

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к определенным 3-пирролзамещенным соединениям 2-индолинона, которые модулируют активность протеинкиназ (ПК). Следовательно, соединения по настоящему изобретению используют при лечении нарушений, связанных с аномальной активностью ПК. К изобретению относятся также фармацевтические композиции, содержащие такие соединения, способы лечения заболеваний с использованием фармацевтических композиций, содержащих такие соединения, и способы их получения.

Уровень техники

В данном разделе представлена информация только о предпосылках создания изобретения, причем данную информацию не следует рассматривать как предшествующий уровень техники настоящего изобретения.

ПК являются ферментами, катализирующими фосфорилирование гидроксильных групп остатков тирозина, серина и треонина в белках. Такая простая на первый взгляд активность имеет глубокие последствия: рост, дифференциация и пролиферация клеток, то есть практически все аспекты функционирования клеток так или иначе зависят от активности ПК. Более того, аномальная активность ПК связана с широким спектром нарушений в организме-хозяина от совместимых с жизнью заболеваний, таких как псориаз, до чрезвычайно опасных заболеваний, таких как глиобластома (рак мозга). Обычно ПК разделяют на два класса: тирозинкиназы (ТК) и серин-треонинкиназы (СТК).

Одним из основных аспектов активности ТК является ее взаимосвязь с рецепторами ростовых факторов - белками, расположенными на поверхности клеток. При связывании рецепторов ростовых факторов с лигандом ростового фактора они превращаются в активную форму, которая взаимодействует с белками, расположенными с внутренней стороны клеточной мембраны. В результате происходит фосфорилирование остатков тирозина рецептора и других белков, а также образование внутри клеток комплексов с рядом цитоплазматических сигнальных молекул, которые в свою очередь влияют на многочисленные типы клеточного ответа, такие как деление клеток (пролиферация), дифференциация клеток, рост клеток, влияние изменения метаболизма на внеклеточное микроокружение и т.п. Более подробная информация приведена в статье Schlessinger и Ullrich, 1992, *Neuron*. 9:303-391, которая включена в данное описание в качестве ссылки, включая любые фигуры, как полностью изложено в данном описании.

Рецепторы факторов роста, обладающие активностью ТК, известны как рецепторные ТК (РТК). К таким рецепторам относится многочисленное семейство трансмембранных рецепторов с разнообразной биологической активностью. В настоящее время идентифицировано по крайней мере девятнадцать (19) различных подсемейств РТК. Примером таких подсемейств является подсемейство, названное РТК "HER", включающее рецептор эпителиального фактора роста (EGFR), HER2, HER3 и HER4. Указанные РТК состоят из внеклеточного гликозилированного олиганд-связывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного цитоплазматического каталитического домена, который может фосфорилировать остатки тирозина в белках.

Другое подсемейство РТК включает рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста I (IGF-1R) и рецептор IRR - родственный рецептору инсулина. IR и IGF-1R взаимодействуют с инсулином, IGF-I и IGF-II с образованием гетеротетрамера, состоящего из двух полностью внеклеточных гликозилированных субъединиц α и двух субъединиц β , которые пересекают клеточную мембрану и содержат домен ТК.

К третьему подсемейству РТК относится группа рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFR), которая включает PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, c-kit и c-fms. Эти рецепторы состоят из гликозилированных внеклеточных доменов, содержащих переменное число иммуноглобулин-подобных петель, и из внутриклеточного домена, в котором последовательность тирозинкиназного домена прерывается другими (неродственными) аминокислотными последовательностями.

Другой группой, которую иногда из-за схожести с подклассом PDGFR относят к вышеупомянутому подклассу, является подсемейство рецепторных киназ из эмбриональной печени (рецепторные киназы flk). Предполагают, что упомянутая группа рецепторов включает дополнительный киназный домен рецептора flk-1 (KDR/FLK-1, VEGF-R2), flk-1R, flk-4 и fms-подобную тирозинкиназу-1 (flt-1).

К другим членам семейства рецепторных ТК, являющихся рецепторами факторов роста, относится подгруппа рецепторов фактора роста фибробластов (FGF). Эта группа включает четыре рецептора, FGFR1-4, и семь лигандов, FGF1-7. Согласно предварительным данным рецепторы состоят из гликозилированных внеклеточных доменов, содержащих переменное число иммуноглобулин-подобных петель, и из внутриклеточного домена, в котором последовательность тирозинкиназы прерывается участками неродственных аминокислотных последовательностей.

К другим членам семейства рецепторных ТК, являющихся рецепторами факторов роста, относится подгруппа рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). По строению VEGF аналогичен димерному гликопротеину PDGF, но характеризуется другими биологическими функциями и специфичностью в отношении клеток-мишеней *in vivo*. В настоящее время, прежде всего, считают, что VEGF играет существенную роль при васкулогенезе (росте сосудов), а также при ангиогенезе (развитии кровеносных

сосудов).

Более подробное описание известных подсемейств РТК представлено в статье Plowman и соавт., 1994, DN&P, 7(6):334-339, которая полностью включена в данное описание в качестве ссылки, включая любые фигуры.

Кроме семейства РТК существует также семейство полностью внутриклеточных ТК, названных "нерецепторные ТК" или "клеточные ТК". Последнее название, сокращенно КТК, будет использовано в данном тексте описания. КТК не содержат внеклеточного и трансмембранного доменов. В настоящее время идентифицировано более 24 КТК, включающих 11 подсемейств (Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes, Fps, Fak, Jak и Ack). До настоящего времени подсемейство Src является самым многочисленным семейством КТК и включает в себя Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fg1 и Yrk. Более подробное описание КТК можно найти в статье Bolen, 1993, Oncogene, 8:2025-2031, которая включена в данное описание в качестве ссылки, включая любые фигуры.

Серин-треонинкиназы СТК, аналогично КТК, являются преимущественно внутриклеточными, хотя известно несколько рецепторных киназ типа СТК. СТК является основной цитозольной киназой, то есть киназой, выполняющей функцию в данной части цитоплазмы, а не в цитоплазматических органеллах и цитоскелете. Цитозолем называется область внутри клетки, в которой проявляется большинство видов метаболической и биосинтетической активности, опосредованной клеткой, например, именно в цитозоле происходит синтез белков на рибосомах.

Все РТК, КТК и СТК принимают участие в развитии многочисленных патологических процессов в организме хозяина, включая, главным образом, онкологические заболевания. К другим патологическим состояниям, ассоциированным с ТК, относятся, без ограничения перечисленным, псориаз, цирроз печени, диабет, ангиогенез, рестеноз, глазные заболевания, ревматоидный артрит и другие воспалительные процессы, иммунологические заболевания, такие как аутоиммунное заболевание, сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз и ряд почечных нарушений.

Что касается рака, в настоящее время существуют две основные гипотезы, объясняющие взаимосвязь избыточной пролиферации клеток, которая приводит к развитию опухоли, с функциями, известными как регулируемые протеинкиназами. Так например, предполагают, что злокачественный рост клеток является результатом нарушения механизмов, контролирующих процессы деления клеток и/или дифференциации. Показано, что белковые продукты ряда прото-онкогенов включены в пути передачи сигналов, регулирующих рост и дифференциацию клеток. Указанные белковые продукты прото-онкогенов включают внеклеточные факторы роста, трансмембранные рецепторы факторов роста ТК(РТК), цитоплазматические ТК (КТК) и цитозольные СТК, описанные выше.

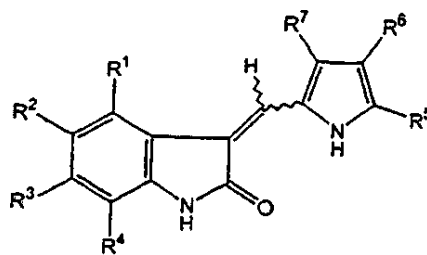
С точки зрения очевидной взаимосвязи между регулируемой ПК клеточной активностью и широким спектром разнообразных патологических состояний у человека нет ничего удивительного в том, что были предприняты многочисленные попытки найти способ модулирования активности ПК. К некоторым из них относятся подходы с использованием биомиметиков, то есть больших молекул, созданных по аналогии с молекулами, включенными в реальные клеточные процессы (например, мутантные лиганды (заявка на выдачу патента США No 4966849); растворимые рецепторы и антитела (заявка No WO 94/10202, статья Kendall и Thomas, 1994, Proc. Nat'l Acad. Sci., 90:10705-09, статья Kim и соавт. 1993, Nature, 362:841-844); лиганды РНК (статья Jelinek и соавт., Biochemistry. 33:10450-56; Takano и соавт., 1993, Mol. Bio. Cell. 4:358A ; Kinsella и соавт., 1992, Exp. Cell Res.. 199:56-62; Wright и соавт., J. Cellular Phys., 152:448-57) и ингибиторы ТК (WO 94/03427; WO 92/21660; WO 91/15495; WO 94/14808; патент США No 5330992; статья Mariani и соавт., 1994, Proc. Am. Assoc. Cancer Res.. 35:2268).

Кроме вышеперечисленных исследований были предприняты попытки идентифицировать малые молекулы, действующие как ингибиторы ПК. Например, в качестве ингибиторов ТК описаны соединения бис-моноциклических, бициклических и гетероциклических арильных производных (заявка РСТ WO 92/20642), производные виниленазаиндола (заявка РСТ WO 94/14808) и 1-циклопропил-4-пиридилхинолоны (патент США No 5330992). В качестве ингибиторов ТК, используемых при лечении рака, описаны стирильные производные (патент США No 5217999), стирилзамещенные пиридинные производные (патент США № 5302606), производные хиназолина (заявка на выдачу европейского патента No 0566266 A1), селенаиндолы и селениды (заявка РСТ WO 94/03427), трициклические полигидроксильные соединения (заявка РСТ WO 92/21660) и соединения бензилфосфоновой кислоты (заявка РСТ WO 91/15495).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к определенным 3-пирролзамещенным 2-индолиноновым соединениям, которые проявляют модулирующую ПК активность и, следовательно, могут быть использованы при лечении нарушений, связанных с аномальной активностью ПК.

Таким образом, одним объектом настоящего изобретения являются 3-пирролзамещенные 2-индолиноны формулы (I)



(I)

где

R^1 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероалициклическую группу, гидроксильную, алкоксильную, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_rR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, тригалогенметил, гидроксильную, алкоксильную, циано-, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, арил, гетероарил, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$ и $-SO_2R^{20}$ (где R^{20} означает алкил, арил, аралкил, гетероарил или гетероаралкил);

R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, тригалогенметил, гидроксильную, алкоксильную, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, арил, гетероарил, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$ и $-SO_2R^{20}$ (где R^{20} означает алкил, арил, аралкил, гетероарил или гетероаралкил);

R^4 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, гидроксильную, алкоксильную и $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^6 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^7 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, арила, гетероарила, $-C(O)R^{17}$ и $-C(O)R^{10}$;

или

R^6 и R^7 могут быть объединены с образованием группы, выбранной из ряда $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ и $-(CH_2)_6-$; при условии, что по крайней мере один из заместителей R^5 , R^6 или R^7 должен означать $-C(O)R^{10}$;

R^8 и R^9 независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила или арила;

R^{10} выбирают из группы, состоящей из гидроксильной, алкоксильной, арилоксильной, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} выбирают из группы, состоящей из водорода и алкила;

R^{12} выбирают из группы, включающей в себя $-NR^{13}R^{14}$, гидроксильную, $-C(O)R^{15}$, арил, гетероарил, $-N^+(O)R^{13}R^{14}$, $-N(OH)R^{13}$ и $-NHC(O)R^a$ (где R^a означает незамещенный алкил, галогеналкил или аралкил);

R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, цианоалкил, циклоалкил, арил и гетероарил; или

R^{13} и R^{14} могут быть объединены с образованием гетероциклической группы;

R^{15} выбирают из группы, состоящей из водорода, гидроксильной, алкоксильной и арилоксильной;

R^{16} выбирают из группы, состоящей из гидроксильной, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ и $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} выбирают из группы, состоящей из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила;

R^{20} означает алкил, арил, аралкил или гетероарил; и

n и g независимо равны 1, 2, 3 или 4; или их фармацевтически приемлемые соли.

Предпочтительно, когда R^1 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, циклоалкил, арил, гетероарил, гетероалициклическую группу, гидроксильную, алкоксильную, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_rR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, тригалогенметил, гидроксильную, алкоксильную, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-C(O)R^{15}$, арил, гетероарил и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, тригалогенметил, гидроксильную, алкоксильную, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, арил, гетероарил, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$ и $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

R^4 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, алкил, гидроксильную, алкоксильную и $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^6 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^7 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, арила, гетероарила, $-C(O)R^{17}$ и $-C(O)R^{10}$;

R^6 и R^7 могут быть объединены с образованием группы, выбранной из ряда $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ и $-(CH_2)_6-$; при условии, что по крайней мере одна из групп R^5 , R^6 или R^7 должна означать $-C(O)R^{10}$;

R^8 и R^9 независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила и арила;

R^{10} выбирают из группы, состоящей из гидроксильной, алкоксильной, арилоксильной, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} выбирают из группы, состоящей из водорода и алкила;

R^{12} выбирают из группы, включающей в себя $-NR^{13}R^{14}$, гидроксильную, $-C(O)R^{15}$, арил и гетероарил;

R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, циклоалкил, арил и гетероарил;

R^{13} и R^{14} могут быть объединены с образованием группы, выбранной из ряда из $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ и $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$;

R^{15} выбирают из группы, состоящей из водорода, гидроксильной, алкоксильной и арилоксильной;

R^{16} выбирают из группы, состоящей из гидрокси, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ и $-C(O)NR^{13}R^{14}$;

R^{17} выбирают из группы, состоящей из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила; и n и g независимо равны 1, 2, 3 или 4; или их фармацевтически приемлемая соль.

Вторым объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый наполнитель.

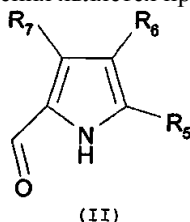
Третьим объектом настоящего изобретения является способ лечения заболеваний, опосредованных аномальной активностью протеинкиназы (ПК), прежде всего рецепторной тирозинкиназы (РТК), нереперторной протеинтирозинкиназы (КТК) и серин-треонин ПК(СТК), в организме, прежде всего человека, причем способ заключается во введении в упомянутый организм фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы

I. Такие заболевания включают в себя в качестве примера, без ограничения перечисленным, рак, диабет, цирроз печени, сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз и ангиогенез, иммунологические заболевания, такие как аутоиммунная болезнь, а также заболевания почек.

Согласно четвертому объекту, настоящее изобретение относится к способу модулирования каталитической активности ПК, прежде всего, рецепторной тирозинкиназы (РТК), нереперторной ПТК (КТК) и СТК с использованием соединения по настоящему изобретению, причем способ можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. В частности, рецепторную протеинкиназу, каталитическую активность которой модулируют соединением по настоящему изобретению, выбирают из группы, включающей в себя EGF, HER2, HER3, HER4, IR, IGF-1R, IRR, PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, C-Kit, C-fms, Flk-1R, Flk4, KDR/Flk-1, Flt-1, FGFR-1R, FGFR-2R, FGFR-3R и FGFR-4R. Клеточную тирозинкиназу, каталитическую активность которой модулируют соединением по настоящему изобретению, выбирают из группы, включающей в себя Src, Frk, Btk, Csk, Abl, ZAP70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr и Yrk. Серин-треонин протеинкиназу, каталитическую активность которой модулируют соединением по настоящему изобретению, выбирают из группы, состоящей из CDK2 и Raf.

Пятым объектом настоящего изобретения является использование соединения формулы (I) в получении лекарственного средства для лечения заболевания, опосредованного аномальной активностью ПК.

Шестым объектом настоящего изобретения является промежуточное соединение формулы (II):



где

R^5 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил и $-C(O)R^{10}$;

R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил и $-C(O)R^{10}$;

R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, арил, гетероарил, $-C(O)R^{17}$ и $-C(O)R^{10}$;

R^6 и R^7 могут быть объединены с образованием группы, выбранной из ряда $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ и $-(CH_2)_6-$, при условии, что по крайней мере одна из групп R^5 , R^6 или R^7 должна означать $-C(O)R^{10}$;

R^{10} выбирают из группы, включающей в себя гидрокси, алкокси, арилокси, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} выбирают из группы, состоящей из водорода и алкила;

R^{12} выбирают из группы, включающей в себя $-NR^{13}R^{14}$, гидрокси, $-C(O)R^{15}$, арил и гетероарил;

R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, цианоалкил, циклоалкил, арил и гетероарил; или

R^{13} и R^{14} могут быть объединены с образованием гетероциклической группы;

R^{15} выбирают из группы, включающей в себя водород, гидрокси, алкокси и арилокси;

R^{17} выбирают из группы, включающей в себя алкил, циклоалкил, арил и гетероарил группы; и

n равно 1, 2, 3 или 4.

Предпочтительно, когда в соединении формулы II R^5 и R^6 означают $-C(O)R^{10}$;

R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, более предпочтительно водород или метил;

R^5 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, более предпочтительно водород или метил, если R^6 означает $-COR^{10}$;

R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, более предпочтительно водород или метил, если R^5 означает $-COR^{10}$;

R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил и арил, более предпочтительно водород, метил или фенил;

R^{10} выбирают из группы, включающей в себя гидрокси, алкокси, $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, более предпочтительно водород или метил;

R^{12} выбирают из группы, включающей в себя $-NR^{13}R^{14}$;

R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород или алкил; или

R^{13} и R^{14} могут быть объединены с образованием гетероциклической группы; и

n равно 1, 2 или 3.

Среди перечисленных выше предпочтительных групп, более предпочтительными группами промежуточных соединений являются те, при которых R^5 , R^6 , R^{11} , R^{12} , R^{13} или R^{14} независимо означают группы, описанные ниже в разделе "Предпочтительные варианты воплощения изобретения".

Седьмым объектом настоящего изобретения является способ получения соединений формулы I.

Наконец, настоящее изобретение относится также к выявлению химического соединения, модулирующего каталитическую активность протеинкиназы путем контактирования клеток, экспрессирующих упомянутую ПК, с соединением или солью по настоящему изобретению, а затем изучению действия соединения на упомянутые клетки.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Определения

Если не оговорено иначе, следующие используемые в описании и формуле изобретения термины имеют нижеследующие значения.

"Алкил" означает насыщенный алифатический углеводородный радикал с разветвленной или неразветвленной цепью, содержащей от 1 до 20 атомов углерода (приведенные интервалы численных значений, например "1-20", означают, что группа, в данном случае алкильная группа, может содержать 1 атом углерода, 2 атома углерода, 3 атома углерода и т.д. вплоть до 20 атомов углерода включительно). Алкильные группы, содержащие от 1 до 4 атомов углерода, называют низшими алкильными группами. Если низшие алкильные группы не имеют заместителей, их называют незамещенными низшими алкильными группами. Более предпочтительно алкильная группа является алкилом среднего размера, содержащим от 1 до 10 атомов углерода, например, метил, этил, пропил, 2-пропил, н-бутил, изо-бутил, трет-бутил, пентил и другие. Наиболее предпочтительная низшая алкильная группа содержит от 1 до 4 атомов углерода, например, метил, этил, пропил, 2-пропил, н-бутил, изо-бутил или трет-бутил и т.п. Алкильная группа может быть замещенной или незамещенной. В замещенных алкильных группах предпочтительно по меньшей мере один, более предпочтительно от одного до трех, наиболее предпочтительно один или два заместителя независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкокси, арил, необязательно замещенный по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, арилокси, необязательно замещенный по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, 6-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 атомов азота в кольце, атомы углерода необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, 5-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, включающей в себя азот, серу или кислород, атомы углерода и азота необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, 5- или 6-членная гетероалициклическая группа, содержащая от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, атомы углерода и азота (при наличии), необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, меркапто-, (незамещенный низш. алкил)тио-, арилтио-, необязательно замещенный по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси, циано-, ацил-, тиоацил-, О-карбамил-, N-карбамил-, О-тиокарбамил-, N-тиокарбамил-, С-амидо-, N-амидо-, нитро-, N-сульфонамидо-, S-сульфонамидо-, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ и $-NR^{18}R^{19}$, где R^{18} и R^{19} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, незамещенный низш. алкил, тригалогенметил, незамещенный (C_3-C_6)циклоалкил, незамещенный низш. алкенил, незамещенный низш. алкинил и арил, необязательно замещенный по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенный низш. алкил или незамещенный низш. алкокси.

Алкильная группа предпочтительно замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, включающей в себя гидроксильную, 5- или 6-членную гетероалициклическую группу, содержащую от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, атомы углерода и азота (при наличии), необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем.

лем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, 5-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, атомы углерода и азота, необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, 6-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 атомов азота в кольце, атомы углерода в кольце, необязательно замещенные по меньшей мере одним заместителем, предпочтительно одним, двумя или тремя, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, или $-NR^{18}R^{19}$, где R^{18} и R^{19} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород и незамещенную низшую алкильную. Алкиль наиболее предпочтительно замещен одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя гидроксильную, диметиламино-, этиламино-, диэтиламино-, дипропиламино-, пирролидино-, пиперидино-, морфолино-, пиперазино-, 4-низшую алкилпиперазино-, фенил-, имидазолил-, пиридинил-, пиридазинил-, пиримидинил-, оксазол-, триазинил и т.п.

"Циклоалкиль" означает моноциклическое углеродное кольцо, содержащее от 3 до 8 атомов углерода, углеродный 5-членный/6-членный или 6-членный/6-членный конденсированный бицикл или полициклическое конденсированное кольцо (в "конденсированной" циклической системе каждое кольцо в системе содержит общую пару соседних атомов углерода с каждым другим кольцом в системе), в которых одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно кольцо не содержит полностью сопряженную систему π -электронов.

Примерами циклоалкильных групп без ограничения перечисленным, являются циклопропан, циклобутан, циклопентан, циклопентен, циклогексан, циклогексадиен, адамантан, циклогептан, циклогептатриен и т.п. Циклоалкильная группа может быть замещенной или незамещенной. В замещенных циклоалкилах предпочтительно по меньшей мере один, более предпочтительно один или два заместителя, независимо выбирают из группы, включающей в себя незамещенную низшую алкильную, тригалогеналкиль, галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкоксильную, арил, необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, арилоксильную, необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную или незамещенную низшую алкоксильную, 6-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 атомов азота в кольце, атомы углерода в кольце, необязательно замещенные по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, 5-членный гетероарил, содержащий от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, атомы углерода и азота, необязательно замещенные по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, 5- или 6-членную гетероалициклическую группу, содержащую от 1 до 3 гетероатомов, которые выбирают из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, атомы углерода и азота (при наличии), необязательно замещенные по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, меркапто-, (незамещенная низшая алкиль)тио-, арилтио-, необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним или двумя заместителями, каждый из которых независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, гидроксильную, незамещенную низшую алкильную и незамещенную низшую алкоксильную, циано-, ацил-, тиоацил-, O-карбамил-, N-карбамил-, O-тиокарбамил-, N-тиокарбамил-, C-амидо-, N-амидо-, нитро-, N-сульфонамидо-, S-сульфонамидо-, $R^{18}S(O)$ -, $R^{18}S(O)_2$ -, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O$ - и $-NR^{18}R^{19}$, определенные выше.

"Алкиль" означает низшую алкильную группу, согласно приведенному в данном контексте определению, включающую по крайней мере два атома углерода и содержащую по крайней мере одну двойную связь углерод-углерод. Типичными примерами, без ограничения перечисленными, являются этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-, 2- или 3-бутенил и т.п.

"Алкинил" означает низшую алкильную группу, согласно приведенному в данном контексте определению, включающую по крайней мере два атома углерода и содержащую по крайней мере одну тройную связь углерод-углерод. Типичными примерами, без ограничения перечисленными, являются этинил, 1-пропинил, 2-пропинил, 1-, 2- или 3-бутинил и т.п.

"Арил" означает углеродное моноциклическое кольцо или конденсированные полициклические группы (то есть систему колец, которые содержат общую пару соседних углеродных атомов), содержащую от 1 до 12 атомов углерода и полностью сопряженную систему π -электронов. Примерами, без ограничения перечисленными, являются фенил-, нафталинил- и антраценил-. Арильная группа может быть замещенной или незамещенной. В замещенных арильных группах, предпочтительно по крайней мере один, более предпочтительно один, два или три, наиболее предпочтительно один или два заместителя незави-

симо выбирают из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, галоген, гидроксид, незамещенный низш. алкокси, меркапто, (незамещенный низш. алкил)тио, циано, ацил, тиоацил, О-карбамил, N-карбамил, О-тиокарбамил, N-тиокарбамил, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ и $-NR^{18}R^{19}$, где R^{18} и R^{19} определены выше. Арильная группа предпочтительно по выбору замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, гидроксид, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфамидо группу.

"Гетероарил" означает моноцикл или конденсированную систему колец (то есть систему колец, которые содержат общую пару соседних атомов углерода), содержащую в кольце от 5 до 12 атомов, из которых один, два или три являются гетероатомами, выбранными из группы, включающей в себя азот, кислород и серу, и остальными атомами углерода, и, кроме того, содержащую полностью конденсированную систему p-электронов. Примерами незамещенных гетероарильных соединений, без ограничения перечисленным, являются пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиримидин, хинолин, изохинолин, пурин и карбазол. Гетероарильная группа может быть замещенной или незамещенной. В замещенных гетероарильных группах, предпочтительно по меньшей мере один, более предпочтительно один, два или три, наиболее предпочтительно один или два заместителя независимо выбирают из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, галоген, гидроксид, незамещенный низш. алкокси, меркапто, (незамещенный низш. алкил)тио, циано, ацил, тиоацил, О-карбамил, N-карбамил, О-тиокарбамил, N-тиокарбамил, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ и $-NR^{18}R^{19}$, где R^{18} и R^{19} определены выше. Гетероарильная группа предпочтительно по выбору замещена одним или двумя заместителями, которые независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, гидроксид, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфонамидо.

"Гетероалициклическая группа" означает моноцикл или систему конденсированных колец, содержащих в кольце от 5 до 9 атомов, из которых один или два атома являются гетероатомами, выбранными из N, O или $S(O)_n$ (где n является целым числом от 0 до 2), и остальными атомами углерода. Кольца могут также содержать одну и более двойных связей. Однако кольца не имеют полностью сопряженной системы p-электронов. Примерами незамещенных гетероалициклических групп, без ограничения перечисленными, являются пирролидино, пиперидино, пиперазино, морфолино, тиоморфолино, гомопиперазино и т.п.. Гетероалициклическое кольцо может быть замещенным или незамещенным. В замещенных гетероалициклах, предпочтительно по меньшей мере один, более предпочтительно один, два или три, наиболее предпочтительно один или два заместителя независимо выбирают из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, галоген, гидроксид, незамещенный низш. алкокси, меркапто, (незамещенный низш. алкил)тио, циано, ацил, тиоацил, О-карбамил, N-карбамил, О-тиокарбамил, N-тиокарбамил, С-амидо, N-амидо, нитро, N-сульфонамидо, S-сульфонамидо, $R^{18}S(O)-$, $R^{18}S(O)_2-$, $-C(O)OR^{18}$, $R^{18}C(O)O-$ и $-NR^{18}R^{19}$, где R^{18} и R^{19} определены выше. Гетероалициклическая группа предпочтительно по выбору замещена одним или двумя заместителями, которые независимо выбирают из группы, включающей в себя галоген, незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, гидроксид, меркапто, циано, N-амидо, моно- или диалкиламино, карбокси или N-сульфонамидо.

"Гетероцикл" означает насыщенный циклический радикал, содержащий от 3 до 8 атомов в кольце, из которых один или два являются гетероатомами, выбранными из N, O или $S(O)_n$ (где n является целым числом от 0 до 2), и остальными атомами в кольце - атомами углерода, из которых один или два атома могут необязательно быть замещены на карбонильную группу.

Гетероциклическое кольцо может необязательно быть независимо замещенным одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, включающей в себя необязательно замещенный низш. алкил (замещенный одним или двумя заместителями, независимо выбранными из карбокси или сложноэфирной групп), галогеналкил, цианоалкил, галоген, нитро, циано, гидроксид, алкокси, амина, моноалкиламино, диалкиламино, аралкил, гетероаралкил, $-COR$ (где R является алкилом) или $-COOR$ (где R является водородом или алкилом). Более подробно термин "гетероцикл" включает в себя, без ограничения перечисленным, тетрагидропиранил, 2,2-диметил-1,3-диоксолан, пиперидино, N-метилпиперидин-3-ил, пиперазино, N-метилпирролидин-3-ил, 3-пирролидино, морфолино, тиоморфолино, тиоморфолино-1-оксид, тиоморфолино-1,1-диоксид, 4-этилоксикарбонилпиперазино, 3-оксопиперазино, 2-имидазолидон, 2-пирролидинон, 2-оксогомопиперазино, тетрагидропиримидин-2-он и их производные. Гетероциклическая группа предпочтительно по выбору замещена одним или двумя заместителями, независимо выбранными из группы, включающей в себя галоген, незамещенный низш. алкил, низш. алкил, замещенный карбоксигруппой, гидроксисложноэфирной группой, моно- или диалкиламино.

"Гидроксид" означает -ОН группу.

"Алкокси" означает -O-(незамещенный алкил) и -O-(незамещенный циклоалкил) группы. Типичными примерами, без ограничения перечисленными, являются метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси, циклогексилокси и т.п..

"Арилокси" означает -O-арил и -O-гетероарил группы, как определено в данном контексте. Типичными примерами, без ограничения перечисленным, являются фенокси, пиридилокси, фуранилокси,

тиенилокси, пиримидинилокси, пиазинилокси и т.п., а также их производные.

"Меркапто" означает -SH группу.

"Алкилтио" означает -S-(незамещенный алкил) и -S-(незамещенный циклоалкил) группы. Типичными примерами, без ограничения перечисленным, являются метилтио, этилтио, пропилтио, бутилтио, циклопропилтио, циклобутилтио, циклопентилтио, циклогексилтио и т.п.

"Арилтио" означает -S-арил и -S-гетероарил группы, как определено в данном контексте. Типичными примерами, без ограничения перечисленным, являются фенилтио, пиридинилтио, фуранилтио, тиенилтио, пиримидинилтио и т.п., а также их производные.

"Ацил" означает -C(O)-R" группу, где R" выбирают из группы, включающей в себя водород, незамещенный низш. алкил, тригалогенметил, незамещенный циклоалкил, арил, необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогенметил, незамещенный низш. алкокси, галоген и -NR¹⁸R¹⁹, гетероарил (присоединенный через атом углерода в кольце), необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, незамещенный низш. алкокси, галоген и -NR¹⁸R¹⁹, а также гетероалицикл (присоединенный через атом углерода в кольце) необязательно замещенный по меньшей мере одним, предпочтительно одним, двумя или тремя заместителями, выбранными из группы, включающей в себя незамещенный низш. алкил, тригалогеналкил, незамещенный низш. алкокси, галоген и -NR¹⁸R¹⁹. Примерами ацильных групп, без ограничения перечисленными, являются ацетил, трифторацетил, бензоил и т.п..

"Альдегид" означает ацильную группу, в которой R" означает водород.

"Тиоацил" означает -C(S)-R" группу, где R" определен в данном контексте.

"Сложный эфир" означает -C(O)O-R" группу, где R" определен в данном контексте, но не означает водород.

"Ацетил" означает -C(O)CH₃ группу.

"Галоген" означает фтор, хлор, бром или иод, предпочтительно фтор или хлор.

"Тригалогенметил" означает -CX₃ группу, где X означает галоген, как определено в данном контексте.

"Тригалогенметансульфонил" означает X₃CS(=O)₂- группу, где X определен выше.

"Циано" означает -C≡N группу.

"Метилендиокси" означает -OCH₂O- группу, где два атома кислорода связаны с соседними атомами углерода.

"Этилендиокси" означает -OCH₂CH₂O- группу, где два атома кислорода связаны с соседними атомами углерода.

"S-сульфонамидо" означает -S(O)₂NR¹⁸R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"N-сульфонамидо" означает -NR¹⁸S(O)₂R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"O-карбамил" означает -OC(O)NR¹⁸R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"N-карбамил" означает R¹⁸OC(O)NR¹⁹- группу, R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"O-тиокарбамил" означает -OC(S)NR¹⁸R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"N-тиокарбамил" означает R¹⁸OC(S)NR¹⁹- группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"Амино" означает -NR¹⁸R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"С-амидо" означает -C(O)NR¹⁸R¹⁹ группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"N-амидо" означает R¹⁸C(O)NR¹⁹- группу, где R¹⁸ и R¹⁹ определены в данном контексте.

"Нитро" означает -NO₂ группу.

"Галогеналкил" означает незамещенный алкил, предпочтительно незамещенный низш. алкил, как определено выше, замещенный одним или более одинаковыми или различными атомами галогена, например, -CH₂Cl, -CF₃, -CH₂CF₃, -CH₂CCl₃ и другие.

"Аралкил" означает незамещенный алкил, предпочтительно незамещенный низш. алкил, как описано выше, замещенный арильной группой, как определено выше, например, -CH₂фенил, -(CH₂)₂фенил, -(CH₂)₃фенил, -CH₂CH(CH₃)CH₂фенил и т.п., а также их производные.

"Гетероаралкил" означает незамещенный алкил, предпочтительно незамещенный низш. алкил, как определено выше, замещенный гетероарильной группой, например, -CH₂пиридинил, -(CH₂)₂пиримидинил, -(CH₂)₃имидазол и т.п., а также их производные.

"Моноалкиламино" означает радикал -NHR, где R означает незамещенный алкил или незамещенный циклоалкил, как определено выше, например, метиламино, (1-метилэтил)амино, циклогексиламино и т.п..

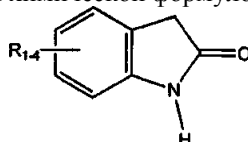
"Диалкиламино" означает радикал -NRR, где каждый R независимо означает незамещенный алкил или незамещенный циклоалкил, как определено выше, например, диметиламино, диэтиламино, (1-метилэтил)этиламино, циклогексилметиламино, циклопентилметиламино и т.п.

"Цианоалкил" означает незамещенный алкил, предпочтительно незамещенный низш. алкил, как описано выше, замещенный одной или двумя цианогруппами.

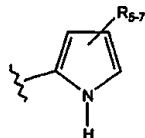
Термин "по выбору" или "необязательно" означает, что последовательно описываемое событие или

условие могут существовать, а могут и не существовать, и что описание содержит примеры, в которых включены событие и условие, а также содержит примеры в которых они не существуют. Например, "гетероцикл, необязательно замещенный алкильной группой" означает, что алкильная группа может существовать, а может и не существовать, и описание содержит пример, в котором гетероцикл является замещенным алкильной группой, и пример, в котором гетероцикл не замещен алкильной группой.

Термины "2-индолинон", "индолин-2-он" и "2-оксидол" взаимозаменяемы и используются в тексте для обозначения молекулы со следующей химической формулой:



Термин "пиррол" употребляется для обозначения молекулы следующей химической формулы:



Термины "пиррол-замещенный 2-индолинон" и "3-пирролиденил-2-индолинон" являются взаимозаменяемыми и используются в тексте для обозначения химического соединения общего химического строения, представленного формулой I.

Соединения с одинаковой химической формулой, которые различаются природой или последовательностью связей атомов или пространственным расположением атомов называют "изомерами". Изомеры, различающиеся пространственным расположением атомов, называют "стереоизомерами". Стереизомеры, которые не являются зеркальным отображением друг друга, называют "диастереомерами", не переводимые друг в друга зеркально-отображенные изомеры называют "энантиомерами". В случае, если соединение содержит асимметрический центр, например, атом, соединенный с четырьмя различными группами, для него возможно существование пары энантиомеров. Энантиомер может быть охарактеризован абсолютной конфигурацией асимметрического центра и описывается согласно R- и S- номенклатуре, введенной Cahn и Prelog, или по вращению плоскости поляризации света на правовращающие и левовращающие (то есть (+) и (-) изомеры, соответственно). Хиральное соединение может содержать индивидуальный энантиомер или являться смесью изомеров. Смесь равных количеств энантиомеров называют "рацемической".

Соединения по настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один асимметрический центр, поэтому эти соединения могут быть получены как индивидуальные (R)- или (S)- стереоизомеры или их смесь. Например, если заместитель R⁶ в соединении формулы (I) означает 2-гидроксиэтил, то атом углерода, к которому присоединена гидроксильная группа, является асимметрическим центром, а значит соединение формулы (I) может существовать как (R)- или (S)- стереоизомер. Если не оговорено иначе, описание и название конкретного соединения в описании и формуле изобретения включает оба индивидуальных энантиомера, а также их рацемические и нерацемические смеси. Способы определения параметров стереохимии и разделения стереоизомеров хорошо известны в данной области техники (см. книгу J. March, "Advanced Organic Chemistry" (Современная органическая химия), гл.4, 4-е издание, John Wiley and Sons, New York, 1992).

Соединения формулы I могут обладать свойством таутомеризма и существовать в форме изомеров. Например, описываемые соединения могут иметь E или Z конфигурацию относительно двойной связи, соединяющей остаток 2-индолинона и остаток пиррола, а также быть смесью этих изомеров. Данное изобретение подразумевает любые таутомерные или структурные изомеры, а также их смеси, которые обладают способностью модуляции активности РТК, КТК и/или СТК и не ограничены конкретной таутомерной или структурно изомерной формой.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь одного или более описываемых здесь соединений или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей и пролекарств, с другими химическими компонентами, такими как физиологически/фармацевтически приемлемые носители и наполнители. Целью создания фармацевтической композиции является облегчение введения соединения в организм.

Соединение формулы (I) может также действовать в качестве пролекарства. Термин "пролекарство" означает агент, который превращается в исходное лекарство *in vivo*. Пролекарства часто используются, так как в некоторых случаях введение в виде пролекарства является более простым способом по сравнению с введением в виде исходного лекарства. Например, пролекарства могут быть биодоступными при оральном введении в отличие от исходного лекарства. Пролекарство в составе фармацевтической композиции может обладать более высокой растворимостью по сравнению с исходным лекарством. Примером пролекарства, без ограничения перечисленным, может быть соединение по настоящему изобретению, которое вводят в виде сложного эфира (пролекарства) с целью облегчения прохождения соединения через клеточную мембрану, где растворимость в воде оказывает отрицательное воздействие на подвиж-

ность, однако затем при прохождении внутрь клетки, где растворимость в воде является положительным свойством, соединение подвергается метаболическому гидролизу с образованием карбоновой кислоты, то есть активного соединения.

Другим примером пролекарства может быть короткий полипептид, например, без ограничения перечисленным, 2-10-членный пептид, присоединенный посредством концевой аминокислотной группы к соединению по настоящему изобретению, причем полипептид гидролизуется или происходит его метаболическое превращение *in vivo* с высвобождением активной молекулы.

Кроме того, предполагается, что соединение формулы (I) будет метаболизировано ферментами в организме, таком как организм человека, с образованием метаболита, который может модулировать активность ПК. Такие метаболиты включены в объем данного изобретения.

Использованный в данном тексте термин "физиологически/фармацевтически приемлемый носитель" означает носитель или разбавитель, который не вызывает значительного раздражения организма и не приводит к отрицательному действию на биологическую активность и свойства введенного соединения.

Термин "физиологически приемлемый наполнитель" означает инертное вещество, которое добавляют в фармацевтическую композицию для дальнейшего облегчения введения соединения. Примеры наполнителей, без ограничения перечисленным, включают в себя карбонат кальция, фосфат кальция, различные типы сахаров и крахмалов, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

Использованный в данном контексте термин "фармацевтически приемлемая соль" означает такие соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства исходного соединения. Такие соли включают в себя:

(i) кислотно-аддитивную соль, которую получают взаимодействием свободного основания исходного соединения с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота, серная кислота, хлорная кислота и другие, или органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, (D) или (L) яблочная кислота, малеиновая кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, *p*-толуолсульфоновая кислота, салициловая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота и малоновая кислота и другие, предпочтительно соляная кислота или (L)-яблочная кислота, например, соль (L)-яблочной кислоты и 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-диэтиламиноэтил)амида; или

(ii) соли, образованные исходным соединением, содержащим кислый протон, который замещается на ион металла, например, ион щелочного металла, ион щелочноземельного металла, ион алюминия; или образует координационную связь с органическим основанием, таким как этаноламин, диэтианоламин, триэтианоламин, трометамин, *N*-метилглюкозаоамин и т.п.

Используемый в данном тексте термин "ПК" означает рецепторную тирозиновую протеинкиназу (РТК), нерецепторную или "клеточную" тирозинкиназу (КТК) и серин-треонинкиназу (СТК).

Термин "способ" означает способ, средства, методы и методики, используемые для достижения поставленной цели, включающие в себя, без ограничения перечисленным, такие способы, средства, методы и методики, которые либо известны специалистами в области химии, фармацевтики, биологии, биохимии и медицины, либо легко могут быть созданы на основе известных способов, средств, методов и методик.

Используемый в данном тексте термин "модуляция" или "модулирование" означает изменение каталитической активности РТК, КТК и СТК. Прежде всего, модулирование означает активирование каталитической активности РТК, КТК и СТК, предпочтительно активирование или ингибирование каталитической активности РТК, КТК и СТК, в зависимости от концентрации соединения или соли, воздействию которой подвергаются РТК, КТК и СТК, более предпочтительно ингибирование каталитической активности РТК, КТК и СТК.

Используемый в данном тексте термин "каталитическая активность" означает скорость фосфорилирования тирозина при прямом или опосредованном действии РТК и/или КТК, или фосфорилирования серина и треонина при прямом или опосредованном действии СТК.

Используемый в данном тексте термин "контактирование" означает осуществление взаимодействия соединения по изобретению с ПК-мишенью таким образом, чтобы соединение могло воздействовать на каталитическую активность ПК, непосредственно, т.е. взаимодействуя с самой киназой, или опосредованно, т.е. взаимодействуя с другой молекулой, от которой зависит каталитическая активность киназы. Такое "контактирование" можно проводить *in vitro*, т.е. в пробирке, в чашке Петри и т.п. Контактирование в пробирке может включать только соединение и исследуемую ПК или целые клетки. Клетки можно культивировать или выращивать в чашках для культивирования клеток (планшетах) и вводить в контакт с соединением, присутствующим в среде. В связи с этим способность конкретного соединения воздействовать на патологическое состояние, связанное с ПК (т.е. величину его IC₅₀, которая будет определена ниже), можно определить до проведения исследований *in vivo* на более сложных живых организмах. Для испытания на клетках вне организма, известно множество способов осуществления контактирования ПК с соединениями, хорошо известных специалистам в данной области техники, включая, без ограниче-

ния перечисленным, микроинъекцию непосредственно в клетку и множество способов с использованием трансмембранных переносчиков.

Термин "in vitro" означает методики, проводимые в искусственной среде, такой как, без ограничения перечисленным, пробирка или культуральная среда.

Термин "in vivo" означает методики, выполняемые на живом организме, таком как, без ограничения перечисленным, мышь, крыса или кролик.

Термины "нарушение, связанное с ПК", "нарушение, вызванное ПК" и "аномальная активность ПК" означают состояние организма, для которого характерна необычная, т.е. низкая или в основном, более высокая, каталитическая активность ПК, причем конкретная ПК может быть РТК, КТК или СТК. Необычная каталитическая активность может быть обусловлена следующими причинами: (1) экспрессией ПК клеткой, которая в норме не экспрессирует ПК, (2) повышенной экспрессией ПК, ведущей к нежелательной клеточной пролиферации, дифференциации и/или росту, или (3) снижением экспрессии ПК, ведущей к нежелательному снижению клеточной пролиферации, дифференциации и/или росту. Гиперактивность ПК означает или амплификацию гена, кодирующего конкретную ПК, или продуцирование ПК с уровнем активности, который коррелирует с нарушением клеточной пролиферации, дифференциации и/или роста (т.е. с увеличением уровня ПК возрастает степень проявления (серьезность) одного или нескольких симптомов нарушения функционирования клетки). Гипоактивность дает обратный эффект, когда проявление одного или нескольких симптомов нарушения функционирования клетки возрастает по мере понижения активности ПК.

Термины "лечить" и "лечение" означают способ облегчения симптомов или устранение вызванных ПК нарушений функционирования клеток и/или сопутствующих симптомов. В отношении опухолевых заболеваний этот термин означает, что способ позволяет продлить предполагаемую продолжительность жизни человека (онкологического больного), или несколько смягчить один или несколько симптомов болезни.

Термин "организм" означает любое живое существо, включая по крайней мере одну клетку. Живой организм может быть простым, например, таким как одна эукариотическая клетка, или сложным, таким как организм млекопитающего, включая человека.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество введенного в организм соединения, которое в некоторой степени ослабляет один или несколько симптомов заболевания, подлежащего лечению. В отношении лечения опухолей, терапевтически эффективное количество означает количество соединения, которое приводит к следующим результатам: (1) уменьшает размер опухоли, (2) подавляет (т.е. в некоторой степени замедляет, предпочтительно останавливает) метастазирование, (3) в некоторой степени подавляет (т.е. в некоторой степени замедляет, предпочтительно останавливает) рост опухоли, и/или (4) в некоторой степени ослабляет (или предпочтительно устраняет) один или несколько симптомов, ассоциированных с раком.

Термин "мониторинг" означает наблюдение или обнаружение результата контактирования соединения с клеткой, экспрессирующей конкретную ПК. Наблюдаемый или обнаруженный эффект может представлять собой изменение клеточного фенотипа, каталитической активности ПК или изменение взаимодействия ПК с природным связывающимся партнером (лигандом). Способы наблюдения или обнаружения таких явлений хорошо известны специалистам.

