



03 011003 00

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE.

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I☒ Capítulo II

SOLICITANTE
(71)
Nombre **CEPHALON, INC** IDENTIFICACIÓN
Dirección **145 Brandywine Parkway** C C ☐ NIT ☐
Teléfono **3132408** Fax: **3131647** C E. ☐ OTRO ☐
E-mail Número
Domicilio: **West Chester, Pennsylvania, Estados Unidos de América**
Lugar de constitución **ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)
Nombre **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
Dirección **Carrera 7 No 74 - 64, Of 506** C C ☒ NIT ☐
Teléfono **3132408** Fax: **3131647** C E. ☐ OTRO ☐
E-mail No **17'192 062 T P 50 007 CSJ**

INVENTOR(ES)
(72)
Nombre **Anna MARONEY, Nicola NEFF** IDENTIFICACIÓN
Kevin M WALTON, Ernest KNIGHT, Jr C C ☐ NIT ☐
Craig A. DIONNE, Marcie A. GLICKSMAN C E. ☐ OTRO ☐
Dirección **Estados Unidos de América** Número
Teléfono **3132408** Fax: **3131647**
E-mail
Domicilio **ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

PCT (86)

Solicitud Internacional No **US/01/24822** Fecha **09 DE AGOSTO DE 2.001**
Publicación Internacional No **WO 02/14536 A2** Fecha **21 DE FEBRERO DE 2.002**

TÍTULO (54) MÉTODOS PARA MODULAR PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE MÚLTIPLE Y PARA ESTUDIAR COMPUESTOS QUE MODULAN PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE MÚLTIPLE

Clasificación Internacional (51)

A61K 31/403

Prioridad (88) País de origen (82) Fecha (81) Número de solicitud

SI ☒ NO ☐ X (PCT **09 DE AGOSTO DE 2.001** **PCT/US01/24822**)
ESTADOUNIDENSE **11 DE AGOSTO DE 2.000** **USN 09/637,054**

Comprobante de pago No	16,835	Fecha.	11 DE MARZO DE 2.002
	1,088		08 DE ENERO DE 2.003
	16,862		11 DE MARZO DE 2.002
	1,097		08 DE ENERO DE 2.003
	16,863		11 DE MARZO DE 2.002
	1,098		08 DE ENERO DE 2.003

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Copia de la solicitud PCT
- ☒ Publicación de la solicitud ante OMPI
- ☒ Copia del reporte de la búsqueda internacional
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser del caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12 x 12

(11) Figura característica.

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA 
C C 17'192 062 de Bogotá
T P 50 007 Consejo Superior de
La Judicatura

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REGISTRO
PATENTE DE INVENCION
"METODOS PARA MODULAR
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE Y PARA ESTUDIAR
COMPUESTOS QUE MODULAN
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE"**

החלטת הוועדה

[illegible]

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

2015 年 4 月 25 日

| תאריך | שם | מס' תעודת זהות | מס' תעודת זהות | מס' תעודת זהות |
|-------|------|----------------|----------------|----------------|
| 1977 | 1977 | 1977 | 1977 | 1977 |

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

החברה מודעת להגדלת תפוצת המידע, ומשתמשת בכלי שיווק ופרסום כדי להגדיל את המודעות למידע.

Содержание

APR 1 1964

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C Colombia

Folio No 2 Extrato Publicacion
donc Holms

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA**

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840.

[illegible]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1

[illegible]

מחיר

החוקרים בדקו את ההשפעה של

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radiacion : 03011033 00300000
 Fecha (AMB) : 2003-02-11 16:22 40
 Folios: 223
 Transito R11 PCT-PATENT 379 FASE NUCI 411 PRESENTAC
 Dependencia. 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

1. התאחדות העובדים 2. התאחדות העובדים 3. התאחדות העובדים 4. התאחדות העובדים

1. The first step is to identify the problem or goal. This involves understanding the current situation and what needs to be achieved.

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax. 281 31 25
Santa Fe de Bogotá D C Colombia

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA**

Radicacion: 03011003 00000000 Folios: 233
 Fecha (MIB): 2003-02-11 16:22:40
 Trámite: 011 PCT-INTENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREATIVAS

**REGISTRO
PATENTE DE INVENCION
"METODOS PARA MODULAR
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE Y PARA ESTUDIAR
COMPUESTOS QUE MODULAN
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE"**

1. DATE OF BIRTH 2. AGE
 3. SEX 4. RELIGION
 5. EDUCATION 6. PROFESSION
 7. RESIDENCE 8. CONTACT

1. 225 2 65 3" 44.

[illegible][illegible]

החוקים האלה יבואו לידי ביטוי גם במסגרת המערכת החדשה של

[illegible][illegible]

RECEIVED
JAN 10 1967

[illegible]

מחירי המוצרים יורדים, ויש להם תאריך תפוגה. יש להם תאריך תפוגה.

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C Colombia



2
6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PARA USU...
RUBRO & L...

...

| ... | ... | ... | ... | ... | ... | REGISTRO |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------------------|
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | PATENTE DE INVENCION: |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | "MÉTODOS PARA MODULAR |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | MÚLTIPLE Y PARA ESTUDIAR |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | COMPUESTOS QUE MODULAN |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | MÚLTIPLE" |

...

...

...

...

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion: 83811003 68886300 Folios: 2+3
Fecha (NPD) 2283-02-11 16:22 48
Trámite: 011 FCT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2288 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

...

...

