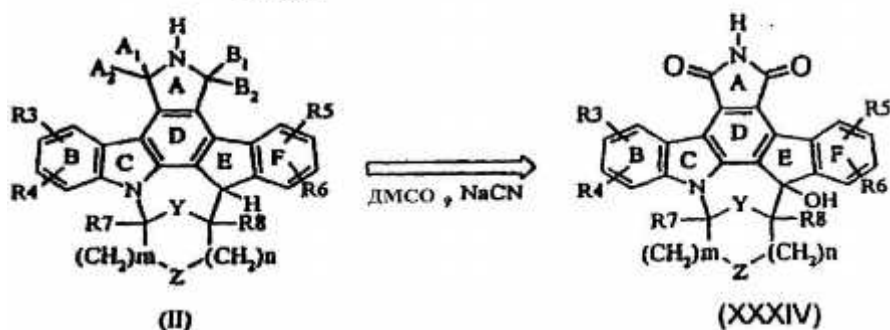
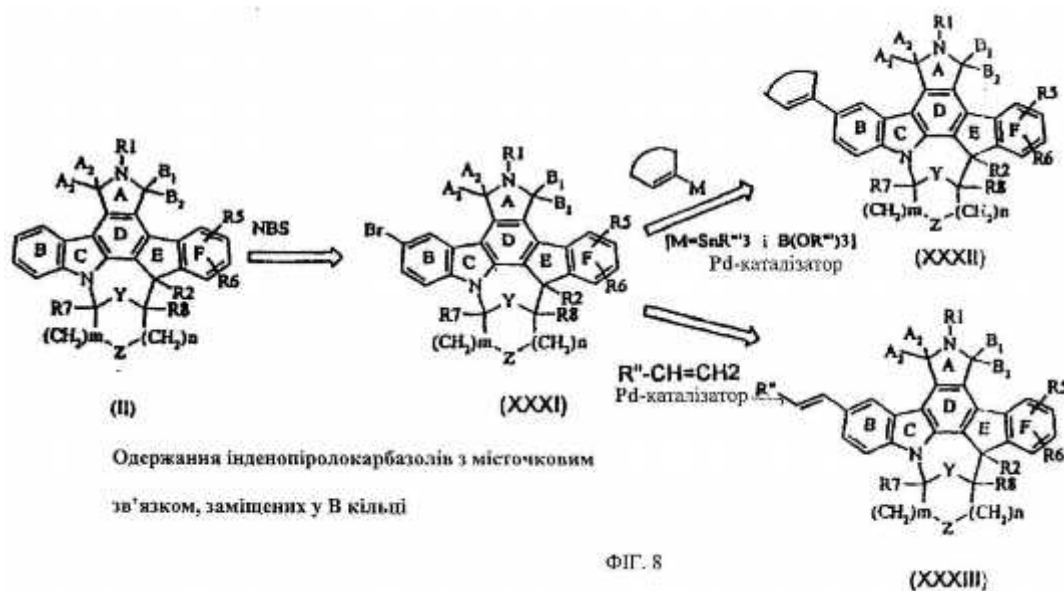
місточковим зв'язком – спосіб В



PG – захисна група

наприклад 4,4 диметоксibenзгiдрил (DMB) (XIV)

або трет-бутилдиметилсиліл (TBS) (XV)