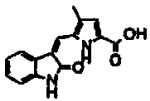
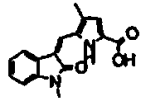
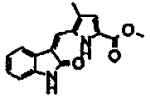
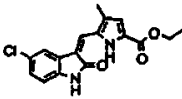
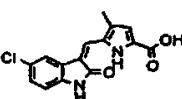
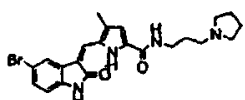
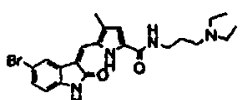
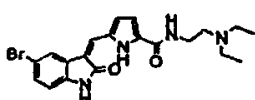
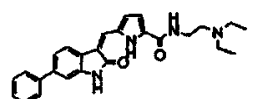
Вышеупомянутый эффект выбирают из следующих результатов: изменение или отсутствие изменений клеточного фенотипа, изменение или отсутствие изменений каталитической активности упомянутой ПК или изменение или отсутствие изменений во взаимодействии вышеупомянутой ПК с природным связывающимся партнером (лигандом).

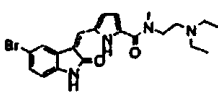
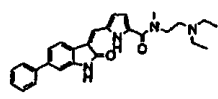
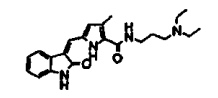
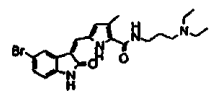
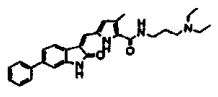
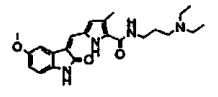
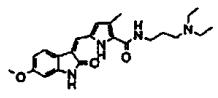
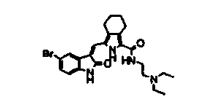
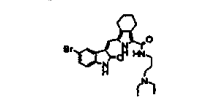
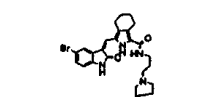
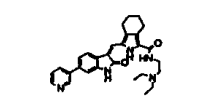
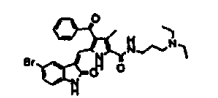
"Клеточный фенотип" означает внешние признаки клетки или ткани или биологические функции клетки или ткани. Примеры клеточного фенотипа включают в себя, без ограничения перечисленным, размер клетки, клеточный рост, клеточную пролиферацию, дифференциацию клеток, выживание клеток, апоптоз, поглощение и использование питательных веществ. Такие характеристики фенотипа могут быть определены по методикам, известным в данной области техники.

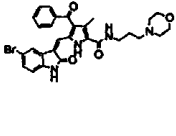
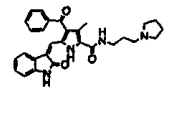
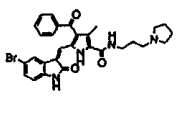
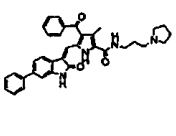
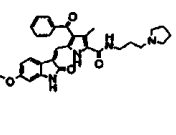
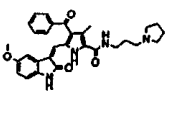
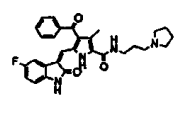
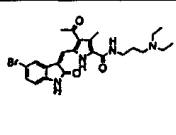
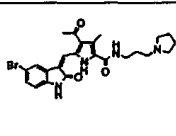
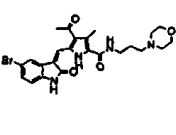
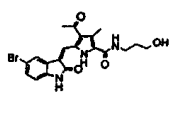
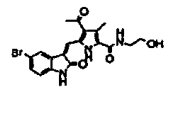
"Природный связывающийся партнер (лиганд)" означает полипептид, который связывается с конкретной ПК в клетке. Природные лиганды могут выполнять (определенную) функцию в процессе передачи сигнала, опосредованном ПК. Изменение взаимодействия природного лиганда с ПК может проявляться непосредственно, как увеличение или уменьшение концентрации комплекса ПК/природный лиганд, и как наблюдаемое изменение способности ПК опосредовать передачу сигнала.

Примеры соединений по настоящему изобретению приведены ниже в табл. 1.

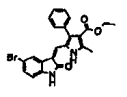
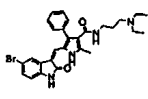
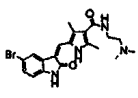
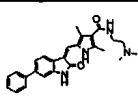
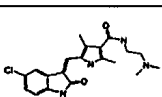
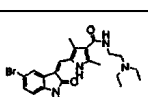
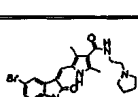
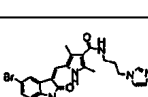
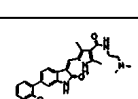
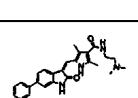
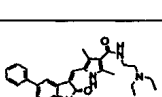
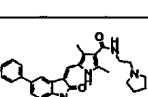
Таблица 1

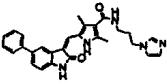
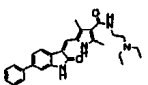
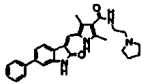
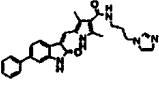
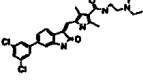
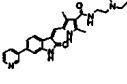
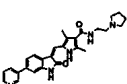
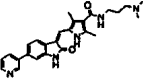
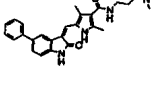
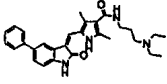
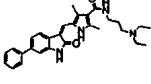
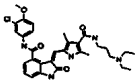
При мер	Формула	Название
1		4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновая кислота
2		4-Метил-5-(1-метил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновая кислота
3		Метилвый эфир 4-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
4		Этиловый эфир 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
5		5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1Н-пиррол-2-карбоновая кислота
6		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
7		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
8		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
9		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты

10		(2-Диэтиламиноэтил)метиламид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
11		(2-Диэтиламиноэтил)метиламид 5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
12		(3-Диэтиламинопропил)амид 3-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
13		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
14		(3-Диэтиламинопропил)амид 3-метил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
15		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
16		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
17		(2-Диэтиламиноэтил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
18		(3-Диэтиламинопропил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
19		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
20		(2-Диэтиламиноэтил)амид 3-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
21		(3-Диэтиламинопропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты

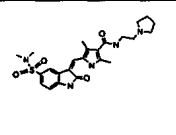
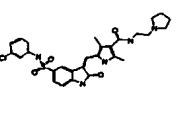
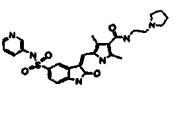
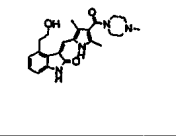
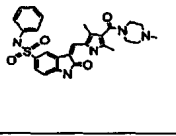
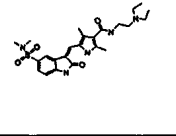
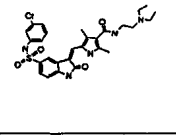
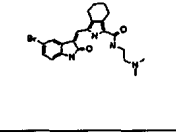
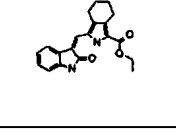
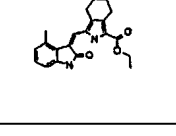
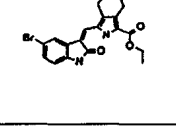
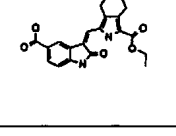
22		(3-Морфолин-4-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
23		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-3-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
24		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
25		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-3-метил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
26		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
27		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
28		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
29		(3-Диэтиламинопропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
30		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
31		(3-Морфолин-4-ил-пропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
32		(3-Гидроксипропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
33		(2-Гидроксиэтил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты

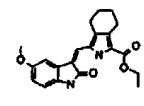
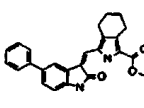
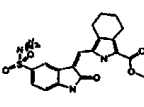
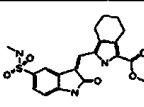
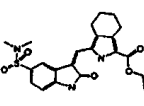
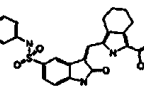
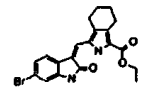
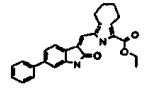
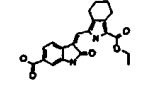
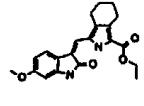
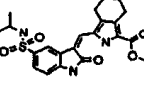
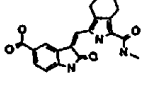
34		(2-Морфолин-4-ил-этил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
35		(2-Пирролидин-1-илэтил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
36		[2-(4-Гидроксифенил)этил]амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты
37		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
38		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
39		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
40		[3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
41		5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота
42		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
43		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
44		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
45		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты

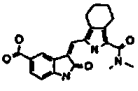
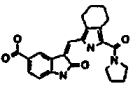
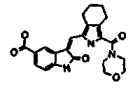
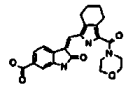
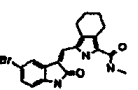
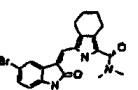
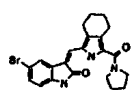
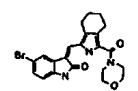
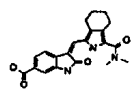
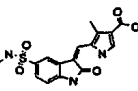
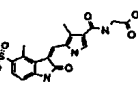
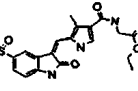
46		Этиловый эфир 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
47		(3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
48		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
49		(2-Диметиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
50		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
51		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
52		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
53		(3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
54		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(2-метокси-фенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
55		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(3-метокси-фенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
56		(2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
57		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты

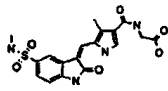
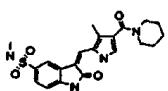
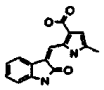
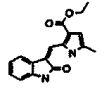
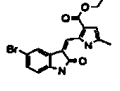
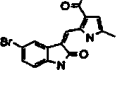
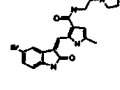
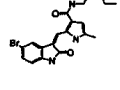
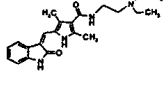
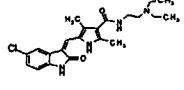
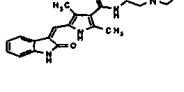
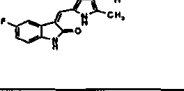
58		(3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
59		(2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
60		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
61		(3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
62		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[6-(3,5-дихлорфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
63		(2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
64		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
65		(3-Диметиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
66		(3-Диметиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
67		(3-Диэтиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
68		(3-Диэтиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
69		(3-Хлор-4-метоксифенил)амид 3-[4-(3-диэтиламино-пропилкарбамоил)-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-ил-метилен]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-4-карбоновой кислоты

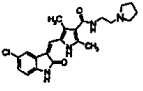
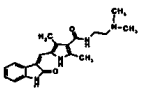
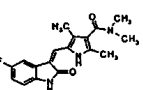
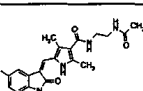
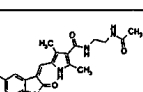
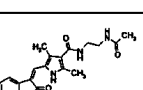
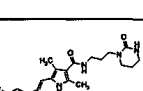
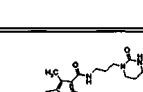
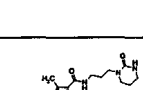
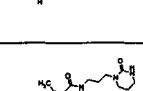
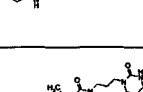
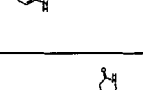
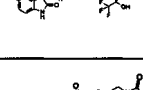
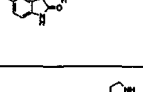
70		(3-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
71		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
72		(3-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
73		(3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
74		(Пиридин-4-ил-метил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
75		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(4-бутилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
76		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(5-изопропил-2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
77		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(4-этилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
78		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(2,4-диметоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
79		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(3-изопропилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
80		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
81		3-[4-(2-Диэтиламиноэтилкарбамоил)-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-ил-метилен]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновая кислота

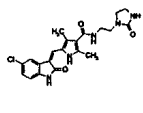
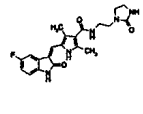
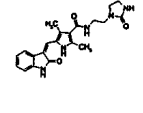
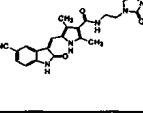
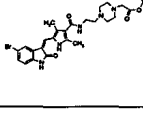
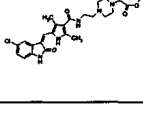
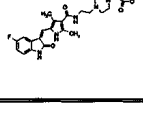
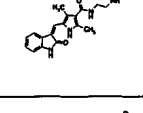
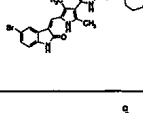
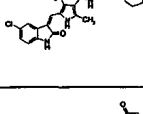
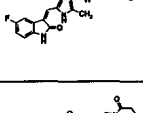
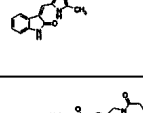
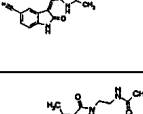
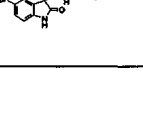
82		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-(5-диметилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
83		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[5-(3-хлорфенилсульфамойл)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
84		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-5-(пиридин-3-ил-сульфамойл)-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
85		3-[3,5-Диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-илметил]-4-(2-гидроксиэтил)-1,3-дигидроиндол-2-он
86		Фениламид 3-[3,5-диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-илметил]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты
87		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-диметилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
88		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[5-(3-хлорфенилсульфамойл)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты
89		(2-Диметиламиноэтил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
90		Этиловый эфир 3-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
91		Этиловый эфир 3-(4-метил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
92		Этиловый эфир 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
93		3-(3-Этоксикарбонил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-илметил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновая кислота

94		Этиловый эфир 3-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
95		Этиловый эфир 3-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
96		Этиловый эфир 3-(2-оксо-5-сульфамойл-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
97		Этиловый эфир 3-(5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
98		Этиловый эфир 3-(5-диметилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
99		Этиловый эфир 3-(2-оксо-5-фенилсульфамойл-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
100		Этиловый эфир 3-(6-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
101		Этиловый эфир 3-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
102		3-(3-Этоксикарбонил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновая кислота
103		Этиловый эфир 3-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
104		Этиловый эфир 3-(5-изопропилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
105		3-(3-Метилкарбамоил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновая кислота

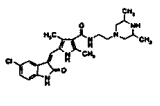
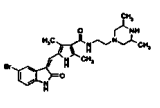
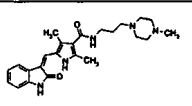
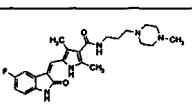
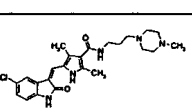
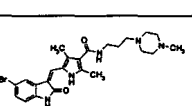
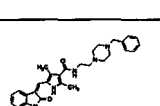
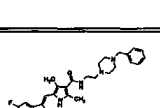
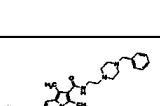
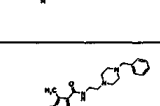
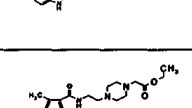
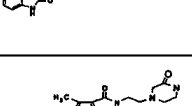
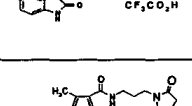
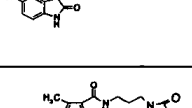
106		3-(3-(Диметилкарбамоил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновая кислота
107		2-Оксо-3-[3-(пирролидин-1-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен]-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновая кислота
108		3-[3-(Морфолин-4-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-карбоновая кислота
109		3-[3-(Морфолин-4-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-ил-метилен]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновая кислота
110		Метиламид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
111		Диметиламид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты
112		5-Бром-3-[3-(пирролидин-1-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-илметилен]-1,3-дигидроиндол-2-он
113		5-Бром-3-[3-(морфолин-4-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-илметилен]-1,3-дигидроиндол-2-он
114		3-(3-(Диметилкарбамоил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-илметилен)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновая кислота
115		4-Метил-5-(5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота
116		Этиловый эфир {[4-метил-5-(4-метил-5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбонил]амино}уксусной кислоты
117		Этиловый эфир {[4-метил-5-(5-метилсульфамойл-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбонил]амино}уксусной кислоты

118		[[4-Метил-5-(5-метилсульфоил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбонил]амино]уксусная кислота		
119		Метиламид 3-[3-метил-4-(пиперидин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-илметил]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты		
120		5-Метил-2-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота		
121		Этиловый эфир 5-метил-2-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		
122		Этиловый эфир 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		
123		2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота		
124		(2-пирролидин-1-ил-этил)амид 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		
125		(2-диэтиламиноэтил)амид 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		
126		(2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	381 [M+1]	
127		(2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	415 [M+1]	
128		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	379 [M+1]	
129		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	397 [M+1]	

130		(2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	413 [M+1]	
131		(2-Диметиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	353 [M+1]	
132		(2-Диметиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	371 [M+1]	
133		(2-Ацетиламиноэтил)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	399 [M-1]	
134		(2-Ацетиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	383 [M-1]	
135		(2-Ацетиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	365 [M-1]	
136		[3-(2-Оксотетрагидропиримидин-1-ил)пропил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	500 [M+1] 502 [M+1]	
137		[3-(2-Оксотетрагидропиримидин-1-ил)пропил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	454 [M-1]	
138		[3-(2-Оксотетрагидропиримидин-1-ил)пропил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	438 [M-1]	
139		[3-(2-Оксотетрагидропиримидин-1-ил)пропил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	422 [M+1]	
140		[3-(2-Оксотетрагидропиримидин-1-ил)пропил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	447 [M+1]	
141		Трифторацетат 4-[2-((5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-2-оксопиперазин-1-ия	486 [M+1] 488 [M+1]	
142		[3-(2-Оксопирролидин-1-ил)пропил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	430 [M-1]	
143		[2-(2-Оксоимидазолидин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	470 [M-1] 472 [M-1]	

144		[2-(2-Оксоимидазолидин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	428 [M+1]	
145		[2-(2-Оксоимидазолидин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	412 [M+1]	
146		[2-(2-Оксоимидазолидин-1-ил)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	392 [M-1]	
147		[2-(2-Оксоимидазолидин-1-ил)этил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	419 [M+1]	
148		Этиловый эфир 4-[2-((5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-пиперазин-1-ил]уксусной кислоты	558 [M+1] 560 [M+1]	
149		Этиловый эфир 4-[2-((5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-пиперазин-1-ил]уксусной кислоты	514 [M+1]	
150		Этиловый эфир 4-[2-((5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-пиперазин-1-ил]уксусной кислоты	498 [M+1]	
153		[2-(Цианометиламино)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	362 [M-1]	
154		[3-(2-Оксоазепан-1-ил)пропил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	511 [M-1] 513 [M-1]	
155		[3-(2-Оксоазепан-1-ил)пропил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	469 [M+1]	
156		[3-(2-Оксоазепан-1-ил)пропил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	453 [M+1]	
157		[3-(2-Оксоазепан-1-ил)пропил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	435 [M+1]	
158		[3-(2-Оксоазепан-1-ил)пропил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	460 [M+1]	
159		(2-Ацетиламиноэтил)амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	443 [M-1] 445 [M-1]	

160		Трифторацетат 4-[2-((5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-2-оксопиперазин-1-ия	426 [M+1]	
161		Трифторацетат 4-[2-((2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-2-оксопиперазин-1-ия	408 [M+1]	
162		Трифторацетат 4-[2-((5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-2-оксопиперазин-1-ия	433 [M+1]	
163		[2-(2-Цианоэтиламино)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	454 [M-1] 456 [M-1]	
164		[2-(2-Цианоэтиламино)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	410 [M-1]	
165		[2-(2-Цианоэтиламино)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	394 [M-1]	
166		[2-(2-Цианоэтиламино)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	376 [M-1]	
167		[2-(2-Цианоэтиламино)этил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	401 [M-1]	
168		[2-(4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	424 [M-1]	
169		[2-(4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	440 [M-1]	
170		[2-(4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	484 [M-1] 486 [M-1]	
171		[2-(4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	406 [M-1]	
172		[2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	422 [M+1]	
173		[2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты	438 [M-1]	

174		[2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	456 [M+1]	
175		[2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	498 [M-1] 500 [M-1]	
176		[3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	422 [M+1]	
177		[3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	438 [M-1]	
178		[3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	454 [M-1]	
179		[3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	498 [M-1] 500 [M-1]	
180		[2-(4-Бензилпиперазин-1-ил)этил]амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	482 [M-1]	
181		[2-(4-Бензилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	500 [M-1]	
182		[2-(4-Бензилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	517 [M-1]	
183		[2-(4-Бензилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	560 [M-1] 562 [M-1]	
184		(3-Пирролидин-1-ил-2-он)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	480 [M+1]	
185		Трифторацетат 4-[2-((5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбонил)амино)этил]-2-оксопиперазин-1-ия	440 [M-1]	
186		(3-Пирролидин-1-ил-2-он)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		
187		(3-Пирролидин-1-ил-2-он)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты		

188		(3-Пирролидин-1-ил-2-он)амид 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
189		(2-Пиридин-2-ил-этил)амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
190		Трифторацетат (2-пиридин-2-ил-этил)амида 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
191		Гидрохлорид (2-пиридин-2-ил-этил)амида 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
192		Трифторацетат (2-пиридин-2-ил-этил)амида 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
193		(2-Этиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
194		(2-Аминоэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
195		(2-Диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
196		(2-Этил-N-гидроксиаминоэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
197		(2-Диэтиламино-2-гидроксиэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
198		[2-Этил-2-(2-гидроксиэтил)аминоэтил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
199		[2-Этил-2-(1-гидроксиэтил)аминоэтил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
200		(2-N-ацетиламиноэтил)амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
201		(Карбоксиметил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	

202		[2-(2-Гидроксиэтиламино)этил]-амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
203		Трифторацетат (2-пиридин-2-ил-этил)амида 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	
204		Трифторацетат (3-пирролидин-1-ил-2-он-пропил)амида 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты	

Номера соединений соответствуют номерам примеров в разделе "Примеры". Таким образом, синтез соединения 1 в табл. 1 описан в примере 1. Соединения представлены в табл. 1 только для иллюстрации, но ни в коей мере не для ограничения объема притязаний настоящего изобретения.

Предпочтительные варианты воплощения изобретения

Так как наиболее широкое определение представлено в разделе "Краткое содержание изобретения", определенные соединения формулы (I), приведенные ниже, являются предпочтительными.

(1) Предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 , R^3 и R^4 означают водород.

(2) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 , R^2 и R^4 означают водород.

(3) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 , R^2 и R^3 означают водород.

(4) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^2 , R^3 и R^4 означают водород.

(5) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 , R^2 , R^3 и R^4 означают водород.

(6) Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 , R^6 или R^7 , предпочтительно R^5 или R^6 , более предпочтительно R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} означает $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, а R^{11} означает водород или незамещенный низш. алкил, предпочтительно водород или метил, n равно 2, 3 или 4, предпочтительно 2 или 3, и R^{12} означает $-NR^{13}R^{14}$, где R^{13} и R^{14} независимо означают алкил, более предпочтительно незамещенный низш. алкил или R^{13} и R^{14} объединены с образованием группы, которую выбирают из следующего ряда: $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$, причем предпочтительно R^{13} и R^{14} независимо означают водород, метил, этил, или они объединены с образованием следующих групп: морфолин-4-ил, пирролидин-1-ил, пиперазин-1-ил или 4-метилпиперазин-1-ил.

Более предпочтительно, когда R^5 или R^6 , указанные выше в пункте (6), означают N-(2-диметиламиноэтил)аминокарбонил, N-(2-этиламиноэтил)-N-метиলামинокарбонил, N-(3-диметиламинопропил)аминокарбонил, N-(2-диэтиламиноэтил)аминокарбонил, N-(3-этиламинопропил)аминокарбонил, N-(3-диэтиламинопропил)аминокарбонил, 3-пирролидин-1-илпропиламинокарбонил, 3-морфолин-4-илпропиламинокарбонил, 2-пирролидин-1-илэтиламинокарбонил, 2-морфолин-4-илэтиламинокарбонил, 2-(4-метилпиперазин-1-ил)этиламинокарбонил, 2-(4-метилпиперазин-1-ил)пропиламинокарбонил, 2-(3,5-диметилпиперазин-1-ил)этиламинокарбонил или 2-(3,5-диметилпиперазин-1-ил)пропиламинокарбонил, еще более предпочтительно N-(2-диэтиламиноэтил)аминокарбонил или N-(2-этиламиноэтил)аминокарбонил.

(7) Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 , R^6 или R^7 , предпочтительно R^5 или R^6 , более предпочтительно R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} означает $-NR^{13}R^{14}$, где R^{13} означает водород, а R^{14} означает алкил, предпочтительно низш. алкил, замещенный одной из следующих групп: гидрокси, арил, гетероарил, гетероалициклическая группа или карбоксо, более предпочтительно метил, этил, пропил или бутил, замещенный одной из следующих групп: гидрокси, арил, гетероалициклическая группа, такая как пиперидин, пиперазин, морфолин и т.п., гетероарил или карбоксо. Наиболее предпочтительно в пункте (7) R^5 или R^6 означает 2-этоксикарбонил-метиলামинокарбонил, карбоксиметиламинокарбонил, 3-гидроксипропиламинокарбонил, 2-гидроксиэтил-аминокарбонил, 3-триазин-1-илпропиламинокарбонил, триазин-1-илэтиламинокарбонил-4-гидрокси-фенилэтиламинокарбонил, 3-имидазол-1-илпропиламинокарбонил, пиридин-4-илметиলামинокарбонил, 2-пиридин-2-илэтиламинокарбонил или 2-имидазол-1-илэтиламинокарбонил.

(8) Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 , R^6 или R^7 , предпочтительно R^5 или R^6 , более предпочтительно R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} означает

$-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, а R^{11} означает водород или алкил, предпочтительно водород или метил, n равно 2, 3 или 4, предпочтительно 2 или 3, и R^{12} означает $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, где R^{13} и R^{14} объединены с образованием гетероцикла, предпочтительно 5-, 6- или 7-членного гетероцикла, содержащего карбонильную группу и 1 или 2 атома азота. Предпочтительно, когда R^5 или R^6 означают 2-(3-этоксикарбонилметилпиперазин-1-ил)этиламинокарбонил, 2-(3-оксопиперазин-1-ил)этиламинокарбонил, 2-(имидазолидин-1-ил-2-он)этиламинокарбонил, 2-(тетрагидропиримидин-1-ил-2-он)этиламинокарбонил, -(2-оксопирролидин-1-ил)этиламинокарбонил, 3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропиламинокарбонил, 3-(3-этоксикарбонилметилпиперазин-1-ил)пропиламинокарбонил, 3-(3-оксопиперазин-1-ил)пропиламинокарбонил, 3-(имидазолидин-1-ил-2-он)пропиламинокарбонил, 3-(тетрагидропиримидин-1-ил-2-он)пропиламинокарбонил, 3-(2-оксопирролидин-1-ил)пропиламинокарбонил, 2-(2-оксогомопиперидин-1-ил)этиламинокарбонил или 3-(2-оксогомопиперидин-1-ил)пропиламинокарбонил.

(9) Еще одной предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 , R^6 или R^7 , предпочтительно R^5 или R^6 , более предпочтительно R^6 означает $-\text{COR}^{10}$, где (а) R^{10} означает $\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, а R^{11} означает водород или алкил, предпочтительно водород или метил, n равно 2, 3 или 4, предпочтительно 2 или 3, и R^{12} означает $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, где R^{13} означает водород, а R^{14} означает цианоалкил или $-\text{NHCOR}^a$, где R^a означает алкил, или (б) R^{10} означает $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, где R^{13} и R^{14} объединены с образованием гетероцикла, не содержащего карбонильную группу в составе цикла. Предпочтительно, когда R^5 или R^6 означают 2-(2-цианоэтиламино)этиламинокарбонил, 2-(ацетиламино)этиламинокарбонил, морфолинокарбонил, пиперидин-1-илкарбонил, 2-цианометиламиноэтиламинокарбонил или пиперидин-1-илкарбонил.

(10) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 означает $-\text{COR}^{10}$, где R^{10} означает $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, а R^{13} означает водород и R^{14} означает низший алкил, замещенный группой гидрокси, низш. алкил, замещенный группой гидроксиалкиламино, карбокси или $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, где R^{18} и R^{19} независимо означают водород или незамещенный низш. алкил, более предпочтительно R^5 означает 2-[(диэтиламино)-2-гидроксиэтил]аминокарбонил, 2-(N-этил-N-2-гидроксиэтиламино)этиламинокарбонил, карбоксиметиламинокарбонил или 2-(2-гидроксиэтиламино)этиламинокарбонил.

(11) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^6 означает $-\text{COR}^{10}$, где R^{10} означает $-\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$, а R^{13} означает водород, и R^{14} означает низш. алкил, замещенный группой гидрокси, низш. алкил, замещенный группой гидроксиалкиламино, карбокси или $-\text{NR}^{18}\text{R}^{19}$, где R^{18} и R^{19} независимо означают водород или незамещенный низш. алкил, R^6 более предпочтительно означает [2-(диэтиламино)-2-гидрокси]этиламинокарбонил, 2-(N-этил-N-2-гидроксиэтиламино)этиламинокарбонил, карбоксиметиламинокарбонил или 2-(2-гидроксиэтиламино)этиламинокарбонил.

(12) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^5 означает $-\text{COR}^{10}$, где R^{10} означает $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, а R^{12} означает $-\text{N}^+(\text{O}^-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ или $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$, а R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород и незамещенный низш. алкил, предпочтительно R^5 означает 2-(N-гидрокси-N-этиламино)этиламинокарбонил или 2-[$\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$] этиламинокарбонил.

(13) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^6 означает $-\text{COR}^{10}$, где R^{10} означает $-\text{NR}^{11}(\text{CH}_2)_n\text{R}^{12}$, и R^{12} означает $-\text{N}^+(\text{O}^-)\text{NR}^{13}\text{R}^{14}$ или $-\text{N}(\text{OH})\text{R}^{13}$, а R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей водород и незамещенный низш. алкил, R^6 предпочтительно означает 2-(N-гидрокси-N-этиламино)этиламинокарбонил или 2-[$\text{N}^+(\text{O}^-)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$]этиламинокарбонил.

(14) Если в перечисленных выше предпочтительных группах (6)-(13) R^5 означает $-\text{COR}^{10}$, то более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, трет-бутил, изобутил или н-бутил, более предпочтительно водород или метил, и R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, арил, гетероарил и $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$, где R^{17} означает гидрокси, алкил или арил, более предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, н-, изо-, или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, еще более предпочтительно метил, водород или фенил.

(15) Если в перечисленных выше предпочтительных группах (6)-(13) R^5 означает $-\text{COR}^{10}$, то другой более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^6 и R^7 объединены с образованием $-(\text{CH}_2)_4-$.

(16) Если в перечисленных выше предпочтительных группах (6)-(13) R^6 означает $-\text{COR}^{10}$, то более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^5 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, трет-бутил, изобутил или н-бутил, более предпочтительно водород или метил, и R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, арил, гетероарил и $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{17}$, где R^{17} означает гидрокси, алкил или арил, более предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, н-, изо-, или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, еще более предпочтительно метил, водород или фенил. (17) Среди перечисленных выше предпочтительных и более предпочтительных групп (6)-(16) еще более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^1 означает водород, алкил, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^8\text{R}^9$, незамещенный циклоалкил или арил, предпочтительно водород, фенил, 3,4-диметоксифениламинокарбонил, 4-метокси-3-хлорфенилами-

нокарбонил, еще более предпочтительно водород или метил, наиболее предпочтительно водород, R^2 означает циано, водород, галоген, низш. алкокси, арил или $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, где R^{13} означает водород, а R^{14} означает водород, арил или алкил, R^2 предпочтительно означает водород, хлор, бром, фтор, метокси, этокси, фенил, диметиламиносульфонил, 3-хлорфениламиносульфонил, карбокси, аминосульфони́л, метиламиносульфонил, фениламиносульфонил, пиридин-3-ил-аминосульфони́л, изопропиламиносульфонил, более предпочтительно водород, фтор или бром, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низший алкокси, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, арил, предпочтительно арил, необязательно замещенный одним или двумя заместителями, которые выбирают из группы, включающей в себя низш. алкил, галоген, или низш. алкокси, и гетероарил, предпочтительно гетероарил, по выбору замещенный одним или двумя заместителями, которые выбирают из группы, включающей в себя низш. алкил, галоген или низш. алкокси, предпочтительно водород, метокси, карбокси, фенил, пиридин-3-ил, 3,4-дихлорфенил, 2-метокси-5-изопропилфенил, 4-н-бутилфенил, 3-изопропилфенил, более предпочтительно водород или фенил, и R^4 означает водород.

(18) Другой предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 означает водород, алкил, $-C(O)NR^8R^9$, незамещенный циклоалкил или арил, предпочтительно водород, 3,4-диметоксифениламинокарбонил, 4-метокси-3-хлорфениламинокарбонил, еще более предпочтительно водород или метил, прежде всего водород, R^2 означает циано, водород, галоген, низш. алкокси, арил или $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, где R^{13} означает водород, а R^{14} означает водород, арил или алкил, R^2 предпочтительно означает водород, хлор, бром, фтор, метокси, этокси, фенил, диметиламиносульфонил, 3-хлорфениламиносульфонил, карбокси, метокси, аминосульфони́л, метиламиносульфонил, фениламиносульфонил, пиридин-3-иламиносульфонил, диметиламиносульфонил, изопропиламиносульфонил, более предпочтительно водород, фтор или бром, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низший алкокси, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, арил, предпочтительно арил, необязательно замещенный одним или двумя заместителями, которые выбирают из группы, включающей в себя низш. алкил, галоген, или низш. алкокси, и гетероарил, предпочтительно гетероарил, необязательно замещенный одним или двумя заместителями, которые выбирают из группы, включающей в себя низш. алкил, галоген или низш. алкокси, предпочтительно водород, метокси, карбокси, фенил, пиридин-3-ил, 3,4-дихлорфенил, 2-метокси-5-изопропилфенил, 4-н-бутилфенил, 3-изопропилфенил, более предпочтительно водород или фенил, и R^4 означает водород.

В приведенной выше предпочтительной группе (18) более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^5 означает $-COR^{10}$, где R^{10} имеет значение, определенное в разделе "Краткое описание изобретения", предпочтительно $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ или $NR^{13}R^{14}$, как определено в разделе "Краткое описание изобретения".

R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, трет-бутил, изобутил или н-бутил, более предпочтительно водород или метил, и R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, арил, гетероарил и $-C(O)R^{17}$, где R^{17} означает гидроксиль, алкил или арил, более предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, еще более предпочтительно метил, водород или фенил.

В приведенной выше предпочтительной группе (18) другой более предпочтительной группой соединений является такая группа, в которой R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} имеет значение, определенное в разделе "Краткое описание изобретения", предпочтительно $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ или $NR^{13}R^{14}$, как определено в разделе "Краткое описание изобретения".

R^5 выбирают из группы, включающей в себя водород и алкил, предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, трет-бутил, изобутил или н-бутил, более предпочтительно водород или метил, и R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, алкил, арил, гетероарил и $-C(O)R^{17}$, где R^{17} означает гидроксиль, алкил или арил, более предпочтительно водород, метил, этил, изопропил, н-, изо- или трет-бутил, фенил, бензоил, ацетил или карбокси, еще более предпочтительно метил, водород или фенил.

(19) Другой более предпочтительной группой соединений формулы (I) является такая группа, в которой R^1 и R^4 означают водород, R^2 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, низш. алкокси, $-C(O)R^{15}$ и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкокси, $-C(O)R^{15}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, арил и гетероарил, R^5 означает $-C(O)R^{10}$, R^6 выбирают из группы, включающей в себя водород и низш. алкил, и R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил и $-C(O)R^{17}$.

Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, имеющее структуру, описанную в пункте (15), в котором R^{10} выбирают из группы, состоящей из гидроксиль, низш. алкокси и $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, где n равно 2 или 3, R^{11} выбирают из группы, состоящей из водорода и низш. алкила, и R^{12} выбирают из группы, состоящей из арила и $-NR^{13}R^{14}$.

Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, имеющее структуру, описанную в двух предыдущих абзацах, R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, низш. алкила и они могут быть объединены с образованием $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(20) Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соедине-

ние, в котором R^1 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил, $-(CH_2)_rR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$, R^2 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, арил и $S(O)_2NR^{13}R^{14}$, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил, низш. алкокси, арил, гетероарил и $-C(O)R^{15}$, R^4 означает водород, R^5 выбирают из группы, состоящей из водорода и низшего алкила, R^6 означает $-C(O)R^{10}$, R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил и арил, R^{16} выбирают из группы, состоящей из гидроксидов и $-C(O)R^{15}$, а r равно 2 или 3.

Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, имеющее структуру, описанную в предыдущем абзаце, в котором R^3 означает арил, необязательно замещенный одной или более группами, выбранными из ряда, состоящего из низш. алкила, низш. алкокси и галогена.

(21) Аналогичным образом, другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, в котором R^1 выбирают из группы, состоящей из водорода, низш. алкила, $-(CH_2)_rR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$, R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, галогена, арила и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил, низш. алкокси, арил, гетероарил и $-C(O)R^{15}$, R^4 означает водород, R^5 выбирают из группы, состоящей из водорода и низш. алкила, R^6 означает $-C(O)R^{10}$, R^7 выбирают из группы, состоящей из водорода, низш. алкила и арила, R^{16} выбирают из группы, состоящей из гидроксидов и $-C(O)R^{15}$, и r равно 2 или 3.

R^{10} выбирают из группы, включающей в себя гидроксиды, низш. алкокси, $-NR^{13}R^{14}$ и $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, где n равно 1, 2 или 3, R^{11} означает водород, а R^{12} выбирают из группы, включающей в себя гидроксиды, низш. алкокси, $-C(O)R^{15}$, гетероарил и $-NR^{13}R^{14}$.

(22) Еще одним предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, имеющее структуру, описанную в предыдущем абзаце, в котором R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил, гетероарил и они могут быть объединены с образованием $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

(23) Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, в котором R^1 означает $-C(O)NR^8R^9$, где R^8 означает водород, а R^9 означает арил, необязательно замещенный одной или более группами, выбранными из ряда, состоящего из галогена, гидроксидов и низш. алкокси, R^2 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, арил и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил, низш. алкокси, арил, гетероарил и $-C(O)R^{15}$, R^4 означает водород, R^5 выбирают из группы, включающей в себя водород и низш. алкил, R^6 означает $-C(O)R^{10}$, R^7 выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил и арил, R^{16} выбирают из группы, состоящей из гидроксидов и $-C(O)R^{15}$, и r равно 2 или 3.

(24) Другим предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, в котором R^1 выбирают из группы, состоящей из водорода и низшего алкила, R^2 выбирают из группы, состоящей из водорода, галогена, низш. алкокси, арила, $-C(O)R^{15}$ и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, R^3 выбирают из группы, включающей в себя водород, галоген, арил, гетероарил и $-C(O)R^{15}$, R^4 означает водород, R^5 означает $-C(O)R^{10}$, R^6 и R^7 объединены с образованием группы $-(CH_2)_4-$.

Предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является такой вариант соединения, имеющего структуру, описанную в предыдущем абзаце, в котором R^{10} выбирают из группы, включающей в себя гидроксиды, алкокси, $-NR^{13}R^{14}$ и $-NH(CH_2)_nNR^{13}R^{14}$, где n равно 2 или 3.

Еще одним предпочтительным вариантом воплощения настоящего изобретения является соединение, имеющее структуру, описанную в двух предыдущих абзацах, в котором R^{13} и R^{14} независимо выбирают из группы, включающей в себя водород, низш. алкил и они могут быть объединены с образованием $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

Применение

ПК, каталитическая активность которых модулируется соединениями по настоящему изобретению, включают ТК трех типов, а именно рецепторные (РТК), клеточные (КТК) и серин-треонинкиназы (СТК). Перенос сигнала, опосредованный РТК, инициируется путем внеклеточного взаимодействия клетки со специфическим ростовым фактором (лигандом) с последующей димеризацией рецептора, временной стимуляцией собственной тирозинкиназной активности и фосфорилированием. Благодаря этому участки связывания становятся доступными для соединений, локализованных в цитоплазме и принимающих участие во внутриклеточной передаче сигнала, что способствует образованию комплексов с целым спектром цитоплазматических сигнальных молекул, которые содействуют формированию соответствующего клеточного ответа (например, деление клетки, метаболические изменения во внеклеточной среде и т.п.). См. статью Schlessinger и Ullrich, 1992, Neuron, 9:303-391.

Установлено, что участки фосфорилирования тирозина у рецепторов ростовых факторов обладают высокой специфичностью связывания SH2 доменов (гомологичных src) сигнальных молекул. См. статьи Fantl и соавт., 1992, Cell, 69:413-423; Songyang и соавт., 1994, Mol. Cell. Biol., 14:2777-2785; Songyang и соавт., 1993, Cell, 72:767-778; Koch и соавт., 1991, Science, 252: 668-678.

Идентифицировано несколько внутриклеточных белков, связывающихся с РТК. Эти белки могут быть подразделены на две основные группы: 1) субстраты, содержащие каталитический домен, 2) субстраты, лишенные каталитического домена, но выполняющие функции посредника и ассоциированные с

каталитически активными молекулами. См. статью Songyang и соавт., 1993 Cell, 72: 767-778. Специфичность взаимодействия между рецепторами и SH2 доменами, содержащимися в соответствующих субстратах, определяется аминокислотными остатками, соседними с остатком тирозина, подлежащего фосфорилированию. Различие в сродстве связывания SH2 доменов и аминокислотными последовательностями в конкретных рецепторах, окружающими остаток фосфотирозина, коррелирует с наблюдаемыми различиями в профилях фосфорилирования субстратов. См. статью Songyang и соавт., 1993 Cell, 72:767-778. Эти данные свидетельствуют о том, что функция каждой РТК зависит не только от характера их экспрессии и доступности лиганда, но также от схемы путей последовательной передачи сигнала, которая активируется данным рецептором. Таким образом, фосфорилирование представляет собой ключевую регуляторную стадию, которая определяет селективность сигнального пути, используемого рецепторами конкретного ростового фактора, а также рецепторами фактора дифференциации.

СТК, содержащиеся преимущественно в цитозоле, действуют на внутреннюю биохимию клетки часто в виде периферического ответа на события с участием РТК. Предполагают, что СТК участвует в сигнальном процессе, который инициирует синтез ДНК и последующий митоз, ведущий к клеточной пролиферации.

Таким образом, перенос сигнала с участием ПК, наряду с прочими событиями, приводит к пролиферации, дифференциации, росту клеток и изменению метаболизма. Аномальная пролиферация клеток может повлечь за собой множество нарушений и заболеваний, включая развитие неоплазии, такой как, карцинома, саркома, гиобластома и гемангиома, нарушений, таких как, лейкоз, псориаз, артериосклероз, артрит, диабетическая ретинопатия и прочие нарушения, связанные с неконтролируемым ангиогенезом и/или васкулогенезом.

Для воплощения настоящего изобретения на практике не обязательно знать механизм ингибирования ПК соединениями по настоящему изобретению. Однако, не вдаваясь в детали какого-либо механизма или теории, авторы полагают, что соединения взаимодействуют с аминокислотными остатками в каталитическом домене ПК. ПК обычно имеют двудольную структуру, причем установлено, что АТФ связывается в щели между двумя долями, где локализованы консервативные аминокислотные остатки ПК. Считается, что ингибиторы ПК связываются за счет нековалентных взаимодействий, таких как, водородные связи, вандерваальсовы силы и ионные взаимодействия, именно в этом ключевом участке, где с ПК связывается вышеупомянутый АТФ. Более подробно, следует полагать, что 2-индолиноновый фрагмент соединений по настоящему изобретению связывается с участком, обычно занятым адениновым циклом АТФ. В таком случае специфичность конкретной молекулы для данной ПК может быть обусловлена дополнительными взаимодействиями между различными заместителями, содержащимися в 2-индолиноновом фрагменте, и аминокислотными доменами, специфичными для данной ПК. Таким образом, различные индолиноновые заместители могут способствовать предпочтительному связыванию с данной ПК. Возможность выбирать соединения, активные к различным участкам связывания АТФ (или другого нуклеотида), позволяет использовать соединения по настоящему изобретению для действия на любой белок, содержащий такие участки связывания. Таким образом, описанные в тексте соединения пригодны как для анализа таких белков *in vitro*, так и для проявления *in vivo* терапевтического действия за счет взаимодействия с такими белками.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению позволяют разработать подход к лечению многих видов солидных опухолей, включая, без ограничения перечисленным, карциномы, саркомы, включая саркому Капоши, эритробластому, глиобластому, менингиому, астроцитому, меланому и миобластому. Настоящее изобретение относится также к лечению или

профилактике несолидных опухолевых заболеваний, таких как лейкоз. Показания могут включать, без ограничения перечисленным, рак мозга, рак мочевого пузыря, рак яичника, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак ободочной кишки, рак крови, рак легких, рак костной ткани.

Другие примеры нарушений, связанных с аномальной активностью ПК, в случае которых описанные в тексте соединения могут быть использованы для профилактики, лечения и обследования, включают, без ограничения перечисленным, нарушения, связанные с клеточной пролиферацией, фиброзные нарушения и метаболические нарушения.

Клеточные пролиферативные нарушения, для профилактики, лечения и обследования которых могут быть использованы соединения по настоящему изобретению, включают рак, пролиферативные нарушения в кровеносных сосудах и мезангиальные пролиферативные нарушения.

Пролиферативные нарушения кровеносных сосудов означают нарушения, связанные с аномальным васкулогенезом (образованием кровеносных сосудов) и ангиогенезом (развитием кровеносных сосудов). Васкулогенез и ангиогенез играют центральную роль во многих нормальных физиологических процессах, таких как, эмбриональное развитие, образование желтого тела, заживление ран и регенерация органов, кроме того, они играют центральную роль в развитии онкологического заболевания, в процессе которого они приводят к образованию новых капилляров, необходимых для выживания опухоли. Другие примеры пролиферативных нарушений в кровеносных сосудах включают артрит, при котором растущие капиллярные кровеносные сосуды внедряются в сустав и разрушают хрящевую ткань, и глазные болезни, подобные диабетической ретинопатии, при которых растущие капилляры внедряются в сетчатку обо-

лочку стекловидного тела, кровоточат и вызывают слепоту.