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax. 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D C Colombia



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PARA USO EXCLUSIVO DE
UMBERTO RUEDA & CIA. LTDA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03011003 00000000 Folios 233
Fecha (AMD) 2003-02-11 16:22:40
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REGISTRO
PATENTE DE INVENCION
"METODOS PARA MODULAR
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE Y PARA ESTUDIAR
COMPUESTOS QUE MODULAN
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MULTIPLE"

7 2 13/02/03

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40
RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

| FECHA DE PAGO | TIPO PAGO | CAUSA | CUENTA | No. PAGO | FECHA PAGO | VALOR PAGO |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|---------------|
| 2003-02-11 | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2003-02-11 | 11.143.000.00 |

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

| FECHA DE PAGO | TIPO PAGO | CAUSA | CUENTA | No. PAGO | FECHA PAGO | VALOR PAGO |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------|------------|
| 2003-02-11 | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES | 2003-02-11 | 106.000.00 |

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

RECIBO DE PAGO DE 2003-02-11 16:22:40

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA

REGISTRO. FASE
PATENTE DE INVENCION
"METODOS PARA MODULAR
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MÚLTIPLE Y PARA ESTUDIAR
COMPUESTOS QUE MODULAN
PROTEINAS KINASA DE LINAJE
MÚLTIPLE"

SE DEBE DEJAR EN CONOCIMIENTO DE LOS INTERESADOS
Y DE LOS EFECTOS DE LA PATENTE DE INVENCION
Y DE LOS EFECTOS DE LA PATENTE DE INVENCION
Y DE LOS EFECTOS DE LA PATENTE DE INVENCION

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 83811003 83800000 Folios 233
Fecha (ADM) 2003-02-11 16:22 40
Tramite 811 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SE DEBE DEJAR EN CONOCIMIENTO DE LOS INTERESADOS

SE DEBE DEJAR EN CONOCIMIENTO DE LOS INTERESADOS

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax 281 31 25
Santa Fe de Bogotá DC Colombia

MÉTODOS PARA MODULAR PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE MÚLTIPLE Y PARA ESTUDIAR COMPUESTOS QUE MODULAN PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE MÚLTIPLE

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se dirige, en parte, a
métodos para modular miembros de la familia de las kinasas
de linaje múltiple ("MLK"), a métodos para identificar com-
puestos que modulan una proteína kinasa de linaje múltiple
y promueyen la supervivencia celular o promueven la muerte
10 celular, a métodos para identificar compuestos que pueden
ser de utilidad en el tratamiento de trastornos degenerati-
vos y/o de la inflamación y a métodos de tratamiento de
trastornos neurodegenerativos con compuestos que inhiben
una proteína kinasa de linaje múltiple

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La familia MLK consiste en un grupo de proteí-
nas en donde la secuencia proteica de los dominios kinasa
de los miembros de la familia tiene un estrecho parecido
con las MAPKKK, pero que tienen una mayor similitud entre
20 sí que con otras MAPKKK. Los miembros de la familia MLK
constituyen una porción de cascadas de kinasas muy comple-
jas, tales como, por ejemplo, la cascada de señalización
del estrés, que implica la modulación, entre otros, de la
kinasa N-terminal c-Jun (JNK), que, a su vez, modula, entre
25 otros, factores de transcripción, incluyendo c-Jun, ATF2 y
ELK-1. La JNK está descrita en las Patentes EE UU
5 534.426, 5 593.884, 5 605 808 y WO95/03324, cada una de
las cuales es aquí incorporada a modo de referencia en su
totalidad

30 La familia MLK incluye, en parte, los siguien-
tes grupos: 1) kinasa 1 de linaje múltiple (MLK1), 2) kina-
sa 2 de linaje múltiple (MLK2), 3) kinasa 3 de linaje múl-
tiple (MLK3), 4) kinasa portadora de cremallera de leucina
("LZK"), 5) kinasa portadora de doble cremallera de leucina
35 ("DLK") y 6) kinasa 6 de linaje múltiple (MLK6). La MLK1
tiene un dominio catalítico similar a ambas kinasas especí-
ficas para Tyr y Ser/Thr. Dorow y col, *Eur J Biochem*,
1993, 213, 701-710. La MLK2 tiene también un dominio cata-
lítico similar a ambas kinasas específicas para Tyr o

está descrita en las Patentes EE.UU 5 534 426, 5 593 884, 5 605.808 y WO95/03324, cada una de las cuales es aquí incorporada a modo de referencia en su totalidad

La familia MLK incluye, en parte, los siguientes grupos 1) kinasa 1 de linaje múltiple (MLK1), 2) kinasa 2 de linaje múltiple (MLK2), 3) kinasa 3 de linaje múltiple (MLK3), 4) kinasa portadora de cremallera de leucina ("LZK"), 5) kinasa portadora de doble cremallera de leucina ("DLK") y 6) kinasa 6 de linaje múltiple (MLK6). La MLK1 tiene un dominio catalítico similar a ambas kinasas específicas para Tyr y Ser/Thr. Dorow y col, *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710. La MLK2 tiene también un dominio catalítico similar a ambas kinasas específicas para Tyr o Ser/Thr Dorow y col., *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710 La MLK2 es también conocida como MST. Katoh y col., *Oncogene*, 1995, 10, 1447-1451 La MLK3 consiste en una proteína que, además del dominio de kinasa, contiene dos cremalleras de leucina con una región básica carboxi-terminal adyacente y una región rica en prolina Ing. y col, *Oncogene*, 1994, 9, 1745-1750 La MLK3 es también conocida como SPRK (Gallo y col., *J Biol Chem*, 1994, 269, 15092-15100) y PTK1 (Ezoe y col., *Oncogene*, 1994, 9, 935-938) LZK es una kinasa portadora de cremallera de leucina Sakuma y col, *J Biol Chem*, 1997, 272, 28622-28629 La DLK tiene un dominio de kinasa y dos supuestos motivos de cremallera de leucina. Holzman y col, *J Biol Chem*, 1994, 269, 30808-30817 La DLK es también conocida como ZPK (Reddy y col, *Biochem Biophys Res Comm*, 1994, 202, 613-620) y MUK (Hirai y col, *Oncogene*, 1996, 12, 641-650) Los miembros de la familia MLK están también descritos, por ejemplo, en las Patentes EE UU 5 676 945 y 5.554 523, WO93/15201, la Patente Canadiense 2 148 898, Diener y col., Diener y col, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 9687-9692, DeAizpurua y col., *J Biol Chem*, 1997, 272, 16364-16373, Tung y col., *Oncogene*, 1997, 14, 653-659, Sells y col, *Trends in Cell Biol*, 1997, 7, 161-167, Mata y col., *J Biol Chem*, 1996, 271, 16888-16896, Hirai y col, *J Biol Chem*, 1997, 272, 15167-15173, Fan y col, *J Biol Chem*, 1996, 271, 24788-24793, Blouin y col., *DNA and Cell Biol*,