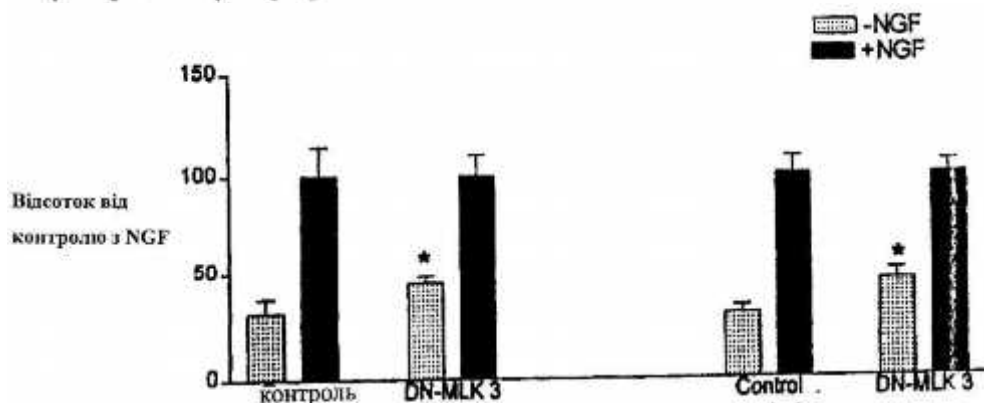
КОЛИ

$A_1$  &  $A_2 = H_2$ ,  $B_1$  &  $B_2 = O$

або

$A_1$  &  $A_2 = O$ ,  $B_1$  &  $B_2 = H_2$

ФІГ. 9

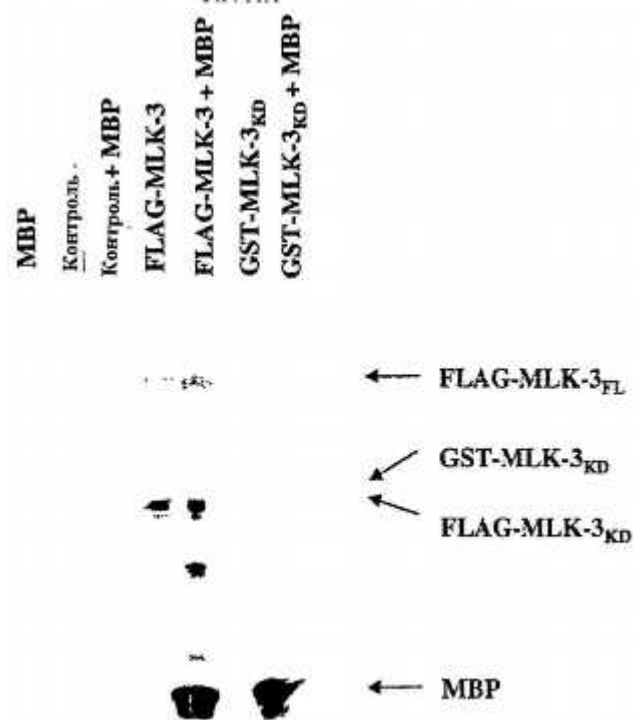


\* статично значуща відмінність між контролем та DN-MLK-3 при відсутності NGF ( $p < 0,05$  Т-критерій на основі аналізу подвійної вибірки)

ФІГ. 10



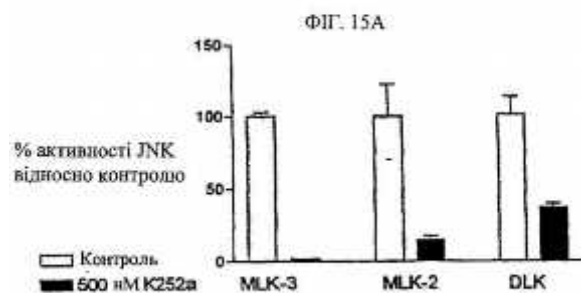
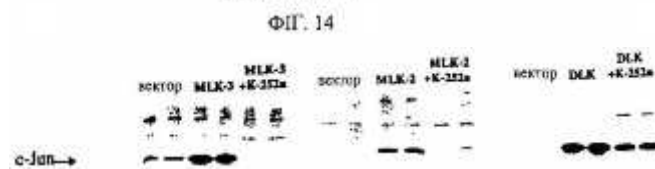
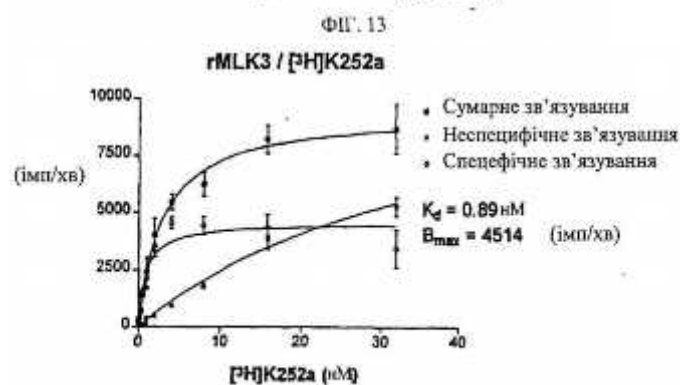
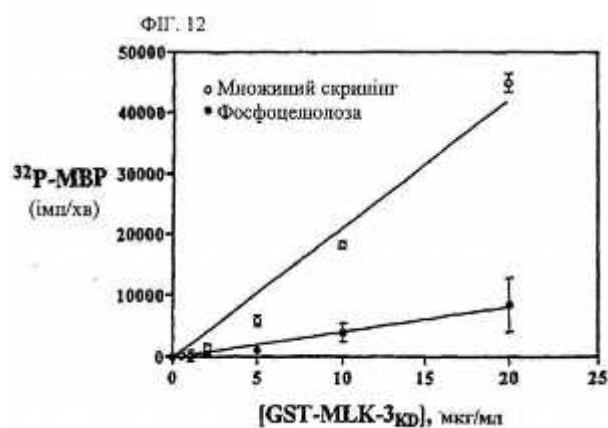
ФІГ. 11А