Установлено, что две близкие в структурном отношении РТК связывают VEGF с высоким сродством: fms-подобный тирозиновый рецептор-1 (fms— 1) (см. статьи Shibuya и соавт., 1990, *Oncogen*. 5:519-524; De Vries и соавт., 1992, *Science*, 255:989-991) и рецептор KDR/FLK-1, известный также, как VEGFR-2. В литературе описано, что фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является специфическим митогеном эндотелиальных клеток, обладающим свойством стимулировать рост клеток эндотелия *in vitro*. См. статьи Ferrara и Henzel, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 161:851-858; Vaisman и соавт., 1990, *J. Biol. Chem.*, 265:19461-19566. Информация, приведенная в заявках на выдачу патента США № 08/193829, 08/038596 и 07/975750, определенно свидетельствует о том, что VEGF не только отвечает за пролиферацию эндотелиальных клеток, но, кроме того, является основным регулятором ангиогенеза в норме и при патологии. См. статьи Klagsburn и Soker, 1993, *Current Biology*, 3(10):699-702; Houck соавт., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267:26031-26037.

Нормальный васкулогенез и ангиогенез играют центральную роль во многих физиологических процессах, таких как, эмбриональное развитие, заживление ран, регенерация органов и репродуктивные процессы у женщин, такие как образование фолликула в желтом теле во время овуляции и рост плаценты в процессе беременности. См. статью Folkman и Shing, 1992, *J. Biol. Chem.* 267(16):10931-10934. Неконтролируемый васкулогенез и/или ангиогенез связаны с заболеваниями, такими как диабет, а также злокачественными солидными опухолями, которые для своего роста нуждаются в васкуляризации. См. статьи Klagsburn и Soker, 1993, *Current Biology*. 3(10):699-702; Folkman, 1991, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:4-6; Weidner и соавт., 1991, *New Engl. J. Med.* 324:1-5.

Предполагаемая роль VEGF в пролиферации эндотелиальных клеток и миграции в процессе ангиогенеза и васкулогенеза свидетельствует о центральной роли рецептора KDR/FLK-1 в этих процессах. Неконтролируемый ангиогенез может быть причиной таких заболеваний, как сахарный диабет (см. доклад Folkman и соавт. in *Xlth Congress of Thrombosis and Haemostasis* (11-ый Конгресс по тромбозу и гемостазу), под ред. Verstraete и соавт., 198, Leuven University Press, Leuven, стр. 583-596), артрит и рост злокачественных опухолей (см., например, статью Folkman, 1971, *N. Engl. J. Med.*, 285:1182-1186). Рецепторы, с которыми специфически связывается VEGF, представляют собой важную и эффективную терапевтическую мишень для регуляции и модулирования васкулогенеза и/или ангиогенеза и множества серьезных заболеваний, которые обусловлены аномальным ростом клеток, вызванным такими процессами (см. статью Plowman и соавт., 1994, *DN & P*. 7(6):334-339). Прежде всего, высокоспецифичная роль рецепторов KDR/FLK-1 в неоваскуляризации позволяет считать их предпочтительной мишенью для терапевтических подходов к лечению рака и других болезней, связанных с неконтролируемым образованием кровеносных сосудов.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединениям, способным регулировать и/или модулировать передачу сигнала, опосредованную ТК, включая передачу сигнала рецептором KDR/FLK-1, с целью ингибирования или индуцирования ангиогенеза и/или васкулогенеза, т.е. к соединениям, которые ингибируют, предотвращают процесс передачи сигнала или препятствуют передаче сигнала, опосредованный рецептором KDR/FLK-1 при активации лигандами, такими как, VEGF. Хотя считается, что соединения по настоящему изобретению взаимодействуют с рецептором или другим компонентом, включенным в цепь передачи сигнала, опосредованной ТК, возможно также, что эти соединения непосредственно действуют на опухолевые клетки, образующиеся при неконтролируемом ангиогенезе.

Хотя рецепторы flk-1 человека и мыши имеют различные названия, сами рецепторы во многих отношениях взаимозаменяемы. У рецептора мыши, Flk-1, и его аналога в организме человека, KDR, гомология аминокислотной последовательности внутриклеточного домена составляет 93,4%. Аналогичным образом, рецептор мыши, Flk-1, связывает VEGF человека с таким же сродством, что и VEGF мыши, и, соответственно, активируется лигандом любого вида. См. статьи Millaueg и соавт., 1993, *Cell*. 72:835-846; Quinn и соавт., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7533-7537. Кроме того, Flk-1 связывается и следовательно фосфорилирует остатки тирозина в субстратах РТК человека (например, PLC-у или p85) при совместной экспрессии в клетках линии 293 (фибробласты почек эмбриона человека).

Следовательно, модели, разработанные на основе рецептора FLK-1, можно непосредственно использовать для изучения KDR рецептора. Например, данные, полученные при использовании мышинового рецептора FLK-1 в методиках, с помощью которых идентифицированы соединения, регулирующие путь передачи сигнала в организме мыши, могут быть непосредственно использованы для идентификации соединений, способных осуществлять регуляцию пути передачи сигнала в организме человека, т.е. соединений, регулирующих активность, связанную с KDR рецептором. Таким образом, химические соединения, идентифицированные как ингибиторы KDR/FLK-1 *in vitro*, могут быть исследованы на соответствующих моделях *in vivo*. Установлено, что обе модели животных для испытаний *in vivo*, мыши и крысы, вполне пригодны для изучения клинических возможностей агентов, действующих на путь передачи сигнала, индуцированный KDR/FLK-1.

Таким образом, настоящее изобретение относится к соединениям, которые регулируют, модулируют и/или ингибируют васкулогенез и/или ангиогенез, путем действия на ферментативную активность рецептора KDR/FLK-1 и препятствуя передаче сигнала, передаваемого KDR/FLK-1. Следовательно, на-

стоящее изобретение относится к разработке подхода к терапевтическому лечению многих видов солидных опухолей, включая, без ограничения перечисленным, глиобластоме, меланоме и саркоме Капоши, а также карциномы яичника, легких, молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, ободочной кишки и эпидермоидного рака. Кроме того, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что введение соединений, которые ингибируют путь передачи сигнала, опосредованный KDR/FLK-1, также могут быть использованы при лечении гемангиомы, рестеноза и диабетической ретинопатии.

Кроме того, настоящее изобретение относится к ингибированию васкулогенеза и ангиогенеза по другим путям, опосредованным рецепторами, включая путь с участием рецептора flt-1.

РТК, принимающая участие в передаче сигнала, инициируется посредством внеклеточного взаимодействия со специфическим ростовым фактором (лигандом) с последующей димеризацией рецептора, временной стимуляцией собственной тирозинкиназной активности и автофосфорилированием. При этом образуются участки связывания для молекул, обеспечивающих внутриклеточную передачу сигнала, которые приводят к образованию комплексов с рядом цитоплазматических сигнальных молекул, что приводит к соответствующему клеточному ответу, например, клеточному делению и метаболическим изменениям во внеклеточной среде. См. статью Schlessinger и Ullrich, 1992, *Neuron*. 9:1-20.

Близкая гомология внутриклеточных участков KDR/FLK-1 и рецептора PDGF- β (гомология 50,3%) и/или близкого по строению рецептора flt-1 указывает на индукцию перекрывающихся путей передачи сигнала. Например, в случае рецептора PDGF- β показано, что члены семейства src (см. статью Twamley и соавт., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7696-7700), фосфатидилинозит-3'-киназа (см. статью Hu и соавт., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12:981-990), фосфолипаза $\text{c}\alpha$ (см. статью Kashishian и Cooper, 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 4:49-51), gas-ГТФаза-активирующий белок (см. статью Kashishian и соавт., 1992, *EMBO J.*, 11:1373-1382), PTP-ID/syp (см. статью Kazlauskas и соавт., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:6939-6943), Grb2 (см. статью Arvidsson и соавт., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:6715-6726), и регуляторные субъединицы Shc и Nck (см. статью Nishimura и соавт., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13:6889-6896) связываются в областях, включающих различные участки автофосфорилирования. Общие сведения см. в статье Claesson-Welsh, 1994, *Prog. Growth Factor Res.*, 5:37-54. Таким образом, можно предположить, что пути передачи сигнала, активируемые KDR/FLK-1, включают путь, опосредованный gas (см. статью Rozakis и соавт., 1992, *Nature*. 360:689-692) и пути, опосредованные киназами PI-3', src и plcy. Каждый из этих путей может играть центральную роль в ангиогенном и/или васкулогенном действии KDR/FLK-1 на эндотелиальные клетки. Следовательно, еще один аспект настоящего изобретения относится к применению описанных в данном тексте органических соединений для модулирования ангиогенеза и васкулогенеза, поскольку такие процессы контролируются указанными путями.

Способы по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения и профилактики нарушений противоположной этиологии, связанных с сжатием, сокращением или смыканием стенок кровеносных сосудов, таких как, рестеноз.

Фиброзные нарушения означают аномальное формирование внеклеточного матрикса. Примеры фиброзных нарушений включают цирроз печени и пролиферативные нарушения мезангиальных клеток. Цирроз печени характеризуется ростом компонентов внеклеточного матрикса, приводящим к образованию печеночного рубца. Гипертрофированный внеклеточный матрикс, приводящий к образованию печеночного рубца, может быть также вызван вирусной инфекцией, такой как вирус гепатита. В развитии цирроза печени центральная роль, по-видимому, принадлежит жировым клеткам. Другим примером фиброзных нарушений является атеросклероз.

Пролиферативные нарушения мезангиальных клеток означают нарушения, вызванные аномальной пролиферацией мезангиальных клеток. Такие заболевания включают различные почечные заболевания человека, такие как, гломерулонефрит, диабетическая нефропатия и злокачественный нефросклероз, а также такие нарушения, как тромботические микроангиопатические синдромы, отторжение трансплантата и гломерулопатии. В поддержании пролиферации мезангиальных клеток принимает участие РТК PDGFR. См. статью Floege и соавт., 1993, *Kidney International*. 43:47S-54S.

Многие онкологические заболевания являются нарушениями, связанными с пролиферацией клеток, а, как отмечалось выше, ПК непосредственно связаны с нарушениями пролиферации клеток. Таким образом, вполне естественно, что ПК, такие, например, как члены семейства РТК, непосредственно связаны с развитием рака. Некоторые из этих рецепторов, например, EGFR (см. статьи Tuzi и соавт., 1991, *Br. J. Cancer*. 63:227-233; Torp и соавт., 1992, *APMIS*. 100:713-719), HER2/neu (см. статью Slamon и соавт., 1989, *Science*. 244:707-712) и PDGF-R (см. статью Kumabe и соавт., 1992, *Oncogen*, 7:627-633) характеризуются повышенной экспрессией во многих опухолях и/или устойчиво активированы в аутокринных петлях. Действительно, показано, что эти рецепторы характеризуются гиперэкспрессией при большинстве обычных и острых онкологических заболеваний (см. статьи Akbasak и Suner-Akbasak и соавт., 1992, *J. Neurol. Sci.* 111:119-133; Dickson и соавт., 1992, *Cancer Treatment Res.*, 61:249-273; Korg и соавт., 1992, *J. Clin. Invest.*, 90:1352-1360 и аутокринных петлях (см. статьи Lee и Donoghue, 1992, *J. Cell. Biol.*, 118:1057-1070; Korg и соавт., см. выше; Akbasak и Suner-Akbasak и соавт., см. выше). Например, FGFR связан с эпидермоидным раком, астроцитомой, глиобластомой, раком головы и шеи, раком легких и раком моче-

вого пузыря. HER2 ассоциирован с раком молочной железы, яичника, желудка, легких, поджелудочной железы и мочевого пузыря. PDGFR ассоциирован с глиобластомой и меланомой, а также с раком легких, яичника и предстательной железы. PTKс-met ассоциирован с образованием злокачественных опухолей. Например, с-met ассоциируется наряду с другими онкологическими заболеваниями, с колоректальной, тиреодной, панкреатической, желудочной и гепатоцеллюлярной карциномами и лимфомами. Кроме того, с-met связан с лейкозом. Гиперэкспрессия гена с-met обнаружена также у пациентов с болезнью Ходжкина и болезнью Буркитта.

IGF-IR, кроме включения в процессы парентерального питания и диабета второго типа, также ассоциирован с некоторыми типами онкологических заболеваний. Например, для некоторых типов опухолей IGF-I выступает в роли аутокринного стимулятора роста, например, для клеток карциномы молочной железы человека (см. статью Artega и соавт., 1989, *J. Clin. Invest.*, 84:1418-1423) и мелкоклеточного рака легких (см. статью Maseley и соавт., 1990, *Cancer Res.*, 50:2511-2517). Кроме того, IGF-I, в полной мере участвующий в процессе нормального роста и дифференциации (клеток) нервной системы, по-видимому, является также аутокринным стимулятором глиомы человека.

См. статью Sandberg-Nordqvist и соавт., 1993, *Cancer Res.*, 53:2475-2478). Важное значение IGF-IR и его лигандов для клеточной пролиферации подтверждается тем, что рост многих типов клеток в культуре (фибробласты, эпителиальные клетки, клетки гладких мышц, Т-лимфоциты, миелоидные клетки, хондроциты и остеобласты (стволовые клетки костного мозга)) стимулируется IGF-I. См. статью Goldring и Goldring, 1991, *Eukariotic Gene Expression*. 1:301-326. В публикациях Baserga и Coppola сообщается, что IGF-IR играет центральную роль в механизме трансформации и поэтому может быть предпочтительной мишенью для терапевтического действия на широкий спектр злокачественных опухолей. См. статьи Baserga, 1995, *Cancer Res.*, 55:249-252; Baserga, 1994, *Cell*, 79:927-930; Coppola и соавт., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:4588-4595.

СТК связывают со многими типами рака, особенно рака молочной железы (см. статью Capse и соавт., 1993, *Int. J. Cancer*. 54:571-577).

Взаимосвязь аномальной активности ПК со многими заболеваниями не ограничивается раком. Например, РТК связана с такими заболеваниями, как псориаз, сахарный диабет, эндометриоз, ангиогенез, развитие атеросклеротических бляшек, болезнь Альгеймера, болезнь Гиппеля-Линдау, эпидермальная гиперпролиферация, нейродегенеративные заболевания, возрастная дегенерация желтого пятна и гемангиомы. Например, EGFR участвует в корнеальном и дермальном ранозаживлении. Дефекты в рецепторе инсулина и IGF-IR связывают с сахарным диабетом типа-II. Более сложная корреляция между специфическими РТК и их терапевтическими показаниями описана в статье Plowman и соавт. 1994, *DN & P*, 7:334-339.

Как отмечалось ранее, в передаче пролиферативного и метаболического сигнала наряду с РТК принимают участие и СТК, включающие, без ограничения перечисленным, src, abl, fps, yes, fyn, lyn, lck, blk, hck, fgr и yrk (см. обзор Volen и соавт., 1992, *FASEB J.*, 6:3403-3409). Таким образом, можно ожидать, и это уже установлено, что они связаны со многими нарушениями, опосредованными ТК, и к которым относится настоящее изобретение. Например, установлено, что мутированный src (v-src) является онкобелком (pp60^{v-src}) в организме цыпленка. Более того, его клеточный гомолог, прото-онкоген pp60^{c-src} переносит онкогенные сигналы многих рецепторов. Гиперэкспрессия EGFR или HER2/neu в опухолях приводит к конститутивной активации pp60^{c-src}, наличие которого характерно для злокачественных клеток, но который отсутствует в нормальных клетках. С другой стороны, мыши, с недостаточной экспрессией c-src, имеют фенотип мраморной болезни (врожденный системный остеопетроз), что свидетельствует о ключевой роли c-src в функционировании остеокластов и возможном его участии в подобных нарушениях.

Аналогичным образом, Zap70 принимает участие в передаче сигналов в Т-клетках, которые имеют отношение к аутоиммунным заболеваниям.

СТК ассоциированы с воспалительными процессами, аутоиммунным заболеванием, иммунными реакциями и гиперпролиферативными нарушениями, такими как, рестеноз, фиброз, псориаз, остеоартрит и ревматоидный артрит.

ПК также принимают участие в имплантации эмбриона. Таким образом, соединения по настоящему изобретению могут быть использованы для разработки эффективного способа предотвращения имплантации эмбриона и благодаря этому могут быть использованы в качестве средства регулирования рождаемости. К другим нарушениям, которые можно вылечить или предотвратить с использованием соединений по настоящему изобретению относятся иммунологические нарушения, такие как аутоиммунное заболевание, СПИД и сердечно-сосудистые нарушения, такие как атеросклероз.

Наконец, в настоящее время предполагают, что РТК и СТК принимают участие в процессах гипериммунных нарушений.

Примеры действия ряда типичных соединений по настоящему изобретению на различные ТК приведены в табл. 2 (см. ниже). Любые описанные соединения и результаты не могут рассматриваться, как ограничивающие объем притязаний настоящего изобретения.

Введение соединений и фармацевтические композиции

Соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль можно вво-

доть человеку отдельно или в составе фармацевтических композиций, в которых вышеупомянутые материалы смешаны с подходящими носителями или наполнителем (наполнителями). Методы получения и введения лекарственных средств можно найти в последнем издании книги "Remington's Pharmacological Sciences" (Фармакологические науки Ремингтона), Mack Publishing Co., Easton, PA. Используемые в данном тексте термины "вводить" или "введение" означают доставку соединения формулы I или его фармацевтически приемлемой соли по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I или его соль по настоящему изобретению, в организм с целью профилактики или лечения нарушения, связанного с ПК.

Подходящие способы введения включают, без ограничения перечисленным, пероральное, ректальное, чрезслизистое или кишечное введение или внутримышечные, подкожные, интрамедуллярные, подбололочные, прямые интравентрикулярные (внутрижелудочковые), внутривенные, интравитреальные, внутрибрюшинные, интраназальные или внутриглазные инъекции. Предпочтительными являются пероральный и парентеральный способы введения.

В альтернативном варианте, предпочтительным способом введения соединения является не системный, а местный способ, например, инъекция соединения непосредственно в солидную опухоль, часто в виде композиции пролонгированного или длительного действия.

Кроме того, лекарственное средство можно вводить в форме системы доставки лекарственного средства, например, в виде липосомы, покрытой антителами, специфичными к опухоли. Липосомы будут доставлены к мишени и специфически поглощены опухолью.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены способами, известными в данной области техники, например, путем обычного смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, включения в полимерные материалы и лиофилизации.

Фармацевтические композиции для применения по настоящему изобретению можно получить с помощью общепринятых способов с использованием по меньшей мере одного физиологически приемлемого носителя, включая наполнители и вспомогательные средства, которые облегчают переработку активных соединений в лекарственные препараты, используемые в фармацевтике. Состав композиции зависит от требуемого способа введения.

Для инъекций соединения по изобретению получают в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферных растворах, таких как, раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический раствор. Для чрезслизистого введения в композицию вводят смачивающие агенты, способствующие проникновению через биологический барьер. Такие смачивающие агенты обычно известны в данной области техники.

Для перорального введения в состав композиции могут быть включены активные соединения в смеси с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными специалистам. Такие носители позволяют получить соединения по изобретению в виде следующих лекарственных форм, предназначенных для приема внутрь: таблетки, пилюли, лепешки, драже, капсулы, растворы, гели, сиропы, взвеси, суспензии и т.п., Фармацевтические композиции для перорального применения могут быть получены с использованием твердого наполнителя, необязательно с измельчением полученной смеси, и обработкой смеси гранул после добавления при необходимости других вспомогательных материалов, для получения таблеток или ядер драже. Подходящими наполнителями являются, прежде всего, носители, такие как, сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит, производные целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, и прочие материалы, такие как желатин, трагакант, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, и/или поливинилпирролидон (ПВП). При необходимости могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как, сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота. Кроме того, можно использовать соль, такую как альгинат натрия.

Ядра драже покрывают подходящим покрытием. Для этой цели используют концентрированные растворы сахаров, которые по выбору содержат аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, карбопол-гель, полиэтиленгликоль, и/или диоксид титана, растворы лака и пригодные органические растворители или смеси растворителей. С целью идентификации или маркировки различных комбинаций доз активного компонента в покрытие таблеток или драже могут быть добавлены красители или пигменты.

Фармацевтические композиции для перорального применения включают штампованные капсулы из желатина, а также мягкие заплавленные капсулы из желатина и пластификатора, такого как, глицерин или сорбит. Штампованные капсулы могут содержать активные компоненты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующим компонентом, таким как, крахмал, и/или замасливателем, таким как, тальк или стеарат магния и, необязательно, стабилизаторами. В мягких капсулах активные компоненты могут быть растворены или суспендированы в подходящих жидкостях, таких как нелетучие масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, в эти композиции могут быть добавлены стабилизаторы.

Фармацевтические композиции, которые могут быть также использованы, включают твердые капсулы из желатина. В качестве примера, без ограничения перечисленным, можно привести лекарственный

состав в капсуле для перорального введения, в которой величина дозы активного соединения составляет 50 и 200 мг (код состава J-011248-AA-00 и J-011248-AA-01, соответственно). Два вида доз получают из одних и тех же гранул путем наполнения твердых капсул из желатина различного размера, для дозы 50 мг используют капсулы размером 3, а для дозы 200 мг используют капсулы размером 0. Пример композиции состава приведен в табл. 2.

Таблица 2

Название компонента/ марка	Концентрация в составе гранул (мас.%)	Количество в капсуле на 50 мг (мг)	Количество в капсуле на 200 мг (мг)
Код состава	J-011248-AA	J-011248-AA-00	J-011248-AA-01
Активное соединение NF	65,0	50,0	200,0
Маннит NF	23,5	18,1	72,4
Натрий кроскармелоза NF	6,0	4,6	18,4
Повидон К 30 NF	5,0	3,8	15,2
Стеарат магния NF	0,5	0,38	1,52
Капсулы, желтые NF, Швеция		Размер 3	Размер 0

Для защиты от действия света на активное соединение капсулы могут быть упакованы во флаконы из темного стекла или пластика. Емкости, содержащие капсулы с активным соединением, можно хранить при контролируемой комнатной температуре (15-30°).

Для введения путем ингаляции соединения по настоящему изобретению его можно вводить в форме аэрозоля с использованием герметичной упаковки или с использованием распылительной насадки и подходящего газа-вытеснителя, например, без ограничения перечисленным, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана или диоксида углерода. В случае герметичного аэрозоля дозировку можно регулировать с помощью клапана для доставки отмеренного количества лекарственного средства. Капсулы и картриджи, например, из желатина для использования в ингаляторе или в инсуффляторе, могут содержать порошок активного соединения в смеси с подходящей порошкообразной основой, такой как лактоза или крахмал.

Активные соединения могут быть также получены в виде композиций для парентерального введения, например, путем струйной инъекции или непрерывного вливания. Композиции для инъекции могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например, в ампулах или в упаковке на несколько доз, с добавлением консервантов. Композиции могут быть в виде суспензий, растворов и эмульсий в масляных или водных носителях, могут содержать композиционные материалы, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы водорастворимой формы активного соединения, такой как, без ограничения перечисленным, его соль. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть получены в липофильном носителе. Подходящие липофильные носители включают нелетучие масла, такие как, кунжутное масло, синтетические эфиры жирных кислот, такие как, этиловый эфир олеиновой кислоты, и триглицериды, или материалы, такие как, липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит или декстран. По выбору, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы и/или агенты, которые увеличивают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы.

В альтернативном варианте, активный компонент может быть получен в порошкообразной форме для смешивания перед использованием с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой.

Соединения могут быть также получены в виде ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, общепринятых суппозиторных основ, таких как кокосовое масло или другие глицериды.

Кроме вышеописанных композиций соединения могут быть получены в виде препаратов пролонгированного действия. Такие долгодействующие композиции имплантируют (например, подкожно или внутримышечно) или вводят внутримышечной инъекцией. Для такого способа введения соединения по изобретению может быть получено в составе смеси с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в фармакологически приемлемом масле), с ионообменными смолами, или в виде труднорастворимого производного, такого как, без ограничения перечисленным, труднорастворимая соль.

Примером фармацевтического носителя для гидрофобных соединений по изобретению, без ограничения перечисленным, является система соразтворителей, включающая бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество (ПАВ), водорастворимый органический полимер и водную фазу, такая как система соразтворителей VPD. Система VPD включает раствор следующего состава: 3 мас./об.% бензилового спирта, 8 мас./об.% неполярного ПАВ полисорбат 80, 65 мас./об.% полиэтиленгликоля 300 и абсолютный этанол (до 100 об.%). Система соразтворителей VPD (VPD:D5W) включает раствор VPD, разбавленный в соотношении 1:1 5%-ным раствором декстрозы в воде. Эта система соразтворителей хорошо растворяет гидрофобные соединения и при системном введении обладает низкой токсичностью. Естественно соотношения компонентов в такой системе соразтворителей могут заметно варьировать без изменения растворяющей способности и токсичности. Кроме того, может быть изменена природа отдельных компонентов: например, вместо полисорбата 80 можно использовать другие малотоксичные неполярные ПАВ, можно варьировать фракционный состав полиэтиленгликоля, использовать вместо полиэтиленгликоля другие биосовместимые полимеры, например, поливинилпирролидон, в вместо декстрозы использовать другие сахара или полисахариды.

В альтернативном варианте можно использовать другие системы доставки гидрофобных фармацевтически приемлемых соединений. Общеизвестными примерами носителей и наполнителей для систем доставки гидрофобных соединений являются такие носители, как липосомы и эмульсии. Кроме того, могут быть также использованы некоторые органические растворители, такие как диметилсульфоксид, хотя в большинстве случаев они обладают более высокой токсичностью.

Кроме того, для доставки соединения могут быть использованы системы пролонгированного действия, такие как полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие терапевтический агент. Множество материалов пролонгированного действия хорошо известны специалистам в данной области техники. В зависимости от своей химической природы капсулы пролонгированного действия могут высвобождать соединения в течение периода от нескольких недель до более 100 дней. В зависимости от химической природы и биологической стабильности терапевтического агента могут быть использованы дополнительные методы стабилизации белков.

Описанные в тексте фармацевтические композиции могут также включать подходящие твердые или гелевые носители или наполнители. Примеры таких носителей или наполнителей включают, без ограничения перечисленным, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин, и полимеры, такие как полиэтиленгликоли. Многие из соединений по изобретению, модулирующие ПК, могут быть получены в виде физиологически приемлемых солей, причем заявленное соединение может иметь положительный или отрицательный заряд. Примеры солей, в которых соединение образует положительно заряженный остаток, включают, без ограничения перечисленным, соли четвертичного аммония (определенного в данном описании), такие как гидрохлорид, сульфат, карбонат, лактат, тартрат, малат, малеат, сукцинат, причем атом азота в группе четвертичного аммония, взаимодействующей с соответствующей кислотой, является атомом азота в соединении по изобретению. Соли, в которых соединение по изобретению образует отрицательно заряженный остаток, включают в себя, без ограничения перечисленным, соли натрия, калия, кальция и магния, образованные при взаимодействии карбоксильной группы соединения по изобретению с соответствующим основанием (например, гидроксидом натрия (NaOH), гидроксидом калия (KOH), гидроксидом кальция (Ca(OH)₂) и т.п.).

Фармацевтические композиции, подходящие для применения по настоящему изобретению, включают в себя композиции, в которых активные компоненты содержатся в количестве, достаточном для достижения поставленной цели, т.е. модулирования активности ПК или лечения или профилактики нарушения, связанного с ПК.

Более подробно, терапевтически эффективное количество означает количество соединения, которое обеспечивает эффективную профилактику и смягчение или снижение интенсивности симптомов заболевания или продлевает жизнь пациента, подлежащего лечению.

Терапевтически эффективное количество определяют специалисты в данной области техники, особенно с учетом информации, детально изложенной в данном тексте.

Для любого соединения, используемого в способах по изобретению, терапевтически эффективное количество или доза могут быть определены путем анализа с использованием клеточной культуры. Затем может быть определена дозировка для испытаний на модельных животных, обеспечивающая диапазон

циркулирующей концентрации, включающий величину IC_{50} , найденную с использованием анализа на клеточной культуре (т.е. концентрации исследуемого соединения, при которой наблюдается ингибирование активности ПК на 50%). Затем полученные данные можно использовать для более точного определения дозы для введения человеку.

Токсичность и терапевтическую эффективность соединений, описанных в данном тексте, определяют с использованием обычных фармацевтических методов в экспериментах на клеточных культурах или на подопытных животных, например, путем определения IC_{50} и LD_{50} (оба параметра определены в данном тексте) для исследуемых соединений. Данные, полученные при испытаниях на клеточной культуре и на подопытных животных, используют для определения диапазона доз для введения человеку. Дозы могут варьировать в зависимости от применяемой формы лекарственного средства и способа введения. Точный состав композиции, способ введения и доза определяются лечащим врачом в соответствии с состоянием больного. (См. книгу Fingl и соавт., 1975 *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Фармакологические основы применения терапевтических средств), гл. 1, стр. 1).

Количество доз и интервал между введениями подбирают индивидуально с целью создания в плазме крови такого уровня активных соединений, который является достаточным для поддержания эффектов модулирования киназы. Эти уровни в плазме названы минимально эффективные концентрации (МЭК). МЭК варьирует для каждого соединения, но их можно определить по результатам испытаний *in vitro*, например, по результатам испытаний, описанных в данном тексте, можно определить концентрацию, необходимую для ингибирования киназной активности на 50-90%. Дозировки, необходимые для достижения МЭК зависят от индивидуальных характеристик и способа введения. Концентрация в плазме может быть определена методом ВЭЖХ или с помощью биоиспытаний.

Интервалы между дозами также определяют, исходя из величины МЭК. Соединения следует вводить по такой схеме, которая обеспечивает поддержание уровня в плазме, превышающего МЭК в течение 10-90% времени, предпочтительно в течение 30-90% времени, наиболее предпочтительно 50-90% времени.

В настоящее время терапевтически эффективное количество соединений формулы I может изменяться от приблизительно 25 мг/м^2 до 1500 мг/м^2 в сутки, предпочтительно приблизительно $3 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$. Еще более предпочтительно от 50 мг/г до 400 мг/г .

В случае местного введения или избирательного поглощения, эффективная местная концентрация лекарственного средства может быть не связана с концентрацией в плазме, и для определения точной дозы и интервалов введения следует использовать другие методики, известные специалистам в данной области техники.

Количество введенной композиции, естественно, зависит от пациента, подлежащего лечению, от степени тяжести заболевания, способа введения, заключения лечащего врача и т.п.

При необходимости композиции могут представлять собой упаковку или дозирующее устройство, такое как набор, утвержденный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA), которые могут содержать одну или более стандартных лекарственных доз, содержащих активный компонент. Для упаковки могут быть использованы, например, металлическая фольга или полимерная пленка, например, для упаковки в виде блистера. К упаковке или дозирующему устройству может прилагаться инструкция по применению лекарственного средства. К упаковке или дозирующему устройству может также прилагаться информация, нанесенная на упаковку и составленная в форме, установленной правительственной организацией по контролю за производством, использованием и продажей фармацевтических средств, причем эта информация должна соответствовать нормам, установленным для форм композиций для введения человеку или для ветеринарного назначения, утвержденным соответствующей организацией. При составлении такой информации можно, например, использовать маркировку, утвержденную Управлением по контролю за продуктами и лекарствами для назначения лекарств, или лист-вкладыш, также утвержденный указанной организацией. Могут быть получены также композиции, содержащие соединение по настоящему изобретению в совместимом фармацевтическом носителе, помещенные в соответствующую упаковку с этикеткой, содержащей инструкции по применению для лечения определенных заболеваний. Подходящие условия, указанные на этикетке, могут включать в себя лечение опухолей, ингибирование ангиогенеза, лечение фиброза, диабета и т.п.

Кроме этого, аспект настоящего изобретения заключается в том, что описанное соединение или его соль или пролекарство может быть использовано совместно с другими химиотерапевтическими агентами для лечения вышеупомянутых заболеваний и нарушений. Например, соединение, соль или пролекарство по настоящему изобретению могут быть использованы в сочетании с алкилирующими агентами, например, фторурацил (5-FU), отдельно или в сочетании с лейковорином; или с другими алкилирующими агентами, например, без ограничения перечисленным, другими пиримидиновыми аналогами, такими как, UFT, капецитабин, гемцитабин и цитарабин; алкилсульфонатами, например, бусульфаноном (применяющимся при лечении хронического гранулоцитарного лейкоза), импросульфаноном и пипосульфаноном; азиридинами, такими как, бензодепа, карбоквон, метуредеп и уредеп; этиленимидами и метилмеламинами, например, алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметилломеламин; (азотистыми) горчичными маслами, такими как, хлорамбуцил (применяющийся при

лечении хронического лимфолейкоза, первичной макроглобулинемии и неходжкинской лимфомы), циклофосфамид (применяющийся при лечении болезни Ходжкина, множественной миеломы, нейробластомы, рака молочной железы, рака яичника, рака легких, аденосаркомы почки (опухоли Вильмса) и рабдомиосаркомы), эстрамустин, ифосфамид, новембрихин, преднимустин и урациловое горчичное масло (применяющееся при лечении первичного тромбоцитоза, неходжкинской лимфомы, болезни Ходжкина и рака яичника); триазидами, например, дакарбазин (применяющийся при лечении саркомы мягких тканей).

Соединение, соль или пролекарство по изобретению могут быть использованы в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами, являющимися антиметаболитами, например, без ограничения перечисленным, аналоги фолиевой кислоты, например, метотрексат (применяющийся при лечении острого лимфолейкоза, хориокарциномы, микозно-грибовидного рака молочной железы, рака головы и шеи и остеогенной саркомы) и птероптерин; аналоги пурина, такие как меркаптопурин и тиогуанин, которые находят применение при лечении острого гранулоцитарного лейкоза, острого лимфолейкоза и хронического гранулоцитарного лейкоза.

Можно также ожидать, что соединение, соль или пролекарство по изобретению будут эффективными в сочетании с химиотерапевтическими агентами на основе природных продуктов, таких как, без ограничения перечисленным, алкалоиды барвинка розового, например, винбластин (применяющийся при лечении рака молочной железы и рака яичка), винкристин и виндезин; эпиподофилотоксины, например, этопозид и тенипозид, каждый из которых применяется при лечении рака яичка и саркомы Капоши; химиотерапевтические антибиотики, например, даунорубин, доксорубин, эпирубин, митомицин (применяющийся при лечении рака желудка, шейки матки, ободочной кишки, молочной железы, мочевого пузыря и поджелудочной железы), дактиномицин, темозоломид, пликамицин, блеомицин (применяющийся при лечении рака кожи, пищевода и мочеполового тракта), и ферментативные химиотерапевтические агенты, такие как L-аспарагиназа.

Кроме того, соединение, соль или пролекарство по изобретению могут быть использованы в сочетании с координационными комплексами платины (цисплатин и др.); замещенными производными мочевины, такими как, гидроксимочевина; производными метилгидразина, например, прокарбазином; адrenoкортикоидными супрессантами, например, митотаном, аминоглутетимидом; гормонами и антагонистами гормонов, такими как, адrenoкортикостероиды (например, преднизолон), прогестины (например, гидроксипрогестерон капроат); эстрогенами (например, диэтилстильбестерол); антиэстрогенами, таким как, тамоксифен; андрогенами, например, тестостерон пропионат; и ингибиторами ароматазы, такими как, анастрозол.

Наконец, можно ожидать, что соединения по изобретению окажутся эффективными в композиции с митоксантроном или паклитакселом при лечении солидных опухолей или лейкозов, таких как, без ограничения перечисленным, острый миелоидный (нелимфоцитарный) лейкоз.

Общая методика синтеза

Для синтеза соединений, представленных в настоящем изобретении, используют следующую общую методологию.

Соответственно замещенный 2-оксидол (1 экв.), соответственно замещенный альдегид (1,2 экв.) и основание (0,1 экв.) смешивают в растворителе (1-2 мл/ммоль 2-оксидола), и затем смесь нагревают в течение от приблизительно 2 ч до приблизительно 12 ч. После охлаждения образующийся осадок фильтруют, промывают холодным этанолом или эфиром и сушат в вакууме. При этом получают твердый продукт. Если осадок не образуется, то реакционную смесь концентрируют и остаток растирают со смесью дихлорметан/эфир, образующийся в результате твердый продукт собирают фильтрованием и затем сушат. В дальнейшем продукт необязательно может быть очищен хроматографически.

Основание может быть органическим или неорганическим. Если используется органическое основание, то предпочтительно используют азотсодержащие основания. Примеры таких оснований включают в себя без ограничения перечисленным диизопропиламин, триметиламин, триэтиламин, анилин, пиридин, 1,8-диазацикло[5.4.1]ундец-7-ен, пирролидин и пиперидин.

Примеры неорганических оснований включают в себя без ограничения перечисленным аммиак, фосфаты, карбонаты, бикарбонаты, бисульфаты и амиды щелочных металлов или щелочно-земельных металлов. Щелочные металлы включают литий, натрий и калий, а щелочно-земельные металлы - кальций, магний и барий.

В предпочтительном варианте воплощения настоящего изобретения в случае, если используют протонный растворитель, такой как вода или спирт, основанием служат неорганические основания щелочных или щелочноземельных металлов, предпочтительно используют гидроксиды щелочных или щелочноземельных металлов.

Для специалистов в данной области техники, с учетом общих принципов органического синтеза, и настоящего изобретения, представляется очевидным выбор наиболее подходящего основания для предполагаемой реакции.

Растворитель, в котором протекает реакция, может быть протонным или апротонным, предпочтительнее использовать протонный растворитель. Термин "протонный растворитель" означает раствори-

тель, который содержит атом(ы) водорода, ковалентно связанные с атомами кислорода или азота, которые придают атому водорода кислотность, и таким образом, способность "соединяться" с растворенным веществом через водородные связи. Примерами протонных растворителей без ограничения перечисленным являются вода и спирты.

"Апротонные растворители" могут быть полярными и неполярными, однако, в любом случае они не содержат кислых атомов водорода и, следовательно, неспособны образовывать водородные связи с растворенным веществом. Примерами неполярных апротонных растворителей без ограничения перечисленным являются пентан, гексан, бензол, толуол, хлористый метилен и четыреххлористый углерод. Примерами полярных апротонных растворителей являются хлороформ, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и диметилформамид.

В настоящем предпочтительном варианте воплощения данного изобретения используется протонный растворитель, предпочтительнее вода или спирт, такой как этанол.

Реакцию проводят при температуре выше комнатной. Обычно температура находится в интервале от приблизительно 30°C до приблизительно 150°C, предпочтительно от приблизительно 80°C до приблизительно 100°C, наиболее предпочтительно от приблизительно 75°C до приблизительно 85°C, то есть около температуры кипения этанола. Термин "приблизительно" означает, что отклонение от указанной температуры составляет 10°C, более предпочтительно 5°C, наиболее предпочтительно 2°C. Например, приблизительно 75°C означает 75°C±10°C, предпочтительно 75°C±5°C и наиболее предпочтительно 75°C±2°C.

2-Оксиндолы и альдегиды легко синтезируют по методикам, которые широко известны в органической химии. Специалистам в этой области представляется очевидным, что доступны другие синтетические схемы синтеза соединений, представленных в изобретении, и следующие схемы представлены в качестве примера без ограничения перечисленным.

Примеры

Следующие методики и примеры представлены для более полного понимания и применения на практике настоящего изобретения. Эти примеры представлены только в качестве иллюстрации и не ограничивают объем притязаний настоящего изобретения.

Примеры синтеза

Метод А. Формилирование пирролов.

POCl₃ (1,1 экв.) добавляют по каплям к диметилформамиду (3 экв.) при -10°C с последующим добавлением соответствующего пиррола, растворенного в диметилформамиде. После перемешивания в течение 2 ч реакционную смесь разбавляют H₂O и подщелачивают до pH 11 с помощью 10н. КОН. При этом образуется осадок, который собирают фильтрованием, затем его промывают H₂O и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают требуемый альдегид.

Метод Б. Омыление эфиров пирролкарбоновых кислот.

Смесь эфира пирролкарбоновой кислоты и КОН (2-4 экв.) в этаноле кипятят с обратным холодильником до тех пор, пока данные тонкослойной хроматографии (ТСХ) не указывают о завершении реакции. Охлажденную реакционную смесь подкисляют до pH 3 с помощью 1н. HCl. При этом образуется осадок, который собирают фильтрованием, затем его промывают H₂O и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают требуемую пирролкарбоновую кислоту.

Метод В. Амидирование.

К раствору пирролкарбоновой кислоты в диметилформамиде (0,3 М) при перемешивании добавляют 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (1,2 экв.), 1-гидроксибензотриазол (1,2 экв.) и триэтиламин (2 экв.). Затем добавляют соответствующий амин (1 экв.) и реакционную смесь перемешивают вплоть до завершения реакции, которую контролируют по данным ТСХ. Затем к реакционной смеси добавляют этилацетат, и раствор промывают насыщенным раствором NaHCO₃ и соевым раствором (с избыточным содержанием соли), сушат над безводным MgSO₄ и концентрируют для получения требуемого амида.

Метод Г. Конденсация альдегидов и оксиндолов, содержащих заместители с остатками карбоновых кислот.

Смесь оксиндола (1 экв.), 1 экв. альдегида и 1 - 3 экв. пиперидина (или пирролидина) в этаноле (0,4 М) перемешивают при 90°- 100°C до завершения реакции, которую контролируют по данным ТСХ. Затем реакционную смесь концентрируют, и остаток подкисляют с помощью 2н. HCl. Образующийся осадок промывают H₂O и EtOH, и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают требуемый продукт.

Метод Д. Конденсация альдегидов и оксиндолов, не содержащих заместителей с остатками карбоновых кислот.

Смесь оксиндола (1 экв.), 1 экв. альдегида и 1 - 3 экв. пиперидина (или пирролидина) в этаноле (0,4 М) перемешивают при 90-100°C до завершения реакции, которую контролируют ТСХ. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, и образующееся при этом твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и сушат. Если при охлаждении осадок не образуется, то реакционную смесь концентрируют и очищают колоночной хроматографией.

Примеры синтезов оксиндола

Следующие примеры синтеза представителей ряда оксиндола составлены не для ограничения объема настоящего изобретения. Альтернативные способы синтеза оксиндолов и другие оксиндолы, которые будут использованы для синтеза соединений в настоящем изобретении, представляются очевидными для специалистов в данной области техники на основании следующего описания. Такие синтезы и оксиндолы включены в объем и сущность настоящего изобретения.

5-Амино-2-оксиндол.

5-Нитро-2-оксиндол (6,3 г) гидрируют в метаноле над 10% палладием на углеводе с образованием 3,0 г (выход 60%) указанного продукта в виде твердого вещества белого цвета.

5-Бром-2-оксиндол.

2-Оксиндол (1,3 г) в 20 мл ацетонитрила охлаждают до -10°C и медленно при перемешивании добавляют 2,0 г N-бромсукцинимид. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при -10°C и 2 ч при 0°C . Осадок собирают, промывают водой и сушат. При этом получают 1,9 г (выход 90%) указанного соединения.

4-Метил-2-оксиндол.

Диэтилоксалат (30 мл) в 20 мл сухого эфира добавляют при перемешивании к 19 г этоксида калия, суспендированного в 50 мл сухого эфира. Реакционную смесь охлаждают в бане со льдом и медленно добавляют 20 мл 3-нитро-о-ксилола в 20 мл сухого эфира. Густую реакционную смесь темно-красного цвета кипятят с обратным холодильником в течение 0,5 ч, затем концентрируют до образования твердого вещества темно-красного цвета и обрабатывают 10% раствором гидроксида натрия до полного растворения твердого вещества. Смесь темно-красного цвета обрабатывают 30% раствором пероксида водорода до изменения окраски с красной на желтую. Другой способ заключается в обработке смеси 10% раствором гидроксида натрия и 30% раствором пероксида водорода до исчезновения темно-красной окраски. Твердое вещество отфильтровывают, а фильтрат подкисляют с помощью 6 н. соляной кислоты. В результате образуется осадок, который собирают фильтрованием в вакууме, промывают водой, сушат в вакууме. При этом получают 9,8 г (выход 45%) 2-метил-6-нитрофенилуксусной кислоты в виде твердого вещества грязно-белого цвета. Это вещество гидрируют в метаноле над 10% палладием на углеводе, что приводит к образованию 9,04 г требуемого продукта в виде твердого вещества белого цвета.

7-Бром-5-хлор-2-оксиндол.

5-Хлор-2-оксиндол (16,8 г) и 19,6 г N-бромсукцинимид суспендируют в 140 мл ацетонитрила и кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. После кипячения в течение 2 ч данные ТСХ (силикагель, этилацетат) показывают присутствие 5-хлор-2-оксиндола или N-бромсукцинимид (Rf 0,8), продукта (Rf 0,85) и второго продукта (Rf 0,9), причем их соотношение не меняется после еще одного часа кипячения. Реакционную смесь охлаждают до 10°C , осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают 25 мл этанола и отфильтровывают досуха на воронке в течение 20 мин. При этом получают 14,1 г влажного продукта (выход 56%). Твердый продукт суспендируют в 200 мл денатурированного этанола, суспензию перемешивают и кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин. Реакционную смесь охлаждают в бане со льдом до 10°C . Твердый продукт собирают фильтрованием в вакууме, промывают 25 мл этанола и сушат в вакууме при 40°C . При этом получают 12,7 г (выход 51%) 7-бром-5-хлор-2-оксиндола.

5-Фтор-2-оксиндол.