1996, 15, 631-642, Pombo y col , *Nature*, 1995, 377, 750-754, Kiefer y col , *EMBO J* , 1996, 15, 7013-7025, Hu y col , *Genes & Dev* , 1996, 10, 2251-2264, Su y col , *EMBO J* , 1997, 16, 1279-1290, y Dorow y col , *Eur J Biochem* ,
 5 1995, 234, 492-500 Recientemente, se identificó otra kina-
 sa relacionada con las MLK en la base de datos EST La se-
 cuencia de ADN de este clon, MLK6, está descrita por siete
 entradas solapantes. Sus números de ID de clon son
 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 y 178522,
 10 cuyas secuencias son aquí incorporadas como referencia en
 su totalidad Cada una de las referencias citadas en el
 presente párrafo es aquí incorporada como referencia en su
 totalidad

Recientemente, se ha mostrado que la expresión
 15 estable de ZPK reduce la capacidad proliferativa de fibro-
 blastos NIH 3T3, según se mide por medio de un ensayo de
 formación de colonias. Bergeron y col , *Biochem Biophys
 Res Commun* , 1997, 231, 153-155 Bergeron y col , sin em-
 bargo, no consiguieron aportar ningún dato que mostrara que
 20 ZPK modulaba la actividad de un substrato ZPK o si ZPK pro-
 movía la muerte celular

Se ha visto que la expresión de un constructo
 codificante de Myc-MLK2 en células Swiss 3T3 conduce a
 apoptosis aproximadamente 20 horas después de la inyección
 25 Nagata y col., *EMBO J* , 1998, 17, 149-158.

Los Solicitantes han desarrollado numerosos
 compuestos indolo e indeno que, entre otras cosas, inhiben
 el crecimiento celular asociado a estados proliferativos e
 inhiben la muerte en una variedad de cultivos embrionarios,
 30 tales como el ganglio de las raíces dorsales, el estriado,
 los ganglios cervicales superiores y las motoneuronas. Pa-
 tentes EE UU 5 475 110, 5 591 855, 5.594 009, 5 461 146,
 5 621.100, 5.621 101, 5 705 511 y 5 756 494, cada una de
 las cuales fue concedida al titular de la presente solici-
 35 tud y cada una de las cuales es aquí incorporada como refe-
 rencia en su totalidad Se hace referencia a los compuestos
 citados en la Patente EE UU 5 705 511 que tienen la fórmu-
 la G en la presente solicitud como de fórmula I Los Soli-
 citantes han mostrado también que la apoptosis de las moto-

neuronas resulta inhibida por un derivado de K-252a, un indolocarbazol que también modula la cascada de señalización del estrés Maroney y col , *J Neurosci* , 1998, 18, 104-111, aquí incorporado como referencia en su totalidad

5 Debido a la inadecuación del estudio de compuestos que modulan a miembros de la cascada de señalización del estrés y promueven la muerte celular o la supervivencia celular, sigue habiendo necesidad de disponer de ensayos de estudio selectivo para agentes terapéuticos que
10 puedan ser de utilidad en el tratamiento de la inflamación y de los trastornos neurodegenerativos La presente invención se dirige a éstos, así como a otros, fines importantes

RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente invención proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y promueven la supervivencia celular, consistentes en las etapas de poner en contacto la célula que contiene la proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto, determinar si el compuesto reduce
20 la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple y determinar si el compuesto promueve la supervivencia celular

La presente invención también proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y promueven la muerte celular, consistentes en las etapas de poner en contacto la célula que contiene la proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto, determinar si el compuesto aumenta la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple y deter-
25 minar si el compuesto promueve la muerte celular

La presente invención también proporciona métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, consistentes en poner en contacto una célula o un extracto celular que
35 contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

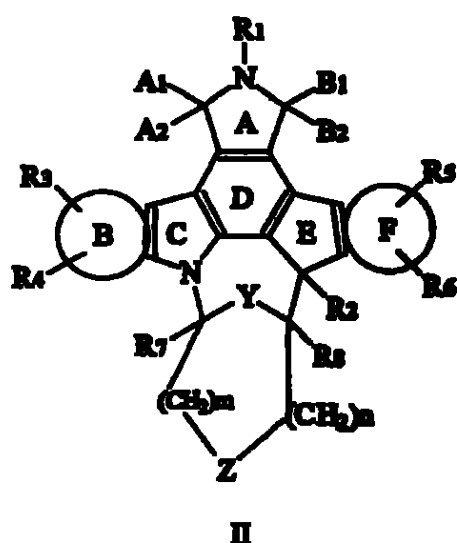
La presente invención también ofrece métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el

tratamiento de la inflamación, consistentes en poner en contacto una célula o un extracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también ofrece métodos para tratar un mamífero que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno neurodegenerativo, consistentes en administrar a dicho mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también proporciona métodos para tratar un mamífero que tiene inflamación, consistentes en administrar a dicho mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también proporciona métodos para modular la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula II



donde

el anillo B y el anillo F, de manera independiente y cada uno junto con los átomos de carbono a los que están unidos, son seleccionados entre el grupo consistente en un anillo aromático carbocíclico de 6 miembros

totalidad

Recientemente, se ha mostrado que la expresión estable de ZPK reduce la capacidad proliferativa de fibroblastos NIH 3T3, según se mide por medio de un ensayo de formación de colonias Bergeron y col , *Biochem Biophys Res Commun* , 1997, 231, 153-155 Bergeron y col , sin embargo, no consiguieron aportar ningún dato que mostrara que ZPK modulaba la actividad de un substrato ZPK o si ZPK promovía la muerte celular

