

Наведений опис допомагає зрозуміти винахід, але не є рівнем техніки винаходу.

Клітинна сигналізація є фундаментальним механізмом, в якому зовнішні стимули регулюють різноманітні клітинні процеси. Одним з ключових біохімічних механізмів передачі сигналу є оборотне фосфорилювання білків, що дозволяє регулювати активність повністю розвинутих білків, змінюючи їх структуру та функцію.

Найкраще описані протеїнкінази еукаріот, що фосфорилюють білки по спиртовій групі серинових, треонінових та тирозинових залишків. Ці кінази поділяються на дві групи: специфічні до фосфорилювання серину й треоніну; і специфічні до фосфорилювання тирозину. Деякі кінази, що мають "подвійну специфічність", здатні до фосфорилювання по тирозину, а також по залишкам серину/треоніну.

Протеїнкінази можуть також бути охарактеризовані за їх розташуванням всередині клітини. Деякі кінази є трансмембранними рецепторними білками, здатними зв'язувати ліганди зовні клітинної мембрани. Зв'язування лігандів змінює рецепторну протеїнкіназу каталітичну активність. Інші є нерецепторними білками, що не містять трансмембранного домену. Нерецепторні протеїнкінази знаходяться в багатьох клітинних компартментах від внутрішньої поверхні клітинної мембрани до ядра.

Багато кіназ беруть участь у регуляторних каскадах, де до їх субстратів можуть належати інші кінази, чия активність регулюється їх станом фосфорилювання. Кінець кінцем, активність підлеглого ефектора модулюється фосфорилюванням внаслідок активації такого шляху.

До сімейства серинових/треонінових кіназ належать члени, що регулюють багато ланок каскадів сигналізації, включаючи каскади, що контролюють ріст клітини, міграцію, диференціацію, експресію генів, скорочення м'язів, метаболізм глюкози, синтез білків у клітині й регулювання клітинного циклу.

Прикладом нерецепторних протеїнкіназ, що фосфорилюють білкові мішені по залишках серину та треоніну, є RAF. RAF модулює каталітичну активність інших протеїнкіназ, наприклад, протеїнкінази, що фосфорилює й таким чином активує активовану мітогеном протеїнкіназу (MAPK). Сама RAF активується мембранозв'язаним білком RAS, який у свою чергу активується у відповідь на активовані лігандом рецепторні тирозинпротеїнкінази, такі як рецептор епідермального фактора росту (EGFR) і рецептор тромбоцитарного фактора росту (PDGFR). Біологічна важливість RAF у контролюванні клітинних процесів є особливою, зокрема завдяки тому факту, що змінені форми RAF можуть викликати рак в організмах. Доказ важливості RAF у злоякісності наведений у Monia et al., 1996, *Nature Medicine* 2:668, представлений тут шляхом посилання, включаючи всі малюнки та таблиці.

Для винайдення нових способів лікування раку й інших хвороб, дослідники в біомедичній галузі й хіміки розробили, синтезували й тестували молекули, що інгібують функцію протеїнкіназ. Деякі малі органічні молекули утворюють клас сполук, що модулюють функцію протеїнкіназ. До прикладів молекул, що інгібують функцію протеїнкіназ, належать моноциклічні, біциклічні або гетероциклічні арильні сполуки (PCT WO 92/20642), такі як вінілен-азаїндольні похідні (PCT WO 94/14808), 1-циклопропіл-4-піридилхінолони (патент США №5330992), стирилові сполуки (Levitzi, et al., патент США №5217999, і "Стирилові сполуки, що інгібують EGF рецепторні тирозинкінази", Lyon i Lyon, Docket №208/050), стирилзаміщені піридилові сполуки (патент США №5,302,606), певні хіназолінові похідні (Європейська патентна заявка №0566266 AI), селеноіндоли та селеніди (PCT WO 94/03427), трициклічні полігідроксильні сполуки (PCT WO 92/21660) і сполуки бензилфосфонові кислоти (PCT WO 91/15495).

Сполуки, що можуть проникати крізь клітинні мембрани й є резистентними до кислотного гідролізу, є потенційно кращими терапевтичними засобами, оскільки вони можуть становитися високобiodоступними після орального введення пацієнтам. Проте, багато з цих інгібіторів протеїнкіназ лише слабо інгібують функцію протеїнкіназ. Крім того, багато з них інгібують багато протеїнкіназ і, таким чином, викликають чисельні побічні ефекти в якості терапевтичного засобу проти хвороби.

Незважаючи на значний прогрес, що був досягнутий у створенні сполук для лікування раку, в галузі залишається потреба ідентифікації окремих структур і протоколів заміщення, що дають змогу утворювати сполуки, здатні модулювати функції окремих протеїнкіназ.

Цей винахід частково стосується способів модулювання функції серинових/треонінових протеїнкіназ сполуками - похідними 5-азахіноксаліну. Способи включають клітини, що експресують серинову/треонінову протеїнкіназу, таку як RAP. Крім того, винахід описує способи запобігання й лікування хвороб, пов'язаних з сериною/треоніною протеїнкіназою, у організмах сполукою, що визначається способами, описаними в цьому винаході. Крім того, винахід стосується фармацевтичних композицій, які складаються зі сполук, що визначаються способами, описаними в цьому винаході.

1. Способи скринінгу сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази

Способи цього винаходу пропонують засоби модулювання функцій рецепторних і цитозольних серинових/треонінових протеїнкіназ. Ці способи пропонують засоби модулювання ферментів *in vitro* та *in vivo*. Для застосування *in vitro* способи винаходу стосуються частково способу ідентифікації сполук, що модулюють функцію серинових/треонінових протеїнкіназ.

Таким чином, у першому аспекті винахід стосується способу модулювання функції серинової/треонінової протеїнкінази сполукою - похідною азабензімідазолу. Азабензімідазолова сполука за бажанням заміщена органічними групами. Спосіб полягає у впливі сполуки на клітини, що експресують серинову/треонінову протеїнкіназу.

Термін "функція" стосується ролі серинової/треонінової протеїнкінази в клітині. До сімейства серинових/треонінових протеїнкіназ належать члени, що регулюють багато ланок у сигнальних каскадах, включаючи каскади, що контролюють ріст клітин, міграцію, диференціацію, експресію генів, скорочення м'язів, метаболізм глюкози, синтез білків в клітині й регулювання клітинного циклу.

Термін "каталітична активність" в контексті винаходу стосується швидкості, за якої протеїнкіназа фосфорилює субстрат. Каталітичну активність можна виміряти як функцію часу, наприклад, визначенням кількості субстрату, перетвореного на продукт. Фосфорилювання субстрату відбувається в активному центрі протеїнкінази. Активний центр - це западина, в який субстрат зв'язується з протеїнкіназою й піддається фосфорилюванню.

Термін "субстрат", що використовується в цьому винаході, стосується молекули, що фосфорилюється сериною/треоніною протеїнкіназою. Краще, якщо субстратом є пептид, і ще краще - білок. Стосовно

протеїнкінази RAF, кращими субстратами є MEK, а субстратом MEK - MAPK.

Термін "активує" стосується підвищення клітинної функції протеїнкінази. Краще, якщо функцією протеїнкінази є взаємодія з природним партнером, що зв'язується з нею, і найкраща каталітична активність.

Термін "інгібувати" стосується зменшення функції протеїнкінази в клітині. Краще, якщо функцією протеїнкінази є взаємодія з природним партнером, що зв'язується з нею, і найкраща каталітична активність.

Термін "модулює" стосується зміни функції протеїнкінази за рахунок підвищення або зменшення вірогідності того, що утворюється комплекс між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з нею. Краще, якщо модулятор підвищує вірогідність того, що такий комплекс утворюється між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з нею, ще краще, якщо підвищує або зменшує вірогідність того, що утворюється комплекс між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з нею, залежно від концентрації сполуки, яку перетворює протеїнкіназа, і найкраще, якщо зменшує вірогідність того, що утворюється комплекс між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з нею. Краще, якщо модулятор активує каталітичну активність протеїнкінази, ще краще, якщо активує або інгібує каталітичну активність протеїнкінази залежно від концентрації сполуки, що перетворює протеїнкіназа, або найкраще, якщо інгібує каталітичну активність протеїнкінази.

Термін «комплекс» стосується з'єднання принаймні двох молекул, зв'язаних одна з одною. Комплекси передачі сигналу часто містять принаймні дві білкових молекули, зв'язаних одна з одною. Наприклад, рецепторна тирозинова протеїнкіназа GRB2, SOS, RAF і RAS з'єднується з утворенням комплексу передачі сигналу у відповідь на мітогенний ліганд.

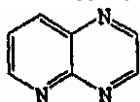
Термін «природний зв'язуючий партнер» стосується поліпептидів, що зв'язуються з протеїнкіназою в клітинах. Природні партнери, що зв'язуються з протеїнкіназами, можуть відігравати певну роль у передачі сигналу в процесі передачі сигналу протеїнкіназою. Зміна у взаємодії протеїнкінази й природного партнера, що зв'язується з нею, може виявитись як підвищена або зменшена вірогідність того, що утворюється взаємодія, або підвищена, або зменшена концентрація комплексу протеїнкінази/природного партнера, що зв'язується з нею.

Природний партнер, що зв'язується з протеїнкіназою, може зв'язуватись з внутрішньоклітинною частиною протеїнкінази з високою афінністю. Висока афінність представляє рівновагу константи зв'язування порядку 10^{-6} М або менше. Крім того, природний партнер, що зв'язується з протеїнкіназою, може також короткочасно взаємодіяти з внутрішньоклітинною частиною протеїнкінази й хімічно модифікувати її. Природні партнери, що зв'язуються з протеїнкіназою, вибрані з групи, до якої належать, крім іншого, гомологічні домени SRC - 2 (SH2) або 3 (SH3), інші фосфорилтирозинзв'язуючі (PTB) домени, фактори обміну гуанінових нуклеотидів, фосфатази білків та інші протеїнкінази. Легкодоступними є способи визначення змін у взаємодіях між протеїнкіназами та їх природними партнерами, що зв'язуються з ними.

Термін "серинова/треонінова протеїнкіназа" стосується ферменту, що має послідовність амінокислот з принаймні 10% амінокислотною ідентичністю у порівнянні з іншими ферментами, що фосфорилують білки по залишках серину та треоніну. Серинова/треонінова протеїнкіназа каталізує додавання фосфату до залишків серину та треоніну білків. Серинові/треонінові протеїнкінази можуть існувати як мембранозв'язані білки або цитозольні білки.

Термін "піддавання дії", що використовується в цьому винаході, стосується змішування розчину, що складається з 5-азахіноксалинової сполуки винаходу, з рідким середовищем, що містить клітини згідно із способом. Розчин, що містить сполуку, може також містити інший компонент, такий як диметилсульфоксид (DMSO), який полегшує проникнення 5-азахіноксалинової сполуки або сполук у клітини згідно із способом. Розчин, що містить 5-азахіноксалинову сполуку, може бути доданий до середовища, що містить клітини, використовуючи пристрій для переносу, наприклад, такий, що в основі має піпетку або шприц.

Термін "5-азахіноксалинова сполука" стосується 5-азахіноксалинової органічної сполуки, заміщеної на хімічні замісники. 5-азахіноксалинові сполуки мають загальну структуру:



Термін "заміщений", у цьому винаході стосується 5-азахіноксалинової сполуки, що є похідною з будь-якою кількістю хімічних замісників.

У кращому втіленні винахід стосується способу модулювання функції серинової/треонінової протеїнкінази, де протеїнкіназою є RAF.