5-Фторизатин (8,2 г) растворяют в 50 мл гидразингидрата и кипятят с обратным холодильником в течение 1,0 ч. Затем реакционную смесь выливают в ледяную воду. Осадок фильтруют, промывают водой и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают указанный продукт.

5-Нитро-2-оксиндол.

2-Оксиндол (6,5 г) растворяют в 25 мл концентрированной серной кислоты, и поддерживают температуру реакционной смеси в интервале от -10 до -15°C . При этом добавляют по каплям 2,1 мл дымящейся азотной кислоты. После добавления азотной кислоты реакционную смесь перемешивают в течение 0,5 ч при 0°C и затем выливают в ледяную воду. Осадок собирают фильтрованием, промывают водой и кристаллизуют из 50% уксусной кислоты. Кристаллический продукт фильтруют, промывают водой и сушат в вакууме. При этом получают 6,3 г (выход 70%) 5-нитро-2-оксиндола.

5-Аминосульфонил-2-оксиндол.

В колбу объемом 100 мл, содержащую 27 мл хлорсульфоновой кислоты медленно добавляют 13,3 г 2-оксиндола. При этом температуру реакции поддерживают ниже 30°C . Затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 ч, нагревают при 68°C в течение 1 ч, охлаждают и выливают в воду. Осадок промывают водой и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают 11,0 г (выход 50%) 5-хлорсульфонил-2-оксиндола, который используется без дополнительной очистки.

5-Хлорсульфонил-2-оксиндол (2,1 г) добавляют к 10 мл гидроксида аммония в 10 мл этанола и перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют и твердый продукт собирают фильтрованием в вакууме. При этом получают 0,4 г (выход 20%) указанного продукта в виде твердого вещества грязно-белого цвета.

5-Изопропиламиносульфонил-2-оксиндол.

В колбу объемом 100 мл, содержащую 27 мл хлорсульфоновой кислоты, медленно добавляют 13,3 г

2-оксидола. При этом температуру реакционной смеси поддерживают ниже 30°C. Затем реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 ч, затем нагревают при 68°C в течение 1 ч, охлаждают и выливают в воду. Осадок, который при этом образуется, отфильтровывают, промывают водой и сушат в вакуумном сушильном шкафу. При этом получают 11,0 г (выход 50%) 5-хлорсульфонил-2-оксидола, который используется без дополнительной очистки.

Суспензию 3 г 5-хлорсульфонил-2-оксидола, 1,15 г изопропиламина и 1,2 мл пиридина в 50 мл дихлорметана перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. При этом образуется твердое вещество белого цвета. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, суспензию промывают горячим этанолом, охлаждают, собирают фильтрованием в вакууме и сушат в вакууме при 40°C в течение ночи. При этом получают 1,5 г (выход 45%) 5-изопропиламиносульфонил-2-оксидола.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,69 (s, br, 1H, NH), 7,63 (dd, J=2 и 8 Гц, 1H), 7,59 (d, J=2 Гц, 1H), 7,32 (d, J=7 Гц, 1H, NH-SO₂-), 6,93 (d, J=8 Гц, 1H), 3,57 (s, 2H), 3,14-3,23 (m, 1H, CH-(CH₃)₂), 0,94 (d, J=7 Гц, 6H, 2xCH₃).

5-Фениламиносульфонил-2-оксидол.

Суспензию 5-хлорсульфонил-2-оксидола (1,62 г, 7 ммоль), анилина (0,782 мл, 8,4 ммоль) и пиридина (1 мл) в дихлорметане (20 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляют этилацетатом (300 мл) и подкисляют с помощью 1н. соляной кислоты (16 мл). Органический слой промывают раствором бикарбоната натрия и соевым раствором, сушат и концентрируют. Остаток промывают этанолом (3 мл) и хроматографируют на силикагеле, элюируют смесью метанол/дихлорметан 1:9. При этом получают 5-фениламиносульфонил-2-оксидол.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,71 (s, br, 1H, NH), 10,10 (s, br, 1H, NH), 7,57-7,61 (m, 2H), 7,17-7,22 (m, 2H), 7,06-7,09 (m, 2H), 6,97-7,0 (m, 1H), 6,88 (d, J=8,4 Гц, 1H), 3,52 (s, 2H).

Пиридин-3-ил-амид 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-сульфоновой кислоты.

Раствор 5-хлорсульфонил-2-оксидола (3 г) и 3-аминопиридина (1,46 г) в пиридине (15 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение ночи, при этом образуется твердое вещество коричневого цвета. Этот продукт отфильтровывают, промывают этанолом и сушат в вакууме. При этом получают 1,4 г (выход 38%) пиридин-3-ил-амида 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-5-сульфоновой кислоты.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,74 (s, 1H, NH), 10,39 (s, 1H, SO₂NH), 8,27-8,28 (d, 1H), 8,21-8,23 (m, 1H), 7,59-7,62 (m, 2H), 7,44-7,68 (m, 1H), 7,24-7,28 (m, 1H), 6,69-6,71 (d, 1H), 3,54 (s, 2H). MS m/z (APCI+) 290,2

5-Фенилоксидол.

5-Бром-2-оксидол (5 г, 23,5 ммоль) растворяют в 110 мл толуола и 110 мл этанола при перемешивании и слабом нагревании. Тетраakis-(трифенилфосфин)палладий (0) (1,9 г, 1,6 ммоль) добавляют в реакционную смесь, затем добавляют 40 мл (80 ммоль) 2 М водного раствора карбоната натрия. К реакционной смеси добавляют бензолборную кислоту (3,7 г, 30,6 ммоль) и нагревают до 100°C на масляной бане в течение 12 ч. Реакционную смесь охлаждают, разбавляют этилацетатом (500 мл), промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия (200 мл), водой (200 мл), 1 н. HCl (200 мл) и соевым раствором (200 мл). Органический слой сушат над сульфатом магния и концентрируют до получения твердого вещества коричневого цвета. Растирают с дихлорметаном и получают 3,8 г (выход 77%) 5-фенил-2-оксидола в виде твердого вещества желто-коричневого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,4 (s, br, 1H, NH), 7,57 (dd, J=1,8 и 7,2 Гц, 1H), 7,5-7,35 (m, 5H), 7,29 (m, 1H), 6,89 (d, J=8,2 Гц, 1H), 3,51 (s, 2H, CH₂CO). MS m/z 209 [M⁺].

Аналогичным образом можно получить следующие оксидолы:

6-(3,5-Дихлорфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,46 (br, 1H, NH), 7,64 (d, J=1,8 Гц, 2H), 7,57 (m, 1H), 7,27 (m, 2H), 7,05 (d, J=1,1 Гц, 1H), 3,5 (s, 2H).

MS-EI m/z 277/279 [M]⁺.

6-(4-Бутилфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,39 (s, 1H, NH), 7,49 (d, J=8,0 Гц, 2H), 7,25 (d, J=8 Гц, 3H), 7,17 (dd, J=1,5 и 7,8 Гц, 1H), 6,99 (d, J=1,5 Гц, 1H), 3,48 (s, 2H, CH₂CO), 2,60 (t, J=7,5 Гц, 2H, CH₂CH₃), 1,57 (m, 2H, CH₂), 1,32 (m, 2H, CH₂), 0,9 (t, J=7,5 Гц, 3H, CH₃).

6-(5-Изопропил-2-метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,29 (s, br, 1H, NH), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,08 (d, J=2,4 Гц, 1H), 6,97-7,01 (m, 2H), 6,89 (d, J=0,8 Гц, 1H), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 3,47 (s, 2H, CH₂CO), 2,86 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,19 (d, J=6,8 Гц, 6H, CH(CH₃)₂).

MS-EI m/z 281 [M]⁺.

6-(4-Этилфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

¹H ЯМР (360 МГц, DMSO-d₆) δ 10,39 (s, br, 1H, NH), 7,50 (d, J=8,2 Гц, 2H), 7,28 (d, J=8,2 Гц, 2H), 7,25 (d, J=7,5 Гц, 1H), 7,17 (dd, J=1,6 и 7,5 Гц, 1H), 6,99 (d, J=1,6 Гц, 1H), 3,48 (s, 2H, CH₂CO), 2,63 (q, J=7,6 Гц, 2H, CH₂CH₃), 1,2 (t, J=7,6 Гц, 3H, CH₂CH₃).

MS-EI m/z 237 [M]⁺.

6-(3-Изопропилфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 10,37 (s, br, 1H, NH), 7,43 (m, 1H), 7,35-7,39 (m, 1H), 7,17-7,27 (m, 3H), 7,01 (d, J=1,8 Гц, 1H), 3,49 (s, 2H, CH₂CO), 2,95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,24 (d, J=6,8 Гц, 6H, CH(CH₃)₂).

МС-EI m/z 251 [M]⁺.

6-(2,4-Диметоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 10,28 (s, br, 1H, NH), 7,17 (m, 2H), 6,93 (dd, J=1,6 и 7,6 Гц, 1H), 6,86 (d, J=1,6 Гц, 1H), 6,63 (d, J=2,4 Гц, 1H), 6,58 (dd, J=2,4 и 8,5 Гц, 1H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,45 (s, 2H, CH₂CO).

МС-EI m/z 269 [M]⁺.

6-Пиридин-3-ил-1,3-дигидроиндол-2-он.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 10,51 (s, 1H, NH), 8,81 (d, J=2,5 Гц, 1H), 8,55 (dd, J=1,8 и 5,7 Гц, 1H), 8 (m, 1H), 7,45 (dd, J=5,7 и 9,3 Гц, 1H), 7,3 (m, 2H), 7,05 (s, 1H), 3,51 (s, 2H, CH₂CO).

МС-EI m/z 210 [M]⁺.

(3-Хлор-4-этоксифенил)амид 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-4-карбоновой кислоты.

К раствору 4-карбокси-2-оксиндола (200 мг, 1,13 ммоль) и 3-хлор-4-метоксифениламина (178 мг, 1,13 ммоль) в диметилформамиде (15 мл) при комнатной температуре добавляют гексафосфат бензотриазол-1-илокситрис(диметиламино)фосфония (реагент ВОР, 997 мг, 2,26 ммоль). Затем добавляют 4-диметиламинопиридин (206 мг, 1,69 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 72 ч. Затем ее разбавляют этилацетатом (300 мл), промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия (100 мл), водой, 2 н. соляной кислотой (100 мл), водой (3x200 мл) и соевым раствором. Затем сушат над сульфатом магния и концентрируют. Остаток растирают с этилацетатом. При этом получают (3-хлор-4-метоксифенил)амид 2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-4-карбоновой кислоты в виде твердого вещества розового цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 10,50 (s, br, 1H, NH), 10,12 (s, br, 1H, NH), 7,9 (s, J=2,5 Гц, 1H), 7,62 (dd, J=2,5 и 9 Гц, 1H), 7,38 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,32 (t, J=7,6 Гц, 1H), 7,13 (d, J=9 Гц, 1H), 6,98 (d, J=7,6 Гц, 1H), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,69 (s, 2H, CH₂).

МС-EI m/z 316 [M]⁺.

4-Карбокси-2-оксиндол.

Раствор триметилсилилдиазометана в гексане (2 М) добавляют по каплям к раствору 2,01 г 2-хлор-3-карбоксинитробензола в 20 мл метанола при комнатной температуре до прекращения выделения газа. Затем добавляют уксусную кислоту для гашения избытка триметилсилилдиазометана. Реакционную смесь упаривают в вакууме, и остаток сушат в сушильном шкафу в течение ночи. Полученный 2-хлор-3-метоксикарбонилнитробензол является достаточно чистым для его использования в дальнейшем без дополнительной очистки.

Диметилмалонат (6,0 мл) добавляют в суспензию 2,1 г гидрида натрия в 15 мл ДМСО, охлажденную льдом. Реакционную смесь перемешивают при 100°C в течение 1 ч, и затем охлаждают до комнатной температуры. 2-Хлор-3-метоксикарбонилнитробензол (2,15 г) добавляют одной порцией к реакционной смеси, и затем нагревают ее при 100°C в течение 1,5 ч.

Затем реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, выливают в ледяную воду, подкисляют до pH 5 и экстрагируют этилацетатом. Органический слой промывают соляным раствором, сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют. При этом получают 3,0 г диметил-2-метоксикарбонил-6-нитрофенилмалоната.

Диметил-2-метоксикарбонил-6-нитрофенилмалонат (3,0 г) кипятят с обратным холодильником в 50 мл бн. соляной кислоты в течение ночи. Реакционную смесь концентрируют досуха, затем добавляют 20 мл этанола и 1,1 г хлорида олова (II) и опять кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч. Реакционную смесь фильтруют через целит, концентрируют и хроматографируют на силикагеле, используя в качестве элюента смесь этилацетат/гексан/уксусная кислота. При этом получают 0,65 г (выход 37%) 4-карбокси-2-оксиндола в виде твердого вещества белого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 12,96 (s, br, 1H, COOH), 10,74 (s, br, 1H, NH), 7,53 (d, J=8 Гц, 1H), 7,39 (t, J=8 Гц, 1H), 7,12 (d, J=8 Гц, 1H), 3,67 (s, 2H).

Синтез пиррол замещенных 2-индолинонов.

Пример 1. 4-Метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-2-карбоновая кислота.

Имеющийся в продаже этиловый эфир 4-метил-2-пирролкарбоновой кислоты подвергают формилированию по методу А. При этом образуется этиловый эфир 5-формил-4-метил-2-пирролкарбоновой кислоты с выходом 73%. Затем это соединение гидролизуют по методу Б, что приводит к образованию 5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (выход 58%).

Оксиндол (133 мг, 1 ммоль) конденсируют с 5-формил-4-метил-пиррол-2-карбоновой кислотой (153 мг) по методу Г. При этом получают 268 мг (выход 100%) требуемого продукта в виде твердого вещества красно-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,84 (s, br, 1H, NH), 12,84 (s, br, 1H, COOH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J=7,5 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H, H-винил), 7,18 (t, J=7,5 Гц, 1H), 7,01 (t, J=7,5 Гц, 1H), 6,88 (d, J=7,5 Гц,

1H), 6,71 (d, J=2,2 Гц, 1H), 2,32 (s, 3H, CH₃).

МС (отрицательный режим) 266,8 [M-1]⁺.

Пример 2. 4-Метил-5-(1-метил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-2-карбоновая кислота.

1-Метил-1,3-дигидроиндол-2-он (147 мг, 1 ммоль) конденсируют с 5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислотой (153 мг) по методу Г. При этом получают 250 мг (выход 86%) требуемого соединения.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,82 (s, br, 1 H, NH), 12,88 (s, br, 1H), 7,83 (d, J=7,5 Гц, 1H), 7,65 (s, 1H, H-винил), 7,26 (t, J=7,5 Гц, 1H), 7,02-7,09 (m, 2H), 6,70 (d, J=2,2 Гц, 1H), 2,32 (s, 3H, CH₃). МС m/z 283,0 [M+1]⁺.

Пример 3. Метилловый эфир 4-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты.

Оксиндол (105 мг, 0,79 ммоль) конденсируют с метиловым эфиром 5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (110 мг, 0,67 ммоль) по методу Д. При этом получают 153,2 мг (выход 81%) требуемого соединения.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,98 (s, br, 1H, NH), 10,97 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,67 (s, 1H, H-винил), 7,2 (dt, J=1,2 и 7,7 Гц, 1H), 7,01 (dt, J=1,2 и 7,7 Гц, 1H), 6,90 (d, J=7,6 Гц, 1H), 6,77 (d, J=2 Гц, 1H).

МС (ES) m/z 283 [M⁺+1].

Пример 4. Этиловый эфир 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Хлор-1,3-дигидроиндол-2-он (2,22 г, 13,2 ммоль) конденсируют с этиловым эфиром 5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (2,43 г) по методу Д. При этом получают 4,1 г (выход 94%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,95 (s, br, 1H, NH), 7,98 (d, J=2,2 Гц, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-винил), 7,18 (dd, J=2,2 и 8,3 Гц, 1H, H-6), 6,87 (d, J=8,3 Гц, 1H, H-7), 7,34 (d, J=1,8 Гц, 1H, H-3'), 4,27 (q, J=7,2 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,29 (t, J=7,2 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС-EI m/z 330 [M⁺].

Пример 5. 5-(5-Хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновая кислота.

Смесь этилового эфира 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (1,3 г, 4 ммоль) и гидроксида калия в метаноле (25 мл) и этаноле (25 мл) кипятят с обратным холодильником в течение ночи. Нерастворимые продукты удаляют фильтрованием, и затем реакционную смесь нейтрализуют с помощью бн. соляной кислоты. При этом получают 0,876 г (выход 70%) требуемого продукта.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,80 (s, br, 1H, NH), 12,90 (s, br, 1H, COOH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,02 (d, J=1,8 Гц, 1H, H-4), 7,81 (s, 1H, H-винил), 7,20 (dd, J=1,8 и 8,3 Гц, 1H, H-6), 6,89 (d, J=8,3 Гц, 1H, H-7), 6,72 (d, J=1,8 Гц, 1H, H-3'), 2,35 (s, 3H, CH₃).

МС-EI m/z 302 [M⁺].

Пример 6. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,16 г, 0,76 ммоль) конденсируют с (3-пирролидин-1-ил-пропил)амидом 5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (0,2 г, синтезированным по методу В). При этом образуется 60 мг (выход 17%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,42 (t, J=5,8 Гц, 1H, CONHCH₂), 8,12 (d, J=1,8 Гц, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-винил), 7,30 (dd, J=1,8 и 8,4 Гц, 1H, H-6), 6,82 (d, J=8,4 Гц, 1H, H-7), 6,77 (d, J=2,4 Гц, 1H, H-3'), 3,22-3,31 (m, 2H, CH₂), 2,38-2,43 (m, 6H, 3xCH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,62-1,71 (m, 6H, 3xCH₂).

МС-EI m/z 456 и 458 [M⁺-1 и M⁺+2].

Пример 7. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,16 г, 0,75 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом-5-формил-4-метил-1H-пиррол-2-карбоновой кислоты (0,2 г, синтезированным по методу В). При этом получают 30 мг (выход 8%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 8,40 (m, 1H, CONHCH₂), 8,12 (d, J=1,5 Гц, 1H, H-4), 7,78 (s, 1H, H-винил), 7,30 (dd, J=1,5 и 8,2 Гц, 1H, H-6), 6,82 (d, J=8,2 Гц, 1H, H-7), 6,78 (d, J=2,4 Гц, 1H, H-3'), 3,23 (m, 2H, CH₂), 2,38-2,45 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J=7,1 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-EI m/z 458 и 460 [M⁺-1 и M⁺+2].

Пример 8. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-

пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (212 мг, 1 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты (полученным из этилового эфира пиррол-2-карбоновой кислоты, синтезированным по методам А, Б и затем В). При этом получают 162 мг (выход 38%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,53(s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,37 (t, 1H, CONHCH₂), 7,89 (m, 2H), 7,32 (dd, J=2,0 Гц, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,80-6,84 (m, 2H), 3,3 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,55 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ и CH₂), 0,95 (t, J=7,2 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 430 и 432 [$\text{M}^+ - 1$ и $\text{M}^+ + 2$].

Пример 9. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (209 мг, 1 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 182 мг (выход 42%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,56 (s, br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 8,36 (t, 1H, CONHCH₂), 7,77 (s, 1H, Н-винил), 7,73 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,64 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,32 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,96 (m, 1H), 6,80 (m, 1H), 3,31-3,32 (m, 2H, CH₂), 2,46-2,53 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂ и CH₂), 0,96 (t, J=6,9 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 428 [M^+].

Пример 10. (2-Диэтиламиноэтил)метиламид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (212 мг, 1 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)метиламидом 5-формил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 246 мг (выход 55%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,54(s,br, 1H, NH), 11,06 (s, br, 1H, NH), 7,90 (m, 2H), 7,33 (dd, J=1,8 и 8,4 Гц, 1H), 6,82-6,85 (m, 3H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,57 (t, J=6,5 Гц, 2H, CH₂), 2,45 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,91 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 444 и 446 [$\text{M}^+ - 1$ и $\text{M}^+ + 1$].

Пример 11. (2-Диэтиламиноэтил)метиламид 5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (209 мг, 1 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)метиламидом 5-формил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 277 мг (выход 63%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,58 (s, br, 1H, NH), 11,04 (s, br, 1H, NH), 7,78 (s, 1H, Н-винил), 7,73 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,64 (d, J=7,5 Гц, 2H), 7,46 (m, 2H), 7,33-7,36 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 6,84 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 3,55 (s, br, 2H, CH₂), 3,25 (s, br, 3H, NCH₃), 2,58 (t, 2H, CH₂), 2,44 (m, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 0,92 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Пример 12. (3-Диэтиламинопропил)амид 3-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

Оксиндол (66,5 мг, 0,5 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты (который получают из этилового эфира 3-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты по методам Б и В). При этом получают 39 мг (выход 21%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,34 (s, br, 1H, NH), 10,88 (s, br, 1H, NH), 7,62-7,67 (m, 3H), 7,17 (m, 1H), 6,99 (m, 1H), 6,87 (d, J=7,6, 1H), 6,63 (d, J=1 Гц, 1H), 3,26-3,32 (m, 2H, CH₂), 2,41-2,48 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J=7,2 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 380 [M^+].

Пример 13. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (106 мг, 0,5 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 35 мг (выход 15%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,35(s, br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 7,89 (d, J=1,9 Гц, 1H, Н-4), 7,80 (s, 1H, Н-винил), 7,74 (t, J=5,3 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,31 (dd, J=1,9 и 8,4 Гц, 1H, Н-6), 6,83 (d, J=8,4 Гц, 1H, Н-7), 6,63 (s, 1H, Н-3'), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,41-2,48 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J=7,1 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

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

Пример 14. (3-Диэтиламинопропил)амид 3-метил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (105 мг, 0,5 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 67,8 мг (выход 30%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,37 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,23-7,73 (m, 11H), 3,29 (m, 2H, CH₂), 2,41-2,48 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,64 (m, 2H, CH₂), 0,94 (t, J=7,0 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-EI m/z 456 [M⁺].

Пример 15. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Метокси-1,3-дигидроиндол-2-он (82,5 мг, 0,5 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 80 мг (выход 39%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,45 (s, br, 1H, NH), 10,70 (s, br, 1H, NH), 7,68-7,70 (m, 2H), 7,32 (d, J=1,8 Гц, 1H), 6,72-6,79 (m, 2H), 6,60 (s, 1H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,28 (m, 2H, CH₂), 2,41-2,48 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,29 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J=7,0 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС m/z 410 [M⁺].

Пример 16. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

6-Метокси-1,3-дигидроиндол-2-он (82,5 мг, 0,5 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты. При этом получают 63 мг (выход 31%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,22 (s, br, 1H, NH), 10,86 (s, br, 1H, NH), 7,39-7,63 и 6,37-6,55 (m, 6H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,3 (m, 2H, CH₂), 2,45 (m, 6H, CH₂ и N(CH₂CH₃)₂), 2,28 (s, 3H, CH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂), 0,93 (m, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС m/z 410 [M⁺].

Пример 17. (2-Диэтиламиноэтил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

Этиловый эфир 4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты (см. статью May, Donald A., Lash, Timothy D., J. Org. Chem., 1992, 57:18, 4820-4828) формируют по методам А и Б, при этом получают 3-формил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновую кислоту.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (1,43 г, 6,8 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 3-формил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты (1,97 г). При этом получают 2,2 г (выход 67%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,47 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,0 (d, 1H, NH), 7,70 (s, 1H, CH), 7,28 (dd, J=2,1 и 8,2 Гц, 1H, ArH), 7,16 (m, 1H, ArH), 6,8 (d, J=8,3 Гц, 1H, ArH), 3,3 (s, 2H, CONH), 2,5 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,78 (m, br 2H, пиррол CH₂), 2,72 (m, br 2H, пиррол CH₂), 1,7 (m, br, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,74 (s, br, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₂), 0,96 (t, J=7,4 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-EI m/z 484 и 486 [M⁺¹ и M⁺¹].

Пример 18. (3-Диэтиламинопропил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (20 мг, 0,1 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 3-формил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты (30 мг). При этом получают 33 мг (выход 46%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,68 (m, 1H, ArH), 7,4 (m, 1H, ArH), 7,29 (d, J=1,9 и 8,5 Гц, 1H, ArH), 6,8 (d, J=8 Гц, 1H, ArH), 2,7 (m, br, 4H, 2xNCH₂), 2,4 (m, 8H, 4xNCH₂), 1,7 (m, br, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (m, br, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J=7,4 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-EI m/z 499 и 501 [M⁺ и M⁺²].

Пример 19. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 3-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (80 мг, 0,4 ммоль) конденсируют с (3-пирролидин-1-илпропил)амидом 3-формил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты (120 мг). При этом получают 43 мг (выход 22%) требуемого соединения в виде твердого вещества рыжевато-коричневого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,4 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 8,0 (m, 1H, NH), 7,69 (m, 1H, ArH), 7,49 (m, 1H, ArH), 7,28 (d, J=1,7 и 7,8 Гц, 1H, ArH), 6,8 (d, J=8 Гц, 1H, ArH), 3,3 (m, br, 2H, 2xNCH₂), 2,8 (m, 4H, 2xпиррол CH₂), 2,5 (m, br, 4H, N(CH₂CH₃)₂), 1,6 (m, br, 8H, 2xпиррол CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₂ и CONHCH₂).

МС-EI m/z 497 и 499 [M⁺ и M⁺²].

Пример 20. (2-Диэтиламиноэтил)амид 3-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

6-Пиридин-3-ил-1,3-дигидроиндол-2-он (60 мг, 0,4 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 3-формил-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты (80 мг). При этом получают 50 мг (выход 38%) требуемого соединения в виде твердого вещества красноватого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,4 (s, 1H, NH), 11 (s, 1H, NH), 8,9 (d, 1H, NH), 8,7 (dd, 1H, ArH), 8,1 (dd, 1H, ArH), 7,9 (d, 1H, ArH), 7,6 (s, 1H, CH), 7,5 (dd, 1H, ArH), 7,3 (dd, 1H, ArH), 7,1 (m, 2H, ArH), 3,35

(m, 2H, CONHCH₂), 2,8 (m, 4H, 2хпиррол CH₂), 2,5 (m, br 6H, N(CH₂CH₃)₂ и NCH₂), 1,75 (s, br, 4H, 2хпиррол CH₂CH₂), 0,9 (t, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 484 [M⁺].

Пример 21. (3-Диэтиламинопропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

К смеси бензоил хлорида (1 экв.) и хлорида алюминия (1 экв.) в дихлорэтане при 0°С добавляют этиловый эфир 3,5-диметил-2-пирролкарбоновой кислоты (1 экв.). Реакционную смесь перемешивают при 80°С в течение 4 ч. Затем ее экстрагируют этилацетатом (EtOAc) и Н₂О. Объединенные органические экстракты промывают насыщенным раствором бикарбоната натрия и соевым раствором, сушат и концентрируют. При этом получают 4-бензоил-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-карбоновую кислоту (выход 51%).

Смесь этилового эфира 4-бензоил-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты (4,13 г, 15,2 ммоль) и церий аммоний нитрата (33 г, 4 экв.) в 50 мл смеси тетрагидрофуран (ТГФ)/уксусная кислота (УК)/Н₂О, 1:1:1 кипятят с обратным холодильником в течение ночи. Затем реакционную смесь охлаждают, экстрагируют EtOAc и подщелачивают до pH 9 с помощью карбоната натрия. Органический слой промывают соевым раствором, сушат (MgSO₄) и концентрируют с последующей колоночной хроматографией. При этом получают 3,25 г (выход 75%) этилового эфира 4-бензоил-5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты в виде твердого вещества желтого цвета.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с 4-бензоил-5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислотой по методу Г. При этом получают 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновую кислоту.

Затем указанная кислота взаимодействует с N,N-диэтил-1,3-пропандиамином по методу В, при этом получают требуемое соединение.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,96 (m, 1H, CONHCH₂), 7,76 (d, J=7,0 Гц, 2H), 7,68 (t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,40 (s, 2H), 7,33 (dd, J=1,6 и 8,3 Гц, 1H, H-6), 6,84 (d, J=8,3 Гц, 1H, H-7), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,46 (m, 6H, 3хCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,65 (m, 2H, CH₂), 0,94 (t, J=7,0 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС, Электронный удар m/z 564 [M⁺+1].

Пример 22. (3-Морфолин-4-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,10 (s, 1H, NH), 11,14 (s, br, 1H, NH), 7,92 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,69 (t, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,33 (dd, J=1,9 и 8,3 Гц, 1H, H-6), 6,85 (d, J=8,3 Гц, 1H, H-7), 3,56 (m, 4H, 2хCH₂), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,35 (m, 6H, 3хCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

Пример 23. (3-Пирролидин-1-илпропил)амид 4-бензоил-3-метил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,18 (s, 1H, NH), 11,14 (s, br, 1H, NH), 8,01 (m, 1H, CONHCH₂), 7,74 (m, 1H), 7,67 (m, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,32 (s, 1H, H-винил), 7,17 (m, 1H), 6,92 (m, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,44 (m, 6H, 3хCH₂), 2,11 (s, 3H, CH₃), 1,65-1,75 (m, 6H, 3хCH₂).

МС, Электронный удар m/z 482 [M⁺].

Пример 24. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,01 (s, 1H, NH), 11,18 (s, br, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,33 (dd, J=2,0 и 8,2 Гц, 1H, H-6), 6,84 (d, J=8,2 Гц, 1H, H-7), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,47 (m, 6H, 3хCH₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,64 (m, 4H, 2хCH₂).

Пример 25. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-3-метил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,15 (s, 1H, NH), 11,16 (s, br, 1H, NH), 7,98 (m, 1H, CONHCH₂), 7,77 (d, J=7,7 Гц, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,53-7,63 (m, 4H), 7,44 (m, 2H), 7,33-7,37 (m, 2H), 7,24 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,43-2,48 (m, 6H, 3хCH₂), 2,12 (s, 3H, CH₃), 1,74 (m, 2H, CH₂), 1,69 (m, 4H, 2хCH₂).

МС, Электронный удар m/z 558 [M⁺].

Пример 26. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(6-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,99 (s, 1H, NH), 11,05 (s, br, 1H, NH), 7,93 (m, 1H, CONHCH₂), 7,72 (m, 2H), 7,65 (m, 1H), 7,54 (m, 2H), 7,15 (s, 1H, H-винил), 7,04 (d, J=8,4 Гц, 1H, H-4), 6,51 (dd, J=2,3 и 8,4 Гц, 1H, H-5), 6,44 (d, J=2,3 Гц, 1H, H-7), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,46 (m, 6H, 3хCH₂), 2,10 (s, 3H, CH₃), 1,12 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2хCH₂).

МС, Электронный удар m/z 512 [M⁺].

Пример 27. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-метокси-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,24 (s, 1H, NH), 10,90 (s, br, 1H, NH), 7,97 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,69 (m, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,24 (s, 1H, H-винил), 6,79 (m, 2H), 6,66 (m, 1H), 3,67 (s,

3H, OCH₃), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,43-2,48 (m, 6H, 3xCH₂), 2,14 (s, 3H, CH₃), 1,71 (m, 2H, CH₂), 1,66 (m, 4H, 2xCH₂).

МС, Электронный удар m/z 512 [M⁺].

Пример 28. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-бензоил-5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,14 (s, br, 1H, NH), 8,03 (m, 1H, CONHCH₂), 7,75 (m, 2H), 7,68 (m, 1H), 7,55 (m, 2H), 7,38 (s, 1H, Н-винил), 7,08 (m, 1H), 7,01 (m, 1H), 6,87 (m, 1H), 3,34 (m, 2H, CH₂), 2,42-2,48 (m, 6H, 3xCH₂), 2,09 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂), 1,65 (m, 4H, 2xCH₂).

МС, Электронный удар m/z 500 [M⁺].

Пример 29. (3-Диэтиламинопропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 4-ацетил-5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты (который получают из этилового эфира 4-ацетил-5-формил-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты по методам Б и затем В).

При этом получают требуемое соединение.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,19 (s, br, 1H, NH), 8,15 (m, 1H, CONHCH₂), 8,11 (s, 1H, Н-винил), 7,72 (d, J=1,8 Гц, 1H, Н-4), 7,38 (dd, J=1,8 и 8,2 Гц, 1H, Н-6), 6,87 (d, J=8,2 Гц, 1H, Н-7), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,46 (m, 9H, CH₃ и 3xCH₂), 1,64 (m, 2H, CH₂), 0,93 (t, J=7,1 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

Пример 30. (3-Пирролидин-1-ил-пропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 8,14 (m, 1H, CONHCH₂), 8,10 (s, 1H, Н-винил), 7,70 (d, 1H, Н-4), 7,36 (dd, J=1,6 и 8,1 Гц, 1H, Н-6), 6,85 (d, J=8,1 Гц, 1H, Н-7), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35-2,48 (m, 6H, 3xCH₂), 1,65-1,71 (m, 6H, 3xCH₂).

МС m/z 499 и 501 [M⁺] и [M⁺+2].

Пример 31. (3-Морфолин-4-ил-пропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,20 (s, 1H, NH), 11,26 (s, br, 1H, NH), 8,09 (m, 2H, Н-винил и CONHCH₂), 7,73 (d, J=1,5 Гц, 1H, Н-4), 7,38 (dd, J=1,5 и 8,3 Гц, 1H, Н-6), 6,87 (d, J=8,3 Гц, 1H, Н-7), 3,55 (m, 4H, 2xCH₂), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,35 (m, 6H, 3xCH₂), 1,68 (m, 2H, CH₂).

МС-EI m/z 514 и 516 [M⁺-1] и [M⁺+2].

Пример 32. (3-Гидроксипропил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,25 (s, br, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, Н-винил), 8,03 (m, 1H, CONHCH₂), 7,71 (s, br, 1H, Н-4), 7,37 (d, br, J=8,4 Гц, 1H, Н-6), 6,87 (d, J=8,4 Гц, 1H, Н-7), 4,51 (s, br, 1H, OH), 3,51 (s, br, 2H, CH₂), 3,36 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,70 (m, 2H, CH₂).

МС-EI m/z 445 и 447 [M⁺-1] и [M⁺+1].

Пример 34. (2-Морфолин-4-ил-этил)амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,19 (s, 1H, NH), 11,14 (s, br, 1H, NH), 8,10 (s, 1H, Н-винил), 7,84 (m, 1H, CONHCH₂), 7,71 (d, J=1,8 Гц, 1H, Н-4), 7,38 (dd, J=1,8 и 8,2 Гц, 1H, Н-6), 6,87 (d, J=8,2 Гц, 1H, Н-7), 3,58 (m, 4H, 2xCH₂), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,45 (m, CH₃ и CH₂).

МС-EI m/z 500 и 502 [M⁺-1] и [M⁺+1].

Пример 35. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид-4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,17 (s, 1H, NH), 11,23 (s, 1H, NH), 8,11 (s, 1H, Н-винил), 7,91 (m, 1H, CONHCH₂), 7,73 (d, J=1,9 Гц, 1H, Н-4), 7,39 (dd, J=1,9 и 8,3 Гц, 1H, Н-6), 6,88 (d, J=8,3 Гц, 1H, Н-7), 3,40 (m, 2H, CH₂), 2,62 (m, 2H, CH₂), 2,57 (s, 3H, CH₃CO), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,69 (m, 4H, 2xCH₂).

Пример 36. [2-(4-Гидроксифенил)этил]амид 4-ацетил-5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-3-метил-1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,21 (s, 1H, NH), 11,18 (s, 1H, OH), 9,09 (s, 1H, NH), 8,06-8,10 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 7,38 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,04 (d, J=7,1 Гц, 2H), 6,88 (d, J=7,8 Гц, 1H), 6,67 (d, J=7,1 Гц, 2H), 3,42 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 2,56 (s, 3H, CH₃CO), 2,37 (s, 3H, CH₃).

МС-EI m/z 507 и 509 [M⁺-1] и [M⁺+1].

Пример 37. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь солянокислой соли 2-аминоацетофенона (1 экв.), этилизобутирилацетата (1,2 экв.) и ацетата натрия (2,4 экв.) в H₂O перемешивают при 100°C в течение 18 ч и затем охлаждают до комнатной темпе-

ратуры. Водный слой декантируют, а масляный растворяют в этилацетате. Затем его промывают водой и соевым раствором, сушат. При этом получают этиловый эфир 2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (выход 93%) в виде масла красно-коричневого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 11,21 (s, br, 1H, NH), 7,14-7,27 (m, 5H), 6,70 (d, $J=2,7$ Гц, 1H), 4,02 (q, $J=7,1$ Гц, 2H, OCH_2CH_3), 3,65 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,22 (d, $J=7,5$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,04 (t, $J=7,1$ Гц, 3H, OCH_2CH_3).

МС-ЕИ m/z 257 [M^+].

Полученный пиррол формилируют по методу А. При этом получают этиловый эфир 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (выход 41%) в виде твердого вещества красноватого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 12,35 (s, br, 1H, NH), 9,14 (s, 1H, CHO), 7,36 (s, 5H), 3,96 (q, $J=7,1$ Гц, 2H, OCH_2CH_3), 3,74 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,29 (d, $J=6,9$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,9 (t, $J=7,1$ Гц, 3H, OCH_2CH_3).

МС-ЕИ m/z 285 [M^+].

Эфир пирролкарбоновой кислоты гидролизуют по методу Б. При этом получают 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (выход 57%) в виде твердого вещества бежевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 12,28 (s, br, 1H, COOH), 12,02 (s, br, 1H, NH), 9,10 (s, 1H, CHO), 7,35 (s, 5H), 3,81 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,28 (d, $J=6,9$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕИ m/z 257 [M^+].

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (120 мг, 0,31 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (полученным по методу В). При этом получают 120 мг (выход 71%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 14,23 (s, br, 1H, NH), 11,08 (s, br, 1H, NH), 7,38-7,55 (m, 7H, Ar-H и CONHCH_2), 7,30 (s, 1H, Н-винил), 7,26 (dd, $J=1,8$ и $7,8$ Гц, 1H), 6,85 (d, $J=8,7$ Гц, 1H), 3,36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,07 (m, 2H, CH_2), 2,34 (q, $J=7,1$ Гц, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,22 (t, $J=6,9$ Гц, 2H, CH_2), 1,40 (m, 2H, CH_2), 1,31 (d, $J=6,9$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,86 (t, $J=7,1$ Гц, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

МС m/z 565,1 [M^++1].

Пример 38. (3-Пирролидин-1-илпропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (127 мг, 0,28 ммоль) конденсируют с 3-пирролидин-1-илпропиламинем (43 мг, 0,336 ммоль). При этом получают 140 мг (выход 66%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 14,40 (s, br, 1H, NH), 7,38-7,47 (m, 7H), 7,23-7,27 (m, 2H), 6,84 (d, $J=8,1$ Гц, 1H), 3,36 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,08 (m, 2H, CH_2), 2,30 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2,20 (t, $J=7,0$ Гц, 2H, CH_2), 1,62 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1,42 (t, $J=7,0$ Гц, 2H, CH_2), 1,31 (d, $J=7,2$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕИ m/z 560 и 562 [M^+-1 и M^++1].

Пример 39. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (57 мг, 0,27 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (120 мг). При этом получают 78 мг (выход 53%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 14,23 (s, br, 1H, NH), 11,09 (s, br, 1H, NH), 7,38-7,51 (m, 6H), 7,25-7,28 (m, 2H), 7,19 (t, 1H, CONHCH_2), 6,85 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 3,43 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,11 (m, 2H, CH_2), 2,28-2,39 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ и CH_2), 1,31 (d, $J=6,9$ Гц, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,85 (t, $J=7,0$ Гц, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕИ m/z 548 и 550 [M^+-1 и M^++1].

Пример 40. [3-(4-Метилпиперазин-1-ил)пропил]амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (53 мг, 0,25 ммоль) конденсируют с [3-(4-метилпиперазин-1-ил)пропил]амидом 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (300 мг). При этом получают 65 мг требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 14,22 (s, br, 1H, NH), 11,08 (s, br, 1H, NH), 7,23-7,50 (m, 9H), 6,85 (d, $J=8,7$ Гц, 1H), 3,37 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,05 (m, 2H, CH_2), 2,24 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$), 2,11 (m, 5H, CH_2 и CH_3), 1,42 (m, 2H, CH_2), 1,31 (d, $J=7,2$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕИ m/z 589 и 591 [M^+-1 и M^++1].

Пример 41. 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (170 мг, 0,8 ммоль) конденсируют с 5-формил-2-изопропил-4-фенил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислотой (205 мг) по методу Г. При этом получают 210 мг (выход 58%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 14,31 (s, br, 1H, NH), 11,16 (s, br, 1H, NH), 7,26-7,44 (m, 7H), 7,11 (s,

1H, H-винил), 6,85 (d, J=7,8 Гц, 1H), 3,78 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 1,34 (d, J=6,9 Гц, 6H, CH(CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 452 [M⁺+1].

Пример 42. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (44 мг, 0,21 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (70 мг, полученным аналогично изопропиловому аналогу, как описано выше). При этом получают 0,03 г (выход 27%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,87(s, br, 1H, NH), 11,11 (s, br, 1H, NH), 7,36-7,51 (m, 6H), 7,26 (dd, J=1,8 и 8,1 Гц, 1H), 7,2 (s, 1H, H-винил), 7,09 (m, 1H, CONHCH₂), 6,83 (d, J=8,1 Гц, 1H), 3,17 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,29-2,35 (m, 6H, 3xNCH₂), 1,59 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-ЕІ m/z 518 и 520 [M⁺-1 и M⁺+1].

Пример 43. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(2-Метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (50 мг, 0,21 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (70 мг). При этом получают 0,04 г (выход 35%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,82 (s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,48 (m, 2H), 7,43 (m, 1H), 7,38 (m, 2H), 7,32 (m, 1H), 7,24 (m, 2H), 7,16 (s, 1H, H-винил), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,19 (m, 2H, NCH₂), 2,49 (m, CH₃), 2,32-2,38 (m, 6H, 3xNCH₂), 1,59 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-ЕІ m/z 546 [M⁺].

Пример 44. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (46 мг, 0,22 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (65 мг). При этом получают 60 мг (выход 55%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,86 (s, br, 1H, NH), 11,09 (s, br, 1H, NH), 7,47-7,49 (m, 2H), 7,38-7,41 (m, 4H), 7,26 (dd, J=2,2 и 8,3 Гц, 1H), 7,21 (s, 1H, H-винил), 7,04 (m, 1H, CONHCH₂), 6,77 (d, J=8,3 Гц, 1H), 3,15 (m, 2H, NCH₂), 2,48 (m, CH₃), 2,16 (t, J=6,8 Гц, 2H, 3xNCH₂), 2,02 (s, 6H, 2xNCH₃).

МС m/z 493 и 494,8 [M⁺ и M⁺+2].

Пример 45. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(2-Метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (53 мг, 0,22 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (65 мг). При этом получают 0,05 г (выход 44%) требуемого соединения в виде смолы оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,82(s, br, 1H, NH), 11,02 (s, br, 1H, NH), 7,37-7,52 (m, 5H), 7,32 (m, 1H), 7,22-7,27 (m, 2H), 7,16 (s, 1H), 7,08 (m, 2H), 7,03 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 3,15 (m, 2H, NCH₂), 2,49 (m, CH₃), 2,16 (t, J=6,5 Гц, 2H, NCH₂), 2,02 (s, 6H, 2xNCH₃).

МС m/z 521 [M⁺+1].

Пример 46. Этиловый эфир 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (60 мг, 0,29 ммоль) конденсируют с этиловым эфиром 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (75 мг). При этом получают 78 мг (выход 60%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,01 (s, br, 1H, NH), 11,13 (s, br, 1H, NH), 7,42-7,46 (m, 3H), 7,27-7,34 (m, 4H), 7,12 (s, 1H), 6,84 (dd, J=2,2 и 8,3 Гц, 1H), 3,99-4,03 (m, 2H, OCH₂CH₃), 2,61 (s, 3H, CH₃), 0,98-1,03 (m, 3H, OCH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 450 и 452 [M⁺-1 и M⁺+1].

Пример 47. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,47 г, 2,2 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2-метил-4-фенил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,75 г). При этом получают 0,11 г (выход 42%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,86 (s, br, 1H, NH), 7,42-7,46 (m, 3H), 7,37-7,50 (m, 7H), 7,24-7,28 (m, 2H), 6,83 (d, J=8,1 Гц, 1H), 3,09 (m, 2H, NCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,38 (q, J=7,1 Гц, 4H, 2xNCH₂CH₃), 2,26 (t, J=6,9 Гц, 2H, NCH₂), 1,42 (m, 2H, NCH₂), 0,87 (t, J=7,1 Гц, 6H, 2xNCH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 535,0 и 537 [M⁺ и M⁺+2].

Пример 48. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь трет-бутил-3-оксобутирата и нитрита натрия (1 экв.) в уксусной кислоте перемешивают при комнатной температуре. При этом получают трет-бутил-2-гидроксимино-3-оксобутират.

Этил-3-оксобутират (1 экв.), порошкообразный цинк (3.8 экв.) и полученный неочищенный трет-бутил-2-гидроксимино-3-оксобутират в уксусной кислоте перемешивают при 60°C в течение 1 ч. Реакционную смесь выливают в H₂O и фильтруют, собирают фильтрат. При этом получают 2-трет-бутилоксикарбонил-3,5-диметил-4-этоксикарбонилпиррол (выход 65%).

Смесь 2-трет-бутилоксикарбонил-3,5-диметил-4-этоксикарбонилпиррола и триэтилортоформиата (1,5 экв.) в трифторуксусной кислоте перемешивают при 15°C в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют и остаток очищают. При этом получают 2,4-диметил-3-этоксикарбонил-5-формилпиррол (выход 64%) в виде игольчатых кристаллов желтого цвета.

2,4-Диметил-3-этоксикарбонил-5-формилпиррол гидролизуют по методу Б.