Se ha visto que la expresión de un constructo codificante de Myc-MLK2 en células Swiss 3T3 conduce a apoptosis aproximadamente 20 horas después de la inyección Nagata y col , *EMBO J* , 1998, 17, 149-158

Los Solicitantes han desarrollado numerosos compuestos indolo e indeno que, entre otras cosas, inhiben el crecimiento celular asociado a estados proliferativos e inhiben la muerte en una variedad de cultivos embrionarios, tales como el ganglio de las raíces dorsales, el estriado, los ganglios cervicales superiores y las motoneuronas Patentes EE UU 5 475 110, 5 591 855, 5 594 009, 5 461 146, 5 621 100, 5 621 101, 5 705 511 y 5 756 494, cada una de las cuales fue concedida al titular de la presente solicitud y cada una de las cuales es aquí incorporada como referencia en su totalidad Se hace referencia a los compuestos citados en la Patente EE UU. 5 705 511 que tienen la fórmula G en la presente solicitud como de fórmula I Los Solicitantes han mostrado también que la apoptosis de las motoneuronas resulta inhibida por un derivado de K-252a, un indolocarbazol que también modula la cascada de señalización del estrés Maroney y col , *J Neurosci* , 1998, 18, 104-111, aquí incorporado como referencia en su totalidad

Debido a la inadecuación del estudio de compuestos que modulan a miembros de la cascada de señalización del estrés y promueven la muerte celular o la supervivencia celular, sigue habiendo necesidad de disponer de ensayos de estudio selectivo para agentes terapéuticos que puedan ser de utilidad en el tratamiento de la inflamación y de los trastornos neurodegenerativos La presente invención se dirige a éstos, así como a otros, fines importan-

tes

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y promueven la supervivencia celular, consistentes en las etapas de poner en contacto la célula que contiene la proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto, determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple y determinar si el compuesto promueve la supervivencia celular

La presente invención también proporciona métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y promueven la muerte celular, consistentes en las etapas de poner en contacto la célula que contiene la proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto, determinar si el compuesto aumenta la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple y determinar si el compuesto promueve la muerte celular

La presente invención también proporciona métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, consistentes en poner en contacto una célula o un extracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple.

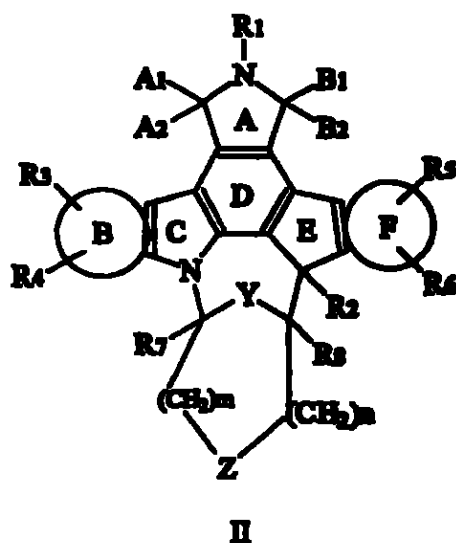
La presente invención también ofrece métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación, consistentes en poner en contacto una célula o un extracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también ofrece métodos para tratar un mamífero que tiene o del que se sospecha que tiene un trastorno neurodegenerativo, consistentes en administrar a dicho mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también proporciona métodos para tratar un mamífero que tiene inflamación, consis-

tentes en administrar a dicho mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple

La presente invención también proporciona métodos para modular la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula II



10

donde

el anillo B y el anillo F, de manera independiente y cada uno junto con los átomos de carbono a los que están unidos, son seleccionados entre el grupo consistente en

15

un anillo aromático carbocíclico de 6 miembros insaturado en el que 1 a 3 átomos de carbono pueden estar substituidos por átomos de nitrógeno,

20

un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, y

un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, en donde

25

o bien un átomo de carbono está substituido con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre,

o bien dos átomos de carbono están substituidos con un átomo de azufre y

uno de nitrógeno, un átomo de oxígeno y
uno de nitrógeno o dos átomos de nitró-
geno,
o bien tres átomos de carbono están
5 substituidos con tres átomos de nitró-
geno,
R¹ es seleccionado entre el grupo consistente
en
10 H, alquilo substituido o no substituido de
1 a 4 carbonos, arilo substituido o no
substituido, arilalquilo substituido o no
substituido, heteroarilo substituido o no
substituido o heteroarilalquilo substituido
o no substituido,
15 -C(=O)R⁹, donde R⁹ es seleccionado entre el
grupo consistente en alquilo, arilo y hete-
roarilo,
-OR¹⁰, donde R¹⁰ es seleccionado entre el
grupo consistente en H y alquilo de 1 a 4
20 carbonos,
-C(=O)NH₂, -NR¹¹R¹², -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pO-
R¹⁰, -O(CH₂)_pOR¹⁰ y -O(CH₂)_pNR¹¹R¹², donde p es
de 1 a 4 y donde
o bien R¹¹ y R¹² son cada uno indepen-
25 dientemente seleccionados entre el gru-
po consistente en H y alquilo de 1 a 4
carbonos,
o bien R¹¹ y R¹² forman juntos un grupo
de unión de fórmula -(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂-,
30 donde X¹ es escogido entre el grupo con-
sistente en -O-, -S- y -CH₂-,
R² es escogido entre el grupo consistente en H,
alquilo de 1 a 4 carbonos, -OH, alcoxi de 1 a 4
carbonos, -OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O-
35 (CH₂)_pNR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, arilalquilo substi-
tuido o no substituido de 6 a 10 carbonos y
heteroarilalquilo substituido o no substituido,
R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente
seleccionados entre el grupo consistente en