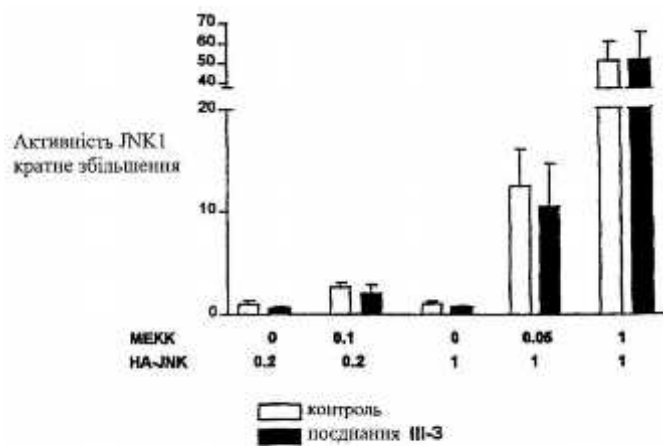
ФІГ. 11В

FLAG-MLK-3  
 Мертва кінгза GST-SEK-1  
 FLAG-MLK-3 + Мертва кінгза

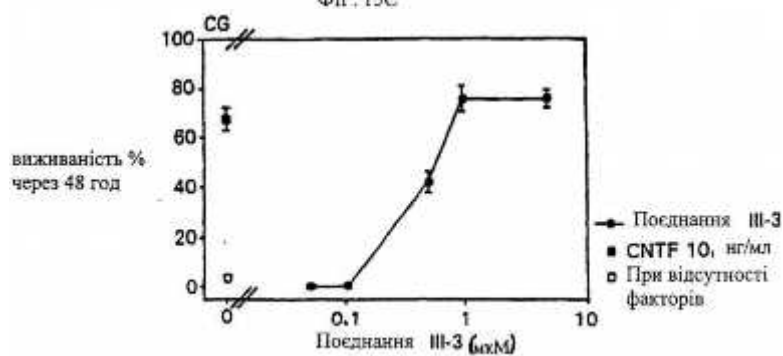
● ← GST-SEK-1



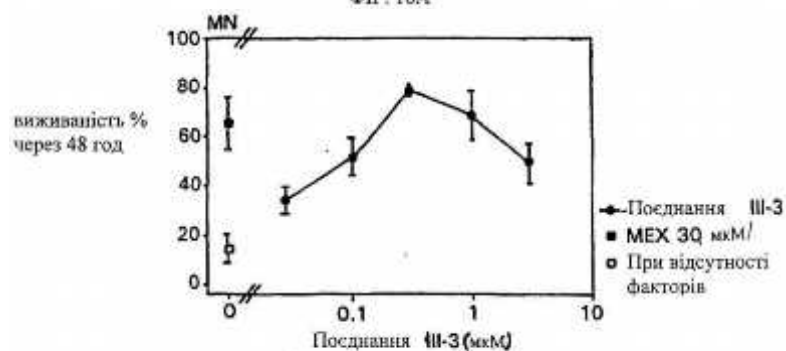
ФІГ. 15B