При этом получают 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (выход 90%).

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 12 (s, br, 2H, NH и CO₂H), 9,58 (s, 1H, CHO), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃).

МС m/z 267 [M⁺].

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,17 г, 0,8 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,2 г, полученным по методу В) с использованием метода Б. При этом получают 0,3 г (выход 83%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,60 (s, br, 1H, NH), 10,94 (s, br, 1H, NH), 8,07 (d, J=1,8 Гц, 1H, H-4), 7,75 (s, 1H, H-винил), 7,44 (t, J=5,2 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J=1,8 и 8,4 Гц, 1H, H-6), 6,82 (d, J=8,4 Гц, 1H, H-7), 3,26-3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,7 Гц, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

МС-EI m/z 430 и 432 [M⁺-1 и M⁺+1].

Пример 49. (2-Диметиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-ил иденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (0,17 г, 0,8 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,2 г). При этом получают 0,13 г (выход 36%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,59 (s, br, 1H, NH), 10,93 (s, br, 1H, NH), 7,85 (d, J=7,92 Гц, 1H, H-4), 7,63-7,65 (m, 3H), 7,40-7,47 (m, 3H), 7,32-7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,30 (dd, J=1,6 и 7,9 Гц, 1H, H-5), 7,11 (d, J=1,6 Гц, 1H, H-7), 3,28-3,34 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,8 Гц, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

МС-EI m/z 428 [M⁺].

Пример 50. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Хлор-1,3-дигидроиндол-2-он (0,1 г, 0,6 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,15 г). При этом получают 0,22 г (выход 90%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 7,96 (d, J=2,0 Гц, 1H, H-4), 7,75 (s, 1H, H-винил), 7,50 (t, J=5,5 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,12 (dd, J=2,0 и 8,3 Гц, 1H, H-6), 6,86 (d, J=8,3 Гц, 1H, H-7), 3,26-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,36 (t, J=6,6 Гц, 2H, NCH₂), 2,17 (s, 6H, N(CH₃)₂).

МС-EI m/z 386 [M⁺].

Пример 51. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,17 г, 0,8 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,2 г). При этом получают 0,09 г (выход 26%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 8,09 (d, J=1,7 Гц, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-винил), 7,42 (t, J=5,5 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J=1,7 и 8,0 Гц, 1H, H-6), 6,82 (d, J=8,0 Гц, 1H, H-7), 3,23-3,32 (m, 2H, NCH₂), 2,46-2,55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃), 0,96 (t, J=7,2 Гц, 6H, 2xNCH₂CH₃).

МС-EI m/z 458 и 460 [M⁺-1 и M⁺+1].

Пример 52. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,09 г, 0,4 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,1 г). При этом получают 0,14 г (выход 81%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,98 (s, br, 1H, NH), 8,09 (d, J=1,9 Гц, 1H, H-4), 7,76 (s, 1H, H-винил), 7,53 (t, J=5,5 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,24 (dd, J=1,9 и 8,5 Гц, 1H, H-6), 6,81 (d, J=8,5 Гц, 1H, H-7), 3,29-3,35 (m, 2H, NCH₂), 2,54 (t, J=6,9 Гц, 2H, NCH₂), 2,47 (m, пик ДМСО), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,66-1,69 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-ЕІ m/z 456 и 458 [$M^+ - 1$ и $M^+ + 1$].

Пример 53. (3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,09 г, 0,4 ммоль) конденсируют с (3-имидазол-1-илпропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,1 г). При этом получают 0,1 г (выход 59%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,63 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 8,09 (d, J=2,2 Гц, 1H, H-4), 7,77 (s, 1H, H-винил), 7,71 (t, J=5,7 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,25 (dd, J=2,2 и 8,4 Гц, 1H, H-6), 7,20 (s, 1H, Ar-H), 6,89 (s, 1H, Ar-H), 6,81 (d, J=8,4 Гц, 1H, H-7), 4,02 (t, J=6,7 Гц, 2H, NCH₂), 3,18 (q, J=6,7 Гц, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 1,93 (m, 2H, CH₂).

МС-ЕІ m/z 467 и 469 [$M^+ - 1$ и $M^+ + 1$].

Пример 54. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(2-Метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (30 мг, 0,13 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (30 мг). При этом получают 0,06 г (выход 100%) требуемого соединения в виде смолы желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,60 (s, dr, 1H, NH), 10,89 (s, br, 1H, NH), 7,79 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,63 (s, 1H, H-винил), 7,46 (t, J=5,5 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,28-7,35 (m, 2H), 6,99-7,11 (m, 4H), 3,76 (s, 3H, OCH₃), 3,27-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,39 (s, 3H, CH₃), 2,37 (m, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 458 [M^+].

Пример 55. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-[6-(3-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(3-Метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (30 мг, 0,13 ммоль) конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (30 мг). При этом получают 8 мг (выход 14%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,59 (s, br, 1H, NH), 10,92 (s, br, 1H, NH), 7,84 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,65 (s, 1H, H-винил), 7,42 (m, 1H, CONHCH₂), 7,36 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,29 (dd, J=1,6 и 7,6 Гц, 1H), 7,20 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,14 (d, J=2,8 Гц, 1H), 7,11 (d, J=1,6 Гц, 1H), 6,91 (dd, J=2,8 и 7,8 Гц, 1H), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,21-3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,36-2,40 (m, 2H, NCH₂), 2,18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 458 [M^+].

Пример 56. (2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (80 мг, 0,4 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,1 г) по методу Б. При этом получают 79 мг (выход 46%) требуемого соединения.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,66 (s, dr, 1H, NH), 10,95 (s, br, 1H, NH), 8,15 (d, J=1,2 Гц, 1H), 7,81 (s, 1H, H-винил), 7,71 (d, J=7,5 Гц, 1H), 7,40-7,47 (m, 4H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d, J=8,1 Гц, 1H), 3,2-3,31 (m, 2H, NCH₂), 2,46-2,55 (m, 6H, 3xNCH₂), 2,44 (s, 6H, 2xCH₃), 0,96 (t, J=7,4 Гц, 6H, 2xNCH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 456 [M^+].

Пример 57. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (0,04 г, 0,2 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,04 г). При этом получают требуемое соединение в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,65 (s, br, 1H, NH), 10,96 (s, br, 1H, NH), 8,15 (d, J=1,0 Гц, 1H), 7,80 (s, 1H, H-винил), 7,71 (d, J=7,2 Гц, 2H), 7,49 (t, J=6,3 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,41-7,46 (m, 3H), 7,31 (m, 1H), 6,95 (d, J=7,8 Гц, 1H), 4,08 (m, 4H, 2xNCH₂), 3,32 (m, 2H, NCH₂), 2,55 (t, J=7,1 Гц, 2H, NCH₂), 2,47 (m, пик ДМСО), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 1,66 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-ЕІ m/z 454 [M^+].

Пример 58. (3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (8 мг, 0,04 ммоль) конденсируют с (3-имидазол-1-илпропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (10 мг). При этом получают 10 мг (выход 59%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,67 (s, br, 1H, NH), 10,96 (s, br, 1H, NH), 8,16 (d, J=1,2 Гц, 1H), 7,81 (s, 1H, H-винил), 7,65-7,72 (m, 4H), 7,44 (m, 3H), 7,31 (m, 1H, CONHCH₂), 7,21 (s, 1H, Ar-H), 4,02 (t, J=6,5 Гц, 2H, NCH₂), 3,19 (q, J=6,5 Гц, 2H, CONHCH₂), 2,44 (s, 6H, 2xCH₃), 1,93 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

МС-ЕІ m/z 465 [M^+].

Пример 59. (2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (0,08 г, 0,4 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,1 г). При этом получают 65 мг (выход 38%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 7,86 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,62-7,66 (m, 3H), 7,40-7,47 (m, 3H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,10 (d, $J=1,2$ Гц, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH_2), 2,46-2,55 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2,44 (s, 3H, CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 0,97 (t, $J=7,2$ Гц, 6H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

МС-ЕІ m/z 456 [M^+].

Пример 60. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (30 мг, 0,15 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (40 мг). При этом получают 5,9 мг (выход 8,5%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,60 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 7,86 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,63-7,66 (m, 3H), 7,51 (m, 1H, CONHCH_2), 7,45 (m, 2H), 7,28-7,36 (m, 2H), 7,10 (d, $J=1,5$ Гц, 1H), 3,31 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2,55 (t, $J=6,6$ Гц, 2H, NCH_2), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,40 (s, 3H, CH_3), 1,67 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

МС-ЕІ m/z 454 [M^+].

Пример 61. (3-Имидазол-1-ил-пропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (8 мг, 0,04 ммоль) конденсируют с (3-имидазол-1-ил-пропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (10 мг). При этом получают 7,3 мг (выход 43%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,62 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 7,86 (d, $J=8,2$ Гц, 1H), 7,62-7,70 (m, 5H), 7,45 (m, 2H), 7,35 (m, 1H), 7,30 (dd, $J=1,4$ и $8,2$ Гц, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,10 (d, $J=1,4$ Гц, 1H), 6,89 (s, 1H), 4,02 (t, $J=6,9$ Гц, 2H, CH_2), 3,19 (m, 2H, NCH_2CH_2), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 1,93 (t, $J=6,9$ Гц, 2H, NCH_2).

МС-ЭУ m/z 465 [M^+].

Пример 62. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[6-(3,5-дихлорфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(3,5-Дихлорфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (64 мг, 0,23 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (60 мг). При этом получают 53 мг (выход 44%) требуемого соединения в виде твердого вещества светло-коричневого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,62 (s, br, 1H, NH), 10,99 (s, br, 1H, NH), 7,89 (d, $J=7,9$ Гц, 1H, H-4), 7,69-7,71 (m, 3H), 7,55 (m, 1H, CONHCH_2), 7,37 (m, 2H), 7,14 (d, $J=1,4$ Гц, 1H, H-7), 3,27 (m, 2H, NCH_2), 2,48-2,58 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2,45 (s, 3H, CH_3), 2,42 (s, 3H, CH_3), 0,97 (t, $J=6,8$ Гц, 6H, $3 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

МС m/z 526.9 [$\text{M}^+ + 1$].

Пример 63. (2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Пиридин-3-ил-1,3-дигидроиндол-2-он (40 мг, 0,19 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 29 мг (выход 33%) требуемого соединения в виде твердого вещества светло-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,62 (s, br, 1H, NH), 11,05 (s, br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,53 (d, $J=5,8$ Гц, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,91 (d, $J=8,1$ Гц, 1H), 7,70 (s, 1H, H-винил), 7,40-7,48 (m, 2H), 7,35 (d, $J=7,5$ Гц, 1H), 7,14 (s, 1H), 3,26 (m, 2H, NCH_2), 2,48-2,55 (m, $3 \times \text{NCH}_2$), 2,42 (s, 3H, CH_3), 2,38 (s, 3H, CH_3), 0,96 (t, $J=6,9$ Гц, 6H, $2 \times \text{NCH}_2\text{CH}_3$).

МС-ЕІ m/z 457 [M^+].

Пример 64. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Пиридин-3-ил-1,3-дигидроиндол-2-он (60 мг, 0,28 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (75 мг). При этом получают 90 мг (выход 71%) требуемого соединения в виде твердого вещества светло-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО- d_6) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,05 (s, br, 1H, NH), 8,86 (d, $J=1,5$ Гц, 1H), 8,54 (dd, $J=1,5$ и $4,8$ Гц, 1H), 8,05 (m, 1H), 7,91 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,70 (s, 1H, H-винил), 7,44-7,53 (m, 2H), 7,36 (dd, $J=1,5$ и $8,1$ Гц, 1H), 7,15 (d, $J=1,2$ Гц, 1H), 3,33 (m, 2H, NCH_2), 2,47-2,57 (m, 6H, $3 \times \text{NCH}_2$), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 1,67 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

МС-ЕІ m/z 455 [M^+].

Пример 65. (3-Диметиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-пиридин-3-ил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Пиридин-3-ил-1,3-дигидроиндол-2-он (42 мг, 0,2 ммоль) конденсируют с (3-диметиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 67 мг (выход 75%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-коричневого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, br, 1H, NH), 11,00 (s, br, 1H, NH), 8,86 (s, br, 1H), 8,54 (s, br, 1H), 8,04 (m, 1H), 7,90 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,69 (s, 1H, Н-винил), 7,63 (m, 1H), 7,45-7,48 (m, 1H), 7,35 (dd, J=1,7 и 8,0 Гц, 1H), 7,15 (d, J=1,7 Гц, 1H), 3,21-3,27 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,28 (m, 2H, NCH₂), 2,14 (s, 6H, 2xNCH₃), 1,64 (m, 2H, CH₂).

МС-EI m/z 443 [M⁺].

Пример 66. (3-Диметиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (67 мг, 0,32 ммоль) конденсируют с (3-диметиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (81 мг). При этом получают 40 мг (выход 28%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,66 (s, br, 1H, NH), 10,92 (s, br, 1H, NH), 8,14 (s, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,71 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 7,44 (m, 3H), 7,32 (m, 1H), 6,95 (m, 1H), 3,33 (m, 2H, NCH₂), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 2,27 (m, 2H, NCH₂), 2,13 (s, 6H, 2xNCH₃), 1,63 (m, 2H, CH₂).

МС-EI m/z 442 [M⁺].

Пример 67. (3-Диэтиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (1,5 г, 7,16 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2 г). При этом получают 1,3 г (выход 40%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 10,91 (s, 1H, NH), 8,14 (d, J=1,4 Гц, 1H, ArH), 7,8 (s, 1H, ArH), 7,7 (dd, J=1,2 и 8,5 Гц, 2H, ArH), 7,6 (t, J=5,3 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,4 (m, 3H, ArH), 7,3 (t, J=7,4 Гц, 1H, ArH), 6,9 (d, J=8,0 Гц, 1H, ArH), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,5 (m, 12H, 3xNCH₂ и 2xCH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J=6,7 Гц, 6H, NCH₂CH₃).

МС-EI m/z 470 [M⁺].

Пример 68. (3-Диэтиламинопропил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-6-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-Фенил-1,3-дигидроиндол-2-он (1,5 г, 7,16 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2 г). При этом получают 1,9 г (выход 57%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,94 (s, 1H, NH), 7,8 (d, J=7,9 Гц, 1H, ArH), 7,6 (m, 4H, ArH), 7,4 (t, J=7,5 Гц, 2H, ArH), 7,3 (m, 2H), 7,1 (d, J=1,4 Гц, 1H, ArH), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,5 (m, 12H, 3xNCH₂ и 2xCH₃), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,93 (t, J=6,7 Гц, 6H, NCH₂CH₃).

МС-EI m/z 470 [M⁺].

Пример 69. (3-Хлор-4-метоксифенил)амид 3-[4-(3-диэтиламинопропилкарбамоил)-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-илметил]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-4-карбоновой кислоты.

(3-Хлор-4-метоксифенил)амид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-4-карбоновой кислоты (1 г, 3,16 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (1 г, 3,58 ммоль). При этом получают 1,7 г (выход 85%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

МС-EI m/z 578,2 [M⁺].

Пример 70. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (0,5 г, 2,36 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (0,51 г). При этом получают 0,84 г требуемого соединения в виде твердого вещества красно-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,61 (s, 1H, NH), 10,99 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J=1,8 Гц, 1H, ArH), 7,7 (m, 4H), 7,2 (dd, J=1,8 и 8,3 Гц, 2H, ArH), 6,8 (d, J=7,8 Гц, 1H, ArH), 3,3 (s, dr, 4H, 2xNCH₂), 3,2 (m, 2H, CONHCH₂), 2,6 (s, br, 2H, NCH₂ и 2xCH₃), 2,4 (s, 6H, 2xCH₃), 1,66 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 0,98 (t, J=7,1 Гц, 6H, NCH₂CH₃).

МС-EI m/z 472 и 474 [M⁻¹ и M⁺¹].

Пример 71. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (100 мг, 0,47 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (150 мг). При этом получают 0,15 г (выход 62%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,97 (s, 1H, NH), 10,95 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J=1,3 Гц, 1H, ArH), 7,84 (m, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,23 (dd, J=1,3 и 8,1 Гц, 1H, ArH), 6,8 (d, J=8,1 Гц, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,3 (m, 3H, CH и NHCH₂), 2,5 (m, br, 6H, 3xNCH₂), 1,28 (d, J=6,9 Гц, 6H, 2xCH₃), 1,23 (d, J=6,6 Гц, 6H, 2xCH₃), 0,96 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

МС-EI m/z 514 и 516 [M⁻¹ и M⁺¹].

Пример 72. (3-Диэтиламинопропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-

диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (90 мг, 0,42 ммоль) конденсируют с (3-диэтиламинопропил)амидом 5-формил-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (140 мг). При этом получают 54 мг (выход 25%) требуемого соединения в виде твердого вещества красно-коричневого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,96 (s, 1H, NH), 8,09 (d, J=1,7 Гц, 2H), 7,78 (s, 1H, Н-винил), 7,23 (dd, J=1,7 и 8,1 Гц, 1H, ArH), 6,82 (d, J=8,1 Гц, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH₂), 3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (s, br, 6H, 3xNCH₂), 1,7 (m, br, 2H, CH₂CH₂CH₂), 1,28 (d, J=6,9 Гц, 6H, 2xCH₃), 1,24 (d, J=5,9 Гц, 6H, 2xCH₃), 1,06 (m, 6H, 2xCH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 528 и 530 [$\text{M}^+ - 1$ и $\text{M}^+ + 1$].

Пример 73. (3-Пирролидин-1-илпропил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (130 мг, 0,6 ммоль) конденсируют с (3-пирролидин-1-илпропил)амидом 5-формил-2,4-диизопропил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (150 мг, 0,45 ммоль). При этом получают 36 мг (выход 15%) требуемого соединения в виде твердого вещества коричневаторыжеватого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,98 (s, 1H, NH), 10,97 (s, 1H, NH), 8,10 (d, J=1,6 Гц, 2H), 7,78 (s, 1H, Н-винил), 7,23 (dd, J=1,6 и 7,6 Гц, 1H, ArH), 6,82 (d, J=7,6 Гц, 1H, ArH), 3,5 (m, 1H, CH), 3,25 (m, 2H, NHCH₂), 3,15 (m, 1H, CH), 2,7 (s, br, 6H, 3xNCH₂), 1,7 (m, br, 6H, 3xNCH₂CH₂), 1,28 (d, J=5,6 Гц, 6H, 2xCH₃), 1,24 (d, J=5,7 Гц, 6H, 2xCH₃).

МС-ЕІ m/z 526 и 528 [$\text{M}^+ - 1$ и $\text{M}^+ + 1$].

Пример 74. (Пиридин-4-илметил)амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Бром-1,3-дигидроиндол-2-он (170 мг, 0,8 ммоль) конденсируют с (пиридин-4-ил-метил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (200 мг). При этом получают 14 мг (выход 4%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,67 (s, 1H, NH), 11,01 (s, br, 1H, NH), 8,51 (dd, J=1,6 и 4,3 Гц, 2H), 8,23 (t, J=6,0 Гц, 1H, CONHCH₂), 8,11 (d, J=1,9 Гц, 1H), 7,78 (s, 1H, Н-винил), 7,31 (d, J=6,0 Гц, 2H), 7,25 (dd, J=1,9 и 8,1 Гц, 1H), 6,82 (d, J=8,1 Гц, 1H), 4,45 (d, J=6,0 Гц, 2H, NCH₂), 2,46 (s, 6H, 2xCH₃).

МС-ЭУ m/z 450 и 452 [$\text{M}^+ - 1$ и $\text{M}^+ + 1$].

Пример 75. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-[6-(4-бутилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-[6-(4-Бутилфенил)]-1,3-дигидроиндол-2-он (50 мг, 0,19 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 74 мг (выход 76%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,58 (s, 1H, NH), 10,93 (s, br, 1H, NH), 7,82 (d, J=7,9 Гц, 2H), 7,63 (s, 1H, Н-винил), 7,54 (d, J=7,9 Гц, 2H), 7,46 (m, 1H, CONH), 7,26 (m, 3H), 7,09 (s, 1H), 3,30 (m, 2H, CH₂), 2,52-2,63 (m, 4H, 2xCH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂), 1,58 (m, 2H, CH₂), 1,34 (m, 2H, CH₂), 0,91 (t, J=7,2 Гц, 3H, CH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 510 [M^+].

Пример 76. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-[6-(5-изопропил-2-метоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(5-Изопропил-2-метоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (50 мг, 0,17 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (45 мг). При этом получают 67 мг (выход 75%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,60 (s, 1H, NH), 10,82 (s, br, 1H, NH), 7,77 (d, J=7,9 Гц, 1H), 7,61 (s, 1H, Н-винил), 7,45 (m, 1H, CONH), 7,0-7,19 (m, 5H), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 3,32 (m, 2H, CH₂), 2,87 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,56 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂), 1,21 (d, J=6,8 Гц, 6H, CH(CH₃)₂).

МС-ЕІ m/z 527,2 [$\text{M}^+ + 1$].

Пример 77. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-[6-(4-этилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(4-Этилфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (45 мг, 0,19 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 60 мг (выход 65%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d6) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,96 (s, br, 1H, NH), 7,83 (d, J=8,4 Гц, 1H), 7,64 (s, 1H, Н-винил), 7,51-7,56 (m, 3H), 7,25-7,30 (m, 3H), 7,08 (d, J=1 Гц, 1H), 3,31 (m, 2H, CH₂), 2,63 (m, 2H, CH₂CH₃), 2,55 (m, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,42 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂), 1,20 (t, J=7,5 Гц, 3H, CH₂CH₃).

МС-ЕІ m/z 482 [M^+].

Пример 78. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 5-[6-(2,4-диметоксифенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(2,4-Диметоксифенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (51 мг, 0,19 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 30 мг (выход 31%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6) δ 13,59 (s, 1H, NH), 10,86 (s, br, 1H, NH), 7,75 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,60 (s, 1H, Н-винил), 7,49 (m, 1H, CONH), 7,22 (d, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,58-6,65 (m, 2H), 3,79 (s, 3H, OCH_3), 3,76 (s, 3H, OCH_3), 3,33 (m, 2H, CH_2), 2,55 (m, 2H, CH_2), 2,50 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2,42 (s, 3H, CH_3), 2,39 (s, 3H, CH_3), 1,67 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$).

МС-ЕІ m/z 514 $[\text{M}^+]$.

Пример 79. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-[6-(3-изопропилфенил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

6-(3-Изопропилфенил)-1,3-дигидроиндол-2-он (48 мг, 0,19 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (50 мг). При этом получают 59 мг (выход 63%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,97 (s, br, 1H, NH), 7,87 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,68 (s, 1H, Н-винил), 7,24-7,55 (m, 6H), 7,13 (s, 1H), 3,34 (m, 2H, CH_2), 3,30 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,60 (m, 2H, CH_2), 2,50 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 2,45 (s, 3H, CH_3), 2,43 (s, 3H, CH_3), 1,70 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,27 (d, $J=6,9$ Гц, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕІ m/z 496 $[\text{M}^+]$.

Пример 80. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фтор-1,3-дигидроиндол-2-он (0,54 г, 3,8 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты. При этом получают 0,83 г (55%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-зеленого цвета.

^1H ЯМР (300 МГц, DMCO-d_6) δ 13,66 (s, 1H, NH), 10,83 (s, br, 1H, NH), 7,73 (dd, $J=2,5$ и $9,4$ Гц, 1H), 7,69 (s, 1H, Н-винил), 7,37 (t, 1H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 6,91 (m, 1H), 6,81-6,85 (m, 1H), 3,27 (m, 2H, CH_2), 2,51 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,41 (s, 3H, CH_3), 0,96 (t, $J=6,9$ Гц, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

МС-ЕІ m/z 398 $[\text{M}^+]$.

Пример 80. (Альтернативный синтез). (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Гидразингидрат (55%, 3000 мл) и 5-фторизатин (300 г) нагревают до 100°C . Через 120 мин добавляют порциями по 100 г при перемешивании 500 г 5-фторизатина. Смесь нагревают до 110°C и перемешивают в течение 4 ч. Затем реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, и твердый продукт собирают фильтрованием в вакууме. При этом получают 748 г неочищенного гидразида (2-амино-5-фторфенил)уксусной кислоты. Гидразид суспендируют в 700 мл воды и рН смеси доводят до значения <3 с помощью 12н. соляной кислоты. Затем реакционную смесь перемешивают в течение 12 ч при комнатной температуре. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме и дважды промывают водой, сушат в вакууме. При этом получают 5-фтор-1,3-дигидроиндол-2-он (600 г, выход 73%) в виде порошка коричневого цвета.

^1H ЯМР (диметилсульфоксид- d_6) δ 3,46 (s, 2H, CH_2), 6,75, 6,95, 7,05 (3 x m, 3H, ароматика), 10,35 (s, 1H, NH). МС m/z 152 $[\text{M}+1]$.

К смеси 2-трет-бутилового эфира, 4-этилового эфира 3,5-диметил-1Н-пиррол-2,4-дикарбоновой кислоты (2600 г) и этанола (7800 мл) при интенсивном перемешивании медленно добавляют 10 н. соляную кислоту (3650 мл). Температуру повышают с 25°C до 35°C , при этом начинается выделение газа. Реакционную смесь нагревают до 54°C и перемешивают, продолжают повышать температуру, и в течение 1 ч температуру реакционной смеси поддерживают равной 67°C . Затем реакционную смесь охлаждают до 5°C , и при перемешивании в нее медленно добавляют 32 л смеси льда и воды. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме и трижды промывают водой. Затем данный продукт сушат на воздухе до постоянного веса. При этом получают 1418 г (выход 87%) этилового эфира 2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты в виде твердого вещества розоватого цвета.

^1H ЯМР (диметилсульфоксид- d_6) δ 2,10, 2,35 (2xs, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{CH}_3$), 4,13 (q, 2H, CH_2), 6,37 (s, 1H, CH), 10,85 (s, 1H, NH). МС m/z 167 $[\text{M}+1]$.

Диметилформаид (322 г) и дихлорметан (3700 мл) охлаждают на бане со льдом до 4°C , после чего добавляют при перемешивании 684 г оксихлорида фосфора. Твердый этиловый эфир 2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (670 г) небольшими порциями медленно добавляют в течение 15 мин. Температура реакционной смеси достигает 18°C . Затем ее кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, охлаждают до 10°C на бане со льдом и при интенсивном перемешивании быстро вливают в реакционную смесь воду со льдом (1,6 л). Температура реакционной смеси повышается до 15°C . При интенсивном перемешивании добавляют 1,6 л 10н. соляной кислоты. Температура реакционной смеси повышается до 22°C . Выключают перемешивание и оставляют реакционную смесь на 30 мин для разделения слоев. Температура достигает максимального значения, равного 40°C . рН водного слоя доводят до значения 12-13 с помощью 10 н. гидроксида калия (3,8 л) с такой скоростью, чтобы в процессе добавления щелочи

температура реакционной среды достигла и сохранялась равной 55°C. После завершения прибавления щелочи реакционную смесь охлаждают до 10°C и перемешивают в течение 1 ч. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме и четыре раза промывают водой. При этом получают 778 г (выход 100%) этилового эфира 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н ЯМР (ДМСО-d6) δ 1,25 (t, 3H, CH₃), 2,44, 2,48 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 4,16 (q, 2H, CH₂), 9,59 (s, 1H, CHO), 12,15 (s, br, 1H, NH). МС m/z 195 [M+1].

806 г этилового эфира 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, 548 г гидроксида калия, 2400 мл воды и 300 мл метанола при перемешивании кипятят с обратным холодильником в течение 2 ч, затем охлаждают до 8°C. Реакционную смесь экстрагируют дважды дихлорметаном. Поддерживая температуру ниже 15°C, доводят рН водного слоя до значения, равного 4, с помощью 1000 мл 10н. соляной кислоты. Для облегчения перемешивания добавляют воду. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, затем его трижды промывают водой и сушат в вакууме при 50°C. При этом получают 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (645 г, выход 93,5%) в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н ЯМР (ДМСО-d6) δ 12,40, 2,43 (2xs, 2x3H, 2xCH₃), 9,57 (s, 1H, CHO), 12,07 (s, br, 2H, NH+COOH). МС m/z 168 [M+1].

К смеси 1204 г 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты и 6020 мл диметилформамида при перемешивании при комнатной температуре добавляют 2071 г гидрохлорида 1-(3-диметил)аминопропил-3-этилкарбодимида, 1460 г гидроксibenзотриазола, 2016 мл триэтиламина и 1215 мл диэтилэтилендиамина. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 20 ч, затем разбавляют 3000 мл воды, 2000 мл солевого раствора и 3000 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия, доводят рН среды до значения, превышающего 10, с помощью 10 н. раствора гидроксида натрия. Реакционную смесь экстрагируют дважды порциями по 5000 мл 10% метанола в дихлорметане и экстракты объединяют, сушат над безводным сульфатом магния и упаривают досуха на роторном испарителе. Затем смесь разбавляют 1950 мл толуола и опять упаривают досуха на роторном испарителе. Остаток растирают со смесью гексан/диэтиловый эфир, 3:1 (4000 мл). Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, дважды промывают 400 мл этилацетата и сушат в вакууме при 34°C в течение 21 ч. При этом получают (2-диэтиламиноэтил)амид 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (819 г, выход 43%) в виде твердого вещества светло-коричневого цвета.

¹Н ЯМР (ДМСО-d6) δ 0,96 (t, 6H, 2xCH₃), 2,31, 2,38 (2xs, 2xCH₃), 2,51 (m, 6H, 3xCH₂), 3,28 (m, 2H, CH₂), 7,34 (m, 1H, амид NH), 9,56 (s, 1H, CHO), 11,86 (s, 1H, пиррол NH). МС m/z 266 [M+1].

Смесь 809 г (2-диэтиламиноэтил)амида 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, 438 г 5-фтор-1,3-дигидроиндол-2-она, 8000 мл этанола и 13 мл пирролидина нагревают при 78°C в течение 3 ч. Смесь охлаждают до комнатной температуры, и твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, затем промывают этанолом. Твердое вещество перемешивают с 5900 мл этанола при 72°C в течение 30 мин. Затем смесь охлаждают до комнатной температуры. Твердое вещество собирают фильтрованием в вакууме, затем промывают этанолом и сушат в вакууме при 54°C в течение 130 ч. При этом получают 1013 г (выход 88%) (2-диэтиламиноэтил)амида 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹Н ЯМР (диметилсульфоксид-d6) δ 0,98 (t, 6H, 2xCH₃), 2,43, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 6H, 3xCH₂), 3,28 (q, 2H, CH₂), 6,84, 6,92, 7,42, 7,71, 7,50 (5xm, 5H, ароматика, винил, CONH), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,68 (s, 1H, пиррол NH). МС m/z 397 [M-1].

Пример 81. 3-[4-(2-Диэтиламиноэтилкарбамоил)-3,5-диметил-1Н-пиррол-2-ил-метилен]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновая кислота.

2-Оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-6-карбоновую кислоту (80 мг, 0,45 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты. При этом получают 210 мг (выход 92%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,6 (s, 1H, NH), 7,76 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,66 (s, 1H, Н-винил), 7,57 (dd, J=1,5 и 8,0 Гц, 1H), 7,40-7,42 (m, 2H), 3,28 (m, 2H, CH₂), 2,88 (m, Н-пиперидин), 2,54 (m, 6H, 3xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 1,56 (m, Н-пиперидин), 0,97 (t, J=6,98 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС m/z 424 [M⁺].

Пример 82. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид [5-(5-диметилсульфамоил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Диметиламид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоукислоты (90 мг, 0,38 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг). При этом получают 100 мг (выход 54%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d6) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,30 (s, br, 1H, NH), 8,25 (d, 1H), 7,92 (s, 1H, Н-винил), 7,48-7,53 (m, 2H), 7,07 (d, J=8,2 Гц, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,61 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,56 (t, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-EI m/z 485 [M⁺].

Пример 83. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-[5-(3-хлорфенилсульфамил)-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

(3-Хлорфенил)амид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфонокислоты (120 мг, 0,38 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг). При этом получают 150 мг (выход 69%) требуемого соединения в виде твердого вещества желто-оранжевого цвета.

¹Н ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,26 (s, br, 1H, NH), 10,30 (s, br, 1H, NH), 8,26 (d, 1H), 7,79 (s, 1H, Н-винил), 7,51-7,57 (m, 2H), 7,22 (t, J=8,1 Гц, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,44 (m, 2H, CH₂), 2,57 (t, J=7,0 Гц, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-EI m/z 568 [M⁺].

Пример 84. (2-Пирролидин-1-ил-этил)амид 2,4-диметил-5-[2-оксо-5-(пиридин-3-илсульфамил)-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил]-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Пиридин-3-иламид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты (110 мг, 0,38 ммоль) конденсируют с (2-пирролидин-1-ил-этил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг), при этом получают 150 мг (74%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹Н-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,58 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J=2,0 Гц, 2H), 8,04 (m, 1H), 7,76 (s, 1H, Н-винил), 7,49-7,54 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 7,14 (m, 1H), 6,94 (d, J=8,5 Гц, 1H), 3,33 (m, 2H, CH₂), 2,56 (t, J=7,06 Гц, 2H, CH₂), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,43 (s, 6H, 2xCH₃), 1,68 (m, 4H, 2xCH₂).

МС m/z 535 [M⁺].

Пример 85. 3-[3,5-Диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-илметил]-4-(2-гидроксиэтил)-1,3-дигидроиндол-2-он.

4-(2-гидроксиэтил)-1,3-дигидроиндол-2-он (71 мг, 0,4 ммоль) конденсируют с 3,5-диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-карбальдегидом, при этом получают 90 мг (55%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 14,25 (s, 1H, NH), 10,88 (s, 1H, NH), 7,57 (s, 1H, Н-винил), 7,03 (m, 1H), 6,75-6,82 (m, 2H), 4,86 (m, 1H, OH), 3,70 (m, 2H, CH₂), 3,04 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 4H, 2xCH₂), 2,28 (br s, 7H), 2,19 (s, 3H, CH₃), 2,18 (s, 3H, CH₃).

МС m/z (+ve) 4.09.3 [M⁺].

Пример 86. Фениламид 3-[3,5-диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-илметил]-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты.

Фениламид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты (110 мг, 0,4 ммоль) конденсируют с 3,5-диметил-4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)-1Н-пиррол-2-карбальдегидом (100 мг), при этом получают 50 мг (24%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н-ЯМР(300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,52(s, 1H, NH), 11,26 (s, 1H,NH), 10,08 (s, 1H, NH), 8,21 (d, J=1,6 Гц, 1H), 7,75 (s, 1H, Н-винил), 7,50 (dd, J=1,6 & 8,3 Гц, 1H), 7,19 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 6,97 (m, 2H), 2,49 (m, 4H, 2xCH₂), 2,28 (m, 10H, 2xCH₃ & 2xCH₂), 2,18 (s, 3H, CH₃).

МС-EI m/z 519 [M⁺].

Пример 87. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-диметилсульфамил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Диметиламид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты (90 мг, 0,38 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг), при этом получают 80 мг (43%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,30 (s, 1H, NH), 8,27 (d, J=1,7 Гц, 1H), 7,94 (s, 1H, Н-винил), 7,49 (dd, J=1,7 и 8,0 Гц, 1H), 7,44 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,07 (d, J=8,0 Гц, 1H), 3,26 (m, 2H, CH₂), 2,60 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,53 (m, 2H, CH₂), 2,45-2,50 (m, 10H, 2xCH₃ и N(CH₂CH₃)₂), 0,96 (t, J=7,2 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС-EI m/z 487 [M⁺].

Пример 88. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[5-(3-хлорфенилсульфамил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

(2-Хлорфенил)амид 2-оксо-2,3-дигидро-1Н-индол-5-сульфоновой кислоты (120 мг, 3,8 ммоль) конденсируют с (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (100 мг), при этом получают 80 мг (37%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтого цвета.

¹Н-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,55 (s, 1H, NH), 11,24(s, 1H, NH), 10,29 (s, 1H, NH), 8,25 (d, J=1,87 Гц, 1H), 7,79 (s, 1H, Н-винил), 7,52 (dd, J=1,87 и 8,3 Гц, 1H), 7,42 (m, 1H, CONHCH₂CH₂), 7,22 (t, J=8,02 Гц, 1H), 7,15 (t, J=2 Гц, 1H), 7,08 (m, 1H), 7,0 (m, 2H), 3,27 (m, 2H, CH₂), 2,48-2,57 (m, 6H, 3xCH₂), 2,45 (s, 3H, CH₃), 2,44 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J=7,0 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС m/z 570,1 [M⁺].

Пример 95. Этиловый эфир 3-(2-оксо-5-фенил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2Н-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,74 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,13 (d, J=1,7 Гц, 1H), 7,74 (s, 1H, Н-винил), 7,70 (d, J=7,7 Гц, 2H), 7,49 (dd, J=1,7 и 8,0 Гц, 1H), 7,44 (t, J=7,7 Гц, 2H), 7,32 (m, 1H), 6,96 (d, J=8,0 Гц, 1H), 4,26 (q, J=7,0 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,72 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂), 1,30 (t, J=7,0 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС-EI m/z 412 [M⁺].

Пример 99. Этиловый эфир 3-(2-оксо-5-фенилсульфамоил-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-4,5,6,7-тетрагидро-2H-изоиндол-1-карбоновой кислоты.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,64 (s, 1H, NH), 11,33 (s, 1H, NH), 10,07 (s, 1H, NH), 8,24 (d, J=1,8 Гц, 1H), 7,74 (s, 1H, Н-винил), 7,57 (dd, J=1,8 и 8,0 Гц, 1H), 7,21 (t, J=7,6 Гц, 2H), 7,11 (d, J=7,6 Гц, 2H), 6,99 (d, J=8,0 Гц, 1H), 6,98 (d, J=7,6 Гц, 1H), 4,27 (q, J=7,0 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 2,80 (m, 2H, CH₂), 2,73 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂), 1,30 (t, J=7,0 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС-EI m/z 491 [M⁺].

Пример 109. 3-[3-(Морфолин-4-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2H-изоиндол-1-илметиле]-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-6-карбоновая кислота.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,75 (br.s, 1H, COOH), 11,08 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,71 (s, 1H, Н-винил), 7,62 (dd, J=1,4 и 7,8 Гц, 1H), 7,41 (d, J=1,4 Гц, 1H), 3,65 (m, 4H, 2xCH₂), 3,55 (m, 4H, 2xCH₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,54 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-EI m/z 421 [M⁺].

Пример 112. 5-Бром-3-[3-(пирролидин-1-карбонил)-4,5,6,7-тетрагидро-2H-изоиндол-1-ил-метиле]-1,3-дигидроиндол-2-он.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,56 (s, 1H, NH), 11,00 (s, 1H, NH), 8,05 (d, J=1,8 Гц, 1H), 7,74 (s, 1H, Н-винил), 7,28 (dd, J=1,3 и 8,3 Гц, 1H), 6,83 (d, J=8,3 Гц, 1H), 3,57 (m, 4H, 2xCH₂), 2,79 (m, 2H, CH₂), 2,65 (m, 2H, CH₂), 1,88 (m, 4H, 2xCH₂), 1,71 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-EI m/z 439 и 441 [M⁺-1] и [M⁺+1].

Пример 114. 3-(3-Диметилкарбамоил-4,5,6,7-тетрагидро-2H-изоиндол-1-ил-метиле)-2-оксо-2,3-дигидро-1H-индол-6-карбоновая кислота.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,60 (s, 1H, NH), 12,72 (br.s, 1H, COOH), 11,05 (s, 1H, NH), 7,85 (d, J=7,9 Гц, 1H), 7,72 (s, 1H, Н-винил), 7,62 (dd, J=1,3 и 7,9 Гц, 1H), 7,42 (d, J=1,3 Гц, 1H), 3,03 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2,81 (m, 2H, CH₂), 2,55 (m, 2H, CH₂), 1,73 (m, 4H, 2xCH₂).

МС-EI m/z 379 [M⁺].

Пример 115. 4-Метил-5-(5-метилсульфамоил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-3-карбоновая кислота.

¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,56 (br.s, 1H, NH), 8,24 (d, J=1,5 Гц, 1H), 7,86 (s, 1H, Н-винил), 7,74 (d, J=2,96 Гц, 1H), 7,56 (dd, J=1,5 и 8,1 Гц, 1H), 7,20 (br.m, 1H, NHCH₃), 7,03 (d, J=8,1 Гц, 1H), 2,57 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃).

МС-EI m/z 361 [M⁺].

Пример 116. Этиловый эфир {[4-метил-5-(4-метил-5-метилсульфамоил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-3-карбонил]амино}уксусной кислоты.

Этиловый эфир 4-метил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (описано в работе D.O. Cheng, T.L. Bowman и E. LeGoff, J. Heterocyclic Chem., 1976; т. 13, стр. 1145-1147) формилируют с использованием метода А, гидролизуют с использованием метода Б, с последующим амидированием (метод В), при этом получают этиловый эфир [(5-формил-4-метил-1H-пиррол-3-карбонил)амино]уксусной кислоты.

4-Метил-5-метиламиносульфонил-2-оксиндол (50 мг, 0,21 ммоль) конденсируют с этиловым эфиром [(5-формил-4-метил-1H-пиррол-3-карбонил)амино]уксусной кислоты (100 мг, 0,42 ммоль) и пиперидином (0,1 мл) в этаноле (2 мл), при этом получают 50 мг (52%) требуемого соединения.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,59 (s, 1H, NH), 11,29 (very br.s, 1H, NH-CO), 8,33 (t, J=5,8 Гц, 1H, CONHCH₂), 7,83 (d, J=3,11 Гц, 1H), 7,80 (s, 1H, Н-винил), 7,71 (d, J=8,5 Гц, 1H), 7,34 (br.m, 1H, NHCH₃), 6,89 (d, J=8,5 Гц, 1H), 4,11 (q, J=7,1 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J=5,8 Гц, 2H, GlyCH₂), 2,86 (s, 3H, CH₃), 2,48 (s, 3H, CH₃), 2,42 (d, J=4,71 Гц, 3H, HNCH₃), 1,20 (t, J=7,1 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС-EI m/z 460 [M⁺].

Пример 117. Этиловый эфир {[4-метил-5-(5-метилсульфамоил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1H-пиррол-3-карбонил]амино}уксусной кислоты.

Смесь 5-метиламиносульфонил-2-оксиндола (0,06 г, 0,22 ммоль), этилового эфира[(5-формил-4-метил-1H-пиррол-3-карбонил)амино]уксусной кислоты (0,075 г, 0,27 ммоль) и пиперидина (2 капли) в этаноле (5 мл) нагревают в закрытой емкости при 90°C в течение 12 ч. После охлаждения осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом, растирают со смесью дихлорметан/эфир и сушат, при этом получают 0,035 г (36%) требуемого соединения в виде твердого вещества желтовато-коричневого цвета.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,6(S, 1H, NH), 11 (very br.s, 1H, NH-CO), 8,30 (t, J=5,7 Гц, 1H, CONHCH₂), 8,25 (d, J=1,2 Гц, 1H), 7,88 (s, 1H, Н-винил), 7,84 (d, J=3,3 Гц, 1H), 7,57 (dd, J=1,9 и 8,5 Гц, 1H), 7,14 (br.m, 1H, NHCH₃), 7,04 (d, J=8,5 Гц, 1H), 4,11 (q, J=6,7 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (d, J=5,7 Гц, 2H,

GlyCH₂), 2,55 (s, 3H, CH₃), 2,41 (m, 3H, NCH₃), 1,20 (t, J=6,7 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС m/z 446 [M⁺].

Пример 118. {[4-Метил-5-(5-метилсульфамоил-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбонил]амино}уксусная кислота.

Смесь этилового эфира [(5-формил-4-метил-1Н-пиррол-3-карбонил)амино]уксусной кислоты (0,142 г, 0,59 ммоль) и 1н. NaOH (1,2 мл) в метаноле (10 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют и полученный осадок конденсируют с 5-метиламиносульфонил-2-оксиндолом (0,13 г, 0,48 ммоль) и пиперидином (0,12 мл) в этаноле (12 мл), при этом получают 0,11 г (52%) требуемого соединения.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,98 (br.s, 1H, NH), 8,17 (s, 1H), 7,80 (s, 1H), 7,75 (d, J=3,1 Гц, 1H), 7,51 (dd, J=2 и 8,2 Гц, 1H), 7,21 (m on br.s, 2H), 6,97 (d, J=8,1 Гц, 1H), 3,41 (d, J=4,2 Гц, 2H, CH₂NH), 2,54 (s, 3H, пиррол-CH₃), 2,39 (s, 3H, ArCH₃).

МС m/z 417 [M-1]⁺.

Пример 120. 5-Метил-2-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,77 (br.s, 1H, NH), 12,49 (s, 1H, COOH), 11,07 (s, 1H, NH), 8,39 (s, 1H, Н-винил), 7,43 (d, J=7,47 Гц, 1H), 7,20 (t, J=7,47 Гц, 1H), 7,03 (t, J=7,47 Гц, 1H), 6,91 (d, J=7,47 Гц, 1H), 6,49 (d, J=1,53 Гц, 1H), 2,34 (s, 3H, CH₃).

МС m/z 269 [M+H]⁺.

Пример 121. Этиловый эфир 5-метил-2-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,79 (br.s, 1H, NH), 11,08 (s, 1H, NH), 8,31 (s, 1H, Н-винил), 7,45 (d, J=7,52 Гц, 1H), 7,20 (t, J=7,52 Гц, 1H), 7,03 (t, J=7,52 Гц, 1H), 6,91 (d, J=7,52 Гц, 1H), 6,50 (d, J=2,1 Гц, 1H), 4,26 (q, J=7,2 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 2,33 (s, 3H, CH₃), 1,32 (t, J=7,2 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС m/z 297,1 [M+H]⁺.