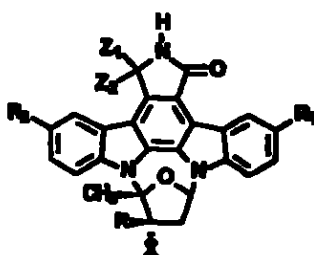
- 5 H, arilo, heteroarilo, F, Cl, Br, I, -CN, CF₃, -NO₂, -OH, -OR⁹, -O(CH₂)_pNR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR²R⁷, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, -CH₂OR¹⁰, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰S(=O)₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)R⁹, -CH₂OR¹⁴, donde R¹⁴ es el residuo de un aminoácido después de eliminar el grupo hidroxilo del grupo carboxilo,
- 10 -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -CO₂R², -C(=O)R², -C(=O)NR¹¹R¹², -CH=NOR², -CH=NR⁹, -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pNHR¹⁴ o -CH=NNR²R^{2A}, donde R^{2A} es igual a R², -S(O)_yR²-(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -CH₂S(O)_yR¹⁴, donde y es 0, 1 ó 2,
- 15 alquilo de 1 a 8 carbonos, alquenilo de 2 a 8 carbonos y alquinilo de 2 a 8 carbonos, donde
- 20 cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está sin substituir o cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está substituido con 1 a 3 grupos seleccionados entre el grupo consistente en arilo de 6 a 10 carbonos, heteroarilo, arilalcoxi, heterocicloalcoxi, hidroxialcoxi, alquilloxialcoxi, hidroxialquiltio, alcoxialquiltio, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂, -OH, -OR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pCO₂R⁹, -X²(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahidropiraniilo, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰C(=O)R⁹, -NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -NHC(=NH)NH₂, NR¹⁰S(O)₂R⁹, -S(O)_yR⁹, -CO₂R², -C(=O)NR¹¹R¹², -C(=O)R², -CH₂-OR¹⁰, -CH=NNR²R^{2A}, -CH=NOR², -CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -S(=O)₂NR²R^{2A}, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -OR¹⁴ y un monosacárido de 5 a 7 átomos de carbono, donde cada grupo
- 35

- hidroxilo del monosacárido está independientemente o bien sin substituir, o bien substituido por H, alquilo de 1 a 4 carbonos, alquilcarboniloxi de 2 a 5 carbonos o alcoxi de 1 a 4 carbonos,
- 5 X^2 es O, S o NR^{10} ,
 R^7 y R^8 son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en H, alquilo de 1 a 4 carbonos, alcoxi de 1 a 4 carbonos,
- 10 arilalquilo substituido o no substituido de 6 a 10 carbonos, heteroarilalquilo substituido o no substituido, $-(CH_2)_pOR^{10}$,
 $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ y $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, o R^7 y R^8 forman juntos o un grupo de unión de fórmula $-CH_2-X^3-CH_2-$, donde X^3 es X^2 o un enlace,
- 15 m y n son cada uno independientemente 0, 1 ó 2,
Y es seleccionado entre el grupo consistente en $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ y $-CH_2-$,
- 20 Z es seleccionado entre el grupo consistente en un enlace, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$,
 $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$,
 $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ y $-CH(O(C=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, donde R^{9A} es igual que R^9 ,
- 25 R^{15} y R^{16} son independientemente seleccionados entre el grupo consistente en H, $-OH$, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, hidroxialquilo y $-CO_2R^{10}$,
- 30 R^{17} es seleccionado entre el grupo consistente en H, alquilo, arilo y heteroarilo,
 A^1 y A^2 son seleccionados entre el grupo consistente en H, H, H, OR^2 , H, $-SR^2$, H, $-N-(R^2)_2$, y un grupo en el que A^1 y A^2 forman juntos un resto seleccionado entre el grupo consistente en $=O$, $=S$ y NR^2 ,
- 35 B^1 y B^2 son seleccionados entre el grupo consistente en H, H, H, $-OR^2$, H, $-SR^2$, H, $-N-(R^2)_2$, y un grupo en el que B^1 y B^2 forman juntos un re-

sto seleccionado entre el grupo consistente en
=O, =S y NR²,
con la condición de que al menos uno de los pares A¹ y A² o
B¹ y B² formen =O

5 La presente invención también ofrece métodos
para modular la actividad de una proteína kinasa de linaje
múltiple, consistentes en poner en contacto la proteína o
una célula que contiene la proteína con un compuesto que
tiene la fórmula (III)