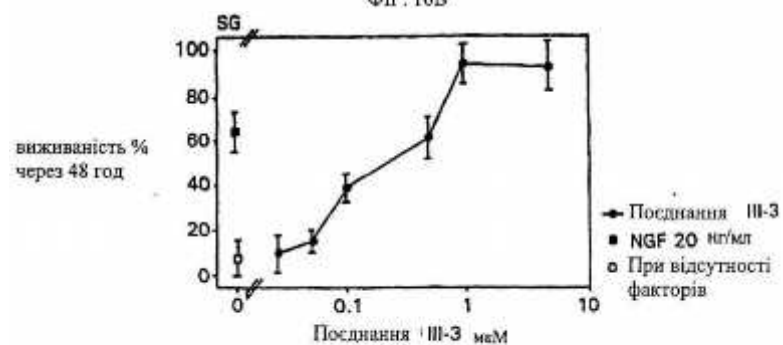
ФІГ. 15С



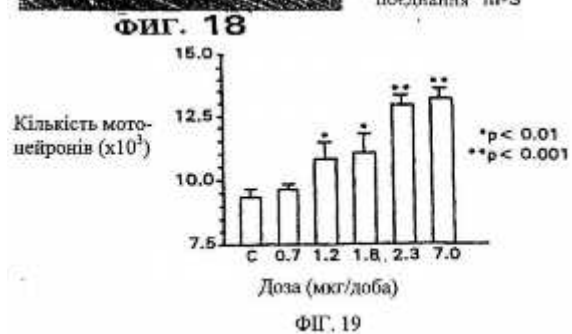
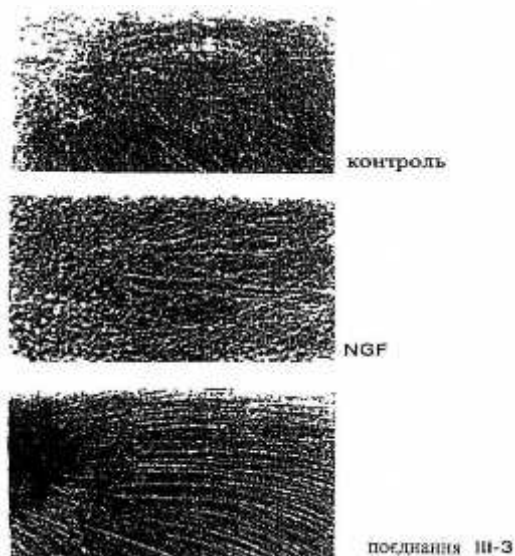
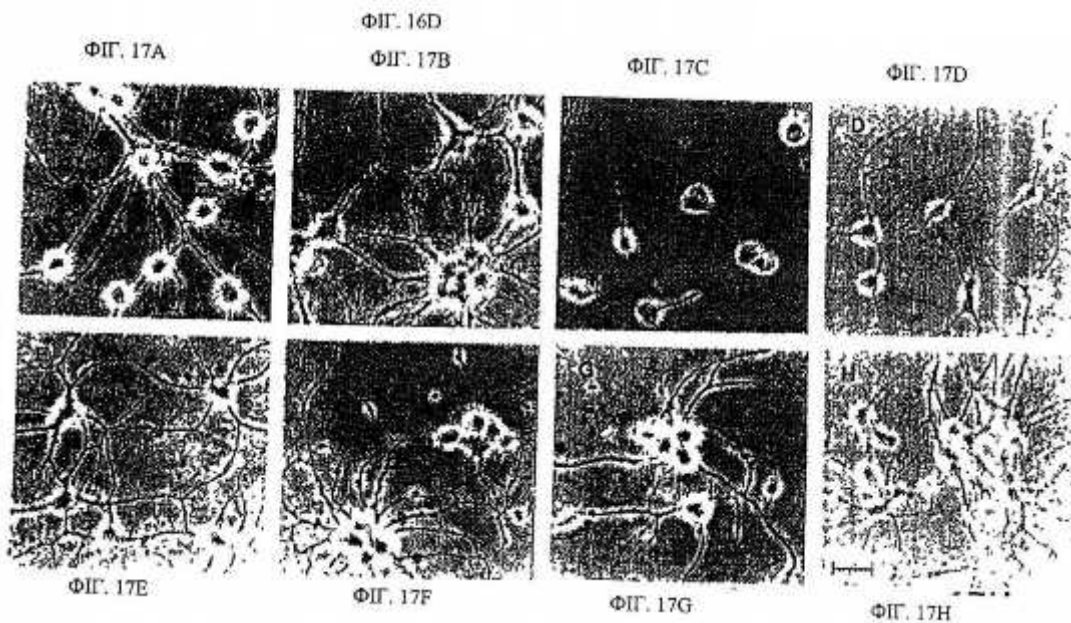
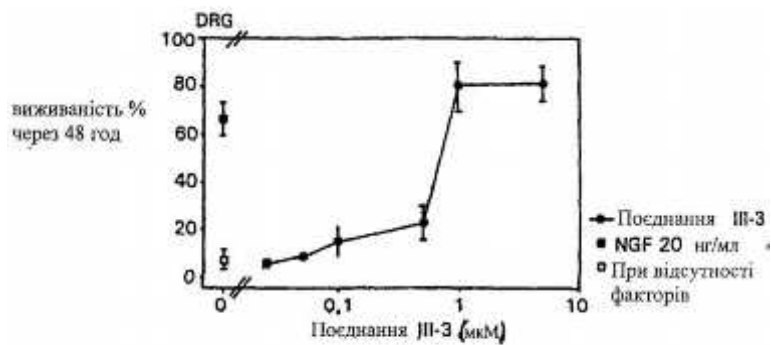
ФІГ. 16А