Пример 122. Этиловый эфир 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

¹Н-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,72 (br.s, 1H, NH), 11,16 (s, 1H, NH), 8,29 (s, 1H, Н-винил), 7,53 (d, J=2,0 Гц, 1H), 7,35 (dd, J=2,0 и 8,05 Гц, 1H), 6,87 (t, J=8,05 Гц, 1H), 6,53 (d, J=2,4 Гц, 1H), 4,28 (q, J=7,03 Гц, 2H, OCH₂CH₃), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,33 (t, J=7,03 Гц, 3H, OCH₂CH₃).

МС m/z 375 и 377 [M+H]⁺.

Пример 123. 2-(5-Бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновая кислота.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,72 (br.s, 1H, NH), 12,57 (s, 1H, COOH), 11,19 (s, 1H, NH), 8,36 (s, 1H, Н-винил), 7,51 (d, J=1,4 Гц, 1H), 7,34 (dd, J=1,4 и 8,17 Гц, 1H), 6,87 (t, J=8,17 Гц, 1H), 6,52 (d, J=2,5 Гц, 1H), 2,35 (s, 3H, CH₃).

МС m/z 347 и 349 [M+H]⁺.

Пример 124. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Краствору 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (250 мг, 1,63 ммоль) в диметилформамиде (3 мл) добавляют 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (376 мг, 1,2 экв.), 1-гидроксибензотриазол (265 мг, 1,2 экв.), триэтиламин (0,45 мл, 2 экв.) и 1-(2-аминоэтил)пирролидин (0,23 мл, 1,1 экв.). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь разбавляют насыщенным раствором бикарбоната натрия и соевым раствором (содержащим избыток соли), экстрагируют 10% раствором метанола в дихлорметане. Объединенные органические слои промывают соевым раствором, сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют, при этом получают 130 мг (2-пирролидин-1-илэтил)амида 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь 5-бром-2-оксиндола (106 мг, 0,5 ммоль), (2-пирролидин-1-ил-этил)амида 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (125 мг, 1 экв.) и пиперидина (0,2 мл) в этаноле (2 мл) нагревают в закрытой емкости при 80 °С в течение 1 ч и затем охлаждают. Полученный осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и этилацетатом, сушат, при этом получают требуемое соединение в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹Н-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,62 (s, 1H, NH), 11,06 (br.s, 1H, NH), 8,56 (s, 1H, Н-винил), 8,15 (m, 1H, CONHCH₂), 7,48 (d, J=1,8 Гц, 1H), 7,31 (dd, J=1,8 и 7,9 Гц, 1H), 6,86 (d, J=7,9 Гц, 1H), 6,60 (d, J=2,3 Гц, 1H), 3,35 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 2,56 (t, J=6,91 Гц, 2H, HNCH₂CH₂), 2,35 (s, 3H, CH₃), 1,67 (m, 4H, 2xCH₂).

МС m/z 443 и 445 [M⁺ и M⁺+2].

Пример 125. (2-Диэтиламиноэтил)амид 2-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

К раствору 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (320 мг, 2,1 ммоль) в диметилформамиде (3 мл) добавляют 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (483 мг, 1,2 экв.), 1-гидроксибензотриазол (340 мг, 1,2 экв.), триэтиламин (0,59 мл, 2 экв.) и N,N-диэтилэтилендиамин (0,32 мл, 1,1

экв.). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи реакционную смесь разбавляют насыщенным раствором бикарбоната натрия и соевым раствором (содержащим избыток соли), экстрагируют 10% раствором метанола в дихлорметане. Объединенные органические слои промывают соевым раствором, сушат над безводным сульфатом натрия и концентрируют, при этом получают (2-диэтиламиноэтил) амид 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь 5-бром-2-оксидола (106 мг, 0,5 ммоль), (2-диэтиламиноэтил)амида 2-формил-5-метил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (126 мг, 1 экв.) и пиперидина (0,2 мл) в этаноле (2 мл) нагревают в закрытой емкости при 80°C в течение 1 ч и затем охлаждают. Полученный осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и этилацетатом, сушат, при этом получают требуемое соединение в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H-ЯМР (360 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,62(s, 1H, NH), 11,11 (br.s, 1H, NH), 8,54 (s, 1H, Н-винил), 8,1 (m, 1H, CONHCH₂), 7,49 (d, J=2,2 Гц, 1H), 7,31 (dd, J=2,2 и 8,3 Гц, 1H), 6,86 (d, J=8,3 Гц, 1H), 6,58 (d, J=2,24 Гц, 1H), 3,31 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 2,59 (m, 6H, 3xCH₂), 2,36 (s, 3H, CH₃), 0,99 (t, J=6,8 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС m/z 445 и 447 [M⁺ и M⁺+2].

Пример 126. (2-Диэтиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь 1,3-дигидроиндол-2-она (266 мг, 2 ммоль), (2-диэтиламиноэтил)амида 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (530 мг, 2 ммоль) и пиперидина (1 капля) в этаноле нагревают при 90°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, полученный осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и сушат, при этом получают 422 мг (55%) требуемого соединения в виде твердого вещества светло-желтого цвета.

¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,7 (s, 1H, NH), 10,9 (s, 1H, NH), 7,88 (d, J=7,6 Гц, 1H), 7,64 (s, 1H, Н-винил), 7,41 (t, J=5,4 Гц, 1H, NH), 7,13 (dt, J=1,2 и 7,6 Гц, 1H), 6,99 (dt, J=1,2 и 7,6 Гц, 1H), 6,88 (d, J=7,6 Гц, 1H), 3,28 (m, 2H), 2,48-2,55 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J=7,2 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС +ve АРСІ 381 [M⁺+1].

Пример 127. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Смесь 5-хлор-1,3-дигидроиндол-2-она (335 мг, 2 ммоль), (2-диэтиламиноэтил) амида 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (530 мг, 2 ммоль) и пиперидина (1 капля) в этаноле нагревают при 90°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, полученный осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и сушат, при этом получают 565 мг (68%) требуемого соединения в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 13,65 (s, 1H, NH), 11,0 (s, 1H, NH), 7,98 (d, J=2,1 Гц, 1H), 7,77 (s, 1H, Н-винил), 7,44 (t, NH), 7,13 (dd, J=2,1 и 8,4 Гц, 1H), 6,87 (d, J=8,4 Гц, 1H), 3,28 (g, 2H), 2,48-2,53 (m, 6H), 2,44 (s, 3H, CH₃), 2,43 (s, 3H, CH₃), 0,97 (t, J=7,0 Гц, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС +ve АРСІ 415 [M⁺+1].

Пример 128. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

1,3-Дигидроиндол-2-он конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, при этом получают требуемое соединение.

МС +ve АРСІ 379 [M⁺+1].

Пример 129. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фтор-1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, при этом получают требуемое соединение.

МС +ve АРСІ 397 [M⁺+1].

Способ получения в препаративном масштабе.

5-Формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (61 г), 5-фтор-1,3-дигидроиндол-2-он (79 г), этанол (300 мл) и пирролидин (32 мл) кипятят с обратным холодильником в течение 4,5 ч. К смеси добавляют уксусную кислоту (24 мл) и продолжают кипятить с обратным холодильником еще 30 мин. Смесь охлаждают до комнатной температуры и твердую фазу собирают фильтрованием в вакууме и затем промывают дважды этанолом. Твердую фазу перемешивают в течение 130 мин в 40% растворе ацетона в воде (400 мл), содержащем 12н. соляную кислоту (6,5 мл). Твердую фазу собирают фильтрованием в вакууме и дважды промывают 40% раствором ацетона в воде. Твердую фазу сушат в вакууме, при этом получают 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (86 г, выход 79%) в виде твердого вещества оранжевого цвета. ¹H-ЯМР (диметилсульфоксид-d₆) δ 2,48, 2,50 (2xs, 6H, 2xCH₃), 6,80, 6,88, 7,68, 7,72 (4xm, 4H, ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 12,12 (s, 1H, COOH), 13,82 (s, 1H, пиррол NH). МС m/z 299 [M-1].

5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую ки-

слоту (100 г) и диметилформамид (500 мл) перемешивают и к смеси добавляют гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-окси-трис(диметиламино)фосфония (221 г), 1-(2-аминоэтил)пирролидин (45,6 г) и триэтиламин (93 г). Смесь перемешивают в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Твердый продукт собирают фильтрованием в вакууме и промывают этанолом. Твердую фазу промывают перемешиванием в этаноле (500 мл) в течение 1 ч при 64 °С и охлаждают до комнатной температуры. Твердую фазу собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом и сушат в вакууме, при этом получают (2-пирролидин-1-илэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (101,5 г, выход 77%). ¹Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d6) δ 1,60 (m, 4H, 2xCH₂), 2,40, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,50 (m, 4H, 2xCH₂), 2,57, 3,35 (2xt, 4H, 2xCH₂), 7,53, 7,70, 7,73, 7,76 (4xt, 4H, ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, пиррол NH). МС m/z 396 [M+1].

Пример 130. (2-Пирролидин-1-илэтил)амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Хлор-1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с (2-пирролидин-1-илэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, при этом получают требуемое соединение.

МС + ve АРСІ 413 [M⁺+1].

Пример 131. (2-Диметиламиноэтил)амид 2,4-диметил-5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, при этом получают требуемое соединение.

¹Н-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ 13,63 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH), 7,78 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,63 (s, 1H, Н-винил), 7,48 (t, 1H, NH), 7,13 (dt, 1H), 6,98 (dt, 1H), 6,88 (d, J=7,7 Гц, 1H), 3,31 (q, J=6,6 Гц, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС +ve АРСІ 353 [M⁺+1].

Пример 132. (2-Диметиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-Фтор-1,3-дигидроиндол-2-он конденсируют с (2-диметиламиноэтил)амидом 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, при этом получают требуемое соединение.

¹Н-ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6) δ 13,68 (s, 1H, NH), 10,90 (s, 1H, NH), 7,76 (dd, J=2,4 и 9,4 Гц, 1H), 7,71 (s, 1H, Н-винил), 7,51 (t, 1H, NH), 6,93 (m, 1H), 6,84 (dd, J=4,6 и 8,4 Гц, 1H), 3,31 (q, J=6,6 Гц, 2H), 2,43 (s, 3H, CH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃), 2,38 (t, J=6,6 Гц, 2H), 2,19 (s, 6H, N(CH₂CH₃)₂).

МС + ve АРСІ 371 [M⁺+1].

Пример 193. (2-Этиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

(2-Этиламиноэтил)амид 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (99 г), этанол (4000 мл), 5-фтор-2-оксиндол (32 г) и пирролидин (1,5 г) кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч при перемешивании. Смесь охлаждают до комнатной температуры и твердую фазу собирают фильтрованием в вакууме. Твердые вещества перемешивают в этаноле при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры и собирают фильтрованием в вакууме. Продукт сушат в вакууме, при этом получают (2-этиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (75 г, выход 95%).

¹Н-ЯМР (диметилсульфоксид-d6) δ 1,03 (t, 3H, CH₃), 2,42, 2,44 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,56 (q, 2H, CH₂), 2,70, 3,30 (2xt, 4H, 2xCH₂), 6,85, 6,92, 7,58, 7,72, 7,76 (5xm, 5H, ароматика, винил и CONH), 10,90 (br.s, 1H, CONH), 13,65 (br.s, 1H, пиррол NH). МС m/z 369 [M-1].

Пример 195. (2-Диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Метод А. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (598 мг) и дихлорметан (60 мл) на ледяной бане обрабатывают 3-хлорпербензойной кислотой (336 мг), смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель упаривают на ротационном испарителе и остаток суспендируют в метаноле (20 мл). К смеси добавляют воду (20 мл), содержащую гидроксид натрия (240 мг) и смесь перемешивают в течение 1 ч. Осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают 5 мл воды и сушат в вакууме, при этом получают (2-диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (510 мг, выход 82%) в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹Н-ЯМР (ДМСО-d6) δ 13,72 (br.s, 1H, NH), 11,02 (br.s, 1H, CONH), 9,81 (br.s, 1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, ароматика), 7,70 (s, 1H, ароматика), 6,93 (td, 1H, ароматика), 6,84 (m, 1H, ароматика), 3,63 (m, 2H, CH₂), 3,29 (m, 2H, CH₂), 3,14 (m, 4H, 2xCH₂), 2,47 (s, 1H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,64 (t, 6H, 2xCH₃). МС m/z 415 [M+1].

Метод Б. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (10 г) суспендируют в дихлорметане (100 мл) и охлаждают на водяной бане. К смеси при перемешивании добавляют 3-хлорпероксибензойную кислоту (13,1 г) и смесь нагревают до комнатной температуры и затем

перемешивают в течение ночи. Смесь упаривают на роторном испарителе досуха и хроматографируют на колонке с силикагелем, элюируют 20% раствором метанола в дихлорметане. Содержащие продукт фракции объединяют и упаривают на роторном испарителе досуха, при этом получают (2-диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (9 г, выход 83%).

(2-Диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 5-формил-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (9 г), 5-фтор-1,3-дигидроиндол-2-он (3 г) и пирролидин (0,1 г) кипятят с обратным холодильником в этаноле (30 мл) в течение 4 ч. Смесь охлаждают на ледяной бане и осадок собирают фильтрованием в вакууме, промывают этанолом. Твердое вещество перемешивают в этилацетате (30 мл), собирают фильтрованием в вакууме, промывают этилацетатом и сушат в вакууме, при этом получают (2-диэтил-N-оксоаминоэтил)амид 3-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (10,3 г, выход 80%) в виде твердого вещества оранжевого цвета.

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 13,72 (br s, 1H, NH), 11,02 (br s, 1H, CONH), 9,81 (br s, 1H, CONH), 7,75 (dd, 1H, ароматика), 7,70 (s, 1H, ароматика), 6,93 (td, 1H, ароматика), 6,84 (m, 1H, ароматика), 3,63 (m, 2H, CH₂), 3,29 (m, 2H, CH₂), 3,14 (m, 4H, 2xCH₂), 2,47 (s, 1H, CH₃), 2,45 (s, 3H, CH₃), 1,64 (t, 6H, 2xCH₃). MS m/z415 [M+1].

Пример 190. [2-(Пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (120 мг, 0,4 ммоль) встряхивают с EDC-HCl (96 мг, 0,5 ммоль), безводным 1-гидроксibenзотриазолом (68 мг, 0,5 ммоль) и 2-(2-аминоэтилпиридином) фирмы Aldrich в безводном ДМФ (3 мл) в течение 2-3 суток при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляют 1М раствором NaHCO₃ (1,5 мл), затем 8 мл воды. Выпавший в осадок неочищенный продукт собирают фильтрованием, промывают водой, сушат и очищают кристаллизацией или хроматографией, при этом получают [2-(пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Пример 189. [2-(Пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Соединение получают в соответствии с предыдущим примером, но вместо 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты используют 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (127 мг), при этом получают [2-(пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Пример 191. [2-(Пиридин-1-ил)этил]амид 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Соединение получают в соответствии с примером 190, но вместо 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты используют 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (113 мг), при этом получают [2-(пиридин-1-ил)этил]амид 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Пример 192. [2-(Пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Соединение получают в соответствии с примером 190, но вместо 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты используют 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (145 мг), при этом получают [2-(пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Пример 203. [2-(Пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Соединение получают в соответствии с примером 190, но вместо 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты используют 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (123 мг), при этом получают [2-(пиридин-1-ил)этил]амид 5-[5-циано-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Примеры 142, 186, 187, 188 и 204.

Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 1-(2-аминоэтил)пирролидин фирмы Aldrich Chemical Company Inc., при этом получают требуемые соединения.

Примеры 143-147. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 1-(2-аминоэтил)имидазолин-2-он, полученный нагреванием диметилкарбоната с бис(2-аминоэтил)амином (2 экв.) в закрытой колбе при 150°C в течение 30 мин, с использованием методики, описанной в патенте США N 2613212 (1950), выданном Rohm &

Naas Co. Неочищенный продукт очищают на силикагеле с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:25:2, при этом получают требуемые соединения.

Примеры 148-151 и 184.

Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют этиловый эфир 4-(2-аминоэтил)пиперазин-1-уксусной кислоты, который получают следующим образом: этиловый эфир пиперазин-1-уксусной кислоты (11,22 г) обрабатывают иодацетонитрилом (5,0 мл) в присутствии карбоната кальция (6,9 г) в этилацетате (260 мл) при 0°C. После завершения добавления иодацетонитрила (45 мин) реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 11 ч. Реакционную смесь фильтруют и фильтраты упаривают. Остаток гидрируют в присутствии бориды кобальта (полученного из CoCl_2 и боргидрида натрия) при комнатной температуре при 344,75 кПа в течение 2 суток в этаноле. Полученную смесь фильтруют, упаривают и очищают хроматографией с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:25:2, при этом получают требуемый амин (3,306 г) в виде маслообразного вещества светло-желтого цвета, при этом получают требуемые соединения.

Примеры 152-153. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 2-[(2-аминоэтиламино)]ацетонитрил (который получают следующим образом: раствор иодацетонитрила (50 ммоль) в этиловом спирте (80 мл) добавляют к раствору этилендиамина (150 мл) в этиловом спирте (60 мл) при 0°C в течение 30 мин. Перемешивание продолжают в течение еще 1 ч при 0°C, затем при комнатной температуре в течение 14 ч. Добавляют 55 ммоль карбоната калия, перемешивают в течение 30 мин, фильтруют и фильтрат концентрируют при комнатной температуре. Остаток очищают хроматографией на силикагеле с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:15:1,5, при этом получают 2-[(2-аминоэтиламино)]ацетонитрил (3,550 г), который немедленно используют), при этом получают требуемые соединения.

Примеры 154-158. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 1-(3-аминопропил)азепин-2-он (который получают по методике, описанной в работе Kraft A., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1999, т.1, N 6, стр. 705-14, за исключением того, что гидролиз DBU проводят точно при 145°C в присутствии гидроксида лития (1 ч, 5 мл DBU, 2 мл воды, 420 мг гидрата гидроксида лития). Неочищенный продукт очищают на силикагеле с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:40:4, при этом получают 1-(3-аминопропил)азепин-2-он (4,973 г, выход 87%), при этом получают требуемые соединения.

Примеры 133-135, 159 и 200. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют N-ацетилэтилендиамин (который получают нагреванием смеси этилацетата с этилендиамином (1,5 экв.) при 160 °C в течение 1 ч в закрытом сосуде. После перегонки в вакууме получают требуемый продукт с выходом 56%. N-ацетилэтилендиамин также производит фирма Aldrich), при этом получают требуемые соединения.

Примеры 146-140. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 1-(3-аминопропил)тетрагидропиримидин-2-он, который получают аналогично 1-(3-аминопропил)азепин-2-ону в соответствии с методикой, описанной в работе Kraft A., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1999, т.1, N 6, стр. 705-14. Краткое описание: 1,3,4,6,7,8-гексагидро-2Н-пиримидо[1,2-а]пиримидин (4,939 г), гидрат гидроксида лития (918 мг) и 2 мл воды нагревают без растворителя в закрытом сосуде до 145°C в течение 1 ч. Неочищенный продукт очищают на колонке с силикагелем с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:40:4, при этом получают чистый амин (5,265 г, выход 94%).

Примеры 141, 160-162 и 185.

Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 1-(2-аминоэтил)пиперазин-2-он (который получают следующим образом: чистый трет-бутилдифенилсиллилхлорид (25 мл, 97,7 ммоль) по каплям добавляют в раствор DBU (19,5 мл, 130 ммоль) и бис(2-аминоэтил)амин (4,32 мл, 40 ммоль) в безводном диметилацетамиде (80 мл) при комнатной температуре при охлаждении на водяной бане в течение 5 мин. Смесь перемешивают в течение 5 ч. Затем осторожно добавляют этиловый эфир бромуксусной кислоты (6,7 мл, 60 ммоль) при охлаждении до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивают в течение 25 мин, затем упаривают в высоком вакууме. Остаток растворяют в метаноле (200 мл), добавляют KHCO_3 (10 г) и KF (12 г, 200 ммоль) и смесь перемешивают при 60°C в течение 5 ч. Добавляют 10 г Na_2CO_3 , перемешивают в течение 10 мин, охлаждают и фильтруют. Фильтраты упаривают. Остаток экстрагируют гексаном (2 раза по 250 мл). Нерастворимое в гексане соединение растворяют в этаноле (60 мл), фильтруют и упаривают. Неочищенный остаток очищают на силикагеле с использованием в качестве элюента смеси хлороформ/метанол/водный раствор аммиака, 80:40:4, при этом получают чистый амин (4,245 г, выход 74%), при этом получают требуемые соединения.

Примеры 163-167. Соединения получают в соответствии с описанием примеров 190, 189, 191, 192 и 203, но вместо 2-(2-аминоэтил)пиридина используют 3-[(2-аминоэтил)амино]пропионитрил (который

получают из этилендиамина (150 ммоль) и акрилонитрила (50 ммоль) в ТГФ при комнатной температуре, как описано в работе Israel M. и соавт., J. Med. Chem., 1964, т. 7, стр. 710-16, при этом получают требуемый амин (4,294 г)), при этом получают требуемые соединения.

Пример 168. [2-(4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой опалесцирующей смеси желтого цвета 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (90 мг), ДМФ (0,8 мл) и триэтиламина (0,084 мл) в реакционной пробирке объемом 20 мл добавляют реагент ВОР (199 мг). Через 5 мин смесь становится прозрачной. К прозрачной смеси добавляют 2-(4-метилпиперазин-1-ил)этиламин (51 мг). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. В реакционной смеси образуется осадок желтого цвета. По данным тонкослойной хроматографии (10% метанол в хлористом метиле) все исходные вещества превращаются в продукт реакции. Твердое вещество выделяют фильтрованием в вакууме и промывают этанолом (1 мл). Твердую фазу озвучивают в диэтиловом эфире (2 мл) в течение 20 мин и собирают фильтрованием в вакууме. После высушивания в вакууме получают (4-метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (79 мг, выход 62%).

¹Н-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,41 (m, 2H, CH₂), 2,47 (m, 8H, 4CH₂), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,82 (dd, J=4,5, 8,7 Гц, 1H), 6,91 (td, ²J=2,4, ³J=8,8 Гц, 1H), 7,43 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,75 (dd, J=2,8, 9,6 Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,67 (s, 1H, NH).

ЖХ-МС (m/z) 424,4 (M-1).

Пример 169. (4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 168, но вместо 5-[5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты используют 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту (95 мг, 0,3 ммоль), получают (4-метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (76 мг, 58%).

¹Н-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (m, 2H, CH₂), 6,84 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,11 (dd, J=2,0, 8,0 Гц, 1H), 7,44 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, J=2,0 Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,98 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH).

ЖХ-МС (m/z) 440,2 (M-1).

Пример 170. (4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 168, но с заменой 5-(5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты на 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту, получают (4-метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (39 мг, 54%), полученный из SUO11670 (54 мг, 0,15 ммоль).

¹Н-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 2,14 (s, 3H, CH₃), 2,41, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,31 (m, 2H, CH₂), 6,80 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,23 (dd, J=2,0, 8,0 Гц, 1H), 7,44 (t, J=5,6 Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,09 (d, J=2,0 Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH).

ЖХ-МС (m/z) 486,6 (M).

Пример 171. (4-Метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 168, но с заменой 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (SUO14900) на 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновую кислоту, получают (4-метилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-(2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, SUO14903 (136 мг, 84%), полученный из SUO12120 (112,8 мг, 0,4 ммоль).

¹Н-ЯМР (ДМСО-d₆) δ 2,13 (s, 3H, CH₃), 2,39, 2,42 (2xs, 6H, 2xCH₃), 2,42 (m, 2H, CH₂), 2,48 (m, 8H, 4xCH₂), 3,30 (t, 2H, CH₂), 6,86 (d, J=8,0 Гц, 1H), 6,96 (t, J=7,4 Гц, 1H), 7,10 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,41 (t, J=5,4 Гц, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,76 (d, J=7,6 Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,61 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 406,6 (M-1).

Пример 172. [2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

К перемешиваемой опалесцирующей смеси желтого цвета 5-[2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (112,8 мг, 0,4 ммоль), ДМФ (0,5 мл) и триэтиламина (0,111 мл) в реакционной пробирке объемом 20 мл добавляют реагент ВОР (265 мг). Через 5 мин смесь становится прозрачной. К прозрачной смеси добавляют 2-(2,6-диметилпиперазин-1-ил)этиламин (68,6 мг) (см. статью Tapia L Alonso-Cires, P. Lopez-Tudanca, R. Mosquera, L Labeaga, A. Inerarity, A. Orjales, J. Med. Chem., 1999, т. 42, стр. 2870-2880). Полученную смесь перемешивают при

комнатной температуре в течение ночи. По данным тонкослойной хроматографии (10% метанол в хлористом метиле) все исходные вещества превращаются в продукт реакции. Реакционную смесь упаривают досуха и очищают экспресс-хроматографией ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}=20/1-15/1$) и перекристаллизацией, при этом получают [2-(3,5-диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[2-оксо-1,2-дигидрондол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (83 мг, выход 50%).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1,95 (t, $J=11,6$ Гц, 2H, CH_2), 2,41, 2,47 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,50 (m, 2H, CH_2), 3,03 (d, $J=10$ Гц, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,86 (d, $J=8,0$ Гц, 1H), 6,97 (t, $J=7,2$ Гц, 1H), 7,11 (t, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,48 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,75 (d, $J=7,6$ Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 422,2 (M+1).

Пример 173. [2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-Фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 168, получают требуемое соединение (60 мг, 0,2 ммоль).

^1H -ЯМР (ДМСО- d_6) δ 0,891, 0,907 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1,49 (t, $J=10,4$ Гц, 2H), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,41 (m, 2H, CH_2), 2,74 (m, 4H), 3,30 (m, 2H), 6,82 (dd, $J=4,5, 8,7$ Гц, 1H), 6,90 (td, $^2J=2,4$ Гц, $^3J=8,4$ Гц, 1H), 7,42 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,74 (dd, $J=4,6, 8,4$ Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,88 (s, 1H, CONH), 13,65 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 438,4 (M-1).

Пример 174. [2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 171, получают требуемое соединение (31,2 мг, 34%) из 5-[5-хлор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (63 мг, 0,2 ммоль).

^1H -ЯМР(ДМСО- d_6) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1,95 (t, $J=11,6$ Гц, 2H, CH_2), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,50 (m, 2H, CH_2), 3,03 (d, $J=11,2$ Гц, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,85 (d, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,11 (dd, $J=2,0, 8,0$ Гц, 1H), 7,52 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,97 (d, $J=2,0$ Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,63 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 456,2 (M+1).

Пример 175. [2-(3,5-Диметилпиперазин-1-ил)этил]амид 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты.

В соответствии с методикой, описанной в примере 171, получают требуемое соединение (40 мг, 40%) из 5-[5-бром-2-оксо-1,2-дигидроиндол-(3Z)-илиденметил]-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (74 мг, 0,2 ммоль).

^1H -ЯМР(ДМСО- d_6) δ 1,15, 1,16 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1,95 (t, $J=11,6$ Гц, 2H, CH_2), 2,40, 2,42 (2xs, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2,50 (m, 2H, CH_2), 3,03 (d, $J=10,4$ Гц, 2H), 3,19 (m, 2H), 3,30 (m, 2H, CH_2), 6,81 (d, $J=8,4$ Гц, 1H), 7,24 (dd, $J=2,0, 8,4$ Гц, 1H), 7,51 (t, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,10 (d, $J=2,0$ Гц, 1H) (ароматика и винил), 10,99 (s, 1H, CONH), 13,62 (s, 1H, NH). ЖХ-МС (m/z) 498,4 (M-1).

Биологические испытания (примеры)

Описанные ниже исследования были использованы для отбора соединений, проявляющих оптимальный уровень требуемой активности.

А. Методы анализа.

Описанные ниже методы анализа могут быть использованы для определения уровня активности и действия различных соединений по настоящему изобретению на одну или более ПК. Аналогичные методы анализа могут быть выработаны по одним и тем же схемам для любых ПК с применением методик, хорошо известных в данной области техники.

Некоторые из анализов, описанных в настоящем описании, проводят методом ИФА (иммуноферментный анализ) (см. книгу Voller и соавт., "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (Иммуноферментный анализ), Manual of Clinical Immunology (Руководство по клинической иммунологии), Изд. 2-е, под ред. Rose and Friedman, (1980), стр. 359-371, Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C.) В основном, методика анализа заключается в следующем: соединение добавляют к клеткам, природным или рекомбинантным, экспрессирующим исследуемую киназу, инкубируют в течение определенного периода времени, а затем, если исследуемая киназа является рецептором, добавляют лиганд, известный как активатор рецептора. Клетки лизируют и лизат переносят в лунки планшета для ИФА, предварительно покрытые антителами, специфичными к субстрату реакции ферментативного фосфорилирования. Компоненты клеточного лизата, не являющиеся субстратом, отмывают и степень фосфорилирования определяют количественно с использованием антител, специфичных к фосфотирозину, по сравнению с контрольными клетками, не обработанными исследуемым соединением.

Таким образом, ниже приведены наиболее предпочтительные методики определения активности специфичных ПК методом ИФА. Однако, возможные модификации указанных методик для определения активности соединений по отношению к другим членам семейства РТК, а также к КТК и СТК, очевидные для специалистов в данной области техники, включены в объем настоящего изобретения. Другие анализы, описанные в тексте настоящей заявки, позволяют определить количество ДНК, синтезированной в ответ на активацию исследуемой киназы, что является общепринятым методом определения про-

лиферативного ответа. В основном, методика данного анализа заключается в следующем: соединение добавляют к клеткам, природным или рекомбинантным, экспрессирующим исследуемую киназу, инкубируют в течение определенного периода времени, а затем, если исследуемая киназа является рецептором, добавляют лиганд, который известен как активатор рецептора. После инкубирования в течение по крайней мере ночи добавляют реагент для введения метки в ДНК, такой, как бромдезоксисуридин (BrdU) или ^3H -тимидин. Количество меченой ДНК определяют либо при помощи антител анти-BrdU, либо путем измерения радиоактивности, по сравнению с контрольными клетками, не обработанными исследуемым соединением.

Биохимическое исследование GST-FLK-1

Данный метод анализа используют для определения киназной активности рецептора GST-FLK-1 на поли(glu, tyr)пептидах.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты Corning для ИФА, производства фирмы Corning (номер по каталогу 5805-96).
2. Лиофилизирующий препарат поли(gly, tyr) 4:1, производства фирмы Sigma (номер по каталогу PO275).
3. Приготовление планшета, покрытого поли(gly, tyr) (pEY): в каждую лунку наносят 2 мкг поли(gly, tyr) (pEY) в 100 мкл PBS, выдерживают при комнатной температуре в течение 2 ч или при 4 °C в течение ночи. Планшет тщательно закрывают, чтобы исключить испарение.
4. Буферный раствор PBS: на 1 л смешивают 0,2 г K_2HPO_4 , 1,15 г Na_2HPO_4 , 0,2 г KCl и 8 г NaCl в приблизительно 900 мл dH_2O .
Когда все компоненты растворятся, pH доводят до 7,2 с помощью HCl. Конечный объем доводят до 1 л dH_2O .
5. Буферный раствор PBST: на 1 л PBS добавляют 1,0 мл Tween-20.
6. Блокирующий буферный раствор TBV: на 1 л смешивают 1,21 г Трис, 8,77 г NaCl, 1 мл Твин-20 в приблизительно 900 мл dH_2O . pH доводят до 7,2 с помощью HCl. Добавляют 10 г БСА, перемешивают до растворения. Общий объем доводят до 1 л с помощью dH_2O . Отфильтровывают от твердых частиц.
7. 1% раствор БСА в PBS: Чтобы приготовить рабочий исходный раствор 1x, добавляют 10 г БСА к приблизительно 990 мл PBS, перемешивают до растворения. Общий объем доводят до 1 л буфером PBS, отфильтровывают от твердых частиц.
8. Нерес, 50 мМ, pH 7,5.
9. GST-Flk1cd, очищенный от рекомбинантного трансформированного бакуловируса (фирмы SUGEN, Inc.).
10. 4% раствор ДМСО в dH_2O .
11. 10 мМ АТФ в dH_2O .
12. 40 мМ MnCl_2 .
13. Буферный раствор для разбавления киназы (БПК): смешивают 10 мл Нерес (pH 7,5), 1 мл 5 М NaCl, 40 мкл 100 мМ ортованадата натрия и 0,4 мл 5% раствора БСА в dH_2O с 88,56 мл dH_2O .
14. Полипропиленовые 96-луночные планшеты с V-образным дном NUNC (фирмы Applied Scientific, номер по каталогу AS-72092).
15. ЭДТУ: смешивают 14,12 г этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ) с приблизительно 70 мл dH_2O . Добавляют 10н. NaOH до растворения ЭДТУ. pH доводят до 8,0. Общий объем доводят до 100 мл с помощью dH_2O .
16. Буферный раствор для разбавления антител 1°: смешивают 10 мл 5% БСА в PBS с 89,5 мл TBST.
17. Моноклональные антитела, специфичные к фосфотирозину, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (PY99 HRP, Santa Cruz Biotech).
18. 2,2'-Азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота) (ABTS, Moss, номер по каталогу ABST).
19. 10% раствор SDS.

Методика

1. В лунки 96-луночного планшета Corning для ИФА наносят по 2 мкг пептида polyEY в стерильном PBS, как описано на стадии 3 в разделе "Материалы и реагенты".
2. Удаляют несвязанную жидкость из лунок переворачиванием планшета. Промывают один раз TBST. Избыток жидкости удаляют, постукивая планшетом по бумажному полотенцу.
3. В каждую лунку добавляют по 100 мкл 1% раствора БСА в PBS. Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.
4. Повторяют стадию 2.
5. В лунки добавляют 50 мМ раствора Нерес (pH 7,5) (по 150 мкл в лунку).
6. Разбавляют исследуемое соединение смесью dH_2O /4% раствор ДМСО до требуемой конечной концентрации исследуемого соединения (в 4 раза) в полипропиленовых планшетах.
7. В лунки планшета для ИФА наносят по 25 мкл разбавленного исследуемого соединения. В контрольные лунки добавляют по 25 мкл смеси dH_2O /4% раствор ДМСО.

8. В каждую лунку добавляют по 25 мкл 40 мМ раствора $MnCl_2$, содержащего раствор 4х АТФ (2 мкМ).
9. В лунки отрицательного контроля добавляют по 25 мкл 0,5 М ЭДТУ.
10. Разбавляют GST-Flk раствором БРК до концентрации 0,005 мкг (5 пг) в каждой лунке.
11. В каждую лунку наносят по 50 мкл разбавленного фермента.
12. Инкубируют при встряхивании в течение 15 мин при комнатной температуре.
13. Реакцию останавливают добавлением по 50 мкл 250 мМ раствора ЭДТУ (рН 8,0).
14. Промывают три раза TBST и постукивают планшетом по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости.
15. В каждую лунку добавляют по 100 мкл конъюгата антител с HRP против фосфотирозина, разбавление 1:5000 в буфере для разбавления антител. Инкубируют при встряхивании в течение 90 мин при комнатной температуре.
16. Промывают, как описано на стадии 14.
17. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABTS при комнатной температуре.
18. Инкубируют при встряхивании в течение от 10 до 15 мин. Удаляют все пузырьки воздуха.
19. Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 20 мкл 10% раствора SDS.
20. Результаты считывают с использованием ридера для ИФА Dynatech MR7000: фильтр для образца при 410 нм фильтр сравнения при 630 нм.

Биохимическое исследование РYК2

Данный анализ используют для измерения киназной активности *in vitro* рекомбинантной киназы, содержащей последовательность рук2 концевой фрагмента НА эпитопа полной длины (FL.рук2-НА) с использованием метода ИФА.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ИФА фирмы Corning.
2. Моноклональные антитела против НА 12CA5 (фирмы SUGEN, Inc).
3. Буферный раствор PBS (фирмы Gibco, номер по каталогу 450-1300EB).
4. Буферный раствор TBST: на 1 л раствора смешивают 8,766 г NaCl, 6,057 г Трис и 1 мл 0,1% Тритон X-100 в приблизительно 900 мл dH_2O . рН доводят до 7,2, объем доводят до 1 л.
5. Блокирующий буферный раствор: на 1 л раствора смешивают 100 г 10% БСА, 12,1 г 100 мМ Трис, 58,44 г 1М NaCl и 10 мл 1% Твин 20.
6. Лизаты FL.рук2-НА, полученные из клеток sf9 (фирмы SUGEN, Inc).
7. 4% ДМСО в воде MilliQue.
8. 10 мМ АТФ в dH_2O .
9. 1 М $MnCl_2$.
10. 1 М $MgCl_2$.
11. 1 М дитиотреитол (DTT).
12. Исходный буфер 10X для фосфорилирования киназы: смешивают 5,0 мл 1,0 М HEPES (рН 7,5), 0,2 мл 1 М $MnCl_2$, 1,0 мл 1 М $MgCl_2$, 1,0 мл 10% Тритон X-100 в 2,8 мл dH_2O . Непосредственно перед использованием добавляют 0,1 мл 1М DTT.
13. 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном фирмы NUNC.
14. 500 мМ ЭДТУ в dH_2O .
15. Буферный раствор для разбавления антител: на 100 мл раствора смешивают 1 мл 5% БСА/PBS и 1 мл 10% Твин-20 в 88 мл TBS.
16. Конъюгированные с HRP антитела anti-Ptyr PY99 фирмы Santa Cruz, Biotech, номер по каталогу SC-7020.
17. Реактив ABTS фирмы Moss, номер по каталогу ABST-2000.
18. 10% SDS.

Методика:

1. В лунки 96-луночного планшета для ИФА фирмы Corning добавляют по 0,5 мкг антител 12CA5 anti-НА в 100 мкл PBS. Хранят в течение ночи при 4°C.
2. Не связавшиеся антитела против НА удаляют из лунок, переворачивая планшет. Планшет промывают dH_2O . Для удаления избытка жидкости планшетом постукивают по бумажному полотенцу.
3. В каждую лунку добавляют по 150 мкл блокирующего буфера. Инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре.
4. Планшет промывают 4 раза буферным раствором TBS-T.
5. Лизат разбавляют в PBS (1,5 мкг лизата/100 мкл PBS).
6. В каждую лунку добавляют по 100 мкл разбавленного лизата. Встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч.
7. Промывают, как описано на стадии 4.
8. В лунки планшета для ИФА, покрытого рук 2-НА, добавляют по 50 мкл буферного раствора 2X для определения киназной активности.
9. В каждую лунку добавляют по 25 мкл 400 мкМ раствора исследуемого соединения в 4% ДМСО.

В контрольные лунки добавляют только 4% ДМСО.

10. В лунки для отрицательного контроля добавляют по 25 мкл 0,5 М ЭДТУ.
11. Во все лунки добавляют по 25 мкл 20 мкМ АТФ. Инкубируют при встряхивании в течение 10 мин.
12. Реакцию останавливают добавлением во все лунки по 25 мкл 500 мМ ЭДТУ (рН 8,0).
13. Промывают, как указано на стадии 4.
14. В каждую лунку добавляют по 100 мкл HRP-конъюгированных антител anti-Ptyr, разбавленных 1:6000 в буфере для разбавления антител. Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.
15. Планшет промывают 3 раза буферным раствором TBST и 1 раз PBS.
16. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABST.
17. При необходимости развитие реакции останавливают добавлением в каждую лунку по 20 мкл 10% SDS.
18. Планшет считывают с использованием ридера для ИФА (фильтр образца при 410 нм и фильтр сравнения 630 нм).

Биохимическое исследование FGFR1

Данный анализ используют для измерения киназной активности *in vitro* FGF1-R с использованием ИФА.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты Costar для ИФА (фирмы Corning, номер по каталогу 3369).
2. Поли(Cl_u-Tyr) (фирмы Sigma, номер по каталогу PO275).
3. Буферный раствор PBS (фирмы Gibco, номер по каталогу 450-1300EB).
4. 50 мМ буферный раствор Hepes.
5. Блокирующий буфер (5% БСА/PBS).
6. Очищенный GST-FGFR1 (фирмы Sugen, Inc.).
7. Буферный раствор для разбавления киназы. Смешивают 500 мкл 1 М Hepes (Gibco), 20 мкл 5% БСА/PBS, 10 мкл 100 мМ ортованадата натрия и 50 мкл 5 М NaCl.
8. 10 мМ АТФ.
9. Смесь для фосфорилирования АТФ/MnCl₂: смешивают 20 мкл АТФ, 400 мкл 1М MnCl₂ и 9,56 мл dH₂O.
10. 96-луночные полипропиленовые планшеты NUNC с V-образным дном (фирмы Applied Scientific, номер по каталогу AS-72092).
11. 0,5 М ЭДТУ.
12. 0,5% TBST, добавляют 500 мкл Твин и объем доводят до 1 л TBS.
13. Поликлональная сыворотка кролика против фосфотирозина (фирмы SUGEN, Inc.).
14. HRP -конъюгированные козы антитела против IgG кролика (фирмы Biosource, номер по каталогу ALI0404).
15. Раствор ABTS.
16. Раствор ABTS/H₂O₂.

Методика

1. 96-луночные планшеты Costar для ИФА покрывают раствором поли(Glu,Tyr), в каждую лунку добавляют по 1 мкг в 100 мкл PBS. Хранят в течение ночи при 4°C.
2. Планшеты с покрытием промывают 1 раз PBS.
3. В каждую лунку добавляют по 150 мкл блокирующего буфера 5% БСА/PBS. Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.
4. Планшет промывают 2 раза PBS, затем 1 раз 50 мМ Hepes. Для удаления избытка жидкости и пузырьков воздуха планшетом постукивают по бумажному полотенцу.
5. В планшет добавляют по 25 мкл 0,4 мМ раствора исследуемого соединения в 4% ДМСО и в контрольные лунки только 4% ДМСО.
6. Очищенный GST-FGFR1 разбавляют БРК (в каждую лунку по 5 нг киназы/50 мкл БРК).
7. В каждую лунку добавляют по 50 мкл разбавленной киназы.
8. Киназную реакцию инициируют добавлением в каждую лунку по 25 мкл свежеприготовленного раствора АТФ/Mn⁺⁺ (0,4 мл 1 М MnCl₂, 40 мкл 10 мМ АТФ, 9,56 dH₂O).
9. Данная киназная реакция проходит с высокой скоростью и должна быть остановлена добавлением по 25 мкл 0,5 М ЭДТУ способом, аналогичным добавлению АТФ.
10. Планшет промывают 4 раза свежеприготовленным раствором TBST.
11. Готовят буфер для разбавления антител: на 50 мл раствора смешивают 5 мл 5% БСА, 250 мкл 5% сухого молока и 50 мкл 100 мМ раствора ванадата натрия. Конечный объем доводят 0,05% TBST.
12. В каждую лунку добавляют по 100 мкл антител против фосфотирозина (разбавление 1:10000 в растворе для разбавления антител). Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.
13. Промывают, как описано на стадии 10.

14. В каждую лунку добавляют по 100 мкл HRP-конъюгированных козьих антител против IgG кролика (фирмы Biosource) (разбавление 1:6000 в растворе разбавления антител). Инкубируют при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре.

15. Промывают, как описано на стадии 10, и затем PBS для удаления пузырьков воздуха и избытка Твина.

16. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂.

17. Инкубируют при встряхивании в течение от 10 до 20 мин. Все пузырьки воздуха удаляют.

18. Результаты считывают с использованием ридера для ИФА Dynatech MR7000 (фильтр для образца при 410 нм, фильтр сравнения при 630 нм).

Биохимический метод исследования рецептора EGFR

Данный метод предназначен для определения киназной активности *in vitro* рецептора FGF1-R с использованием метода ИФА.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ИФА фирмы Corning.
2. Моноклональные антитела anti-EGFR SUMO1 (производства фирмы Sugen, Inc.).
3. Буферный раствор PBS.
4. Буферный раствор TBST.
5. Блокирующий буферный раствор: на 100 мл раствора смешивают 5,0 г обезжиренного быстрорастворимого молока фирмы Carnation со 100 мл PBS.
6. Лизат клеток A431 (производства фирмы Sugen, Inc.).
7. Буферный раствор TBS.
8. Буферный раствор TBS + 10% ДМСО: на 1 л раствора смешивают 1,514 г Трис, 2,192 г NaCl и 25 мл ДМСО, и конечный объем доводят до 1 л dH₂O.
9. Аденозин-5'-трифосфат (АТФ из мышц лошади, производства фирмы Sigma, номер по каталогу А-5394), 1,0 М раствор в dH₂O. Указанный реагент готовят непосредственно перед использованием и хранят во льду.
10. 1,0 mM MnCl₂.
11. Раствор для фосфорилирования АТФ/MnCl₂: на 10 мл раствора смешивают 300 мкл 1 mM АТФ, 500 мкл MnCl₂ и 9,2 мл dH₂O. Данный реагент готовят непосредственно перед использованием и хранят во льду.
12. 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном NUNC.
13. ЭДТУ.
14. Кроличья поликлональная сыворотка к фосфотирозину (производства фирмы Sugen Inc.).
15. HRP-Конъюгат козьих антител против IgG кролика (фирмы Biosource, номер по каталогу ALI0404).
16. Реагент ABTS.
17. 30% раствор перекиси водорода.
18. Смесь ABTS/H₂O₂.
19. 0,2 М раствор HCl.

Методика

1. 96-луночный планшет для ИФА фирмы Corning обрабатывают антителами SUMO1, добавляя в каждую лунку по 0,5 мкг SUMO1 в 100 мкл PBS, хранят в течение ночи при 4°C.

2. Несвязанные антитела SUMO1 удаляют путем переворачивания планшета и удаления раствора. Планшет промывают 1 раз dH₂O. Избыток раствора удаляют, постукивая планшетом по бумажному полотенцу.

3. В каждую лунку добавляют по 150 мкл блокирующего буферного раствора и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании.