Протеїнкіназа RAF фосфорилує білкові мішені по серинових або треонінових залишках. Однією такою білковою мішенню є протеїнкіназа (MEK), що фосфорилує й в результаті активує протеїнкіназу, що активується мітогеном (MAPK). Сам RAF активується мембранозв'язаним гуанінтрифосфатгідролізуючим ферментом RAS у відповідь на рецепторні тирозинкінази, що активуються мітогеном, такі як рецептор епідермального фактора росту (EGFR) і рецептор тромбоцитарного фактора росту (PDGFR).

Способи цього винаходу можуть визначити сполуки, що модулюють функцію протеїнкінази RAF в клітинах. RAF фосфорилує протеїнкіназу (MEK), яка, у свою чергу, фосфорилує протеїнкіназу, що активується мітогеном (MAPK). Тести, що виявляють лише фосфорилування MEK за допомогою RAF, не є чутливими, тому що фосфорилування MEK є незначним. Для подолання цієї проблеми проводять фосфорилування MEK і MAPK у тестах цього винаходу. Сигнал фосфорилування MAPK підсилює сигнал фосфорилування MEK і тому дозволяє виконувати RAF-залежне фосфорилування, таке як ферментний імуносорбентний аналіз. Крім того, тест винаходу виконують з високим виходом так, що багато сполук можуть бути швидко виявлені за короткий проміжок часу.

В іншому аспекті винахід описує спосіб визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, що складається з етапів піддавання клітин, що експресують серинову/треонінову протеїнкіназу, дії сполуки і виявлення впливу на клітини.

Термін "виявлення" стосується спостереження ефекту додавання сполуки до клітин згідно із способом цього винаходу. Вплив може проявлятися як зміна фенотипу клітини, проліферації клітини, каталітичної активності протеїнкінази або як взаємодія між протеїнкіназою та природним партнером, що зв'язується з

протеїнкіназою.

Термін "вплив" стосується зміни або відсутності зміни фенотипу клітини, або проліферації клітини. "Вплив" може також стосуватися зміни або відсутності зміни в каталітичній активності протеїнкінази. "Вплив" може також стосуватися змін або відсутності зміни у взаємодії між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з протеїнкіназою.

Краще втілення винаходу стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, де вплив виражається як зміна або відсутність зміни фенотипу клітини.

Термін "фенотип клітини" стосується зовнішнього вигляду клітини чи тканини або функції клітини чи тканини. До прикладів фенотипу клітини належать розмір клітини (зменшення або збільшення), проліферація клітини (підвищення або зменшення кількості клітин), диференціація клітин (зміна або відсутність зміни у формі клітини), виживаність клітин, апоптоз (смерть клітин), або використання метаболічної поживної речовини (наприклад, поглинання глюкози). Зміна або відсутність зміни фенотипу клітини легко визначаються способами, що відомі у галузі.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, де впливом є зміна або відсутність зміни в проліферації клітин.

Термін "проліферація клітин" стосується швидкості, за якої група клітин ділиться. Кількість клітин, що зростають у посудині, може підраховувати фахівець шляхом звичайного візуального підрахунку кількості клітин у відомому об'ємі, використовуючи звичайний світловий мікроскоп. Як альтернатива, швидкість проліферації клітин можна підрахувати за допомогою лабораторного пристрою, що оптично або за рахунок світлопровідності вимірює щільність клітин у певному середовищі.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, де впливом є зміна або відсутність змін у взаємодії між сериною/треоніною протеїнкінази та природним партнером, що зв'язується з протеїнкіназою.

Термін "взаємодія" в контексті винаходу описує комплекс, що утворюється між внутрішньоклітинною частиною протеїнкінази та природним партнером, що зв'язується з протеїнкіназою, або сполукою. Термін "взаємодія" може також стосуватися комплексу, що утворюється між сполукою винаходу з внутрішньоклітинними частинами й зовнішньоклітинними частинами протеїнкінази, що досліджується. Хоча цитозольна протеїнкіназа не має зовнішньоклітинної частини, рецепторна протеїнкіназа має зовнішньоклітинну й внутрішньоклітинну частину.

Термін "внутрішньоклітинна частина", що використовується в цьому винаході, стосується частини протеїнкінази, яка існує всередині клітини. Термін "зовнішньоклітинна частина", що використовується в цьому винаході, стосується частини протеїнкінази, яка існує назовні клітини.

У кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, що складається з наступних етапів: (а) лізису клітин для одержання лізату, що містить серинову/треонінову протеїнкіназу; (б) адсорбції серинової/треонінової протеїнкінази до антитіла; (в) інкубування адсорбованої серинової/треонінової протеїнкінази з субстратом або субстратами; і (г) адсорбції субстрату або субстратів до твердої основи або антитіла. Етап спостереження впливу на клітини складається з вимірювання концентрації фосфату субстрату або субстратів.

Термін "лізис", що використовується в цьому винаході, стосується способу руйнування цілісності клітини так, що її внутрішній вміст вивільнюється. Лізис клітин виконується багатьма способами, відомими фахівцям у галузі. Краще, якщо за допомогою обробки ультразвуком або ще краще, якщо за допомогою детергенту.

Термін "антитіло", що використовується в цьому винаході, стосується білкової молекули, що специфічно зв'язується з протеїнкіназою. Краще, якщо антитіло зв'язується з одним класом протеїнкіназ, і ще краще, якщо специфічно зв'язується з протеїнкіназою RAF.

Термін "специфічно зв'язує", що використовується в цьому винаході, стосується антитіла, що зв'язується з протеїнкіназою з вищою афінністю, ніж інша протеїнкіназа або клітинний білок. Антитіло, що специфічно зв'язується з протеїнкіназою, зв'язуватиме більшу концентрацію специфічної протеїнкінази, ніж будь-яка інша протеїнкіназа або клітинний білок.

Термін "адсорбування", що використовується в цьому винаході, стосується зв'язування молекули з поверхнею антитіла або твердої основи. До прикладів твердих основ належать хімічно модифіковані целюлоза, наприклад, фосфоцелюлоза, та нейлон. Антитіла можуть бути зв'язані з твердими основами, використовуючи способи, добре відомі звичайним фахівцям у цій галузі. Див., наприклад, Harlo & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratories.

Термін "вимірювання концентрації фосфату", що використовується в цьому винаході, стосується способів, що зазвичай відомі звичайним фахівцям у цій галузі. До цих способів можуть належати підрахування концентрації фосфорилизованого субстрату або визначення відносної кількості фосфорилизованого субстрату. Ці способи можуть включати адсорбцію субстрату до мембрани й визначення кількості фосфорилизованого субстрату з використанням радіоактивних ізотопів.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, які модулюють функцію серинових/треонінових протеїнкіназ, що складається з наступних етапів: (а) лізису клітин для одержання лізату, що містить RAF; (б) адсорбування RAF до антитіла; (в) інкубування адсорбованої RAF з MEK і MAPK; і (г) адсорбування MEK і MAPK до твердої основи або антитіла чи антитіл. Етап визначення впливу на клітини складається з визначення концентрації фосфату вищезгаданих MEK і MAPK.

У кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію серинової/треонінової протеїнкінази, де сполука - похідна 5-азахіноксаліну має структуру, наведену у формулі I, як описано в цьому винаході, або будь-яку з її підгруп, наведених у цьому винаході.

Термін "сполука" стосується сполуки або її фармацевтично прийнятної солі, естеру, аміді, проліків, ізомеру або метаболіту.

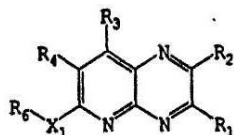
Термін "фармацевтично прийнятна сіль" стосується композиції сполуки, що не змінює біологічну активність і властивості сполуки. Фармацевтичні солі можуть бути одержані за допомогою реакції сполуки винаходу з неорганічними або органічними кислотами, такими як соляна кислота, бромводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота,

п-толуолсульфонова кислота, саліцилова кислота й подібні.

Термін "проліки" стосується агента, що перетворюється на вихідні ліки *in vivo*. Проліки можна легше вводити, ніж вихідні ліки в деяких ситуаціях. Наприклад, проліки можуть бути біодоступними при оральному введенні, у той час як вихідні - не можуть, або проліки можуть покращувати розчинність, що робить їх придатними для внутрішньовенного введення.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу визначення сполук, що модулюють функцію сериної/треонінової протеїнкінази, де сполука є похідною 5-азахіноксаліну й має структуру, наведену у формулі I, де сполука, що є похідною 5-азахіноксаліну, вибрана з групи, що складається зі сполук SAQAR.

Термін "сполуки SAQAR" стосується групи сполук похідних 5-азахіноксаліну, що мають структуру, наведену у формулі I, і номери A-1 - A-90 в наступній таблиці:



(i)

Сполука №	R ₂	R ₁	R ₆ X ₁
A-1	H	4-гідроксифеніл	Феніламіно
A-2	H	4-гідроксифеніл	Бензиламіно
A-3	Метил	феніл	Метокси
A-4	Феніл	феніл	Метокси
A-5	Метил	феніл	4-фторбензиламіно
A-6	Феніл	феніл	4-фторбензиламіно
A-7	H	феніл	Феніламіно
A-8	H	4-гідроксифеніл	2-карбоксибензиламіно
A-9	H	4-гідроксифеніл	3-карбоксибензиламіно
A-10	H	4-гідроксифеніл	4-карбоксибензиламіно
A-11	H	4-гідроксифеніл	2-нітробензиламіно
A-12	H	4-гідроксифеніл	3-нітробензиламіно
A-13	H	4-гідроксифеніл	4-нітробензиламіно
A-14	H	4-гідроксифеніл	2-метилбензиламіно
A-15	H	4-гідроксифеніл	3-метилбензиламіно
A-16	H	4-гідроксифеніл	4-метилбензиламіно
A-17	H	4-гідроксифеніл	2-хлорбензиламіно
A-18	H	4-гідроксифеніл	3-хлорбензиламіно
A-19	H	4-гідроксифеніл	4-хлорбензиламіно
A-20	H	4-гідроксифеніл	2-фторбензиламіно
A-21	H	4-гідроксифеніл	3-фторбензиламіно
A-22	H	4-гідроксифеніл	4-фторбензиламіно
A-23	H	4-гідроксифеніл	2-(триформетил)бензиламіно
A-24	H	4-гідроксифеніл	3-(триформетил)бензиламіно
A-25	H	4-гідроксифеніл	4-(триформетил)бензиламіно
A-26	H	4-гідроксифеніл	фенетил-1-аміно
A-27	H	4-гідроксифеніл	2-карбоксифеніламіно
A-28	H	4-гідроксифеніл	3-карбоксифеніламіно
A-29	H	4-гідроксифеніл	4-карбоксифеніламіно
A-30	H	4-гідроксифеніл	2-нітрофеніламіно
A-31	H	4-гідроксифеніл	3-нітрофеніламіно
A-32	H	4-гідроксифеніл	4-нітрофеніламіно
A-33	H	4-гідроксифеніл	2-метилфеніламіно
A-34	H	4-гідроксифеніл	3-метилфеніламіно
A-35	H	4-гідроксифеніл	4-метилфеніламіно
A-36	H	4-гідроксифеніл	2-хлорфеніламіно
A-37	H	4-гідроксифеніл	3-хлорфеніламіно
A-38	H	4-гідроксифеніл	4-хлорфеніламіно
A-39	H	4-гідроксифеніл	2-фторфеніламіно
A-40	H	4-гідроксифеніл	3-фторфеніламіно
A-41	H	4-гідроксифеніл	4-фторфеніламіно
A-42	H	4-гідроксифеніл	2-(триформетил)феніламіно
A-43	H	4-гідроксифеніл	3-(триформетил)феніламіно
A-44	H	4-гідроксифеніл	4-(триформетил)феніламіно
A-45	H	4-гідроксифеніл	пірид-2-аміно
A-46	H	4-гідроксифеніл	пірид-3-аміно
A-47	H	4-гідроксифеніл	пірид-4-аміно
A-48	H	4-гідроксифеніл	пірид-2-метиламіно
A-49	H	феніл	2-карбоксибензиламіно
A-50	H	феніл	3-карбоксибензиламіно