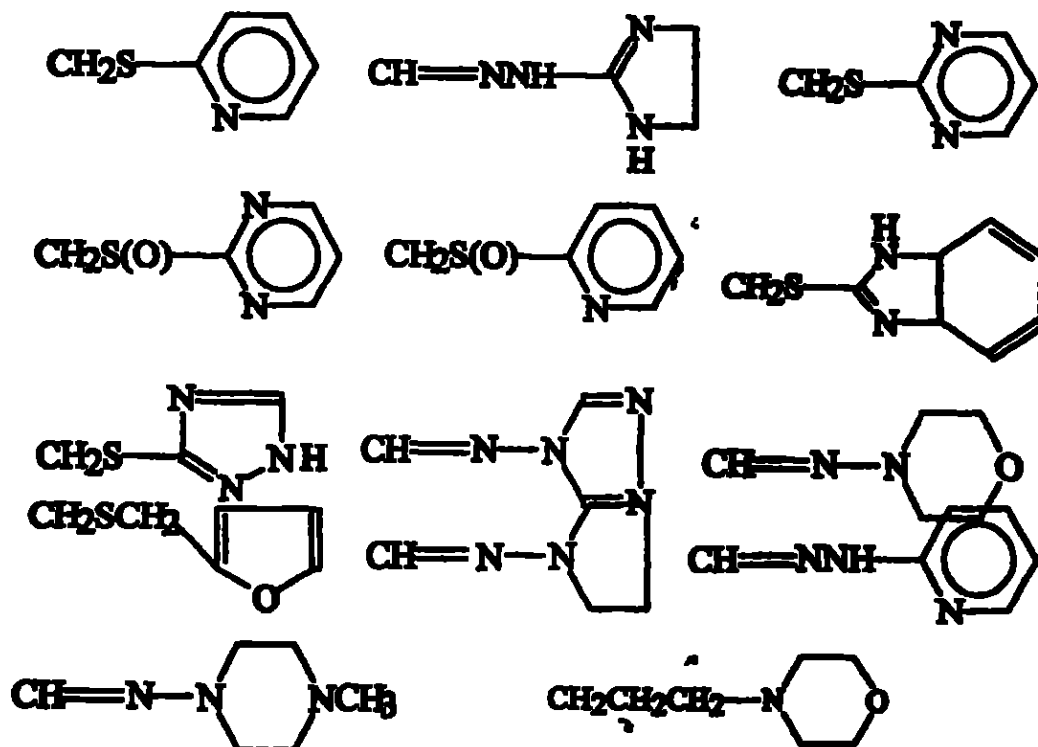
10



III

donde

15 Z₁ es H y Z₂ es H o Z₁ y Z₂ forman juntos =O,
R₁ es seleccionado entre el grupo consistente
en H, Cl, CH₂SO₂C₂H₅, Br, CH₂S(CH₂)₂NH₂,
CH₂S(CH₂)₂N(CH₃)₂, CH₂S(CH₂)₂NH₂n-C₄H₉, NHCONH-
C₆H₅, NHCONHC₂H₅, CH₂SC₂H₅, CH₂SC₆H₅, N(CH₃)₂, CH₃,
CH₂OCONHC₂H₅, NHCO₂CH₃, CH₂OC₂H₅, CH₂N(CH₃)₂, OH,
O-n-propilo, CH=NNH-C(-NH)NH₂, CH=N-N-(CH₃)₂,
20 CH₂S(CH₂)₂NH-n-C₄H₉, CH₂OCH₂OCH₂CH₃, CH₂S-[3-
(1,2,4-triazina)], CH₂CH₂SCH₃,



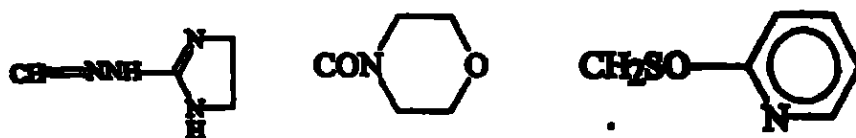
5

R_2 es seleccionado entre el grupo consistente en H, Br, Cl, I, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-triazina)]$, $CH_2CH_2SCH_3$ y CH_2OH ,

10

X es seleccionado entre el grupo consistente en H, CH_2OH , $CH_2NH-SerinaH$, CO_2CH_3 , $CONHC_6H_5$, $CH_2NHCO_2C_6H_5$, $CH_2NHCO_2CH_3$, CH_2N_3 , $CONHC_2H_5$, $CH_2NH-Glicina$, $CON(CH_3)_2$, $-CH_2NHCO_2-$, $CONH_2$, $CONHC_3H_7$, $CH_2NH-Serina$, CH_2SOCH_3 , $CH=NOH$, $CH_2NH-Prolina$, $CH_2CH_2(2-piridilo)$, $CH=NNHC(-NH)NH_2$, $CONH-(CH_2)_2OH$, $CH=NNHCONH_2$, CH_2OCOCH_3 , $-CH_2OC(CH_3)_2O-$, $CH_2SC_6H_5$, $CH_2SOC_6H_5$, $CO_2n-hexilo$, $CONHCH_3$ y $CO_2(CH_2)_4CH_3$ o una de las siguientes fórmulas

15



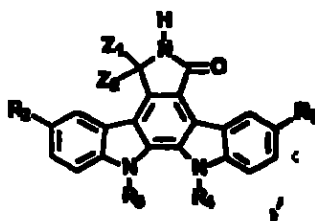
y

R es seleccionado entre el grupo consistente en OH y OCH_3

20

La presente invención proporciona también métodos de modulación de la actividad de una proteína kinasa de

linaje múltiple, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula IV



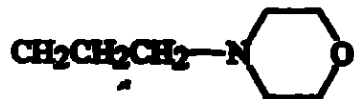
IV

5

donde

Z₁ es H y Z₂ es H o Z₁ y Z₂ forman juntos -O,
R₁ es H o Br,
R₂ es H,
R₃ es H, CH₂CH=CH₂, CH₂CH₂CH₂OH o

10



y

R₄ es H, CH₂CH=CH₂ o CH₂CH₂CH₂OH

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Con el fin de ilustrar realizaciones de la presente invención, se muestran en los dibujos determinadas características. Habría que entender, sin embargo, que esta invención no se limita a las realizaciones precisas mostradas

20

La Figura 1 es un dibujo esquemático que muestra una preparación general de indenopirrolocarbazoles con puente

La Figura 2 es un dibujo esquemático que muestra una preparación general de indenopirrolocarbazoles con puente

25

La Figura 3 es un dibujo esquemático que muestra una preparación de indenopirrolocarbazoles unidos a resina

La Figura 4 es un dibujo esquemático que muestra la preparación de indenopirrolocarbazoles solubles pro-

30

tegidos

La Figura 5 es un dibujo esquemático que muestra la preparación del intermediario V

La Figura 6 es un dibujo esquemático que muestra la preparación de indenopirrolocarbazoles con puente usando el método A

La Figura 7 es un dibujo esquemático que muestra la preparación de indenopirrolocarbazoles con puente usando el método B

La Figura 8 es un dibujo esquemático que muestra la preparación de indenopirrolocarbazoles con puente substituidos con el anillo B.