4. Планшет промывают 3 раза деионизированной водой, затем один раз раствором TBST. Планшетом постукивают по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости и пузырьков воздуха.

5. Лизат разбавляют раствором PBS (7 мкг лизата в 100 мкл PBS).

6. В каждую лунку добавляют по 100 мкл разбавленного лизата, планшет встряхивают при комнатной температуре в течение 1 ч.

7. Планшет промывают, как указано на стадии 4 выше.

8. В каждую лунку планшета для ИФА, с нанесенным рецептором EGFR, добавляют по 120 мкл раствора TBS.

9. Исследуемое соединение разбавляют в TBS в соотношении 1:10 и добавляют в лунки.

10. В лунки планшета для ИФА добавляют по 13,5 мкл разбавленного исследуемого соединения. В контрольные лунки добавляют по 13,5 мкл TBS в 10% ДМСО.

11. Планшет инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре и при встряхивании.

12. Во все лунки, кроме лунок с отрицательным контролем, добавляют по 15 мкл смеси для фосфорилирования, конечный объем смеси в каждой лунке должен составлять приблизительно 150 мкл, конечная концентрация компонентов в каждой лунке составляет 3 мкМ АТФ/5 мМ MnCl₂. Планшет инкуби-

руют в течение 5 мин при встряхивании.

13. Реакцию останавливают путем добавления в каждую лунку по 16,5 мкл раствора ЭДТУ при непрерывном встряхивании, после добавления раствора ЭДТУ планшет встряхивают в течение 1 мин.

14. Планшет промывают 4 раза деионизированной водой, два раза раствором TBST.

15. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора антител к фосфотирозину (разбавление в TBST 1:3000). Инкубируют в течение 30-45 мин при комнатной температуре при встряхивании.

16. Промывают, как указано на стадии 4 выше.

17. В каждую лунку добавляют по 100 мкл HRP-конъюгата козьих антител против IgG кролика фирмы Biosource (разбавленного в TBST 1:2000). Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании.

18. Промывают, как указано на стадии 4 выше.

19. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂.

20. Инкубируют в течение от 5 до 10 мин при встряхивании, удаляют любые пузырьки воздуха.

21. При необходимости реакцию останавливают путем добавления в каждую лунку по 100 мкл 0,2 М раствора HCl.

22. Поглощение в лунках измеряют на ридере Dynatech MR7000 ELISA (фильтр для образцов - 410 нм, фильтр сравнения - 630 нм).

Биохимический метод исследования рецептора PDGFR

Данный метод предназначен для определения *in vitro* киназной активности рецептора FGF1-R с использованием метода ИФА.

Материалы и реагенты

1. 96-луночные планшеты для ИФА фирмы Corning.
2. Моноклональные антитела anti-PDGFR 28D4C10 (производства фирмы Sugen, Inc.).
3. Буферный раствор PBS.
4. Буферный раствор TBST.
5. Блокирующий буферный раствор (аналогично буферному раствору, использованному для биоиспытаний EGFR).
6. Лизат клеток NIH 3T3, экспрессирующих рецептор PDGFR-β (производства фирмы Sugen, Inc.)
7. Буферный раствор TBS.
8. Буферный раствор TBS + 10% ДМСО.
9. АТФ.
10. MnCl₂.
11. Смесь для фосфорилирования киназой: на 10 мл раствора смешивают 250 мкл 1 М Трис, 200 мкл 5 М NaCl, 100 мкл 1 М MnCl₂ и 50 мкл 100 мМ Тритона X-100, объем доводят dH₂O до 10 мл.
12. 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном NUNC.
13. ЭДТУ.
14. Кроличья поликлональная сыворотка к фосфотирозину (производства фирмы Sugen Inc.).
15. HRP-Конъюгат козьих антител против IgG кролика (производства фирмы Biosource, номер по каталогу ALI0404).
16. Реагент ABTS.
17. 30% раствор перекиси водорода.
18. Смесь ABTS/H₂O₂.
19. 0,2 М раствор HCl.

Методика

1. 96-луночный планшет для ИФА фирмы Corning обрабатывают антителами, добавляя в каждую лунку по 0,5 мкг 28D4C10 в 100 мкл PBS, хранят в течение ночи при 4°C.

2. Несвязанные антитела 28D4C10 удаляют путем переворачивания планшета для удаления жидкости. Планшет промывают 1 раз dH₂O. Избыток жидкости удаляют, постукивая планшетом по бумажному полотенцу.

3. В каждую лунку добавляют по 150 мкл блокирующего буфера и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре при встряхивании.

4. Планшет промывают 3 раза деионизированной водой, затем один раз раствором TBST. Планшетом постукивают по бумажному полотенцу для удаления избытка жидкости и пузырьков воздуха.

5. Лизат разбавляют раствором HNTG (10 мкг лизата в 100 мкл HNTG).

6. В каждую лунку добавляют по 100 мкл разбавленного лизата, планшет встряхивают при комнатной температуре в течение 60 мин.

7. Планшет промывают, как указано на стадии 4 выше.

8. В каждую лунку планшета для ИФА, содержащего связанный рецептор PDGFR, добавляют по 80 мкл рабочего раствора для фосфорилирования киназой.

9. Исследуемое соединение разбавляют в TBS в соотношении 1:10 в лунках 96-луночного полипропиленового планшета.

10. В лунки планшета для ИФА добавляют по 10 мкл разбавленного исследуемого соединения. В

контрольные лунки добавляют 10 мкл TBS + 10% ДМСО.

11. Во все лунки, кроме лунок с отрицательным контролем, добавляют по 10 мкл раствора АТФ (конечный объем смеси в каждой лунке должен составлять приблизительно 100 мкл, конечная концентрация АТФ в каждой лунке составляет 20 мкМ). Планшет инкубируют в течение 30 мин при встряхивании.

12. Реакцию останавливают путем добавления в каждую лунку по 10 мкл раствора ЭДТУ.

13. Планшет промывают 4 раза деионизированной водой, два раза раствором TBST.

14. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора антител к фосфотириозину (разбавление в TBST 1:3000). Инкубируют в течение 30-45 мин при комнатной температуре при встряхивании.

15. Промывают, как указано на стадии 4 выше.

16. В каждую лунку добавляют по 100 мкл HRP-конъюгата козьих антител против IgG кролика фирмы Biosource (разбавленного в TBST 1:2000). Инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании.

17. Промывают, как указано на стадии 4 выше.

18. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂.

19. Инкубируют в течение от 10 до 30 мин при встряхивании, удаляют любые пузырьки воздуха.

20. При необходимости реакцию останавливают путем добавления в каждую лунку по 100 мкл 0,2 М раствора HCl.

21. Поглощение в лунках измеряют на ридере Dynatech MR7000 ELISA (фильтр для образцов - 410 нм, фильтр сравнения - 630 нм).

Исследование киназы HER-2 на клеточном уровне

Этот метод анализа используют для определения активности киназы HER-2 на целых клетках в формате ИФА.

Материалы и реагенты

1. Среда DMEM (фирмы Gibco, номер по каталогу 11965-092).
2. Эмбриональная сыворотка коровы (FBS, фирмы Gibco, номер по каталогу 16000-044), инактивированная нагреванием на водяной бане в течение 30 мин при 56°C.
3. Трипсин (фирмы Gibco, номер по каталогу 25200-056).
4. L-Глутамин (фирмы Gibco, номер по каталогу 25030-081).
5. Нерес (фирмы Gibco, номер по каталогу 15630-080).
6. Среда для роста клеток: смешивают 500 мл DMEM, 55 мл инактивированной нагреванием FBS, 10 мл Нерес и 5,5 мл L-глутамина.
7. Среда для истощения: смешивают 500 мл DMEM, 2,5 мл инактивированной нагреванием FBS, 10 мл Нерес и 5,5 мл L-глутамина.
8. PBS.
9. 96-луночные планшеты для микротитрования культуральных тканей с плоским дном (фирмы Corning, номер по каталогу 25860).
10. Чашки Петри для культуральных тканей диаметром 15 см (фирмы Corning, номер по каталогу 08757148).
11. 96-луночные планшеты для ИФА фирмы Corning.
12. 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном NUNC.
13. Картриджи для переноса Costar для Transtar 96 (фирмы Costar, номер по каталогу 7610).
14. SUMO 1: моноклональные антитела против EGFR (фирмы Sugen Inc.).
15. Буферный раствор TBST.
16. Блокирующий буферный раствор: 5% быстрорастворимое сухое молоко Carnation в PBS.
17. Лиганд EGF: EGF-201 (фирмы Shinco American, Japan). Порошок суспендируют в 100 мкл 10 мМ HCl. Добавляют 100 мкл 10 мМ NaOH. Добавляют 800 мкл PBS и переносят в пробирку Эппендорф, хранят при -20°C до использования.
18. Буферный раствор для лизиса HNTG: исходный раствор 5X HNTG: смешивают 23,83 г Нерес, 43,83 г NaCl 500 мл глицерина и 100 мл Тритон X-100, конечный объем доводят до 1 л dH₂O. Исходный буферный раствор 1X HNTG*: смешивают 2 мл HNTG, 100 мкл 0,1 М Na₃VO₄, 250 мкл 0,2 М Na₄P₂O₇ и 100 мкл ЭДТУ.
19. ЭДТУ.
20. Na₃VO₄. Исходный раствор: смешивают 1,84 г Na₃VO₄ с 90 мл dH₂O. pH доводят до 10. Кипятят в микроволновой печи в течение 1 мин (раствор становится прозрачным). Охлаждают до комнатной температуры. pH доводят до 10. Повторяют стадии нагревание/охлаждение до тех пор, пока pH составляет 10.
21. 200 мМ Na₄P₂O₇.
22. Поликлональная антисыворотка кролика против фосфотириозина (антитела anti-Ptyr, фирма Sugen Inc.).
23. Антисыворотка, очищенная аффинной хроматографией, козы антитела против IgG кролика, конъюгат с HRP (фирмы Biosource, номер по каталогу ALI0404).

24. Раствор ABTS.
25. 30% раствор пероксида водорода.
26. ABTS/H₂O₂.
27. 0,2 М HCl.

Методика

1. 96-луночные планшеты Corning для ИФА покрывают SUNO1, добавляя в каждую лунку по 1,0 мкг антител в PBS, конечный объем в каждой лунке доводят до 100 мкл. Хранят в течение ночи при 4°C.
2. В день использования удаляют буферный раствор для покрытия и планшет промывают 3 раза dH₂O и 1 раз буферным раствором TBST. Если не оговорено иначе, все стадии промывки выполняют, как описано выше.
3. В каждую лунку добавляют по 100 мкл блокирующего буферного раствора. Планшет инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывают непосредственно перед использованием.
4. В данном эксперименте используют линию клеток химерного белка EGF/HER-2/3T3-C7.
5. Выбирают чашки, в которых конфлюентность составляет 80-90%. Клетки отбирают трипсинизацией и центрифугированием при 1000 об/мин при комнатной температуре в течение 5 мин.
6. Клетки ресуспендируют в среде для истощения и количество клеток подсчитывают с использованием Тгуран blue. Необходимая жизнеспособность должна составлять приблизительно более 90%. Клетки высевают в среду для истощения при плотности 2500 клеток в лунке, по 90 мкл в лунку 96-луночного планшета для микротитрования. Пересеянные клетки инкубируют в течение ночи при 37°C в присутствии 5% CO₂.
7. Эксперимент начинают через 2 дня после посева.
8. Исследуемые соединения растворяют в 4% ДМСО. Затем образцы еще раз разбавляют в планшете с использованием истощенной среды DMEM. Обычно разбавление составляет 1:10 или более. Затем содержимое всех лунок переносят в чашки с клетками при дальнейшем разбавлении 1:10 (10 мкл образца и среды в 90 мкл среды для истощения). Конечная концентрация ДМСО составляет 1% или менее. Может быть также использовано стандартное серийное разбавление.
9. Инкубируют в присутствии 5% CO₂ при 37°C в течение 2 ч.
10. Готовят раствор лиганда EGF путем разбавления исходного раствора EGF (16,5 мкМ) теплой средой DMEM до 150 нМ.
11. Готовят свежеприготовленный HMTG* в количестве, достаточном для нанесения по 100 мкл в каждую лунку; раствор хранят во льду.
12. После инкубирования в течение 2 ч с исследуемым соединением к клеткам добавляют приготовленный раствор лиганда EGF, в каждую лунку по 50 мкл, конечная концентрация лиганда составляет 50 нМ. В лунки с положительным контролем добавляют такое же количество EGF. В лунки с отрицательным контролем EGF не добавляют. Инкубируют при 37°C в течение 10 мин.
13. Исследуемое соединение удаляют, EGF и DMEM. Клетки промывают один раз PBS.
14. В клетки переносят HNTG*, в каждую лунку по 100 мкл. Помещают в лед на 5 мин. В это время из планшета для ИФА удаляют блокирующий буфер и промывают.
15. Клетки собирают из планшета микродозатором и клеточный материал гомогенизируют с помощью многократного повторения операций засасывания и выдавливания раствора для лизиса HNTG*. Лизат переносят в лунки покрытого, заблокированного и промытого планшета для ИФА. Или для переноса лизата в планшет используют картридж для переноса Costar.
16. Инкубируют при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч.
17. Лизат удаляют и лунки промывают. В планшет для ИФА переносят свежерастворенные антитела anti-Ptyg (1:3000 в TBST, 100 мкл в лунке).
18. Инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре.
19. Антитела anti-Ptyg удаляют, планшет промывают. В планшет для ИФА добавляют свежеразбавленные антитела Biosource (разбавление 1:8000 в TBST, по 100 мкл в каждую лунку).
20. Инкубируют при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре.
21. Антитела Biosource удаляют, планшет промывают. В планшет для ИФА переносят свежеприготовленный раствор ABTS/H₂O₂, по 100 мкл в лунку.
22. Инкубируют при встряхивании в течение 5-10 мин. Все пузырьки воздуха удаляют.
23. Реакцию останавливают добавлением в каждую лунку по 100 мкл 0,2 М HCl.
24. Поглощение в лунках измеряют на ридере Dynatech MR7000 ELISA (фильтр для образцов - 410 нм, фильтр сравнения - 630 нм).

Исследование комплекса CDK2/циклин А

Данный анализ используют для определения *in vitro* активности серин-треонинкиназы в системе cdk2 человека/циклин А с использованием сцинтилляционного анализа (СА).

Материалы и реагенты

1. 96-луночные гибкие планшеты из сополимера полиэтилена и терефталата Wallac (фирмы Wallac, номер по каталогу 1450-401).

2. [$\gamma^{33}\text{P}$]-АТФ Amersham Redivue (фирмы Amersham, номер по каталогу АН 9968).
3. Поливинилтолуоловые гранулы Amersham для СА, покрытые стрептавидином (фирмы Amersham, номер по каталогу RPNQ00071). Гранулы ресуспендируют в PBS в отсутствие магния или кальция, концентрация гранул составляет 20 мг/мл.
4. Активированный ферментный комплекс cdk2/циклин А, очищенный от клеток Sf9 (фирмы Sugen Inc.).
5. Биотинилированный пептидный субстрат (Debtide). Пептид биотин-Х-РКТРККАККЛ растворяют в dH_2O при концентрации 5 мг/мл.
6. Смесь пептид/АТФ: на 10 мл раствора смешивают 9,979 мл dH_2O , 0,00125 мл "холодного" АТФ, 0,010 мл Debtide и 0,010 мл $\gamma^{33}\text{P}$ АТФ. Конечная концентрация в лунке составляет 0,5 мкМ "холодного" АТФ, 0,1 мкг Debtide и 0,2 мкКи $\gamma^{33}\text{P}$ АТФ.
7. Буферный раствор для определения киназы: на 10 мл раствора смешивают 8,85 мл dH_2O , 0,625 мл Трис (рН 7,4), 0,25 мл 1 М MgCl_2 , 0,25 мл 10% NP40 и 0,025 мл 1 М DTT, который добавляют свежеприготовленным непосредственно перед использованием.
8. 10 мМ АТФ в dH_2O .
9. 1 М Трис, рН доводят до 7,4 с использованием HCl.
10. 1 М MgCl_2 .
11. 1 М DTT.
12. PBS (фирмы Gibco, номер по каталогу 14190-144).
13. 0,5 М ЭДТУ.
14. Раствор для остановки реакции: на 10 мл раствора смешивают 9,25 мл PBS, 0,005 мл 100 мМ АТФ, 0,1 мл 0,5 М ЭДТУ, 0,1 мл 10% Тритон X-100 и 1,25 мл (20 мг/мл) гранул для СА.

Методика

1. Готовят растворы исследуемых соединений с концентрацией, в 5 раз превышающей конечную, в 5% ДМСО. В каждую лунку добавляют по 10 мкл. В лунки с отрицательным контролем добавляют только по 10 мкл 5% ДМСО.
2. 5 мкл раствора cdk2/циклин А разбавляют в 2,1 мл буферного раствора 2х для определения активности киназы.
3. В каждую лунку добавляют по 20 мкл фермента.
4. В лунки с отрицательным контролем добавляют по 10 мкл 0,5 М ЭДТУ.
5. Для иницирования киназной реакции в каждую лунку добавляют по 20 мкл смеси пептид/АТФ. Инкубируют в течение 1 ч без встряхивания.
6. В каждую лунку добавляют по 200 мкл раствора для остановки реакции.
7. Планшет выдерживают в течение по крайней мере 10 мин.
8. Планшет центрифугируют при приблизительно 2300 об/мин в течение 3-5 мин.
9. Радиоактивность в планшете измеряют с использованием ридера Trilux или с использованием аналогичного ридера.

Анализ трансфосфорилирования MET

Данный анализ используют для определения уровней фосфотирозина в субстрате поли(глутаминовая кислота/тирозин) (4:1) с целью идентификации агониста/антагониста процесса трансфосфорилирования субстрата с помощью MET.

Материалы и методы

1. 96-луночные планшеты Corning для ИФА (фирмы Corning, номер по каталогу 26805-96).
2. Поли(Glu, Tyr), 4:1, фирмы Sigma, номер по каталогу P 0275.
3. PBS, фирмы Gibco, номер по каталогу 450-1300EB.
4. 50 мМ Hepes.
5. Блокирующий буферный раствор: 25 г БСА, фирмы Sigma, номер по каталогу А-7888, растворяют в 500 мл PBS, фильтруют через фильтр с диаметром пор 4 мкм.
6. Очищенный гибридный белок GST, содержащий домен киназы MET, фирмы Sugen Inc.
7. Буферный раствор TBST.
8. 10% водный (H_2O MilliQ) раствор ДМСО.
9. 10 мМ водный (dH_2O) раствор аденозин-5'-трифосфата, фирмы Sigma, номер по каталогу А-5394).
10. Буферный раствор 2х для разбавления киназы: на 100 мл раствора смешивают 10 мл 1 М HEPES при рН 7,5 с 0,4 мл 5% смеси БСА/PBS, 0,2 мл 0,1 М ортованадата натрия и 1 мл 5 М хлорида натрия в 88,4 мл dH_2O .
11. Реакционная смесь АТФ 4х: на 10 мл раствора смешивают 0,4 мл 1 М хлорида марганца и 0,02 мл 0,1 М АТФ в 9,56 мл dH_2O .
12. Смесь 4х для отрицательного контроля: на 10 мл раствора смешивают 0,4 мл 1 М хлорида марганца в 9,6 мл dH_2O .
13. 96-луночные полипропиленовые планшеты NUNC с V-образным дном, фирмы Applied Scientific, номер по каталогу S-72092.

14. 500 мМ раствор ЭДТУ.
15. Буферный раствор для разбавления антител: на 100 мл раствора смешивают 10 мл 5% смеси БСА/PBS, 0,5 мл 5% быстрорастворимого сухого молока Carnation в PBS и 0,1 мл 0,1 М ортованадата натрия в 88,4 мл TBST.
16. Кроличьи поликлональные антитела к фосфотирозину, фирмы Sugen, Inc.
17. HRP-Конъюгат козьих антител против IgG кролика, фирмы Biosource Inc.
18. Раствор ABTS: на 1 л раствора смешивают 19,21 г лимонной кислоты, 35,49 г Na₂HPO₄ и 500 мг ABTS, конечный объем раствора доводят dH₂O до 1 л.
19. Смесь ABTS/H₂O₂: смешивают 15 мл раствора ABTS с 2 мкл H₂O₂ за 5 мин до использования.
20. 0,2 М HCl.

Методика

1. В лунки планшета для ИФА добавляют по 2 мкг поли(Glu-Tyr) в 100 мкл PBS, хранят в течение ночи при 4°C.
2. Планшет блокируют 150 мкл 5% смеси БСА/PBS в течение 60 мин.
3. Планшет промывают 2 раза PBS, один раз буферным раствором Hepes, pH 7,4.
4. Во все лунки добавляют по 50 мкл разбавленной киназы. (Очищенную киназу разбавляют буферным раствором для разбавления киназы. Конечная концентрация составляет 10 нг в лунке.)
5. В каждую лунку добавляют исследуемое соединение (в 4% ДМСО), а в контрольные лунки только ДМСО (4% dH₂O).
6. Инкубируют смесь киназа/соединение в течение 15 мин.
7. В лунки с отрицательным контролем добавляют по 25 мкл 40 мМ MnCl₂.
8. Во все остальные лунки (кроме лунок с отрицательным контролем) добавляют по 25 мкл смеси АТФ/MnCl₂. Инкубируют в течение 5 мин.
9. Реакцию останавливают добавлением 25 мкл 500 мМ ЭДТУ.
10. Планшет промывают три раза TBST.
11. В каждую лунку добавляют по 100 мкл кроличьих поликлональных антител anti-Ptyr, разбавленных в соотношении 1:10000 буферным раствором для разбавления антител. Инкубируют при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч.
12. Планшет промывают три раза TBST.
13. Конъюгат HRP с антителами к IgG кролика фирмы Biosource разбавляют при соотношении 1:6000 буферным раствором для разбавления антител. В каждую лунку добавляют по 100 мкл и инкубируют при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 ч.
14. Планшет промывают один раз PBS.
15. В каждую лунку добавляют по 100 мкл раствора ABTS/H₂O₂.
16. При необходимости реакцию останавливают добавлением в каждую лунку 100 мкл 0,2 М HCl.
17. Поглощение в лунках измеряют на ридере Dynatech MR7000 ELISA (фильтр для образцов - 410 нм, фильтр сравнения - 630 нм).

Анализ трансфосфорилирования IGF-1

Данный анализ используют для определения уровня фосфотирозина в субстрате поли(глутаминовая кислота/тирозин) (4:1) с целью идентификации агониста/антагониста в процессе трансфосфорилирования субстрата с помощью gst-IGF-1.

Материалы и методы

1. 96-луночные планшеты Corning для ИФА.
2. Поли(Glu, Tyr), 4:1, фирмы Sigma, номер по каталогу P 0275.
3. PBS, фирмы Gibco, номер по каталогу 450-1300EB.
4. 50 мМ Hepes.
5. Блокирующий буферный раствор TBV: на 1 л раствора смешивают 100 г БСА, 12,1 г dТрис (pH 7,5), 58,44 г хлорида натрия и 10 мл 1% Твин-20.
6. Очищенный гибридный белок GST, содержащий домен киназы IGF-1, фирмы Sugen Inc.
7. Буферный раствор TBST: на 1 л раствора смешивают 6,057 г Трис, 8,766 г хлорида натрия и 0,5 мл Твин-20, конечный объем раствора доводят до 1 л dH₂O.
8. 4% раствор ДМСО в H₂O Milli-Q.
9. 10 мМ АТФ в dH₂O.
10. Буферный раствор 2x для разбавления киназы: на 100 мл раствора смешивают 10 мл 1 М HEPES (pH 7,5), 0,4 мл 5% БСА в dH₂O, 0,2 мл 0,1 М ортованадата натрия и 1 мл 5 М хлорида натрия, конечный объем доводят dH₂O до 100 мл.
11. Реакционная смесь АТФ 4x: на 10 мл раствора смешивают 0,4 мл 1 М MnCl₂, 0,008 мл 0,01 М АТФ и 9,56 мл dH₂O.
12. Смесь 4x для отрицательного контроля: смешивают 0,4 мл 1 М хлорида марганца в 9,6 мл dH₂O.
13. 96-луночные полипропиленовые планшеты NUNC cV-образным дном.
14. 500 мМ раствор ЭДТУ в dH₂O.
15. Буферный раствор для разбавления антител: на 100 мл раствора смешивают 10 мл 5% БСА в

PBS, 0,5 мл 5% обезжиренного быстрорастворимого сухого молока Carnation в PBS и 0,1 мл 0,1 М орто-ванадата натрия в 88,4 мл TBST.

16. Кроличьи поликлональные антитела к фосфотирозину, фирмы Sugen, Inc.
17. HRP-Конъюгат козьих антител против IgG кролика, фирмы Biosource.
18. Раствор ABTS.
19. Смесь ABTS/H₂O₂: смешивают 15 мл раствора ABTS с 2 мкл H₂O₂ за 5 мин до использования.
20. 0,2 М HCl в dH₂O.

Методика

1. В лунки планшета для ИФА добавляют по 2 мкг поли(Glu-Tyr) 4:1 (фирмы Sigma, номер по каталогу P0275) в 100 мкл PBS, хранят в течение ночи при 4°C.
2. Планшет промывают 1 раз PBS.
3. В каждую лунку добавляют по 100 мкл блокирующего буфера TBV. Планшет инкубируют в течение 1 ч при встряхивании при комнатной температуре.
4. Планшет промывают один раз PBS, затем два раза 50 мМ буферным раствором Hepes, pH 7,5.
5. В каждую лунку добавляют по 25 мкл исследуемого соединения в 4% ДМСО (который получают разбавлением исходного 10 мМ раствора исследуемого соединения в 100% ДМСО с dH₂O).
6. Во все лунки добавляют по 10,0 нг киназы gst-IGF-1 в 50 мкл буферного раствора для разбавления киназы.
7. Киназную реакцию инициируют добавлением по 25 мкл реакционной смеси АТФ 4х во все лунки с исследуемым соединением и в лунки с положительным контролем. Во все лунки с отрицательным контролем добавляют по 25 мкл смеси для отрицательного контроля 4х. Инкубируют в течение 10 мин при встряхивании при комнатной температуре.
8. Во все лунки добавляют по 25 мкл 0,5 М ЭДТУ (pH 8,0).
9. Планшет промывают буферным раствором TBST четыре раза.
10. В каждую лунку добавляют кроличью поликлональную антисыворотку против фосфотирозина, разбавленную в соотношении 1:10000 в 100 мкл буферного раствора для разбавления антител. Инкубируют при встряхивании при комнатной температуре в течение 1 ч.
11. Планшет промывают, как описано на стадии 9.
12. Во все лунки добавляют по 100 мкл HRP-конъюгата с антителами к IgG кролика фирмы Biosource, разбавленного в соотношении 1:10000 буферным раствором для разбавления антител. Инкубируют при комнатной температуре при встряхивании в течение 1 ч.
13. Планшет промывают, как описано на стадии 9, затем один раз PBS для удаления пузырьков воздуха и избытка Твин-20.
14. Реакцию проявляют добавлением в каждую лунку по 100 мкл смеси ABTS/H₂O₂.
15. Через приблизительно 5 мин поглощение в лунках измеряют на ридере ELISA (фильтр для образцов - 410 нм, фильтр сравнения - 630 нм).

Определение включения метки BrdU

В следующем анализе используют клетки, полученные методом геной инженерии с целью экспрессии определенного рецептора, для оценки влияния исследуемого соединения на активность индуцированного лигандом синтеза ДНК путем определения включения метки BrdU в ДНК.

Следующие материалы, реагенты и методики являются общими для всех анализов с использованием BrdU. Специфические варианты анализа приведены ниже.

Материалы и реагенты

1. Соответствующий лиганд.
2. Соответствующие клетки, созданные методом геной инженерии.
3. Реагент для введения метки BrdU: 10 мМ раствор в буфере PBS (pH 7,4), производства фирмы Boehringer, Mannheim, Германия.
4. FixDenat: раствор для фиксации (готовый для использования), производства фирмы Boehringer, Mannheim, Германия.
5. Anti-BrdU-POD: конъюгат мышинных моноклональных антител с пероксидазой, производства фирмы Boehringer, Mannheim, Германия.
6. Раствор субстрата ТМВ: тетраметилбензидин (ТМВ), производства фирмы Boehringer, Mannheim, Германия.
7. Раствор для промывки, PBS: PBS 1X, pH 7,4.
8. Бычий сывороточный альбумин (BSA): фракция V, порошкообразный, производства фирмы Sigma Chemical Co., США.

Общая методика

1. Клетки культивируют в 96-луночном планшете в количестве 8000 клеток в лунке в присутствии 2 мМ раствора глутамин в среде DMEM, 10% CS. Клетки инкубируют при 37°C в 5% CO₂ в течение ночи.
2. Через 24 ч клетки промывают раствором PBS, затем среду истощают, заменяя среду на бессывороточную среду (0% CS в DMEM, 0,1% BSA) и инкубируя клетки в течение 24 ч.
3. На третий день к клеткам одновременно добавляют соответствующий лиганд и тестируемое со-

единение. В лунки с отрицательным контролем добавляют только бессывороточную среду DMEM, содержащую 0,1% БСА, в лунки с положительным контролем - лиганд, но без исследуемого соединения. Растворы исследуемых соединений готовят в 96-луночной планшете в бессывороточной среде DMEM в смеси с лигандом и последовательно разбавляют, получая семь концентраций тестируемого соединения.

4. Активацию лиганда проводят в течение 18 ч, затем добавляют разбавленный реагент BrdU для введения метки (1:100 в среде DMEM, содержащей 0,1% БСА) и клетки инкубируют с реагентом BrdU (конечная концентрация 10 мкМ) в течение 1,5 ч.

5. После инкубирования с реагентом для введения метки, среду удаляют декантацией и постукиванием перевернутого планшета по бумажному полотенцу. Добавляют раствор FixDenat (по 50 мкл в лунку) и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 45 мин на качалке для планшетов.

6. Раствор для фиксации тщательно удаляют декантацией и постукиванием перевернутого планшета по бумажному полотенцу. В качестве блокирующего буфера добавляют молоко (5% раствор обезжиренного молока в PBS, по 200 мкл в лунку) и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин на качалке для планшетов.

7. Блокирующий раствор удаляют декантацией и лунки промывают один раз раствором PBS. Добавляют раствор конъюгата антител Anti-BrdU-POD (разбавленный 1:200 в PBS, содержащем 1% БСА, по 50 мкл в лунку) и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 90 мин на качалке для планшетов.

8. Конъюгат антител тщательно удаляют декантацией и промыванием лунок 5 раз раствором PBS, затем планшет сушат путем переворачивания и постукивания планшетом по бумажному полотенцу.

9. Добавляют раствор субстрата ТМВ (по 100 мкл в лунку) и инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре на качалке для планшетов до образования окрашивания, достаточного для фотометрического измерения.

10. Поглощение образцов измеряют при 410 нм (в режиме "двойной длины волны" с использованием фильтра при 490 нм в качестве сравнения) на ридере DYNATECH ELISA.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором EGF

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (фирмы Toyobo Co., Ltd., Япония).
2. 3T3/EGFRc7.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором EGF и Her-2

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (фирмы Toyobo Co., Ltd., Япония).
2. 3T3/EGFr/Her2/EGFr (EGFr, содержащий домен киназы Her-2).

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором EGF и Her-4

Материалы и реагенты

1. Мышиный EGF, 201 (фирмы Toyobo Co., Ltd., Япония).
2. 3T3/EGFr/Her4/EGFr (EGFr, содержащий домен киназы Her-4).

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором PDGF

Материалы и реагенты

1. PDGF человека В/В (фирмы Boehringer, Mannheim, Германия).
2. 3T3/EGFRc7.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором FGF

Материалы и реагенты

1. FGF2/bFGF человека (фирмы Gibco BRL, США).
2. 3T3c7/EGFr.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором IGF1

Материалы и реагенты

1. Рекомбинантный IGF1 человека (G511, фирмы Promega Corp., США).
2. 3T3/IGF1r.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного инсулином

Материалы и реагенты

1. Кристаллический инсулин быка, препарат с цинком (13007, фирмы Gibco BRL, США).
2. 3T3/H25.

Анализ включения метки BrdU, индуцированного фактором HGF

Материалы и реагенты

1. Рекомбинантный HGF человека (номер по каталогу 249-HG, фирмы R&D Systems, Inc., США).
2. Клетки VxPC-3 (ATCC CRL-1687).

Методика

1. Клетки культивируют в 96-луночной планшете в количестве 9000 клеток в лунке в присутствии RPMI 10% FBS. Клетки инкубируют при 37°C в 5% CO₂ в течение ночи.

2. Через 24 ч клетки промывают раствором PBS, затем среду истощают, заменяя среду на 100 мкл бессывороточной среды (RPMI, содержащей 0,1% БСА) и инкубируя клетки в течение 24 ч.

3. На третий день к клеткам добавляют 25 мкл лиганда (приготовленного следующим образом: 1 мг/мл в RPMI, содержащей 0,1% БСА, конечная концентрация HGF составляет 200 нг/мл) и тестируемые соединения. В лунки с отрицательным контролем добавляют 25 мкл бессывороточной среды RPMI, содержащей только 0,1% БСА, в лунки с положительным контролем - лиганд (HGF), но без исследуемого соединения. Растворы исследуемых соединений готовят в 96-луночном планшете в бессывороточной среде RPMI в смеси с лигандом при концентрации в 5 раз большей их конечной концентрации, и последовательно разбавляют, получая семь концентраций исследуемого соединения. Обычно наибольшая конечная концентрация исследуемого соединения составляет 100 мкМ, при этом используют разбавление 1:3 (то есть конечная концентрация исследуемого соединения находится в интервале 0,137 - 100 мкМ).

4. Активацию лиганда проводят в течение 18 ч, затем в каждую лунку добавляют 12,5 мкл разбавленного реагента BrdU для введения метки (1:100 в среде RPMI, содержащей 0,1% БСА) и клетки инкубируют с реагентом BrdU (конечная концентрация 10 мкМ) в течение 1 ч.

5. Эту стадию проводят аналогично общей методике.

6. Эту стадию проводят аналогично общей методике.

7. Блокирующий раствор удаляют декантацией и лунки промывают один раз раствором PBS. Добавляют раствор конъюгата антител Anti-BrdU-POD (разбавленный 1:100 в PBS, содержащем 1% БСА, по 100 мкл в лунку) и планшет инкубируют при комнатной температуре в течение 90 мин на качалке для планшет.

8. Эту стадию проводят аналогично общей методике.

9. Эту стадию проводят аналогично общей методике.

10. Эту стадию проводят аналогично общей методике.

Исследование с использованием клеток HUV-EC-C

Следующая методика предназначена для определения активности исследуемых соединений по отношению к рецепторам PDGF-R, FGF-R, VEGF, aFGF или Flk-1/KDR, причем все перечисленные рецепторы являются природными соединениями, экспрессируемыми клетками HUV-EC.

Нулевой день

1. Клетки HUV-EC-C (эндотелиальные клетки пупочной вены человека из коллекции American Type Culture Collection, номер по каталогу 1730 CRL) промывают и обрабатывают трипсином. Клетки промывают раствором D-PBS (фосфатный буфер, содержащий хлористый натрий, Dulbecco, производства фирмы Gibco BRL, номер по каталогу 14190-029) два раза объемом приблизительно 1 мл на флакон с площадью 10 см². Клетки обрабатывают раствором 0,05% трипсин-ЭДТУ в несодержащем ферментов растворе для диссоциации клеток (производства фирмы Sigma Chemical Company, номер по каталогу C-1544). 0,05% раствор трипсина готовят путем разбавления раствора 0,25% трипсин/1 мМ ЭДТУ (производства фирмы Gibco, номер по каталогу 25200-049) в растворе для диссоциации клеток. Клетки обрабатывают трипсином объемом приблизительно 1 мл на флакон с площадью 25-30 см² в течение 5 мин при 37°C. Когда клетки сняты с поверхности флакона, добавляют равный объем среды для анализа и переносят в стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл (производства фирмы Fisher Scientific, номер по каталогу 05-539-6).

2. Клетки промывают приблизительно 35 мл среды для анализа в стерильной центрифужной пробирке объемом 50 мл путем добавления среды для анализа, центрифугирования при приблизительно 200xg в течение 10 мин, удаления супернатанта и ресуспендирования в 35 мл раствора D-PBS. Клетки промывают еще два раза раствором D-PBS, затем клетки ресуспендируют в среде для анализа в объеме приблизительно 1 мл на культуральный флакон площадью 15 см². Среда для анализа содержит среду F12K (производства фирмы Gibco BRL, номер по каталогу 21127-014) и 0,5% инактивированной нагреванием FBS. Число клеток подсчитывают на приборе Coulter Counter® (производства фирмы Coulter Electronics Inc.) и добавляют среду для анализа до концентрации клеток 0,8-1,0x10⁵ клеток/мл.

3. В каждую лунку 96-луночного планшета с плоским дном добавляют по 100 мкл клеточной суспензии или по 0,8-1,0x10⁴ клеток, инкубируют при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение приблизительно 24 ч.

Первый день

1. Готовят серию двухкратных разведений исследуемого соединения в отдельном 96-луночном планшете, в основном в диапазоне концентрации от 50 мкМ до 0 мкМ. Используют вышеупомянутую среду для анализа, как указано на стадии 2 выше в нулевой день. Разведения получают путем добавления в верхнюю лунку определенного столбца лунок в планшете 90 мкл 200 мкМ раствора исследуемого соединения (раствор 4X). Так как концентрация исходного раствора исследуемого соединения обычно составляет 20 мМ в ДМСО, то концентрация раствора лекарственного средства составляет 200 мкМ, а концентрация ДМСО - 2%.

В качестве раствора для разбавления исследуемого соединения используют среду для анализа (F12K+0,5% FBS), содержащую 2% ДМСО, с целью разбавления исследуемого соединения при постоянной концентрации ДМСО. В каждую из остальных лунок в (столбце) добавляют по 60 мкл указанного раствора для разбавления. Из верхней лунки, содержащей 120 мкл 200 мкМ раствора исследуемого соединения, отбирают 60 мкл и смешивают их с 60 мкл раствора во второй лунке столбца. Затем отбирают

60 мкл из этой лунки и смешивают их с 60 мкл третьей лунки столбца и разбавления продолжают до завершения двухкратных разведений. Когда смешивание в предпоследней лунке столбца завершено, из нее отбирают 60 мкл раствора и отбрасывают их. В последней лунке столбца оставляют 60 мкл среды, содержащей ДМСО, и используют эту лунку как контрольную, не содержащую исследуемого соединения. Готовят 9 столбцов с разбавлениями исследуемых соединений, которых достаточно для проведения анализа в трех повторных сериях для каждого исследуемого соединения: (1) фактор VEGF (полученный на фирме PerproTech Inc., номер по каталогу 100-200), (2) фактор роста эндотелиальных клеток (ECGF), известный также под названием кислый фибробластный фактор роста или aFGF (полученный на фирме Boehringer Mannheim Biochemica, номер по каталогу 1439 600) или (3) фактор PDGF В/В человека, полученный на фирме Boehringer Mannheim, Германия) и контроль со средой для анализа. ECGF используют в виде препарата, содержащего натриевую соль гепарина.

2. В 96-луночный планшет для анализа, содержащий в каждой лунке по $0,8-1,0 \times 10^4$ клеток HUV-EC-C в 100 мкл среды, полученных в течение нулевого дня, переносят по 50 мкл разбавленного исследуемого соединения из каждой лунки планшета с разбавлениями, и инкубируют в течение приблизительно 2 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 .

3. В три повторные серии лунок, содержащих исследуемое соединение, добавляют по 50 мкл раствора фактора VEGF с концентрацией 80 мкг/мл, раствора фактора ECGF с концентрацией 20 нг/мл или контрольной среды. По аналогии с концентрацией исследуемых соединений концентрация факторов роста в четыре раза выше (раствор 4X) по сравнению с необходимой конечной концентрацией. Для разбавления факторов роста до необходимой концентрации используют среду для анализа, описанную на стадии 2 нулевого дня. Клетки инкубируют приблизительно в течение 24 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . В каждой лунке содержится 50 мкл исследуемого соединения, 50 мкл фактора роста или среды и 100 мкл клеток, общий объем в лунке составляет 200 мкл. Таким образом раствор 4X исследуемого соединения и фактора роста разбавляется в 4 раза (образуется раствор 1X) после добавления всех указанных компонентов в лунку.

Второй день

1. В каждую лунку добавляют по 10 мкл (1 мкКи) раствора ^3H -тимидина (производства фирмы Amersham, номер по каталогу TRK-686), указанный раствор с радиоактивностью 100 мкКи/мл получают в среде RPMI + инактивированная нагреванием 10% FBS. Планшет инкубируют в течение приблизительно 24 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Среду RPMI получают на фирме Gibco BRL, номер по каталогу 11875-051.

Третий день

1. Планшеты замораживают при -20°C и хранят в течение ночи.

Четвертый день

Планшеты размораживают и клетки снимают на полоски фильтровальной бумаги (производства фирмы Wallac, номер по каталогу 1205-401) с использованием прибора для сбора клеток Tomtec Harvester 96®. Количество радиоактивности определяют на жидкостном сцинтиляционном счетчике Wallac Betaplate™.

В табл. 3 представлены результаты биологического исследования некоторых соединений из примеров по изобретению. Результаты представлены в виде величины IC_{50} , то есть микромолярной концентрации (мкМ) исследуемого соединения, которая вызывает 50% изменение активности ТК-мишени по сравнению с активностью ТК в контрольных лунках, в которые исследуемое соединение не добавляют. Более подробно, полученные результаты означают концентрацию исследуемого соединения, которая требуется для снижения активности ТК-мишени на 50%. Результаты биохимических исследований, которые были проведены или могут быть проведены для оценки соединений, будут подробно описаны ниже.

Таблица 3

При- мер	Биохим. анализ fkGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Heg2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ CA киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
1	57.68	15.16	>100	>100	>100			>100
2	>100		>100	>100	>100			
3	9.85	9.62	>100	>100	>100			>100
4	3.57	>20	>100	>100	>100	>100		
5	8.3	16.06	>100	>100	>100	>100		
6	4.04		>100	3.26	7.82	2.43		
7	7.74		>100	5.07	9.8	4.24		
8	12.1		>100	51.34	20.08	5.5		
9	0.96		>100	>100	>100	16.38		
10	5.72		>100	94.04	15.86	8.06		
11	9.77		>100	>100	>100	>100		
12	>20		21.46	>100		27.73		
13	>20		81.92	8.17		2.66		
14	13.01		42.41	>100		66.02		
15	>20		>100	>100		98.61		
16	>20		98.06	>100		23.32		
17	8.25	2.47	94.35	0.83	11.47	15.94	>10	
18	2.67			2.57	9.23	4.99		

При- мер	Биохим. анализ лkGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Her2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ СА киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
19	7.5			6.86	34.18	8.37		
20	11.53			>100	41.16	8		
21	7.18		>100	40.34		27.69		
22	>20		>100	>100		87.67		
23	>20		>100	36.64		4.05		
24			>100	16.84		5.31		
25	12.55		>100	23.48		7.9		
26	16.03		66.87	34.67		10.04		
27			>100	26.5		3.91		
28	4.5		71.27	53.66		2.67		
29	10.12		>100	26.72		3.98		
30	9.4		>100	18.69		4.1		
31	>50		>100	9.83		47.19		
32	45.74		5.94	>100		>100		
34	>50		>100	>100		>100		

При- мер	Биохим. анализ ЯКGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Her2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ СА киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
35	>20		>100	80.4		54.14		
36	>20		>100	>100		>100		
37	0.22		3.06	10.78	9.84	1.4		
38	4.17		3.06	6.04	8.97	2.16		
39	3.38		4.69	3.67	14.54	3.53		
40	4.5		7.9	6.52		6.27		
42	0.1		0.12	11.95	74.55	20.43		
43	1.12		8.38	>100	37.33	53.37		
44	<0.05		0.02	20.73	67.46	6.99		
45	1.71		>100	>100	29.95	>100		
46	30.62		6.18	>100	>100	>100		
47	0.08	1.56	0.06	11.42	41.54	8.4	>20	1.05
48	0.006	0.3	<0.78	17.88	21.58	7.93		0.09
49			<0.78	>100	43.86	>100		
50			<0.78	>100	20.34	>100		
51	0.006	1.66	0.01	18.1	21.61	23.24	16.69	0.35

При- мер	Биохим. анализ лkGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Her2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ CA киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
52	0.08	1.26	<0.78	12.53	>100	>100	10.66	0.45
53			<0.78	>100	>100	>100		
54	1.98		<0.78	23.88	9.76	7.02		
55	0.27		0.53	6.03	35.99	77.82		
56	2.32		3.19	>100	10.03	7.11		
57	0.06		7.98	>100	9.97	6.94		
58			21.14	>100	>100	>100		
59			<0.78	>100	>100	>100		
60			<0.78	>100	>100	>100		
61			<0.78	>100	>100	>100		
62	8.00		8.32	>100	>100	>100		
63	0.21		<0.78	8.59	>100	>100		
64	0.55		<0.78	30.49	>100	>100		
65	0.37		<0.05	>100	74.36	15.97		
66	<0.05			>100	11.84	2.76		

При- мер	Биохим. анализ IκGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Her2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ СА киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
67	0.39		24.77	31.38	19.79	2.56		
68	1.16		0.03	>100	23.52	34.13		
69	0.3		56.55	>100	97.54	>100		
70	0.09	1.50	0.0030	10.57	6.42	7.99	12.62	0.63
71	15.21		22.5	>100		9.91		
72	6.06		10.54	>100	39.94	9.65		
73	5.95		14.12	>100	39.5	8.59		
74	1.2		0.09	46.75		>100		
75	2.7		61.55	>100		>100		
76	3.33		19.18	5.11		3.01		
77	0.49		25.01	>100		>100		
78	1.94		70.62	9.33		4.25		
79	1.49		>100	27.39		>100		
80	0.13	4.29	0.001	>100		50.19	17.19	0.28
81	0.21		0.18	>100		>100		

При- мер	Биохим. анализ fkGST, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ FGFR1, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ PDGF, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ на клеточном уровне EGF, IC ₅₀ (мкМ)	Киназа Her2, IC ₅₀ (мкМ)	Анализ CA киназы cdk2, IC ₅₀ (мкМ)	Биохим. анализ рук2, IC ₅₀ (мкМ)
82	2.03	7.69	6.88	>100		>100		0.31
83	0.34	0.41	9.46	2.18		86.9		0.008
84	1.38		12.51	67.2		5.86		0.006
85	0.2	0.8	2.59	>100		3.76		
86	1.45	1.3	19.6	41.8		>100		3.58
87	3.27	7.56	6.46	>100		9.1		0.17
88	0.35	1.18	8.06	2.36		>100		0.09
89	7.84		47.58	8.53	9.67	15.97		
115	7.3		7.48	>100		>100	0.006	
116	>20		>100	>100		>100	<0.0005	
117	0.91		12.9	>100		>100	0.006	
118	1.93		1.2	>100		>100	0.002	
119	1.38		61.63	>100		>100	<0.0005	

Модели животных *in vivo*

Ксенотрансплантатные модели животных

Способность опухоли человека расти в виде ксенотрансплантата в мышах с отсутствующей вилочковой железой (например, мыши Balb/c, nu/nu) позволяет использовать таких мышей в качестве модели *in vivo* для исследования биологического ответа при терапии опухолей человека. С момента первой успешной ксенотрансплантации опухолей человека в мышь без вилочковой железы (см. статью Rygaard и Povlsen, 1969, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 77:758-760) множество клеточных линий различных опухолей человека (например, молочной железы, легких, мочеполового тракта, желудочно-кишечного тракта, головы и шеи, глиобластомы, костей и злокачественных меланом) были трансплантированы и успешно развивались в голых мышах. Следующие методы анализа могут быть использованы для определения уровня активности, специфичности и действия различных соединений по настоящему изобретению. Для изучения соединений используют три основных типа анализа: клеточно-каталитический, клеточно-биологический анализы и анализ *in vivo*. Целью клеточно-каталитического анализа является оценка действия соединения на степень фосфорилирования с помощью ТК остатков тирозина в известном субстрате в клетке. Целью клеточно-биологического анализа является оценка действия соединения на стимулиро-

ванный ТК(тирозинкиназой) клеточный ответ. Целью анализа *in vivo* является оценка действия соединения на модельное животное с определенным заболеванием, таким как рак.