A-51	H	феніл	4-карбоксибензиламіно
A-52	H	феніл	2-нітробензиламіно
A-53	H	феніл	3-нітробензиламіно
A-54	H	феніл	4-нітробензиламіно
A-55	H	феніл	2-метилбензиламіно
A-56	H	феніл	3-метилбензиламіно
A-57	H	феніл	4-метилбензиламіно
A-58	H	феніл	2-хлорбензиламіно
A-59	H	феніл	3-хлорбензиламіно
A-60	H	феніл	4-хлорбензиламіно
A-61	H	феніл	2-фторбензиламіно
A-62	H	феніл	3-фторбензиламіно
A-63	H	феніл	4-фторбензиламіно
A-64	H	феніл	2-(трифторметил)бензиламіно
A-65	H	феніл	3-(трифторметил)бензиламіно
A-66	H	феніл	4-(трифторметил)бензиламіно
A-67	H	феніл	фенетил-1-аміно
A-68	H	феніл	2-карбоксифеніламіно
A-69	H	феніл	3-карбоксифеніламіно
A-70	H	феніл	4-карбоксифеніламіно
A-71	H	феніл	2-нітрофеніламіно
A-72	H	феніл	3-нітрофеніламіно
A-73	H	феніл	4-нітрофеніламіно
A-74	H	феніл	2-метилфеніламіно
A-75	H	феніл	3-метилфеніламіно
A-76	H	феніл	4-метилфеніламіно
A-77	H	феніл	2-хлорфеніламіно
A-78	H	феніл	3-хлорфеніламіно
A-79	H	феніл	4-хлорфеніламіно
A-80	H	феніл	2-фторфеніламіно
A-81	H	феніл	3-фторфеніламіно
A-82	H	феніл	4-фторфеніламіно
A-83	H	феніл	2-(трифторметил)феніламіно
A-84	H	феніл	3-(трифторметил)феніламіно
A-85	H	феніл	4-(трифторметил)феніламіно
A-86	H	феніл	пірид-2-аміно
A-87	H	феніл	пірид-3-аміно
A-88	H	феніл	пірид-4-аміно
A-89	H	феніл	пірид-2-метиламіно
A-90	H	4-метоксифеніл	Феніламіно

II. Способи запобігання або лікування хвороб

В іншому аспекті винахід стосується способу запобігання або лікування хвороби в організмі. Спосіб складається з наступних етапів: (а) введення сполуки винаходу, що описується в цьому винаході формулою I, з будь-яким носієм в організмі; і (б) стимулювання або переривання ненормальної взаємодії.

Термін «організм» стосується будь-якої живої істоти, що складається з принаймні однієї клітини. Організм можуть бути таким простим, як одна еукаріотична клітина, або таким складним, як організм ссавців. У кращих втіленнях організм стосується людини або ссавців.

Термін «попередження» стосується способу винаходу, що зменшує вірогідність або позбавляє можливість того, що організм набуває або створює умови для розвитку хвороби.

Термін «лікування» стосується способу винаходу, що чинить терапевтичний вплив і принаймні частково полегшує або позбавляє організм від хвороби.

Термін «терапевтичний вплив» стосується інгібування росту клітин, що викликають або роблять внесок в хворобу (наприклад рак), термін «терапевтичний вплив» також стосується інгібування факторів росту, що викликають або роблять внесок в розвиток хвороби. Терапевтичний вплив полегшує деякою мірою один або кілька з симптомів хвороби. Стосовно лікування раку терапевтичний вплив стосується одного або кілька з наступних етапів: (а) зменшення розміру пухлини; (б) інгібування (тобто уповільнення або зупинення) метастазування пухлини; (в) інгібування росту пухлини; і (г) полегшення деякою мірою одного або кількох симптомів, пов'язаних з хворобою. Сполуки, що можуть бути визначені, як описано в цьому винаході, виявили ефективність проти лейкемій, за винятком того, що поряд з інгібуванням метастазів сполуки можуть уповільнювати або зменшувати проліферацію клітин або ріст клітин.

Термін "хвороба" стосується функцій клітин або тканин організму, що відрізняються від їх нормальних функцій в організмі. Хвороба може стосуватися проліферації клітин, диференціації клітин або виживаності клітин.

Ненормальна проліферація клітин стосується раку, такого як фібрози й мезангіальні розлади, ненормальний ангиогенез і васкулогенез, загоєння ран, псоріаз, цукровий діабет та запалення.

Ненормальна диференціація стосується, крім іншого, нейродегенеративних розладів, повільного загоєння ран, а також способів трансплантації тканин.

Ненормальна виживаність клітин стосується станів, в яких шляхи запрограмованої смерті клітин (апоптоз), активовані або інгібовані. Кілька протеїніназ пов'язані зі шляхами апоптозу. Відхилення у функції

будь-якої однієї протеїнкінази може призвести до безсмертя клітин або передчасної смерті клітин.

Проліферація клітин, диференціація й виживаність є феноменом, що просто вимірюється способами у галузі. До цих способів можуть належати підрахунок кількості клітин або зовнішній вигляд клітин під мікроскопом у часі (наприклад, у днях).

Термін "введення" стосується головним чином надходження до організму, а саме способу включення сполук в клітини або тканини організму. Хвороби можна попереджати або лікувати, якщо клітини або тканини організму існують всередині організму або зовні організму. Клітини, що існують зовні організму, можуть утримуватись або вирощуватись в посудинах для культур клітин. Для клітин, що знаходяться всередині організму, існує багато способів введення сполук, включаючи (крім іншого) оральне, парентеральне, нашірне, ін'єкційне й аерозольне застосування. Для клітин, що знаходяться зовні організму існують чисельні способи введення сполуки, включаючи (крім іншого) методи мікроін'єкції в клітини, способи трансформації та способи, що використовують носії.

У кращому втіленні винахід стосується способу попередження або лікування хвороби в організмі, де сполука - похідна 5-азахіноксаліну має структуру, наведену у формулі I, як описано в цьому винаході, або будь-яка з її підгруп, наведена в цьому винаході.

В інших кращих втіленнях винахід стосується способу попередження або лікування хвороби в організмі, де сполука - похідна 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, вибрана з групи, що складається зі сполук SAQAR.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу попередження або лікування хвороби в організмі, де організмом є організм ссавця.

Краще, якщо термін "ссавець" стосується таких організмів як миші, щури, кролі, морські свинки та козли, ще краще, якщо мавп і людиноподібних мавп, і найкраще, якщо людини.

У ще іншому кращому втіленні винахід стосується способу запобігання або лікування хвороби в організмі, де хворобою є рак або фіброз.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу запобігання або лікування хвороби в організмі, де рак вибраний з групи, що складається з раку легень, раку яєчників, раку грудей, раку мозку, міжвісьового раку мозку, раку товстої кишки, раку простати, саркоми, саркоми Капоші, меланоми та гліоми.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується способу запобігання або лікування хвороби в організмі, де спосіб стосується хвороби, пов'язаної з порушенням шляху передачі сигналу, що характеризується взаємодією між сериновою/треоніновою протеїнкіназою і природним партнером, який зв'язується з протеїнкіназою.

Термін "шлях передачі сигналу" стосується розповсюдження сигналу. Взагалі, зовнішньоклітинний сигнал передається через клітинну мембрану з утворенням внутрішньоклітинного сигналу. Цей сигнал може потім стимулювати клітинну відповідь. Термін також стосується сигналів, що розповсюджуються цілком всередині клітини. Молекули поліпептидів, що беруть участь в процесах передачі сигналу, є типово рецепторними й нерцепторними протеїнкіназами, рецепторними й нерцепторними фосфатазами білків, факторами обміну нуклеотидів і факторами транскрипції.

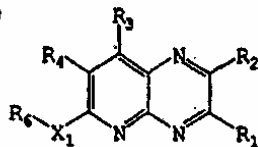
Термін "відхилення", у зв'язку з процесом передачі сигналу, стосується протеїнкінази, що надмірно або недостатньо експресується в організмі, піддана мутації таким чином, що її каталітична активність є нижчою або вищою, ніж активність протеїнкінази дикого типу, або піддана мутації таким чином, що вона більше не може взаємодіяти з природним партнером, що зв'язується з протеїнкіназою, більше не модифікується іншою протеїнкіназою або фосфатазою білка, або більше не взаємодіє з природним партнером, що зв'язується з протеїнкіназою.

Термін "стимулюючи або перериваючи ненормальну взаємодію" стосується способу, що може бути здійснений введенням сполуки винаходу в клітини або тканини в організмі. Сполука може стимулювати взаємодію між протеїнкіназою й природним партнером, що зв'язується з нею за рахунок утворення сприятливих взаємодій з чисельними атомами на поверхні місця утворення комплексу. Як альтернатива, сполука може інгібувати взаємодію між протеїнкіназою й природним партнерами, що зв'язуються з нею, за рахунок створення сприятливих взаємодій, що утворюються між атомами на поверхні місця утворення комплексу. В іншому кращому втіленні винахід стосується способу запобігання або лікування хвороби в організмі, де сериновою/треоніновою протеїнкіназою є RAF.

III. Сполуки та фармацевтичні композиції винаходу

В іншому аспекті винахід стосується 5-азахіноксалінових сполук, що мають структури, наведені у формулі I:

(I)



де

(a) R₁, R₂ і R₆ незалежно вибрані з групи, що складається з

(i) водню;

(ii) насиченого або ненасиченого алкілу;

(iii) аміну формули NX₂X₃, де X₂ і X₃ незалежно вибрані з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних кільцевих складових;

(iv) галогену або тригалометилу;

(v) кетону формули -CO-X₄, де X₄ вибрано з групи, що складається з водню, алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових;

(vi) карбонової кислоти формули -(X₅)_n-COOH або естеру формули -(X₆)-COO-X₇, де X₅, X₆ і X₇ незалежно вибрані з групи, що складається з алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, і де n - це 0 або 1;

(vii) спирту формули $(X_8)_n\text{-OH}$ або алкокси складової формули $-(X_8)_n\text{-O-X}_9$, де X_8 і X_9 незалежно вибрані з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, де кільце за бажанням заміщено на один або кілька замісників, незалежно вибраних з групи, що складається з алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи та естеру, і де n - це 0 або 1;

(viii) амідів формули -NHCOX_{10} , де X_{10} вибрана з групи, що складається з алкілу, гідроксилу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, де кільце за бажанням заміщено на один або кілька замісників, незалежно вибраних з групи, що складається з алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи або естеру;

(ix) $\text{-SO}_2\text{NX}_{11}\text{X}_{12}$, де X_{11} і X_{12} вибрані з групи, що складається з водню, алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних кільцевих складових;

(x) п'ятичленної або шестичленної арильної або гетероарильної кільцевої складової, за бажанням заміщеної на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи та естеру;

(xi) альдегіду формули -CO-H ; і

(xii) сульфону формули $\text{-SO}_2\text{-X}_{13}$, де X_{13} вибрано з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових; і

(б) X_1 вибраний з групи, що складається з азоту, сірки та кисню.

Термін "насичений алкіл" стосується алкільної складової, що не містить будь-якої алкенової або алкінової складової. Алкільна складова може бути розгалужена або нерозгалужена.

Термін "ненасичений алкіл" стосується алкільної складової, що містить принаймні одну алкенову або алкінову складову. Алкільна складова може бути розгалужена або нерозгалужена.