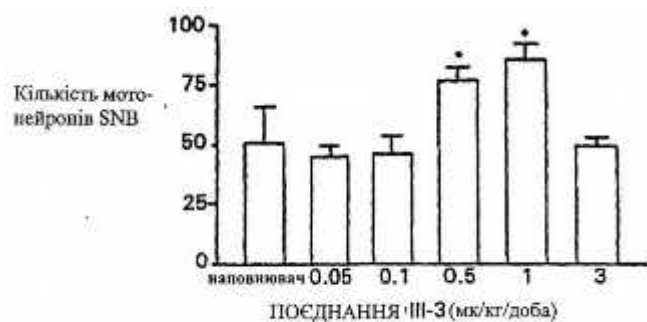


ФІГ. 16В

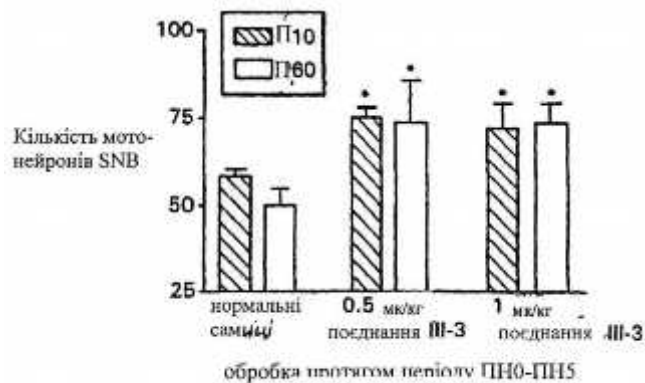


ФІГ. 16С





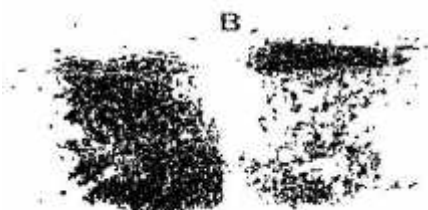
ФІГ. 20А



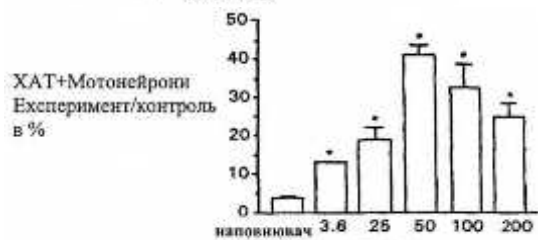
ФІГ. 20В



ФІГ. 21А

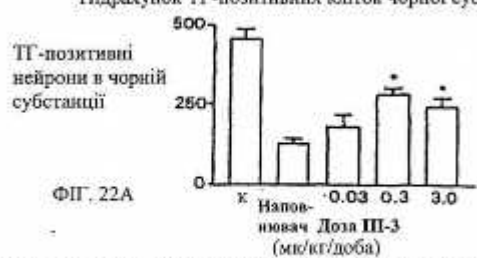


ФІГ. 21В



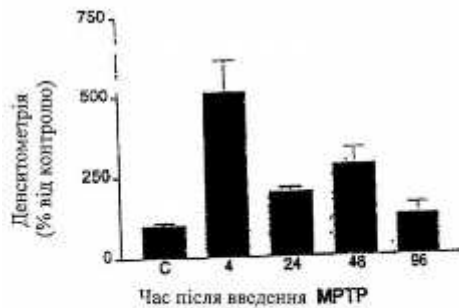
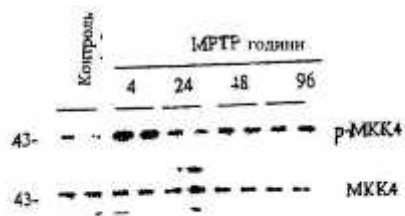
ФІГ. 21С

Підрахунок ТГ-позитивних кліток чорної субстанції



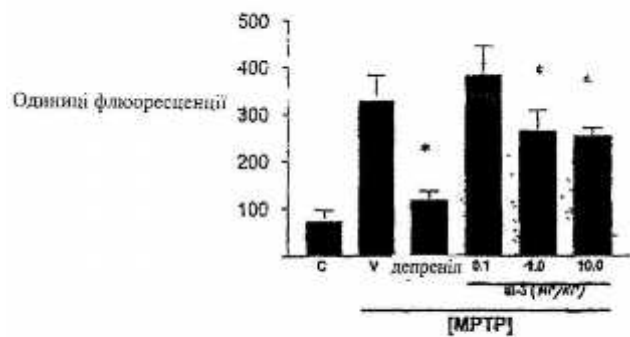