La Figura 9 es un dibujo esquemático que muestra la derivatización del anillo E de los indenopirrolocarbazoles con puente

La Figura 10 muestra un gráfico de dos experimentos independientes que representa la cantidad de células PC-12 neuronalmente diferenciadas viables que permanecen después de 5 días de cultivo en ausencia de NGF. Los resultados son expresados como porcentaje de control NGF en cada grupo (control del vector en ausencia de NGF, n=12, todos los demás grupos, n=3). La diferencia entre el control del vector y las reservas estables de células que expresan un mutante MLK-3 negativo dominante en ausencia de NGF es estadísticamente significativa, según se determina mediante una prueba t de dos colas ($p < 0,05$)

La Figura 11A muestra la fosforilación de GST-SEC-1 muerta con kinasa por FLAG-MLK-3 expresada en baculovirus (mezcla de longitud total y dominio de kinasa) usando un ensayo basado en gel radiactivo

La Figura 11B muestra un producto proteico basado en mielina fosforilado y marcado con ^{32}P formado como resultado de una reacción de kinasa catalizada por FLAG-MLK-3 expresada en baculovirus (mezcla de longitud total y dominio de kinasa) o por el dominio de kinasa de GST-MLK-3.

La Figura 12 es un análisis de inmunotransferencia que muestra la fosforilación de GST-SEC-1 muerto con kinasa por FLAG-MLK-3 expresada en baculovirus (mezcla de longitud total y dominio de kinasa), según se detecta me-

diante un anticuerpo SEK-1 fosfoespecífico

La Figura 13 muestra la fosforilación de la proteína básica de la mielina por el dominio de kinasa de GST-MLK-3 expresada en bacterias usando el (o) ensayo de precipitación con ácido tricloroacético de multiselección o el (*) método de la membrana de fosfocelulosa

La Figura 14 muestra una curva de unión a la saturación de [³H]K252a incubado con un lisado de células de insecto infectadas con baculovirus MLK-3

La Figura 15A muestra la cantidad de c-jun marcada con ³²P en una reacción de inmunoprecipitación/kinasa procedente de células que sobreexpresan MLK-3, MLK-2 o DLK y tratadas con un 0,025% de DMSO (control) o con 500 nM de K-252a

La Figura 15B muestra un gráfico que cuantifica el porcentaje de actividad que permanece en las reacciones de inmunoprecipitación/kinasa de las muestras descritas en la FIG 15A. Las columnas representan la media de muestras por duplicado, en donde la barra de error indica el rango de la media

La Figura 15C muestra la cantidad de c-jun marcada con ³²P en una reacción de inmunoprecipitación/kinasa de células que sobreexpresan HA-JNK1 sola o con MIKK1 a varias cantidades de ADN según se indica y tratadas con un 0,025% de DMSO (control) o con 500 nM de Compuesto III-3 (véase la Tabla 3). Las columnas representan la media de muestras por duplicado, donde la barra de error indica el rango de la media

La Figura 16 muestra que el Compuesto III-3 promueve la supervivencia neuronal de un modo dependiente de concentración. Se cultivaron neuronas disociadas de ganglios simpáticos ("SG") (A), de ganglios de la raíz dorsal ("DRG") (B), de ganglios ciliares ("CG") (C) y de motoneuronas (MN) (D), en presencia o en ausencia de los factores tróficos indicados. Las células fueron contadas 48 h después de plaquear como se describe en materiales y métodos. Los datos representan las medias ± SD de determinaciones por triplicado o por cuadruplicado. Se muestra uno de tres experimentos

La Figura 17 muestra las micrografías de contraste de fase de cultivos de neuronas DRG E12 (A, E), simpáticas (B, F), ciliares E8 (C, G) y motoras E5 5 (D, H) después de 48 h en cultivo (24 h para las neuronas ciliares) en presencia del respectivo factor neurotrófico (20 ng/ml de NGF para las neuronas simpáticas y sensoriales, 10 ng/ml de CNTF para las neuronas ciliares, 30 µg/ml de extracto de músculo ("MEX") para las motoneuronas (A-D)) o en presencia de 1 µM de Compuesto III-3 (E-H) Barra = 200 µm

La Figura 18 muestra una fotomicrografía de explantes de ganglios de la raíz dorsal in vitro Se plaquearon explantes de DRG de pollo (E9) en placas de 96 pocillos con medio que contenía un 0,05% de BSA Después de un período de unión de 2 h, se hicieron las adiciones (A) control de DMSO, (B) 20 ng/ml de NGF, (C) 250 nM de Compuesto III-3 A las 48 h, se retiró el medio y se fijaron los explantes con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfatos

La Figura 19 muestra el número de motoneuronas lumbares de pollo que sobreviven en E10 después de un tratamiento diario (E5-9) con dosis especificadas de Compuesto III-3 Los datos presentados son la media ± SD de 5-6 animales/grupo de tratamiento Se repitió el experimento citado dos veces. Los datos proceden de un experimento representativo y representan un lado de la columna lumbar *p<0,01, **p<0,001, prueba de la t de Student entre el Compuesto III-3 y los grupos control con corrección de Bonferroni