Термін "амін" стосується хімічної складової формули NR_1R_2 , де R_1 і R_2 незалежно вибрані з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, де кільце за бажанням заміщено на один або кілька замісників, незалежно вибраних з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи та естеру.

Термін "арил" стосується ароматичної групи, яка має принаймні одне кільце, що має сполучену р-електронну систему й містить карбоциклічний арил (наприклад, феніл) і гетероциклічний арил (наприклад, піридин). Термін "карбоциклічний" стосується сполуки, що містить одну або кілька ковалентно замкнутих кільцевих структур так, що всі атоми, які утворюють структуру кільця, є атомами вуглецю. Термін, таким чином, відокремлює карбоциклічні кільця від гетероциклічних кілець, в яких кільцева структура містить принаймні один атом, що відрізняється від вуглецю. Термін "гетероарил" стосується арильної групи, яка містить принаймні одне гетероциклічне кільце.

Термін "галоген" стосується атома, вибраного з групи, що складається з фтору, хлору, броду та йоду.

Термін "кетон" стосується хімічної складової формули $-(R)_n\text{-CO-R}'$, де R і R' вибрані з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу і п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, і де n - 0 або 1.

Термін "карбонова кислота" стосується хімічної складової формули $-(R)_n\text{-COOH}$, де R вибрана з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, і де n - 0 або 1.

Термін "естер" стосується хімічної складової формули $-(R)_n\text{-COOR}'$, де R і R' незалежно вибрані з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, і де n - 0 або 1.

Термін "спирт" стосується хімічного замісника формули -OH , де R вибрана з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, де кільце за бажанням заміщено на один або кілька замісників, незалежно вибраних з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи та естеру.

Термін "амід" стосується хімічного замісника формули -NHCO-R , де R вибрана з групи, що складається з водню, алкілу, гідроксилу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, де кільце за бажанням заміщено на один або кілька замісників, незалежно вибраних з групи, що складається з алкілу, галогену, тригалометилу, карбоксилату, нітрогрупи або естеру.

Термін "складова алкокси" стосується хімічного замісника формули -OR , де R - це водень чи насичена або ненасичена алкільна складова.

Термін "альдегід" стосується хімічної складової формули $-(R)_n\text{-CHO}$, де R вибрана з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових, і де n - 0 або 1.

Термін "сульфон" стосується хімічної складової формули $\text{-SO}_2\text{-R}$, де R вибрана з групи, що складається з насиченого або ненасиченого алкілу й п'ятичленних чи шестичленних арильних або гетероарильних складових.

В іншому кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R_3 і R_4 незалежно вибрані з групи, що складається з водню й насиченого або ненасиченого алкілу.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R_3 і R_4 є атомами водню.

В інших кращих втіленнях винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R_1 і R_2 вибрані з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу, п'ятичленного чи шестичленного арилу або гетероарильної кільцевої складової, за бажанням заміщеної на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, гідрокси, алкокси, карбоксилату, нітрогрупи та естеру.

У інших кращих втіленнях винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R_1 - це феніл, за бажанням заміщений на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається з алкілу, галогену, гідрокси й алкокси складових.

В іншому кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₁ - це феніл.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₁ - це 4-гідроксифеніл.

В інших кращих втіленнях винахід стосується сполуки похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₂ вибрано з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу й фенілу, за бажанням заміщеного на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається з алкілу, галогену, гідрокси й алкокси складових.

В іншому кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₂ - це водень.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₂ - це метил.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₂ - це феніл.

В іншому кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де X₁ - це атом азоту або кисню.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де X₁ - це кисень.

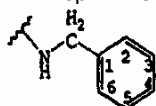
У ще одному кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де X₁ - це атом азоту.

В інших кращих втіленнях винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₄ вибрано з групи, що складається з водню, насиченого або ненасиченого алкілу, за бажанням заміщеного на п'ятичленну чи шестичленну арильну або гетероарильну кільцеву складову, за бажанням заміщену на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, гідрокси, алкокси, карбоксилату, нітрогрупи й естеру; і п'ятичленної чи шестичленної арильної або гетероарильної кільцевої складової, за бажанням заміщеної на один, два або три замісники, незалежно вибрані з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, гідрокси, алкокси, карбоксилату, нітрогрупи та естеру.

У інших кращих втіленнях винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де R₆ і X₁ складові, взяті разом, утворюють сполуку, яка вибрана з групи, що складається із замісників SAQAR.

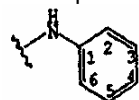
Термін "замісники SAQAR" стосується групи замісників, що складається з метокси, бензиламіно, 4-фторбензиламіно, 2-карбоксибензиламіно, 3-карбоксибензиламіно, 4-карбоксибензиламіно, 2-нітробензиламіно, 3-нітробензиламіно, 4-нітробензиламіно, 2-метилбензиламіно, 3-метилбензиламіно, 4-метилбензиламіно, 2-хлорбензиламіно, 3-хлорбензиламіно, 4-хлорбензиламіно, 2-фторбензиламіно, 3-фторбензиламіно, 4-фторбензиламіно, 2-(трифторметил)бензиламіно, 3-(трифторметил)бензиламіно, 4-(трифторметил)бензиламіно, фенетил-1-аміно, феніламіно, 2-карбоксифеніламіно, 3-карбоксифеніламіно, 4-карбоксифеніламіно, 2-нітрофеніламіно, 3-нітрофеніламіно, 4-нітрофеніламіно, 2-метилфеніламіно, 3-метилфеніламіно, 4-метилфеніламіно, 2-хлорфеніламіно, 3-хлорфеніламіно, 4-хлорфеніламіно, 2-фторфеніламіно, 3-фторфеніламіно, 4-фторфеніламіно, 2-(трифторметил)феніламіно, 3-(трифторметил)феніламіно, 4-(трифторметил)феніламіно, пірид-2-аміно, пірид-3-аміно, пірид-4-аміно та пірид-2-метиламіно.

Термін "бензиламіно" стосується групи, що має структуру, наведену в наступній формулі:



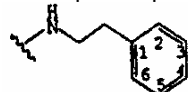
де арильне кільце може бути за бажанням заміщене у 2, 3 або 4 положенні.

Термін "феніламіно" стосується групи, що має структуру, наведену в наступній формулі:



де арильне кільце може бути за бажанням заміщене в 2, 3 або 4 положенні.

Термін «фенетил-1-аміно» стосується групи, що має структуру, наведену в наступній формулі:



Термін «пірид-2-аміно» стосується піридинового кільця, яке заміщене на NH-групу в 2 положенні. Таким самим чином, терміни "пірид-3-аміно" і "пірид-4-аміно" стосуються піридинового кільця, яке заміщене на NH-групу у 3 і 4 положеннях, відповідно.

У ще іншому кращому втіленні винахід стосується сполуки - похідної 5-азахіноксаліну, що має структуру, наведену у формулі I, де сполука - похідна 5-азахіноксаліну вибрана з групи, що складається зі сполук SAQAR.

IV. Способи синтезу винаходу

В іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що складається зі сполук, які мають структуру формули I, як описано в цьому винаході, або будь-якої з її підгруп, наведених в цьому винаході, або її солі та фізіологічно прийнятної носія або розчинника.

У кращому втіленні винахід стосується фармацевтичної композиції, де сполука - похідна 5-азахіноксаліну вибрана з групи, що складається зі сполук SAQAR.

Термін "фармацевтична композиція" стосується суміші сполуки 5-азахіноксаліну даного винаходу з іншими хімічними компонентами, такими як розчинники або носії. Фармацевтична композиція полегшує

введення сполуки в організм. У галузі існують чисельні способи введення сполук, включаючи, крім іншого, оральне, ін'єкційне, аерозольне, парентеральне та місцеве введення. Фармацевтичні композиції можуть також бути одержані за допомогою реакції сполук з неорганічними кислотами, такими як соляна кислота, бромводнева кислота, сірчана кислота, азотна кислота, фосфорна кислота, метансульфонова кислота, етансульфонова кислота, п-толуолсульфонова кислота, саліцилова кислота й подібні.

Термін "фізіологічно прийнятний" стосується носія або розчинника, що не перешкоджає біологічній активності й властивостям сполуки.

Термін "носіє" стосується хімічної сполуки, що сприяє включенню сполуки в клітини або тканини. Наприклад, диметилсульфоксид (DMSO) є носієм, що зазвичай використовується, оскільки він сприяє поглинанню багатьох органічних сполук в клітини або тканини організму.

Термін "розчинник" стосується хімічної сполуки, розведеної у воді, що розчиняє потрібну сполуку, а також стабілізує біологічно активні сполуки. Солі, розчинені у буферних розчинах, використовуються у галузі як розчинники. Одним зазвичай використовуваним буферним розчином є фосфатний буферний розчин, тому що він нагадує сольовий стан крові людини. Оскільки буферні солі можуть контролювати рН розчину за низьких концентрацій, забуферений розчинник рідко модифікує біологічну активність сполуки.

У ще іншому аспекті винахід стосується способу синтезування сполук винаходу, що складається з етапів: (а) реакції 2-аміно-6-хлор-3-нітропіридину з другою реагуючою речовиною в розчиннику й у присутності основи, де друга реагуюча речовина вибрана з групи, що складається зі спирту та аміну, з утворенням першого інтермедіату; (б) реакції першого інтермедіату з 1,2-діоном у присутності каталізатора і відновлюючого агента; і (г) очищення кінцевого продукту.

Термін "1,2-діон" стосується хімічної складової формули $R_1-C(O)C(O)-R_2$ де R_1 і R_2 незалежно вибрані з групи, що складається з водню; насиченого або ненасиченого алкілу, за бажанням заміщеного на п'ятичленну чи шестичленну арильну або гетероарильну кільцеву складову, за бажанням заміщену на один, два або три замісники, вибрані незалежно з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, гідрокси, алкокси, карбоксилату, нітрогрупи та естеру; і п'ятичленної чи шестичленної арильної або гетероарильної кільцевої складової, за бажанням заміщеної на один, два або три замісники, вибрані незалежно з групи, що складається зі складових алкілу, галогену, тригалометилу, гідрокси, алкокси, карбоксилату, нітрогрупи та естеру.

У кращому втіленні винахід стосується способу синтезу сполук винаходу де розчинником є н-бутанол.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способу синтезу сполук винаходу, де основою є карбонат калію у вигляді порошку.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується способу синтезу сполуки винаходу, де друга реагуюча речовина вибрана з групи, що складається з реагентів SAQAR.

Термін "реагенти SAQAR" стосується групи реагентів, що складається з метанолу, бензиламіну, 4-фторбензил аміну, 2-карбоксибензиламіну, 3-карбоксибензиламіну, 4-карбоксибензиламіну, 2-нітробензиламіну, 3-нітробензиламіну, 4-нітробензиламіну, 2-метилбензиламіну, 3-метилбензиламіну, 4-метилбензиламіну, 2-хлорбензиламіну, 3-хлорбензиламіну, 4-хлорбензиламіну, 2-фторбензиламіну, 3-фторбензиламіну, 4-фторбензиламіну, 2-(трифторметил)бензиламіну, 3-(трифторметил)бензиламіну, 4-(трифторметил)бензиламіну, фенетил-1-аміну, аніліну, 2-карбоксианіліну, 3-карбоксианіліну, 4-карбоксианіліну, 2-нітроаніліну, 3-нітроаніліну, 4-нітроаніліну, 2-толуїдину, 3-толуїдину, 4-толуїдину, 2-хлораніліну, 3-хлораніліну, 4-хлораніліну, 2-фтораніліну, 3-фтораніліну, 4-фтораніліну, 2-(трифторметил)аніліну, 3-(трифторметил)аніліну, 4-(трифторметил)аніліну, 2-амінопіридину, 3-амінопіридину, 4-амінопіридину та 2-метиламінопіридину.