Подходящие клеточные линии для подкожных ксенотрансплантатных экспериментов включают клетки С6 (глиома, ATCC # CCL 107), клетки A375 (меланома, ATCC # CRL 1619), клетки A431 (эпидермоидный рак, ATCC # CRL 1555), клетки Calu 6 (легкие, ATCC # HTB 56), клетки PC3 (предстательная железа, ATCC # CRL 1435), клетки SKOV3TP5 и фибробластные клетки NIH 3T3, модифицированные методом генной инженерии с целью получения гиперэкспрессии рецепторов EGFR, PDGFR, IGF-1R или любой другой исследуемой киназы. Следующую методику можно использовать для проведения ксенотрансплантатных экспериментов:

Самки мышей с отсутствующей вилочковой железой (BALB/c, nu/nu) получают на фирме Simonsen Laboratories (Gilroy, CA). Всех животных содержат в чистых условиях в микроклетках с подстилкой типа Alpha-dri. Животные получают стерильный корм для грызунов и стерильную воду в неограниченном количестве.

Клеточные линии выращивают в соответствующей среде (например, среды MEM, DMEM, Ham's F10 или Nem's F12, содержащие 5%-10% FBS и 2 мМ глутамина). Все среды для культуральных линий, глутамин и FBS, если особо не указано, получены на фирме Gibco Life Technologies (Grand Island, NY). Все клетки выращивают во влажной атмосфере, содержащей 90-95% воздуха и 5% CO₂ при 37°C. Все клеточные линии пересеивают дважды в неделю, причем клеточные линии не содержат микоплазму, отсутствие которой контролируют по методу Mycotect (производство фирмы Gibco).

Клетки собирают путем добавления смеси 0,05% трипсин-EDTA в состоянии конфлюэнтности или перед конфлюэнтностью и осаждают центрифугированием при 450xg в течение 10 мин. Осадок ресуспендируют в стерильном растворе PBS или в среде, не содержащей FBS, до соответствующей концентрации и клетки имплантируют в заднюю часть бока мыши (8-10 мышей в группе, 2-10x10⁶ клеток на одно животное). Рост опухоли измеряют через 3-6 недель с использованием штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывают, если особо не указано, как произведение длина x ширина x высота. Величину Р рассчитывают с использованием t-критерия Стьюдента. Исследуемые соединения в 50-100 мкл наполнителя (DMCO или VPD:D5W) можно вводить внутрибрюшинно при различных концентрациях в основном через один день после имплантации.

Модель прорастания опухоли

Следующая модель прорастания опухоли была разработана для оценки терапевтического действия и эффективности соединений, селективно ингибирующих рецептор KDR/FLK-1.

Методика

В качестве экспериментальных животных используют 8-ми недельных голых мышей (производства фирмы Simonsen Inc.). Имплантацию опухолевых клеток проводят в проточном ламинаре. Анестезию проводят путем внутрибрюшинного введения смеси ксилазин/кетамин (100 мг/кг кетамина и 5 мг/кг ксилазина). Делают центральный надрез (длиной приблизительно 1,5 см) для доступа в брюшную полость для введения опухолевых клеток в количестве 10⁷ в 100 мкл среды. Клетки вводят в дуоденальную долю поджелудочной железы или в серозную оболочку ободочной кишки. Брюшину и мышцы сшивают, накладывая непрерывный шелковый шов (6-0) и кожу смыкают с использованием скоб для заживления ран. За животными ведут ежедневное наблюдение.

Анализ

Через 2-6 недель, в зависимости от общих наблюдений за животными, мышей забивают, вырезают местные метастазы в различных органах (легкие, печень, мозг, желудок, селезенка, сердце, мышцы) и анализируют их (измеряют размер опухоли, степень прорастания, проводят иммунохимический анализ, гибридизацию *in situ* и т.п.).

Анализ c-kit

Данный анализ используют для определения уровня фосфорилирования тирозина в c-kit.

Клетки MO7E (острого миелолейкоза человека) истощают по сыворотке в течение ночи в 0,1%-ной сыворотке. Клетки предварительно обрабатывают соединением (одновременно с истощением) до стимуляции лигандом. Клетки стимулируют 250 нг/мл rh-SCF в течение 15 мин. Затем после стимулирования клетки лизируют и проводят иммуноосаждение с антителами к c-kit. Уровни фосфотирозина и белка определяют вестерн-блоттингом.

Анализ пролиферации с использованием МТТ

Клетки MO7E истощают по сыворотке и предварительно обрабатывают соединением, как описано в экспериментах по фосфорилированию. Клетки вносят в 96-луночный планшет для культивирования в количестве 4x10⁵ клеток/в лунку в 100 мкл среды RPMI + 10%-ная сыворотка. Затем добавляют rh-SCF (100 нг/мл) и планшет инкубируют в течение 48 ч. Затем добавляют 10 мкл раствора (5 мг/мл) МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) и инкубируют в течение 4 ч. Затем добавляют подкисленный изопропанол (100 мкл 0,04 н. HCl в изопропанол) и измеряют оптическую плотность при 550 нм.

Анализ апоптозных клеток

Клетки MO7E инкубируют в присутствии или отсутствии SCF и в присутствии или отсутствии со-

единения в 10%-ной эмбриональной сыворотке телят (FBS) в смеси с rh-GM-CSF (10 нг/мл) и rh-IL-3 (10 нг/мл). Образцы анализируют через 24 ч и 48 ч. Для определения активированной каспазы-3 образцы промывают буферным раствором PBS и пропитывают ледяным 70%-ным этанолом. Затем клетки проявляют PE-конъюгатом поликлональных кроличьих антител против активной каспазы-3 и анализируют в активируемом флуоресценцией анализаторе клеток (FACS). Для определения количества расщепленной PARP (поли-АТФ-рибозилполимеразы), образцы лизируют и анализируют вестерн-блоттингом с использованием антител к PARP.

Прочие методы анализа

Прочие методы анализа, которые могут быть использованы для испытания соединений по настоящему изобретению, включают, без ограничения перечисленным, анализ bio-flk-1, анализ химерного рецептора EGF рецептор/HER2 на целых клетках, анализ bio-src, анализ bio-lck и анализ определения фосфорилирующей функции raf. Методики каждого из указанных анализов можно найти в заявке на выдачу патента США регистрационный No 09/099842, которая включена в данное описание в качестве ссылки, включая любые фигуры.

Определение цитотоксичности

Соединения, предназначенные для терапии, должны проявлять в большей степени ингибирующую активность по отношению к активности рецепторов ТК, и не обладать цитотоксическим действием. Эффективность действия и цитотоксичность соединения определяют по терапевтическому индексу, то есть по соотношению IC_{50}/LD_{50} . IC_{50} означает дозу, необходимую для достижения 50% ингибирования, которую определяют по стандартному методу, такому как представленный в данном описании. LD_{50} означает дозу, которая приводит к 50% токсичности, и которую также определяют по одному из стандартных методов: (см. статью Mossman, 1983, J. Immunol. Methods. 65:55-63), путем измерения количества высвобождающегося LDH (см. статью Korzeniewski и Callewaert, 1983, J. Immunol. Methods. 64:313, Decker и Lohmann-Matthes, 1988, J. Immunol. Methods. 115:61) или путем измерения летальной дозы на модельных животных. Предпочтительными являются соединения с более высоким терапевтическим индексом. Терапевтический индекс должен быть более 2, предпочтительно по крайней мере 10, более предпочтительно по крайней мере 50.

Б. Пример результатов анализа на клеточном уровне с использованием (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты.

Для подтверждения активности (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80), определенной с использованием биохимических методов анализа (см. ниже), исследуют способность упомянутого соединения ингибировать лиганд-зависимое РТК фосфорилирование с использованием методов анализа на клеточном уровне и полученных методом геной инженерии мышечных клеток NIH-3T3, характеризующихся гиперэкспрессией Flk-1 или PDGFR β человека. (2-Диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует VEGF-зависимое Flk-1 фосфорилирование тирозина, причем величина IC_{50} составляет приблизительно 0,03 мкМ. Эта величина близка к величине K_i , равной 0,009 мкМ и определенной методом биохимического анализа для ингибирования Flk-1 в присутствии (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80). Этот факт свидетельствует о том, что (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) легко проникает в клетки. В соответствии с биохимическими данными (см. ниже), с помощью которых показано, что (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) обладает сопоставимой активностью в отношении FLK-1 и PDGFR β , было также показано, что это соединение ингибирует PDGF-зависимое фосфорилирование рецептора в клетках, причем величина IC_{50} составляет приблизительно 0,03 мкМ. Способность (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибировать рецептор c-kit, который представляет собой родственную РТК и связывает фактор стволовых клеток (SCF), определяют с использованием клеток MO7E, экспрессирующих этот рецептор. При использовании этих клеток (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует SCF-зависимое фосфорилирование c-kit, причем величина IC_{50} составляет 0,01-0,1 мкМ. Это соединение ингибирует также SCF-стимулированное фосфорилирование c-kit в бластных клетках острого миелолейкоза, выделенных из периферической крови пациентов.

Кроме испытания способности (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1H-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибировать лиганд-зависимое фосфорилирование рецептора в клетках, исследуют также его действие на лиганд-зависимый пролиферативный ответ клеток, определенный *in vivo* (см. табл. 4). В этих экспериментах в клетках, которые дезактивируют истощением по сыворотке в течение ночи, индуцируют синтез ДНК с помощью добавления соответствующего митогенного лиганда. Как показано в табл. 4, (2-диэтиламиноэтил)амид 5-

(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует PDGF-индуцируемую пролиферацию клеток NIH-3Т3, характеризующихся гиперэкспрессией PDGFR β или PDGFR α , причем величины IC₅₀ составляют 0,031 и 0,069 мкМ, соответственно, и ингибирует SCF-индуцируемую пролиферацию клеток MO7E, причем величина IC₅₀ составляет 0,007 мкМ.

Таблица 4

Рецептор	Биохимические испытания	Испытания на клеточном уровне	
		IC ₅₀	
	K _i ¹ (мкМ)	Фосфорилирование рецептора (мкМ)	Лиганд-зависимая пролиферация (мкМ)
Flk-1/KDR	0,009	0,03 ²	0,004 ³
PDGFR α	0,008	0,03 ⁴	0,031 ⁴
PDGFR β	н/о	н/о	0,069 ⁵
FGFR	0,83	н/о	0,7 ³
c-kit	н/о	0,01-0,1 ⁶	0,007 ⁶

н/о - не определено

¹ - определено с использованием рекомбинантного фермента

² - определено с использованием истощенных по сыворотке клеток NIH-3Т3, экспрессирующих Flk-1

³ - определено с использованием истощенных по сыворотке клеток HUVEC

⁴ - определено с использованием истощенных по сыворотке клеток NIH-3Т3, экспрессирующих PDGFR α

⁵ - определено с использованием истощенных по сыворотке клеток NIH-3Т3, экспрессирующих PDGFR β

⁶ - определено с использованием истощенных по сыворотке клеток MO7E

Как показано в табл. 4, наблюдается общее соответствие между биохимической и клеточной активностью (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80), что подтверждает вывод о том, что указанное соединение проникает через клеточные мембраны. Более того, можно сделать вывод, что клеточные ответы происходят в результате активности соединения 80 по отношению к указанной мишени. И наоборот, при тестировании в присутствии полной среды роста *in vitro*, для ингибирования роста ряда опухолевых клеток человека требуются значительно более высокие концентрации (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) (>10 мкМ) (см. табл. 5). Указанные данные означают, что соединение ингибирует рост этих клеток косвенно (не напрямую) при концентрациях, которые требуются для ингибирования фосфорилирования лиганд-зависимого рецептора и клеточной пролиферации.

Таблица 5

Клеточная линия	Источник	IC ₅₀ (мкМ)	LD ₅₀ (мкМ)
HT29	Карцинома ободочной кишки	10	22
A549	Карцинома легких	9,5	22
NCI-H460	Карцинома легких NSC	8,9	20
SF767T	Глиома	7,9	14
A431	Эпидермоидная карцинома	6,0	18

Краткое описание: результаты, представленные в табл. 5, получают при инкубировании клеток в течение 48 ч в полной среде роста в присутствии серийных разведений (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты. При завершении периода роста определяют относительное число клеток. Величины IC_{50} рассчитывают как концентрацию соединения, при которой происходит ингибирование роста клеток на 50% по сравнению с необработанными клетками. Величины LD_{50} рассчитывают как концентрацию соединения, которая вызывает снижение числа клеток на 50% по сравнению с исходными клетками до начала эксперимента.

Более значимым анализом на клеточном уровне, в котором исследуют противоангиогенное действие (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80), является анализ митогенеза *in vitro* с использованием эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) в качестве модельной системы для пролиферации эндотелиальных клеток, определяющей ангиогенный процесс. В этом методе анализа митогенный ответ, измеряемый как увеличение синтеза ДНК, индуцируют в истощенных по сыворотке клетках HUVES путем добавления VEGF или FGF. В этих клетках (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует VEGF- и FGF-индуцированный митогенный ответ по дозозависимому механизму, причем величины IC_{50} составляют 0,004 мкМ и 0,7 мкМ, соответственно, если соединение присутствует в течение всего 48-часового периода анализа.

Краткое описание: выше упомянутые результаты получают с использованием истощенных по сыворотке клеток HUVES, которые инкубируют при митогенной концентрации VEGF (100 нг/мл) или FGF (30 нг/мл) в присутствии серийных разведений (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) в течение 24 ч. Митогенный ответ в течение следующих 24 ч в присутствии лиганда и ингибитора рассчитывают путем измерения синтеза ДНК, которое основано на включении бромдезоксигидроуридина в клеточную ДНК.

По данным других экспериментов соединение 80 ингибирует VEGF-зависимое фосфорилирование ERK 1/2 (киназа p42/44MAP), более ранней из последовательных мишеней киназы Fk-1/KDR, по дозозависимому механизму. Показано также, что ингибирующая активность соединения 80 является продолжительным процессом в данной системе; ингибирование VEGF-зависимого фосфорилирования ERK 1/2 наблюдается в течение 48 ч после удаления (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) из среды после краткосрочного инкубирования (2 ч) при микромолярных концентрациях соединения.

Показано, что VEGF является важным фактором для выживания эпителиальных клеток. В связи с тем, что (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует VEGF-зависимый митогенный ответ клеток HUVES, исследуют влияние соединения на выживание клеток HUVES. В этих экспериментах в качестве признака апоптоза используют расщепление каспазы 3, субстрата поли-АТФ-рибозилполимеразы (PARP). Клетки HUVES, культивируемые в отсутствие сыворотки в течение 24 ч, характеризуются значительными уровнями расщепления PARP, которое определяют по накоплению фрагмента расщепления PARP размером 23 кДа. Такое явление в значительной степени предотвращается при добавлении VEGF в клеточную среду, что указывает на действие VEGF в качестве фактора выживания в данном эксперименте. Показано, что (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует передачу сигнала KDR. Соответственно, (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует VEGF-опосредованное выживание клеток HUVES по дозозависимому механизму. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соединение 80 индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток в культуре в присутствии VEGF.

В. Испытания эффективности *in vivo*.

i. Эффективность в отношении развитых ксенотрансплантатных опухолей.

Эффективность *in vivo* (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) исследуют на подкожных ксенотрансплантатных моделях с использованием опухолевых клеток человека, привитых в задний бок мыши без вилочковой железы. После имплантации перед пероральным введением соединения животных выдерживают до развития опухоли до размеров 100-550 мм³.

При ежедневном пероральном введении соединение 80 проявляет дозозависимое ингибирование роста опухоли A431, если лечение начинают при опухоли размером 400 мм³. При этом наблюдается статистически значимое ингибирование ($P < 0,05$) роста опухоли при введении дозы 40 мг/кг/сут (74% ингибирование) и дозы 80 мг/кг/сут (84% ингибирование) (см. табл. 6). По данным предварительных экспериментов более высокая доза (160 мг/кг/сут) соединения не превышает эффективность в отношении развитых опухолей A431 по сравнению с дозой 80 мг/кг/сут. Кроме того, мыши, получавшие дозу соединения 160 мг/кг/сут, теряют в весе, что свидетельствует о том, что более высокая доза проявляет пониженную толерантность. Аналогичные результаты получают в экспериментах с использованием опухолей A431, достигающих размеров 100 мм³ (см. табл. 5). В этом втором эксперименте наблюдается полная

регрессия опухолей у шести из восьми животных, получавших дозу 80 мг/кг/сут в течение 21 суток. У этих шести животных опухоли не вырастают снова при наблюдении в течение 110 дней после завершения лечения. У двух животных, у которых опухоли выросли снова до огромных размеров (2000-3000 мм³), наблюдается регрессия опухолей после второго курса лечения соединением 80. Важно отметить, что во всех экспериментах по определению эффективности (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) проявляет удовлетворительную толерантность при дозе 80 мг/кг/сут, даже при продолжительном лечении в течение более 100 суток.

Таблица 6

Исходный размер опухоли (мм ³)	Соединение ¹ (мг/кг/сут)	Ингибирование в % (сут)	Величина Р
400	80	84 (36)	0,001
	40	74 (36)	0,003
	20	51 (36)	0,130
100	80	93 (40)	0,002
	40	75 (40)	0,015
	10	61 (40)	0,059
¹ - соединение 80			

Краткое описание: результаты, представленные в табл. 6, получают с использованием клеток А431 (0,5x10⁶ клеток/мышь), которые прививают подкожным способом в задний бок мыши без вилочковой железы. Ежедневное пероральное введение (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) в наполнителе на основе кремфора или введение контрольного наполнителя начинают в момент, когда опухоли достигают указанного среднего размера. Размеры опухоли измеряют с использованием штангенциркуля и рассчитывают как произведение длина x толщина x высота. Величины Р рассчитывают при сравнении размеров опухолей у животных, получивших дозу соединения 80 (n=8), с размерами опухолей у животных, получивших наполнитель (n=16), в последний день эксперимента с помощью двухфакторного анализа с использованием t-критерия Стьюдента.

Эффективность соединения 80 определяют в отношении развитых опухолей человека в виде ксено-трансплантатов из различных источников: Colo205 (карцинома ободочной кишки), SF763Т (глиома) и NCI-H460 (не мелкоклеточная карцинома легких), см. табл. 7. Эти эксперименты проводят с использованием (2-диэтиламиноэтил)амида 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80), которое вводят пероральным способом в дозе 80 мг/кг/сут, причем указанная доза является эффективной и обладает удовлетворительной толерантностью.

Таблица 7

	Тип опухоли	Исходный размер опухоли (мм ³)	Ингибирование в % (сутки)	Величина Р
A431 ¹	Эпидермид	100	93 (40)	0,002
A431 ¹	Эпидермид	400	84 (36)	0,001
Colo205	Ободочная кишка	370	77 (54)	0,028

	Тип опухоли	Исходный размер опухоли (мм ³)	Ингибиро- вание в % (сутки)	Величина Р
NCI-H460	Легкие	300	61 (54)	0,003
SF763T	Глиома	550	53 (30)	0,001
¹ - данные получены из эксперимента, представленного в Таблице 5				

В вышеупомянутых экспериментах соединение 80 вводят ежедневно один раз в сутки в дозе 80 мг/кг в наполнителе на основе кремофора при достижении указанных размеров опухоли. При завершении эксперимента рассчитывают процент ингибирования по сравнению с контрольной группой, получившей наполнитель. Величины Р рассчитывают при сравнении размеров опухолей у животных, получивших дозу соединения, с размерами опухолей у животных, получивших наполнитель, с помощью двухфакторного анализа с использованием t-критерия Стьюдента.

Несмотря на то, что (2-диэтиламиноэтил)амид 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (соединение 80) ингибирует рост всех видов опухолей, указанных в табл. 7, наблюдаются различия в ответе различных ксенотрансплантатных моделей. Более подробно, при обработке (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты рост опухолей NCI-H460 и SF763T останавливается или значительно замедляется, в то время как опухоли Colo205, подобные опухолям A431, регрессируют.

Для определения причины на молекулярном уровне различия в ответе ксенотрансплантатных моделей исследуют опухоли SF763T. Таким образом, опухоли SF763T, которые характеризуются меньшей чувствительностью к обработке (2-диэтиламиноэтил)амидом 5-(5-фтор-2-оксо-1,2-дигидроиндол-3-илиденметил)-2,4-диметил-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, исследуют на молекулярном уровне с использованием иммуногистологических методов с целью определения влияния обработки соединением. Такие исследования проводят с использованием указанного типа опухоли в начале эксперимента, так как опухоли SF763T значительно васкуляризируются с микрососудами, которые характеризуются гиперэкспрессией маркера CD31 эндотелиальных клеток и следовательно хорошо подходят для исследования плотности микрососудов (ПМС) опухоли. Иммуногистологические исследования опухолей SF763T показали, что опухоли обработанных животных характеризуются пониженной ПМС относительно контрольных животных, обработанных наполнителем, что согласуется с противоангиогенным механизмом действия соединения 80, причем величина ПМС у обработанных соединением 80 животных составляет $24,2 \pm 4,1$, а у животных, которые получали только наполнитель, составляет $39,3 \pm 5,7$. Какожидалось в связи с остановкой роста опухоли, представляется очевидным значительное ингибирование пролиферации опухолевых клеток в опухолях, обработанных соединением 80. Митотический индекс таких опухолей составляет половину величины индекса опухолей, обработанных наполнителем (данные не приведены). Действие соединения 80 на ПМС и клеточную пролиферацию свидетельствует о том, что соединение 80 обладает высоким противоангиогенным и противоопухолевым действием даже в условиях, в которых опухоли не регрессируют.

Способность соединения 80 ингибировать фосфорилирование PDGFR и последующую передачу сигнала *in vivo* исследуют также с использованием опухолей SF763T, которые экспрессируют высокие уровни PDGFR β . Обработка опухолей SF763T соединением 80 приводит к значительному ингибированию фосфорилирования тирозина PDGFR β в развитых опухолях SF763T. Соединение 80 снижает также уровни фосфорилированной (активированной) фосфолипазы С гамма (ФЛС- γ), промежуточного последующего индикатора активации PDGFR. Эти данные свидетельствуют о том, что пероральное введение соединения 80 вызывает прямое действие на активность мишени (PDGFR) в опухолях *in vivo*.

На основании данных о том, что способность соединения 80 ингибировать VEGF-зависимую передачу сигнала в клетках HUVEC *in vitro* является продолжительной (см. выше), исследуют эффективность соединения при более редком введении в модель опухоли Colo205. Как показано в табл. 8, доза 80 мг/кг (ингибирование 91%) и доза 40 мг/кг (ингибирование 84%) эффективны при ежедневном введении, но не эффективны при введении два раза в неделю. И наоборот, более высокая доза соединения 80 (160 мг/кг) ингибирует (ингибирование 51%) рост развитых опухолей Colo205 при введении два раза в неделю, что свидетельствует об эффективности этого соединения при более редком введении в более высокой дозе. Следует отметить, что схему приема лекарственного средства может определить специалист в данной области медицины без дополнительных экспериментов.

Таблица 8

Доза (мг/кг)	Частота введения	Ингибирование, %	Величина P
160	Два раза в неделю	52	0,085
	Один раз в неделю	17	Н/д
80	Ежедневно	91	0,039
	Два раза в неделю	19	Н/д
	Один раз в неделю	0	Н/д
40	Ежедневно	84	0,028
	Два раза в неделю	36	Н/д
Н/д - недостоверные результаты (P>0,05)			

Краткое описание: результаты, представленные в табл. 8, получают с использованием клеток Co1o205 ($0,5 \times 10^6$ клеток/мышь), привитых в задний бок мыши без вилочковой железы. Пероральное введение соединения 80 начинают проводить в соответствии с указанной схемой при достижении размера опухоли до 400 мм^3 . Размеры опухоли измеряют с использованием штангенциркуля и рассчитывают как произведение длина \times толщина \times высота.

Величины P рассчитывают при сравнении размеров опухолей у животных, получивших дозу соединения 80, с размерами опухолей у животных, получивших наполнитель, в последний день эксперимента с помощью двухфакторного анализа с использованием t-критерия Стьюдента.

ii. Эффективность соединения 80 в отношении модели распространенной опухоли.

Кроме обеспечения продолжительного роста солидных первичных опухолей, ангиогенез является важным компонентом, обеспечивающим развитие распространенной опухоли путем метастаза первичной опухоли. Действие соединения 80 на развитие распространенной опухоли исследуют с использованием модели колонизации меланомы B16-F1 легких мыши. В этой модели, клетки B16-F1, привитые внутривенно через хвостовую вену мыши без вилочковой железы, образуют в легких колонии и опухоли. Как показано в табл. 8, пероральное введение соединения 80 в дозе 80 мг/кг/сут приводит к эффективному снижению содержания клеток B16-F1 в легких по данным измерения общей массы легких. Эти данные свидетельствуют о том, что соединение 80 ингибирует распространение опухоли *in vivo*.

Таблица 9

	Масса легких (г)	Ингибирование%	Величина P
Наполнитель	$0,83 \pm 0,07$	-	-
Соединение ¹	$0,41 \pm 0,04$	50	<0,001
¹ - соединение 80			

Краткое описание: результаты, представленные в табл. 9, получают с использованием мышей без вилочковой железы с опухолевыми клетками B16-F1 (5×10^5 клеток/мышь), привитыми внутривенно через хвостовую вену. Мыши получают ежедневно перорально соединение 80 в дозе 80 мг/кг/сут (n=10) или носитель (n=18) в течение 24 ч после прививки опухолевых клеток. После завершения периода обработки мышей забивают, легкие удаляют и взвешивают. Процент ингибирования рассчитывают при сравнении массы легких у животных, получивших дозу соединения 80, с массой легких у животных, получивших только наполнитель. Величины P определяют с помощью двухфакторного анализа с использованием t-критерия Стьюдента.

Г. Примеры биологической активности

Примеры активности соединений по настоящему изобретению *in vitro* представлены в табл. 2.

Заключение

В экспериментах по исследованию фармакокинетических характеристик соединений по предпочтительным вариантам настоящего изобретения показано, что пероральное введение однократной дозы упомянутых соединений характеризуется высокой пероральной биодоступностью у мышей. Удовлетворительная пероральная биодоступность и линейная фармакокинетика свидетельствуют о благоприятных фармакокинетических характеристиках соединений по предпочтительным вариантам настоящего изобретения.

Кроме того, соединения по вариантам воплощения настоящего изобретения являются высокоактивными ингибиторами тирозинкиназной активности расщепленного киназного домена РТК Flk-1 и PDGFR, которые включены в ангиогенез, а также РТК c-kit, рецептора фактора стволовых клеток (SCF), который включен в процессы некоторых гематологических раков. При высоких концентрациях соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения ингибируют также тирозинкиназную активность FGFR-1, третьей РТК, включенной в ангиогенез. В соответствии с их биохимической активностью соединения по предпочтительным вариантам воплощения настоящего изобретения ингибируют лиганд-зависимое фосфорилирование тирозина РТК-мишеней и митогенный ответ *in vitro* клеток HUVEC, стимулированный VEGF или FGF, экспрессирующей PDGFR клеток NIH-3T3, стимулированный PDGF, и клеток MO7E острого миелолейкоза, стимулированный SCF. И наоборот, соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения не напрямую ингибируют пролиферацию опухолевых клеток в полной среде роста за исключением концентраций, на 2-3 порядка превышающих величины доз, необходимые для ингибирования лиганд-зависимых митогенных ответов. По данным исследования ксенотрансплантатных моделей у мышей соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения ингибируют рост развитых опухолей человека из различных источников по дозозависимому механизму и при концентрациях, которые характеризуются удовлетворительной толерантностью даже в течение продолжительного введения лекарственного средства (>100 суток). В дозе 80 мг/кг/сут соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения индуцируют регрессию крупных развитых опухолей A431 и Colo205, вызывают значительное ингибирование роста или стаза опухолей SF763T и NCI-H460. У мышей-носителей опухолей SF763T соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения вызывают снижение плотности микрососудов, фосфорилирования PDGFR в опухолях и митогенного индекса опухолевых клеток. В указанной дозе соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения ингибируют также колонизацию опухолевых клеток B16-F1 в легких на модели метастаза опухоли. По данным изучения схем введения соединений показано, что соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения являются наиболее эффективными при ежедневном введении. Прямое доказательство проявления противоангиогенной активности соединений по предпочтительным вариантам настоящего изобретения выявлено в опухолях SF763T, в которых снижается плотность микрососудов. Прямое доказательство проявления соединениями по предпочтительным вариантам настоящего изобретения ингибирующей активности в отношении фосфорилирования PDGFR и передачи сигнала *in vivo* было также получено на опухолях SF763T.

Суммируя вышеизложенное, следует отметить, что полученные данные подтверждают предположение о том, что соединения по предпочтительным вариантам настоящего изобретения являются противоангиогенными агентами, используемыми при лечении рака, включая солидные опухоли и гематологические злокачественные заболевания, в патологии которых определяющим фактором являются ангиогенез и/или передача сигнала через c-kit.

Следует понимать, что соединения, способы и фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются эффективными модуляторами активности ПК и следует ожидать, что указанные соединения и композиции могут быть эффективно использованы в качестве терапевтических средств для лечения нарушений, связанных с активностью РТК, КТК и СТК.

Для специалистов в данной области техники представляется совершенно очевидным, что настоящее изобретение разработано не только для достижения упомянутых целей и преимуществ, но и для достижения других целей, характерных для настоящего изобретения. Молекулярные комплексы и способы, методики, способы лечения, молекулы, специфические соединения представлены в данном описании в качестве предпочтительных вариантов воплощения настоящего изобретения и не ограничивают объем изобретения. Любые изменения и другие способы использования, очевидные для специалистов в данной области техники, включены в объем настоящего изобретения, определенный в пунктах формулы изобретения.

Для специалистов в данной области техники представляется очевидным, что изменение заместителей и другие модификации предметов, представленных в данном описании, также включены в объем притязаний и сущность настоящего изобретения.

Все упомянутые патенты и публикации представлены для определения уровня техники для специалистов, для которых предназначено данное изобретение. Все упомянутые в данном описании патенты и публикации включены в описание в качестве ссылок таким же образом, как отдельные публикации, про каждую из которых в тексте описания упомянуто, что она включена в качестве ссылки в текст описания.

Настоящее изобретение описано в иллюстративном варианте и может быть использовано в отсутст-

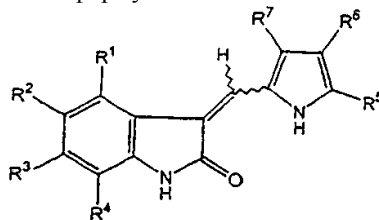
вии любого элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые подробно не описаны в данном описании. Таким образом, например, в данном описании в каждом конкретном случае любой из терминов "включающий", "в значительной степени включающий" и "состоящий из" может быть заменен на один из оставшихся двух терминов. Термины и выражения, использованные в данном описании, предназначены для описания, но не для ограничения объема изобретения и, следовательно, использование таких терминов и выражений не означает исключение любых эквивалентов описанных признаков или их части, но при этом следует понимать, что возможны различные модификации в пределах заявленного объема изобретения. Таким образом, следует понимать, что несмотря на подробное описание предпочтительных вариантов воплощения изобретения и признаков по выбору, для специалиста в данной области техники представляется возможным модифицировать и изменить концепцию изобретения, и что такие модификации и изменения будут рассматриваться как включенные в объем притязаний настоящего изобретения, заявленный в пунктах прилагаемой формулы изобретения.

Кроме того, если признаки или аспекты изобретения описаны в терминах групп Маркуша, то для специалиста в данной области техники представляется очевидным, что в настоящем изобретении описаны любой индивидуальный член или подгруппа членов группы Маркуша. Например, если X описан как выбранный из группы, включающей в себя бром, хлор и иод, то пункты формулы изобретения, в которых X означает бром, и пункты формулы, в которых X означает бром и хлор, полностью описаны.

Другие варианты воплощения изобретения включены в следующие пункты формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пирролзамещенный 2-индолинон формулы I



(I)

где

R^1 выбран из группы, включающей в себя водород, галоген, C_1 - C_4 алкил, C_3 - C_8 циклоалкил, C_6 - C_{10} арил, гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N, гетероциклил, содержащий 3-6 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N, гидроксиль, C_1 - C_4 алкокси, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, $-(CH_2)_rR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 выбран из группы, включающей в себя водород, галоген, C_1 - C_4 алкил, тригалогенметил, гидроксиль, C_1 - C_4 алкокси, $-NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-(CO)R^{15}$, C_6 - C_{10} арил, гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N, и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 выбран из группы, включающей в себя водород, галоген, C_1 - C_4 алкил, тригалогенметил, гидроксиль, C_1 - C_4 алкокси, $-(CO)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$, C_6 - C_{10} арил, гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N, $-NR^{13}S(O)_2R^{14}$, $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$, $-NR^{13}C(O)R^{14}$, $-NR^{13}C(O)OR^{14}$;

R^4 выбран из группы, включающей в себя водород, галоген, C_1 - C_4 алкил, гидроксиль, C_1 - C_4 алкокси и $-NR^{13}R^{14}$;

R^5 выбран из группы, состоящей из водорода, C_1 - C_4 алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^6 выбран из группы, состоящей из водорода, C_1 - C_4 алкила и $-C(O)R^{10}$;

R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, C_1 - C_4 алкила, C_6 - C_{10} арила, гетероарила, содержащего 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N, $-C(O)R^{17}$ и $-C(O)R^{10}$; или

R^6 и R^7 объединены с образованием групп, выбранных из следующего ряда:
 $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$ и $-(CH_2)_6-$; при условии, что по меньшей мере один из радикалов R^5 , R^6 или R^7 означает $-COR^{10}$;

R^8 и R^9 независимо выбраны из группы, включающей в себя водород, C_1 - C_4 алкил и C_6 - C_{10} арил;

R^{10} выбран из группы, включающей в себя гидроксиль, C_1 - C_4 алкокси, C_6 - C_{10} арилокси, $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$;

R^{11} выбран из группы, включающей в себя водород и C_1 - C_4 алкил;

R^{12} выбран из группы, включающей в себя $-NR^{13}R^{14}$, гидроксиль, $-COR^{15}$, C_6 - C_{10} арил и гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N;

R^{13} и R^{14} независимо выбраны из группы, включающей в себя водород, C_1 - C_4 алкил, C_3 - C_8 циклоалкил, C_6 - C_{10} арил и гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N; или

R^{13} и R^{14} могут быть объединены с образованием группы, состоящей из $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$;

R^{15} выбран из группы, состоящей из водорода, гидрокси, C_1 - C_4 алкокси и C_6 - C_{10} арилокси;

R^{16} выбран из группы, состоящей из гидрокси, $-C(O)R^{15}$, $-NR^{13}R^{14}$ и $-C(O)NR^{13}R^{14}$,

n и g независимо равны 1, 2, 3 или 4;

или его фармацевтически приемлемые соли.

2. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, отличающееся тем, что R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} означает $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, где R^{11} означает водород или незамещенный низший C_1 - C_4 алкил, n равно 2 или 3, а R^{12} означает $-NR^{13}R^{14}$, где R^{13} и R^{14} независимо означают незамещенный низший C_1 - C_4 алкил.

3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, отличающееся тем, что R^6 означает $-COR^{10}$, где R^{10} означает $-NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$, где R^{11} означает водород или незамещенный низший C_1 - C_4 алкил, n равно 2 или 3, а R^{12} означает $-NR^{13}R^{14}$, где R^{13} и R^{14} объединены с образованием групп, выбранных из следующего ряда: $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.3, отличающееся тем, что R^{13} и R^{14} объединены с образованием $-(CH_2)_4-$.

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, отличающееся тем, что

R^1 выбран из группы, включающей в себя водород, низший C_1 - C_4 алкил, $-(CH_2)_gR^{16}$ и $-C(O)NR^8R^9$;

R^2 выбран из группы, включающей в себя водород, галоген, C_1 - C_4 алкил, C_6 - C_{10} арил, гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N и $-S(O)_2NR^{13}R^{14}$;

R^3 выбран из группы, включающей в себя водород, низший C_1 - C_4 алкил, низший C_1 - C_4 алкокси, C_6 - C_{10} арил, гетероарил, содержащий 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N и $-(CO)R^{15}$;

R^4 представляет собой водород;

R^5 выбран из группы, состоящей из водорода и низшего C_1 - C_4 алкила;

R^6 представляет собой $-C(O)R^{10}$,

R^7 выбран из группы, состоящей из водорода, низшего C_1 - C_4 алкила и C_6 - C_{10} арила;

R^{16} выбран из группы, состоящей из гидрокси и $-C(O)R^{15}$; и

g равно 2 или 3.

6. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.5, отличающееся тем, что R^3 означает C_6 - C_{10} арил, необязательно замещенный по меньшей мере одной группой, выбранной из группы, состоящей из низшего C_1 - C_4 алкила, низшего C_1 - C_4 алкокси и галогена.

7. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.5, отличающееся тем, что R^{10} выбран из группы, состоящей из гидрокси, низшего C_1 - C_4 алкокси, $NR^{11}(CH_2)_nR^{12}$ и $-NR^{13}R^{14}$, где R^{11} означает водород, n равно 1, 2 или 3, а R^{12} выбран из группы, состоящей из $-NR^{13}R^{14}$, гидрокси, низшего C_1 - C_4 алкокси, $-COR^{15}$ и гетероарила, содержащего 3-5 атомов углерода и 1-2 гетероатома, выбранных из O, S, N.

8. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.7, отличающееся тем, что R^{13} и R^{14} независимо выбраны из группы, состоящей из $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ или $-(CH_2)_2N(CH_3)(CH_2)_2-$.

9. Соединение по п.1, отличающееся тем, что R^1 означает водород;

R^2 означает хлор, фтор или бром;

R^3 означает водород;

R^4 означает водород;

R^5 означает метил;

R^6 представляет собой $-C(O)R^{10}$, где R^{10} означает $-N(R^{11})(CH_2)_nR^{12}$;

причем R^{11} означает водород или незамещенный низший C_1 - C_4 алкил;

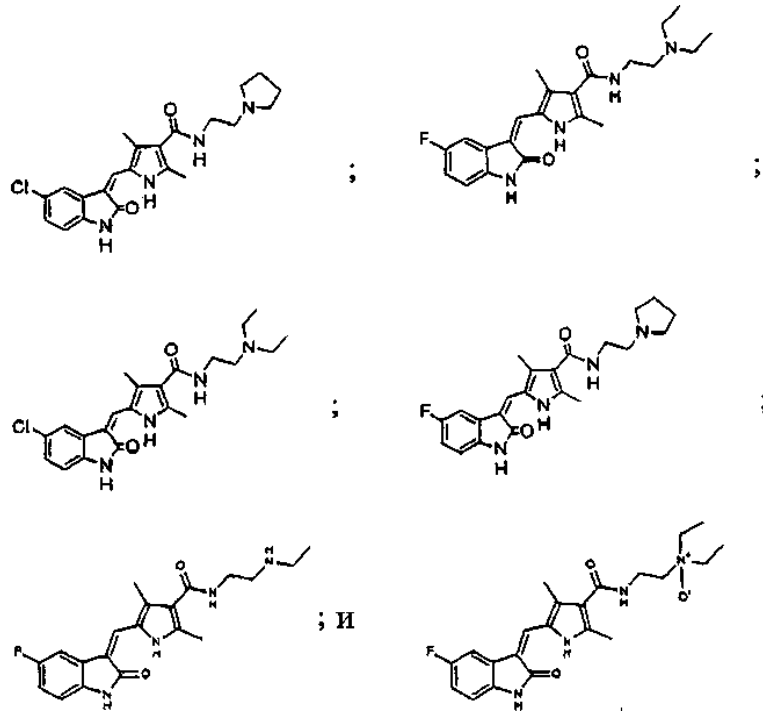
n равно 2 или 3;

R^{12} означает $-NR^{13}R^{14}$,

где R^{13} и R^{14} независимо означают незамещенный низший C_1 - C_4 алкил;

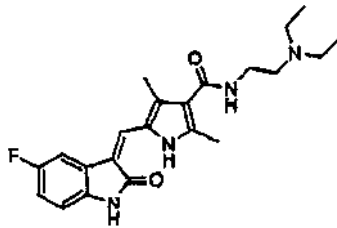
R^7 означает метил.

10. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, отличающееся тем, что оно выбрано из группы, включающей в себя



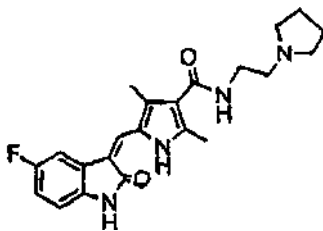
11. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.10, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемой солью являются L-малаты.

12. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.10, отличающееся тем, что оно имеет следующую формулу



13. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.12, отличающееся тем, что солью является L-малат.

14. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п.10, отличающееся тем, что оно имеет следующую формулу



15. Фармацевтическая композиция, отличающаяся тем, что она содержит по меньшей мере одно соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.1, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

16. Фармацевтическая композиция, отличающаяся тем, что она содержит соединение или его фармацевтически приемлемую соль по п.10 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

17. Способ модулирования каталитической активности протеинкиназы, отличающийся тем, что проводят контактирование упомянутой протеинкиназы с соединением по п.1 или его солью.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что упомянутую протеинкиназу выбирают из группы, включающей в себя рецепторную тирозинкиназу, нереперторную тирозинкиназу и серинтреонинкиназу.

19. Способ лечения или профилактики нарушения в организме, связанного с протеинкиназой, отличающийся тем, что вводят в упомянутый организм терапевтически эффективное количество соединения или соли по п.1.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что упомянутое нарушение, связанное с протеинкиназой, выбирают из группы, включающей в себя нарушение, связанное с рецепторной тирозинкиназой, нарушение, связанное с нереперторной тирозинкиназой и нарушение, связанное с серин-треонинкиназой.

21. Способ по п.19, отличающийся тем, что упомянутое заболевание, связанное с протеинкиназой, выбирают из группы, включающей в себя нарушение, связанное с EGFR, нарушение, связанное с PDGFR, нарушение, связанное с IGFR, и нарушение, связанное с flk.

22. Способ по п.19, отличающийся тем, что упомянутым нарушением, связанным с протеинкиназой, является рак, выбранный из группы, включающей в себя плоскоклеточную карциному, астроцитому, саркому Капоши, глиобластому, рак легких, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи, меланому, рак яичника, рак предстательной железы, рак молочной железы, мелкоклеточный рак легких, глиому, рак ободочной и прямой кишки, рак мочеполового тракта и рак желудочно-кишечного тракта.

23. Способ по п.19, отличающийся тем, что упомянутое нарушение, связанное с протеинкиназой, выбирают из группы, включающей в себя диабет, аутоиммунное нарушение, нарушение, связанное с гиперпролиферацией, рестеноз, фиброз, псориаз, болезнь Гиппеля-Линдау, остеоартрит, ревматоидный артрит, ангиогенез, воспалительные процессы, иммунологические нарушения и сердечно-сосудистые нарушения.

24. Способ по п.19, отличающийся тем, что упомянутым организмом является организм человека.