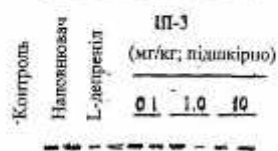
ФІГ. 22А

- показані статистично значені відмінності ( $P < 0,5$  при порівнянні з зворотнім МРІГ контролем в присутності наповнювача)



ФІГ. 22В

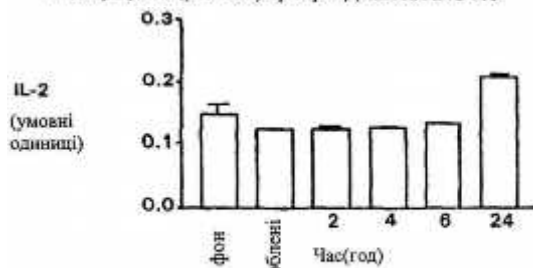
Чорна субстанція  
МРТР (40 мг/кг)



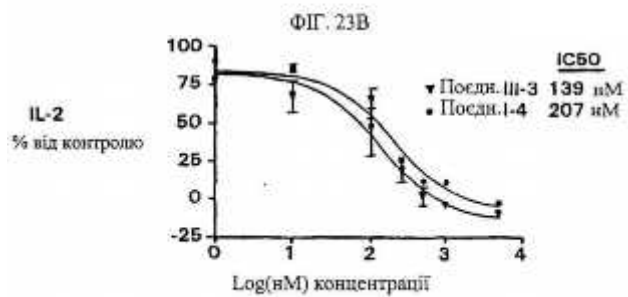
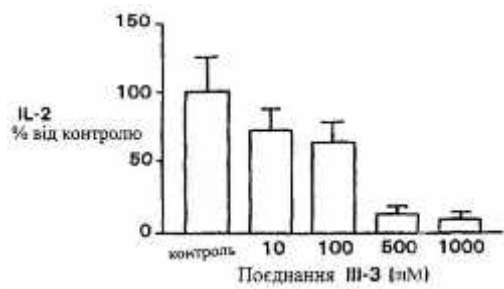
N=5/групу  
\*p < 0.05

ФІГ. 22С

апостеріорний (post-hoc) критерій Даннета ANOVA



ФІГ. 23А



ФІГ. 23С