У ще одному кращому втіленні винахід стосується способу синтезу сполуки винаходу, де третя реагуюча речовина вибрана з групи, що складається з 4-гідроксифенілглюксалу, 1-феніл-1,2-пропандіону та бензилу.

Термін "каталізатор", що використовується в цьому винаході, стосується хімічної молекули, що при додаванні до групи реагентів може підвищувати швидкість, за якої реагенти реагують з утворенням продуктів. Багато типів каталізаторів є добре відомими звичайним фахівцям у цій галузі.

У кращому втіленні винахід стосується способів синтезування сполук винаходу, де відновлюючий агент - це водень.

В іншому кращому втіленні винахід стосується способів синтезування сполук винаходу, де каталізатором є нікелевий каталізатор Ренея.

Короткий опис винаходу, наведений вище, не є обмежувачим, й інші риси та переваги винаходу стануть очевидними з наступного опису кращих втілень і формули винаходу.

Цей винахід частково спрямований на способи модулювання функції серинових/треонінових протеїнкіназ сполуками - похідними 5-азахіноксаліну. Крім того, винахід частково стосується способів ідентифікації сполук, що модулюють функцію серинових/треонінових протеїнкіназ. До способів належать клітини, що експресують серинову/треонінову протеїнкіназу, таку як RAF.

RAF - це нерепетиторна протеїнкіназа, що зв'язана з клітинною мембраною, коли вона зв'язується з активованою RAS, гуанінтрифосфатгідролізуючим ферментом. RAS активується, коли активована рецепторна тирозинова протеїнкіназа, така як EGFR або PDGFR, зв'язується з адапторним білком - GRB2, і фактор обміну гуанінових нуклеотидів - SOS. SOS видаляє гуаніндіфосфат з RAS, заміщує його на гуанінтрифосфат, і, таким чином, активує RAS. RAS потім зв'язує RAF і таким чином активує RAF. RAF може потім фосфорилювати інші білкові мішені по залишкам серину та треоніну, таких як кіназа (MEK), що фосфорилює і таким чином активує мітоген-активовану протеїнкіназу (MAPK). Таким чином, RAF існує як проміжний контролюючий фактор у мітоген-активованій передачі сигналу.

Завдяки важливий регуляторній ролі RAF в клітинах модифікації послідовності амінокислот RAF можуть змінити її функцію і, таким чином, модифікувати життєдіяльність клітини. Роль RAF у проліферації клітини є значною, виходячи зі спостереження, що мутації послідовності амінокислот RAF пов'язані з пухлинами та раками. Оскільки мутації RAF, що призводять до утворення раку в клітинах, виявляються такими, що їм властива нездатна до регулювання каталітична активність, то інгібітори RAF можуть послаблювати або навіть перешкоджати проліферації клітини, що призводить до раку в цій клітині.

Способи цього винаходу можуть виявити сполуки, що модулюють функцію протеїнкінази RAF в клітинах. RAF фосфорилує протеїнкіназу (MEK), яка у свою чергу фосфорилує мітоген-активовану протеїнкіназу (MAPK). Тести, що визначають лише фосфорилування MEK за допомогою RAF, не є чутливими, тому що рівень фосфорилування MEK є значним. Для подолання цієї проблеми чутливості використовують фосфорилування MEK і MAPK у тестах цього винаходу. Сигнал фосфорилування MAPK підсилює сигнал фосфорилування MEK і приводить до RAF-залежного фосфорилування у ферментному імуносорбентному аналізі. Крім того, краще, якщо тест винаходу виконується так, що багато сполук можуть бути швидко виявлені за короткий проміжок часу.

Способи цього винаходу визначають сполуки, що інгібують функцію протеїнкінази RAF. Ці сполуки є похідними 5-азахіноксалину. Хоча похідні 5-азахіноксалину були перевірені на їх здатність інгібувати ферменти, що приймають участь у синтезі нуклеотидів у бактерій, багато з цих сполук не були досліджені стосовно інгібування протеїнкінази.

Оскільки RAF виявляє значну амінокислотну гомологію з іншими сериновими/треоніновими протеїнкіназами, 5-азахіноксалинові сполуки винаходу можуть імовірно інгібувати серинові/треонінові протеїнкінази, інші, ніж RAF. Таким чином, способи винаходу також стосуються серинових/треонінових протеїнкіназ інших, ніж RAF, включаючи рецепторні й нерцепторні серинові/треонінові протеїнкінази.

Способи винаходу також стосуються інших сполук, що модулюють функцію RAF в клітинах, оскільки властивості способу дозволяють визначати багато молекул за короткий проміжок часу. Таким чином, способи винаходу можуть ідентифікувати існуючі молекули, не описані у цьому винаході, що модулюють функцію RAF.

I. Біологічна активність сполук похідних 5-азахіноксалину

Сполуки - похідні 5-азахіноксалину цього винаходу перевіряли на їх здатність інгібувати функцію протеїнкінази RAF. У цьому винаході представлено біологічні тести й результати цих досліджень щодо інгібування. Способи, що використовуються для модулювання функції протеїнкінази сполуками - похідними 5-азахіноксалину, подібні до тих, що описані у заявці США №08/702232, на ім'я Tang et al., яка має назву: "Комбінаторні бібліотеки індолінолу й відповідні продукти та способи лікування хвороби" (Lyon & Lyon Docket №221/187), зареєстрована 23 серпня, 1996 року, стосовно аспекту високої ефективності цього способу. Заявка 08/702232 включена сюди шляхом посилання цілком, включаючи будь-які малюнки.

II. Хвороби, що лікуються сполуками похідними 1,4,5-триазанафталіну

Способи, сполуки та фармацевтичні композиції, описані в цьому винаході, розроблені для інгібування проліферативних розладів клітини модулюванням функції протеїнкінази RAF. Проліферативні розлади призводять до небажаної проліферації клітин одного або кількох осередків клітин у багатоклітинному організмі, що веде до пошкодження організму. Способи, сполуки та фармацевтичні композиції, описані в цьому винаході, можуть також бути корисними для лікування й попередження інших розладів в організмах, таких як завчасна смерть клітин (тобто, хвороби нервової системи) або запалення. Ці хвороби можуть прогресувати завдяки молекулам RAF, що функціонують неналежним чином, або завдяки протеїнкіназам RAF, що функціонують неналежним чином.

Зміни функції протеїнкінази RAF або протеїнкіназ, пов'язаних з RAF, можуть привести до підвищеної або зменшеної здатності клітин до проліферації за певних хвороб. До змінених умов проліферації клітин належать раки, фібрози, мезангіальні розлади, ненормальний ангиогенез і васкулогенез, загоєння ран, псоріаз, рестеноз і запалення.

Фібрози - це ненормальне утворення зовнішньоклітинного матриксу. Прикладом фіброзу є цироз печінки. Цироз печінки описується як підвищена концентрація складників зовнішньоклітинного матриксу, що призводить до утворення печінкового рубця.

Ненормальна проліферація клітин відбувається внаслідок ненормальної проліферації мезангіальних клітин. До мезангіальних проліферативних розладів належать різні ниркові хвороби людини, такі як гломерулонефрити, діабетичні нефропатії, злоякісний нефросклероз, синдроми тромбічних ангиопатій, відторгнення трансплантату та гломерулопатії.

До типів раку, що можна лікувати способами та сполуками винаходу, належать рак легень, рак яєчників, рак грудей, рак мозку, міжвісьовий рак мозку, рак товстої кишки, рак простати, саркома Капоші, меланома й гліома. Доказ того, що сполуки та способи винаходу можуть ефективно бути використані для затримання й зупинення проліферації ракових клітин, наведений в цьому винаході шляхом посилання.

Ангиогенні й васкулогенні розлади з'являються внаслідок надлишку проліферації кровоносних судин. Проліферація кровоносних судин є необхідною в багатьох нормальних фізіологічних процесах, таких як розвиток ембріону, утворення жовтого тіла, загоєння ран і регенерація органів. Проте, проліферація кровоносних судин є також необхідною для розвитку пухлини. До інших прикладів розладів проліферації кровоносних судин належать артрит, де нові капілярні кровоносні судини проникають крізь суглоб і руйнують хрящ. Крім того, до хвороб проліферації кровоносних судин належать хвороби ока, такі як діабетична ретинопатія, де нові капіляри в сітківці проникають крізь склоподібний елемент, починають кровоточити й викликати сліпоту. І навпаки, розлади, що стосуються звуження, скорочення або закривання кровоносних судин, такі як рестеноз, також беруть участь у шкідливому регулюванні протеїнкіназ.

Крім того, васкулогенез і ангиогенез пов'язані з ростом злоякісних твердих пухлин і метастаз. Енергійно зростаюча пухлина потребує багато поживних речовин і кисню для продовження росту. Як наслідок, ненормально велика кількість капілярів кровоносних судин часто виростає разом з пухлиною, і вони діють як постачальники вищезгаданих компонентів пухлини. Крім того, для постачання поживних речовин до пухлини нові кровоносні судини, що пронизують пухлину, забезпечують прохід клітинам пухлини до кровообігу й метастазування у віддалених ділянках організму. Folkman, 1990, J. Natl. Cancer Inst 82:4-6.

Ненормальна активність RAF може стимулювати розлади проліферації клітини. Виявилось, що молекули, які специфічно модулюють функцію протеїнкінази RAF, здатні інгібувати проліферацію клітин. Зокрема, антизмистовні молекули нуклеїнової кислоти, які були створені для зв'язування з мРНК, що кодує протеїнкіназу RAF і блокує трансляцію цієї мРНК, ефективно попереджали трансформацію клітин A549 *in vitro*. Monia et al., 1996, Nature Medicine 2: 688, включений сюди цілком шляхом посилання з усіма малюнками та таблицями. Клітини A549 - це злоякісні клітини людини.

Ці спрямовані на RAF дослідження з використанням антизмистовних молекул РНК довели, що 5-азахіноксалінові молекули винаходу, які модулюють функцію протеїнкінази RAF, можуть затримувати й імовірно зупиняти проліферацію злоякісних клітин в організмі. Ці сполуки 5-азахіноксаліну можуть бути перевірені способами *in vitro*, як наведено в цьому винаході за допомогою прикладів. Крім того, сполуки 5-азахіноксаліну можуть бути перевірені на їх вплив на клітини пухлин *in vivo* способами з використанням ксенотрансплантата, як наведено в цьому винаході за допомогою прикладів.

Існують принаймні два шляхи, в яких ненормальна активність RAF може стимулювати небажану проліферацію клітин окремого типу клітин: (1) прямо стимулюючи ріст окремих клітин, або (2) підвищуючи васкуляризацію окремих ділянок, таких як тканини пухлин, таким чином полегшуючи ріст тканин.

Використання цього винаходу полегшується завдяки ідентифікації того, чи є проліферація клітин RAF-обумовленою. Як тільки це з'ясовано, пацієнти, що страждають на такий розлад, можуть бути визначені аналізуванням їх симптомів, використовуючи процедури, добре відомі лікарям або ветеринарам зі звичайним досвідом у галузі. Такі пацієнти можуть потім лікуватися, як описано в цьому винаході.

Визначення того, чи є розлад проліферації клітин RAF-обумовленим, може бути здійснено спочатку визначенням рівня активності RAF в клітині або в окремих розташуваннях тіла пацієнта. Наприклад, у випадках раку рівень однієї або кількох активностей RAF може бути порівняний з необумовленими RAF-типами раку і RAF-обумовленими типами раку. Якщо ракові клітини мають вищий рівень активності RAF, ніж RAF-обумовлені типи раку, то краще, якщо такий самий або більший рівень, ніж RAF-обумовлені типи раку, тоді вони мають лікуватися, використовуючи описані способи модулювання RAF і сполуки винаходу.

У випадках розладів проліферації клітин, що виникли завдяки небажаній проліферації неракових клітин, рівень активності RAF порівнюють з рівнем, що зустрічається в загальній популяції (наприклад, середній рівень в загальній популяції людини або тварин, за винятком тих людей або тварин, що страждають на розлад проліферації клітин). Якщо небажана проліферація клітин характеризується вищим рівнем RAF, ніж у загальній популяції, тоді цей розлад потрібно лікувати, використовуючи описані способи й сполуки винаходу для модулювання RAF.

III. Фармацевтичні композиції й введення сполук - похідних 5-азахіноксаліну

Способи приготування фармацевтичних композицій сполук, способи визначення кількості сполуки для введення пацієнтові й шляхи введення сполук в організм описані в заявці США №08/702232, Tang et al., яка має назву: "Комбінаторні бібліотеки індолінолу й відповідні продукти та способи лікування хвороби" (Lyon & Lyon Docket №221/187), зареєстрована 23 серпня 1996 року, і міжнародна патентна заявка WO 96/22976, Buzzetti et al., яка має назву "Водорозчинні похідні 3-ариліден-2-оксіндол як інгібітори тирозинкінази", опублікована 1 серпня 1996 року, обидві включені сюди цілком шляхом посилання, включаючи будь-які малюнки. Фахівці у галузі визнаватимуть, що такі описи придатні до цього винаходу й можуть бути легко застосовані.

Приклади

Нижченаведені приклади є необмежуваними й лише ілюструють різні аспекти й властивості цього винаходу. Приклади описують способи синтезування сполук винаходу й способи вимірювання впливу сполуки на функцію протеїнкінази RAF.

Клітини, що використовуються у способах, є комерційно доступними. Вектори нуклеїнових кислот, що потрапляють у клітину, є також комерційно доступними й послідовності генів для різних протеїнкіназ є легко доступними в банках даних послідовностей. Таким чином, звичайний фахівець у галузі може легко відтворити клітинні лінії своєчасно шляхом комбінування комерційно доступних клітин, комерційно доступних векторів нуклеїнових кислот і генів протеїнкіназ, використовуючи методи, що є у розпорядженні звичайних фахівців у цій галузі.

Приклад 1: Процедури синтезу сполук похідних 5-азахіноксаліну

Винахід буде проілюстровано наступними прикладами, що не є обмеженими, в яких, якщо інше не вказано:

- (i) випаровування виконували обертальним випаровуванням у вакуумі;
- (ii) операції виконували в атмосфері інертного газу, такого як азот;
- (iii) рідинну хроматографію високої розподільної здатності (HPLC) виконували на Merck LiChrosorb RP-18 силікагелі зі зворотною фазою, придбану у E. Merck, Дармштадт, Німеччина;
- (iv) виходи наведені лише для ілюстрації і не обов'язково є максимально досяжними;
- (v) точки плавлення наведені без врахування поправки й визначались, використовуючи цифровий апарат для визначення точки плавлення HWS Mainz SG 2000;
- (vi) структури всіх сполук формули (I) цього винаходу підтверджували протонною магнітно-резонансною спектроскопією на спектрофотометрі Bruker AMX500-NMR, а також мікроаналізом елементів, і, в певних випадках, мас-спектроскопією;
- (vii) чистоту структур перевіряли тонкошаровою хроматографією (TLC), використовуючи силікагель (Merck Silica Gel 60 F254) або за допомогою HPLC; і
- (viii) проміжні речовини повністю не були описані й чистоту оцінювали тонкошаровою хроматографією (TLC) або HPLC.

Процедури синтезу

Сполука А-2: 6-бензиламіно-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

4-Гідроксифенілгіюксаль одержували з 4-гідроксиацетофенону (Lancaster, Acros) згідно з опублікованим методом (J. Amer. Chem. Soc, 71, 1045 (1949)).

2-Аміно-6-бензиламіно-3-нітропіридин одержували з 2-аміно-6-хлор-3-нітропіридину наступним чином: 2-аміно-6-хлор-3-нітропіридин (17,35г, 0,10моль), бензиламін (Fluka) (10,72г, 0,10моль) і порошок карбонату калію порошок (10,4г, 0,035моль) у н-бутанолі (100мл) нагрівали при дефлегмації протягом 2 годин. Суспензію фільтрували й після охолодження до кімнатної температури тверду речовину збирали за допомогою фільтрації, промивали бутанолом і висушували при 50°C у вакуумі для утворення 2-аміно-6-бензиламіно-3-нітропіридину (22,2г, 91%, т.пл. 145-146°C).

6-Бензиламіно-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін одержували з 2-аміно-6-бензиламіно-3-нітропіридину наступним чином: 2-аміно-6-бензиламіно-3-нітропіридин (25г, 0,10моль) гідрогенізували під тиском в 5,5бар

H₂ в присутності 10г нікелевого каталізатора Ренея у 400мл діоксану при 60°C. За 2 години реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, фільтрували й додавали 4-гідроксифенілглюксаль і перемішували протягом 2 годин в атмосфері аргону. Суспензію потім розводили водою, тверду речовину збирали за допомогою фільтрації, промивали водою, рекристалізували з 2-пропанолом і висушували при 50°C у вакуумі для утворення 6-бензиламіно-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксаліну (8г, 24,4%, т.пл. 271-273°C).

Сполука А-1: 6-Феніламіно-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Застосування феніламіну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 6-феніламіно-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін.

Сполука А-3: 6-метокси-2-метил-3-Феніл-5-азахіноксалін Застосування 1-феніл-1,2-пропандіону замість 4-гідроксифенілглюксалю і метанолу замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 6-метокси-2-метил-3-феніл-5-азахіноксалін.

Сполука А-4: 6-метокси-2,3-дифеніл-5-азахіноксалін

Застосування бензилу замість 4-гідроксифенілглюксалю і метанолу замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 6-метокси-2,3-дифеніл-5-азахіноксалін.

Сполука А-5: 6-(4-Фторбензиламіно)-2-метил-3-феніл-5-азахіноксалін

Застосування 1-феніл-1,2-пропандіону замість 4-гідроксифенілглюксалу й 4-фторбензиламіну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 6-(4-фторбензиламіно)-2-метил-3-феніл-5-азахіноксалін.

Сполука А-6: 2,3-дифеніл-6-(4-фторбензиламіно)-5-азахіноксалін

Застосування бензилу замість 4-гідроксифенілглюксалу й 4-фторбензиламіну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 2,3-дифеніл-6-(4-фторбензиламіно)-5-азахіноксалін.

Сполука А-7: 3-феніл-6-феніламіно-5-азахіноксалін

Застосування фенілглюксалу замість 4-гідроксифенілглюксалу й аніліну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає 3-феніл-6-феніламіно-5-азахіноксалін.

Сполука А-8: А-26

Застосування належним чином заміщеного бензиламіну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає наступні Сполуки:

Сполука А-8: 6-(2-Карбоксибензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-9: 6-(3-Карбоксибензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-10: 6-(4-Карбоксибензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-11: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(2-нітробензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-12: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(3-нітробензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-13: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(4-нітробензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-14: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(2-метилбензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-15: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(3-метилбензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-16: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(4-метилбензиламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-17: 6-(2-Хлорбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-18: 6-(3-Хлорбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-19: 6-(4-Хлорбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-20: 6-(2-Фторбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-21: 6-(3-Фторбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-22: 6-(4-Фторбензиламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-23: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[2-(трифторметил)бензиламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-24: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[3-(трифторметил)бензиламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-25: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[4-(трифторметил)бензиламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-26: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(фенетил-1-аміно)-5-азахіноксалін.

Сполука А-27 - А-48

Застосування належним чином заміщеного аніліну замість бензиламіну у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає наступні Сполуки:

Сполука А-27: 6-(2-Карбоксифеніламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-28: 6-(3-Карбоксифеніламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-29: 6-(4-Карбоксифеніламіно)-3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-30: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(2-нітрофеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-31: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(3-нітрофеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-32: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(4-нітрофеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-33: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(2-метилфеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-34: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(3-метилфеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-35: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(4-метилфеніламіно)-5-азахіноксалін

Сполука А-36: 6-(2-Хлорфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-37: 6-(3-Хлорфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-38: 6-(4-Хлорфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-39: 6-(2-Фторфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-40: 6-(3-Фторфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-41: 6-(4-Фторфеніламіно) 3-(4-гідроксифеніл)-5-азахіноксалін

Сполука А-42: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[(2-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-43: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[(3-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-44: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-[(4-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін

Сполука А-45: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(пірид-2-аміно)-5-азахіноксалін

Сполука А-46: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(пірид-3-аміно)-5-азахіноксалін

Сполука А-47: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(пірид-4-аміно)-5-азахіноксалін

Сполука А-48: 3-(4-Гідроксифеніл)-6-(пірид-2-метиламіно)-5-азахіноксалін

Сполуки А-49 - А-67

Застосування належним чином заміщеного бензиламіну замість бензиламіну і фенілглюксалу замість

4-гідроксифенілглюксалью у процедурі для Сполуки А-2 та ідентичний процес дає наступні Сполуки:

- Сполука А-49: 6-(2-Карбоксибензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-50: 6-(3-Карбоксибензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-51: 6-(4-Карбоксибензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-52: 6-(2-Нітробензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-53: 6-(3-Нітробензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-54: 6-(4-Нітробензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-55: 6-(2-Метилбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-56: 6-(3-Метилбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-57: 6-(4-Метилбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-58: 6-(2-Хлорбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-59: 6-(3-Хлорбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-60: 6-(4-Хлорбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-61: 6-(2-Фторбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-62: 6-(3-Фторбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-63: 6-(4-Фторбензиламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-64: 3-Феніл-6-(2-(трифторметил)бензиламіно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-65: 3-Феніл-6-(3-(трифторметил)бензиламіно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-66: 3-Феніл-6-(4-(трифторметил)бензиламіно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-67: 3-Феніл-6-(фенетил-1-аміно)-5-азахіноксалін
- Сполуки А-68 - А-89.

Застосування належним чином заміщеного аніліну замість бензиламіну й фенілглюксалью замість 4-гідроксифенілглюксалью у процедурі для сполуки А-2 та ідентичний процес дає наступні сполуки:

- Сполука А-68: 6-(2-Карбоксифеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-69: 6-(3-Карбоксифеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-70: 6-(4-Карбоксифеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-71: 6-(2-Нітрофеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-72: 6-(3-Нітрофеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-73: 6-(4-Нітрофеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-74: 6-(2-Метилфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-75: 6-(3-Метилфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-76: 6-(4-Метилфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-77: 6-(2-Хлорфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-78: 6-(3-Хлорфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-79: 6-(4-Хлорфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-80: 6-(2-Фторфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-81: 6-(3-Фторфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-82: 6-(4-Фторфеніламіно)-3-феніл-5-азахіноксалін
- Сполука А-83: 3-Феніл-6-[(2-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін
- Сполука А-84: 3-Феніл-6-[(3-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін
- Сполука А-85: 3-Феніл-6-[(4-трифторметил)феніламіно]-5-азахіноксалін
- Сполука А-86: 3-Феніл-6-(пірид-2-аміно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-87: 3-Феніл-6-(пірид-3-аміно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-88: 3-Феніл-6-(пірид-4-аміно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-89: 3-Феніл-6-(пірид-2-метиламіно)-5-азахіноксалін
- Сполука А-90: 6-Феніламіно-3-(4-метоксифеніл)-5-азахіноксалін

Застосування 4-метоксифенілу замість 4-гідроксифенілу у процедурі для Сполуки А-1 та ідентичний процес дає 6-феніламіно-3-(4-метоксифеніл)-5-азахіноксалін.

Приклад 2: Тест на вимірювання функції фосфорилування RAF

Наступний тест визначає кількість каталізованого RAF фосфорилування його мішені-білка MEK, а також мішені MEK - MAPK. Послідовність гена RAF описана у Bonner et al., 1985, *Molec. Cell. Biol.* 5:1400-1407, і є легкодоступною у чисельних базах даних послідовність гена. Створення вектора нуклеїнової кислоти й клітинних ліній, використовуваних у цій частині винаходу, повністю описані у Morrison et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8855-8859.

Матеріали та реактиви

1. Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) клітини; GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.
2. Буфер RIPA: 20мМ Трис/HCl pH 7,4; 137мМ NaCl, 10% гліцерин, 1мМ PMSF, 5мг/л Апротеніну, 0,5% Тритон X-100;
3. Реконбітантний білок тіоредоксин-MEK (T-MEK): T-MEK експресію й очищення виконували за допомогою афінної хроматографії згідно з інструкціями виробника. Каталог № K 350-01 і R 350-40, Invitrogen Corp., Сан-Дієго, штат Каліфорнія, США.
4. His-MAPK (ERK 2); His-мічений MAPK експресували у "XL1 Blue cells", трансформованих pUC18 вектором, що кодує His-MAPK. His-MAPK очищали Ni-афінною хроматографією. Каталог №27-4949-01, Pharmacia, Аламеда, штат Каліфорнія, США, як описано в цьому винаході.
5. Антитіла вівці проти IgG: Jackson laboratories, West Grove, штат Пенсильванія. Каталог №515-006-008, Номер партії №28563
6. Антитіло, специфічне до протеїнкінази RAF-1: URP2653 з UBI.
7. Буфер для інкубації: PBS; фосфатний буферний розчин, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.
8. Буфер для промивання: TBST - 50мМ Трис/HCL pH 7,2, 150мМ NaCl, 0,1% Тритон X-100
9. Буфер для блокування: TBST, 0,1% етаноламін pH 7,4;
10. DMSO, Sigma, Св. Льюїс, штат Міссурі, США
11. Буфер для кінази (KB): 20мМ Hepes/HCl pH 7,2, 150мМ NaCl, 0,1% Тритон X-100, 1мМ PMSF, 5мг/л Апротеніну, 75нм ортованадату натрію, 0,5мМ DTT і 10мМ MgCl₂.

12. Суміш АТФ: 100мМ MgCl₂, 300мМ АТФ, 10мкМ γ-³³Р АТФ (Dupont-NEM)/мл.
13. Розчин для зупинки реакції: 1% фосфорна кислота; Fisher, Піттсбург, штат Пенсильванія, США.
14. Підкладки Wallace Cellulose Phosphat Filter; Wallace, Турку, Фінляндія.
15. Розчин для промивання фільтрів: 1% фосфорна кислота, Fisher, Піттсбург, штат Пенсильванія, США.
16. Колектор для планшетів Tomtec plate harvester, Wallace, Турку, Фінляндія.
17. Зчитувач планшетів Wallace beta plate reader # 1205, Wallace, Турку, Фінляндія.
18. NUMC 96-коміркові з V-подібним дном поліпропіленові планшети для сполук Applied Scientific Каталог №AS-72092.

Процедура

Усі з наступних етапів проводились за кімнатної температури, якщо додатково не зазначено.

1. Завантаження планшети для ELISA: лунки для ELISA завантажували 100мкл антисироватки вівці проти миші, очищеної за допомогою афінної хроматографії (1мкг/100мкл буфера для завантаження), протягом ночі при 4°C. Планшети для ELISA можуть використовуватись протягом двох тижнів при зберіганні при 4°C.

2. Перегортати планшет і видаляли рідину. Додавали 100мкл розчину для блокування й інкубували протягом 30хв.

3. Видаляли розчин для блокування і промивали чотири рази буфером для промивання. Струшували планшет на паперовий рушник для видалення надлишку рідини.

4. Додавали 1мкг антитіла, специфічного до RAF-1, до кожної комірки й інкубували протягом 1 години. Промивали, як описано в етапі 3.

5. Розморожували лізати з RAS/RAF-інфікованих клітин Sf9 і розводили TBST до 10нг/100мкл. Додавали 10мкг розведеного лізату в лунки й інкубували протягом 1 години. Струшували планшет протягом інкубування. До негативних контрольних зразків не додавали лізату. Лізати RAS/RAF-інфікованих клітин Sf9 комах одержували після інфікування клітин рекомбінантними бакуловірусами при MOI=5 для кожного вірусу й збирали через 48 годин. Клітини промивали один раз PBS і лізували в буфері RIPA. Нерозчинний матеріал видаляли центрифугуванням (5хв при 10000G). Аліквоти лізатів заморожували в сухому льоді/етанолі і зберігали при - 80°C до використання.

6. Видаляли матеріал, що не зв'язався, й промивали, як було описано вище (етап 3),

7. Додавали 2мкг Т-МЕК і 2мкг His-MAEPK на комірку і доводили об'єм до 40мкл кіназним буфером. Способи очищення Т-МЕК і MAPK з клітинних екстрактів наведені в цьому винаході шляхом прикладів.

8. Сполуки попередньо розчиняли (вихідний розчин 10мг/мл у DMSO) або екстрагували 20-кратною TBST та 1% DMSO. Додавали 5мкл попередньо розведених сполук/екстрактів в комірки, як описано в етапі 6. Інкубували протягом 20 хвилин. До контролю ліків не додавали.

9. Починали реакцію кінази з додаванням 5мкл суміші АТФ; струшували планшети на шейкері для ELISA протягом інкубації.

10. Зупиняли реакцію кінази за 60 хвилин додаванням 30мкл розчину для зупинки реакції у кожну комірку.

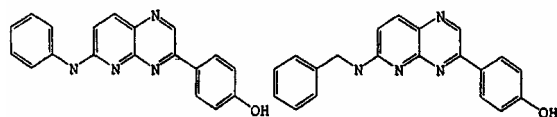
11. Розміщували фосфоцелюлозну підкладку та планшет для ELISA у колектор для планшетів TOMTEC. Збирали й промивали фільтр розчином для промивання згідно з інструкціями виробника. Висушували фільтрувальні підкладки. Розміщували фільтрувальні підкладки в утримувачі. Вставляли утримувач в апарат для визначення радіоактивності й вираховували радіоактивний фосфор на фільтрувальних підкладках.

Як альтернатива, 40мкл аліквот з окремих комірок планшети для дослідження переносили до відповідних положень на фосфоцелюлозній фільтрувальній підкладці. Після повітряного просушування фільтри переносили у піднос. Після м'якого струшування підносу змінювали розчин для промивання кожні 15 хвилин протягом години. Фільтрувальні підкладки висушували на повітрі. Розміщували фільтрувальні підкладки в утримувачі. Вставляли утримувач в апарат для визначення радіоактивності й вираховували кількість радіоактивного фосфору на фільтрувальних підкладках.

Значення IC₅₀ вимірювали згідно з протоколом для наступних сполук похідних 5-азахіноксаліну в тесті ELISA з використанням RAF-1:

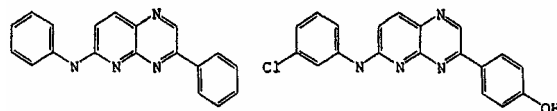
(A-1)

(A-2)



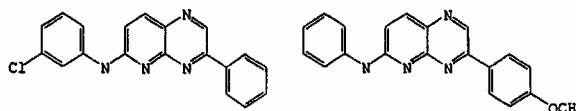
(A-7)

(A-36)



(A-77)

(A-90)



Значення IC₅₀ - це концентрація інгібітора на основі 5-азахіноксаліну, потрібного для зменшення максимальної кількості фосфорилизованого білка-мішені або росту клітини на 50%. Значення IC₅₀ вимірювали

у тесті з фосфорилюванням RAF-1, як показано у Таблиці 1:

Таблиця 1

Сполука	IC ₅₀ (мкМ)
A-1	11,5
A-2	7,8
A-7	33
A-36	45,6
A-77	20,3
A-90	98,0

Приклад 3: Очищення Марк і Мек

Білки MAPK і MEK легко експресуються в клітинах з допомогою субклонування гена, що кодує ці білки, у комерційно доступний вектор, що експресує білки з полігистидиновою міткою. Гени, що кодують ці білки, є легко доступними у лабораторіях, що зазвичай працюють з цими білками або шляхом клонування цих генів з клітин, що містять бібліотеки кДНК. Бібліотеки є комерційно доступними і фахівець у галузі може легко розробити зонди нуклеїнових кислот, гомологічних молекулі кДНК, що кодує MEK або MAPK, з послідовності нуклеїнових кислот MEK і MAPK, доступних у чисельних базах даних генів, таких як Genbank. Клонування гена може відбуватись за короткий проміжок часу з використанням способів, зараз доступних фахівцям у галузі.

Очищення білків MEK і MAPK з клітинних екстрактів може бути виконано з використанням наступного протоколу, який був перейнятий у Robbins et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 5097-5106:

1. Лізис клітин шляхом обробки ультразвуком, осмотичного стресу або способами French Press, легко доступними фахівцям у галузі. Певний буфер для обробки ультразвуком наведений нижче.

2. Урівноваження твердої основи, яка зв'язана з нікелем або кобальтом, буфером для врівноваження, описаним нижче. Полігистидинова мітка специфічно зв'язується з атомами нікелю й кобальту на твердій основі. Врівноваження може бути досягнуто промиванням смоли тричі об'ємом буфера для врівноваження, що в 10 разів менше за об'єм твердої основи. Тверда основа є легко доступною звичайним фахівцям у галузі.

3. Додавали клітинний лізат до твердої основи й врівноважували в посудині протягом деякого часу. Як альтернатива, тверда основа може бути запакована всередині білкової хроматографічної колонки й лізат може пропускатись через тверду основу.

4. Промивали тверду основу буфером для промивання, описаним нижче.

5. Елюювали білок MEK або MAPK з твердої основи такою кількістю буфера для елювання (наведений нижче), що видаляє значну частину білка з твердої основи.

Буфер для обробки ультразвуком:

50mM фосфату натрію pH 8,0

0,3M хлориду натрію

10mM β-меркаптоетанолу

1% NP40

10mM NaF

0,5mM Pefablock

Буфер для врівноваження:

50mM фосфату натрію pH 8,0

0,3M хлориду натрію

10mM β-меркаптоетанолу

1% NP40

10mM NaF

1mM Імідазолу

Буфер для промивання:

50mM фосфату натрію pH 8,0

0,3M хлориду натрію

10mM β-меркаптоетанолу

1% NP40

10mM NaF

10mM імідазолу

Буфер для елювання:

50mM фосфату натрію pH 8,0

0,3M хлориду натрію

10mM β-меркаптоетанолу

1% NP40

10mM NaF

10-500mM імідазолу

Приклад 4: Тест на вимірювання функції фосфорилювання рецептора EGF

Кіназна активність рецептора EGF (EGFR-NIH3T3 тест) в цілих клітинах вимірювали, як описано детально в заявці PCT W0 9640116, зареєстрованій 5 червня, 1996, на ім'я Tang et al., яка має назву "Сполуки індолінолу для лікування хвороб" та включена сюди цілком шляхом посилання, включаючи будь-які малюнки.

Значення IC₅₀, що вимірювали в тесті на фосфорилювання рецептора EGF, зображені в Таблиці 2:

Таблиця 2

Сполука	IC ₅₀ (мкМ)
A-2	>50
A-3	>100
A-4	>100
A-5	>100
A-6	>100
A-7	>50

Приклад 5: Тест на вплив сполук похідних 5-азахіноксаліну на ріст клітин, що експресують RAS
Наступний тест вимірює швидкість росту клітин NIH-3T3, що експресують RAS. Метою тесту є визначення впливу сполук на ріст клітин NIH 3T3, що надмірно експресують H-Ras.

Матеріали:

96-коміркові стерильні планшети з плоским дном

96-коміркові стерильні планшети з круглим дном

стерильні 25мл або 100мл посудини

піпетки, підставка для багатьох піпеток

стерильні кінчики для піпетки

стерильні 15мл і 50мл пробірки

Реактиви

0,4% SRB у 1 % оцтова кислота

10мМ основи Трису

10% TCA

1% оцтова кислота

стерильний DMSO (Sigma)

сполука в DMSG (100мМ або менший вихідний розчин)

Трипсин-EDTA (GIBCO BRL)

Клітинна лінія:

3T3/H-Ras (NIH 3T3 клон 7 клітин, що експресують геномний фрагмент онкогенного H-Ras).

Клітин можуть бути створені з використанням наступного протоколу:

1. Субклонували фрагмент гена, що кодує Ras, у комерційно доступний вектор, що стабільно трансфікуватиме клітини NIH-3T3. Фрагмент брали з геномного трансформуючого алелю cHa-ras.

2. Трансфікували клітини NIH-3T3 субклонуваним вектором згідно зі способом з використанням фосфату кальцію. Відбирали клітини, що експресують конструкт Ras у 2% сироватці у DMEM/Oseredki, що видно неозброєним оком, можна зберігати після 2 тижнів. Збирали трансформовані клітини для створення стабільно трансформованої клітинної лінії.

Середовище для росту:

2% сироватки теляти/DMEM + 2мМ глутаміну, Pen/Strep

Протокол:

День 0: Висадження клітин:

Ця частина тесту виконували у витяжній шафі з ламінарним потоком.

1. Клітини піддавали трипсинізації. Перенесли 200мкл суспензії клітин до 10мкл ізотонічного розчину. Підраховували клітини лічильником Coulter.

2. Розводили клітини в середовищі для росту до 6000клітин/мл. Перенесли 100мкл клітин до кожної комірки у 96-комірковий планшет із плоским дном для створення 600клітин/комірку.

3. Використання половини планшету (4 рядки) для кожної сполуки й у чотири рази більше лунок для кожної концентрації сполуки й 4 лунки для контролювання середовища.

4. Планшети помірно струшували для рівномірного прилипання клітин.

5. Інкубували планшети при 37°C у 10% CO₂ інкубаторі.

День 1: Додавання сполуки:

Цю частину тесту виконували у витяжній шафі з ламінарним потоком.

1. У 96-комірковий планшет додавали 120мкл середовища для зростання, що містило подвійну кінцеву концентрацію DMSO, яку використовували при найвищій концентрації сполуки під час скринінгу, у колонки 1-11. Наприклад, якщо найвища концентрація становить 100мкл, і яку створювали зі 100мМ вихідного розчину, то одинична концентрація DMSO становить 0,1%, а подвійна концентрація DMSO становить 0,2%. Цей планшет використовували для титрування сполуки - 4 рядки на сполуку.

2. У стерильній 15мл пробірці створювали подвійні розчин найвищої концентрації скринінгу сполуки у середовищі для росту плюс подвійний DMSO. Необхідним є 1мл на клітинну лінію. Початкова концентрація сполуки зазвичай становить 100мкМ, але ця концентрація може змінюватись залежно від розчинності сполуки.

3. Перенесли 240мкл подвійного початкового розчину сполуки до лунок, яких у чотири рази більше, у колонку 12 з 96-коміркового планшету з круглим дном. Проводили 1:2 послідовні розведення по планшету справа наліво за допомогою перенесення 12мкл з колонки 12 до колонки 11, з колонки 11 до 10 і так далі до колонки 2. Перенесли 100мкл розведень сполуки і 100мкл середовища в колонку 1 на 100мкл середовища на клітини у відповідні лунки 96-коміркового планшету із плоским дном. Загальний об'єм на комірку має бути 200мкл.

4. Повертали планшет до інкубатора й інкубували протягом 3 днів.

День 4: Проведення тесту

Цю частину тесту виконували в лабораторних умовах.

1. Видаляли рідину або зливали середовище. Додавали 200мкл охолодженого 10% TCA до кожної комірки для фіксації клітин. Інкубували планшет протягом принаймні 60хв. при 4°C.

2. Видаляли TCA і промивали лунки 5 разів водою з-під крана. Висушували планшети верхом донизу на

паперових рушниках.

3. Фарбували клітини 100мкл/комірку 0,4% SRB протягом 10хв.

4. Заливали SRB і промивали лунки 5 разів 1% оцтовою кислотою. Висушували планшети повністю верхнім боком донизу на паперових рушниках.

5. Розчиняли барвник у 100мкл/комірку 10мМ основи Трису протягом 5-10хв. на шейкері.

6. Зчитували планшети з допомогою планшетного зчитувача Dynatech ELISA при 570нм стосовно 630нм.

Відбирали сполуки, що уповільнювали швидкість росту клітин, що занадто експресують RAS, як проілюстровано в Таблиці 3.

Таблиця 3

Сполука	IC ₅₀ (мкМ) RAS/NIH3T3
A-1	1,04
A-2	7,6
A-6	13,5
A-36	0,18
A-77	0,7

Приклад 6: Тест на вплив сполук похідних 5-азахіноксаліну на ріст клітин A549

Наступний тест вимірює швидкість росту для клітин A549. Метою тесту є визначення впливу сполуки на ріст клітин карциноми легень людини A549. Клітини A549 легко доступні від комерційних джерел, таких як ATCC (CCL185).

Матеріали:

96-коміркові стерильні планшети з плоским дном

96-коміркові стерильні планшети з круглим дном

стерильні 25мл або 100мл посудини

піпетки, підставка для багатьох піпеток

стерильні кінчики для піпетки

стерильні 15мл і 50мл пробірки

Реактиви:

0,4% SRB у 1% оцтовій кислоті

10мМ основи Трису

10%TCA

1% оцтова кислота

стерильний DMSO (Sigma)

сполука в DMSG (100мМ або менший вихідний розчин)

Трипсин-EDTA (GIBCO BRL)

Клітинна лінія та середовище для росту:

Клітини карциноми легень людини A549 (ATCC CCL185)

10% сироватки плоду великої рогатої худоби у середовищі Ham F12-K

Протокол:

День 0: Висадження клітин:

Ця частина тесту виконували у витяжній шафі з ламінарним потоком.

1. Клітини піддавали трипсинізації. Переносили 200мкл суспензії клітин до 10мкл ізотонічного розчину.

Підраховували клітини лічильником Coulter.

2. Розводили клітини в середовищі для росту до 20000клітин/мл. Переносили 100мкл клітин до кожної комірки у 96-комірковий планшет із плоским дном для створення 2000клітин/комірку.

3. Використання половини планшету (4 рядки) для кожної сполуки, у чотири рази більше лунок для кожної концентрації сполуки і 4 лунок для контролювання середовища.

4. Планшети помірно струшували для рівномірного прилипання клітин.

5. Інкубували планшети при 37°C у 10% CO₂ інкубаторі.

День 1: Додавання сполуки:

Цю частину тесту виконували у витяжній шафі з ламінарним потоком.

1. У 96-комірковий планшет додавали 120мкл середовища для зростання, що містило подвійну кінцеву концентрацію DMSO, яку використовували при найвищій концентрації сполуки під час скринінгу, у колонки 1-11. Наприклад, якщо найвища концентрація становить 100мкМ, і яку створювали зі 100мМ вихідного розчину, то одинична концентрація DMSO становить 0,1%, а подвійна концентрація DMSO становить 0,2%. Цей планшет використовували для титрування сполуки - 4 рядки на сполуку.

2. У стерильній 15мл пробірці створювали подвійні розчин найвищої концентрації для скринінгу сполуки у середовищі для росту плюс подвійний DMSO. Необхідним є 1мл на клітинну лінію. Початкова концентрація сполуки зазвичай становить 100мкМ, але ця концентрація може змінюватись залежно від розчинності сполуки.

3. Переносили 240мкл подвійного початкового розчину сполуки до лунок, яких у чотири рази більше, у колонку 12 з 96-коміркового планшету з круглим дном. Проводили 1:2 послідовні розведення по планшету справа наліво за допомогою перенесення 12мкл з колонки 12 до колонки 11, з колонки 11 до 10 і так далі до колонки 2. Переносили 100мкл розведень сполуки і 100мкл середовища в колонку 1 на 100мкл середовища на клітини у відповідні лунки 96-коміркового планшету із плоским дном. Загальний об'єм на комірку має бути 200мкл.

4. Повертали планшет до інкубатора й інкубували протягом 3 днів.

День 5: Проведення тесту

Цю частину тесту виконували в лабораторних умовах.

1. Видаляли рідину або зливали середовище. Додавали 200мкл охолодженого 10% TCA до кожної комірки для фіксації клітин. Інкубували планшет протягом принаймні 60хв. при 4°C.
 2. Видаляли TCA і промивали лунки 5 разів водою з-під крана. Висушували планшети верхом донизу на паперових рушниках.
 3. Фарбували клітини 100мкл/комірку 0,4% SRB протягом 10хв.
 4. Заливали SRB і промивали лунки 5 разів 1% оцтовою кислотою. Висушували планшети повністю верхнім боком донизу на паперових рушниках.
 5. Розчиняли барвник у 100мкл/комірку 10мМ основи Трису протягом 5-10хв. на шейкері.
 6. Зчитували планшети з допомогою планшетного зчитувача Dynatech ELISA при 570нм стосовно 630нм.
- Відбирали сполуки, що уповільнювали швидкість росту A549 клітин, як проілюстровано в Таблиці 4.

Таблиця 4

Сполука	IC ₅₀ (мкМ) A549
A-2	25,1>10 (2% FBS)
A-6	23,8>10 (2% FBS)

Приклад 7: Спосіб визначення біологічної активності модуляторів RAF in vivo

Дослідження з використанням ксенотрансплантатів можуть бути використані для визначення впливу сполуки винаходу на інгібування клітин пухлин яєчників, меланоми, простати, легень й молочних залоз. Протокол тесту описаний детально в публікації PCT W09640116, зареєстрований 5 червня 1996 року на ім'я Tang et al., що має назву "Сполуки індолінолу для лікування хвороби", включений сюди цілком шляхом посилання, з будь-якими малюнками.

Винахід, як приклад, описаний тут, може бути здійснений за відсутності будь-якого елемента або елементів, обмеження або обмежень, як не специфічно описані в цьому винаході. Терміни й вирази, які були використані, використовуються як терміни опису, а не з метою обмеження, і не існує такого винаходу, в якому би використання таких термінів і виразів виключало будь-які еквіваленти властивостей, показаних і описаних, або його частин, до того ж, треба зазначити, що різні модифікації можливі в межах об'єму винаходу. Таким чином, треба зрозуміти, що хоча цей винахід був специфічно описаний кращими втіленнями, властивості, модифікації та варіації концепції цього винаходу можуть бути зроблені фахівцями у галузі, і що такі модифікації і варіації вважаються такими, що не виходять за межі цього винаходу, і визначаються доданою формулою.

Ті посилання, попередньо не включені сюди шляхом посилання, включаючи як патентні, так і непатентні посилання, спеціально включені сюди шляхом посилання з будь-якою метою. Інші втілення знаходяться в межах наступної формули.