La Figura 20 muestra el número de motoneuronas en el núcleo espinal de la rata hembra del bulbocavernoso ("SNB") que sobrevivían en PN10 o PN60 después del tratamiento diario (PN1-5) con el Compuesto III-3 o con el vehículo control (5% de Solutol™) En PN10 (A, B) o PN 60 (B), las ratas fueron sacrificadas y la región de la médula espinal que contenía el SNB fue disecada y procesada para histología, se contaron entonces las motoneuronas teñidas con violeta de Cresylecht en sección seriada de la región lumbar 5-sacra 1 de la médula espinal según se ha descrito previamente (Wingfield y col., *Steroids*, 1975, 26, 311-

327) Los datos experimentales son las medias $\pm$ S E M de 4-8 animales/grupo de tratamiento

La Figura 21 muestra la pérdida de inmunorreactividad ChAT después de la axotomía hipoglósica en la rata adulta tras el tratamiento con el Compuesto III-3. Fotomicrografías del núcleo hipogloso tras la transección del nervio hipogloso y el tratamiento con (A) solución de vehículo solo (5% de Solutol[™]) y (B) 200 μ g del Compuesto III-3 aplicados en el sitio de la transección. (C) Número de motoneuronas hipoglósicas inmunorreactivas con ChAT después de los tratamientos descritos en (A) y (B) anteriormente. Los resultados son expresados como el porcentaje de motoneuronas inmunorreactivas con ChAT, definiendo el 100% como el número de motoneuronas inmunorreactivas con ChAT en el núcleo hipogloso no lesionado contralateral.

La Figura 22 muestra que la inhibición de la ruta de MLK-3 demuestra la eficacia y el bloqueo *in vivo* de los fenómenos de fosforilación aguas abajo. La Figura 22A muestra el aumento de neuronas inmunorreactivas con la tirosina hidroxilasa de la sustancia nigra después de la lesión MPTP tras la administración sistemática de Compuesto III-3. La Figura 22B es una inmunotransferencia representativa que muestra el aumento inducido por MPTP en los niveles de MKK4 fosforilada. La Figura 22C representa una inmunotransferencia y un ELISA representativos que muestran la atenuación de MKK4 fosforilada inducida por MPTP en presencia de Compuesto III-3.

La Figura 23 muestra la inducción de IL-2 en células Jurkat. La Figura 23A muestra el curso temporal de la inducción de IL-2. La Figura 23B muestra la inhibición de la inducción de IL-2 por el Compuesto III-3. La Figura 23C muestra la inhibición de la inducción de IL-2 por el Compuesto III-3 y el Compuesto I-4.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Tal como se empleó antes y a través de toda esta descripción, los siguientes términos, a menos que se indique algo diferente, serán entendidos como con los siguientes significados:

"Apoptosis" se refiere a una forma morfológica

específica de muerte celular caracterizada por fragmentación de las células y de sus núcleos en partículas unidas a membranas. La apoptosis puede ser disparada, por ejemplo, por tratamiento con compuestos inductores de la apoptosis, tales como etopósido, estaurosporina, factor α de necrosis tumoral, ceramida y similares, o por condiciones tales como la irradiación x.

El término "muerte celular" se refiere a la muerte de las células por apoptosis o por otros medios ampliamente conocidos para los expertos en la técnica. La "muerte celular" puede caracterizarse, por ejemplo, como una reducción de los números totales de células o una reducción de la viabilidad celular comparado con poblaciones de células control no tratadas. Los compuestos que "promueven la muerte celular" dan lugar a una reducción en los números de células o a una reducción en la viabilidad celular en comparación con poblaciones control. Por el contrario, los compuestos que "promueven la supervivencia celular" dan lugar a un aumento en los números de células o en la viabilidad celular, o bien hacen más lento o reducen el ritmo de muerte celular.

Los términos "reacciona selectivamente" o "se une específicamente" describen compuestos que interaccionan física o químicamente de forma directa con una proteína MLK. Por el contrario, los compuestos que no "reaccionan selectivamente" o que no "se unen específicamente" pueden afectar a proteínas aguas abajo o aguas arriba de la proteína MLK y, por lo tanto, pueden afectar a la actividad de las proteínas MLK, pero no interaccionan física o químicamente de forma directa con una proteína MLK.

El término "modula" se refiere a que aumenta o disminuye una actividad de una proteína particular o sustrato de la misma.

La presente invención se dirige, en parte, a métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una proteína MLK y promueven la supervivencia celular o la muerte celular. Los compuestos que dan lugar a una mayor actividad de la proteína MLK pueden promover la muerte celular, mientras que los compuestos que dan lugar a una

menor actividad de la proteína MLK pueden promover la supervivencia celular.

La proteína MLK puede ser cualquier proteína identificada como perteneciente a la clase MLK de proteínas. Preferiblemente, la proteína MLK es seleccionada entre el grupo consistente en MLK1, MLK2, MLK3 (SPRK, PTK1), LZK, DLK (ZPK, MUK) y MLK6 antes descrito. En realizaciones preferidas de la invención, los métodos identifican compuestos que interaccionan directamente o se unen a la proteína MLK, según se determina por medio de ensayos de unión, ensayos de kinasas u otros ensayos equivalentes.

Con objeto de identificar compuestos que modulan la actividad de la proteína MLK y promueven la supervivencia celular o la muerte celular, se pone en contacto una célula o células que contienen la proteína MLK con el compuesto de ensayo. El contacto puede tener lugar en tampones o en medios bien conocidos para los expertos en la técnica. Alternativamente, el contacto puede tener lugar in vivo, en cuyo caso se administra a un animal, por ejemplo un ratón u otro animal adecuado conocido para los expertos en la técnica, una composición farmacéutica que contiene el compuesto de ensayo y una sal farmacéuticamente aceptable, un vehículo o un diluyente. Además, se pueden usar números variables de células y concentraciones variables de compuestos de ensayo. Se determina si el compuesto de ensayo aumenta o disminuye la actividad de la proteína MLK. Además, se determina también si el compuesto de ensayo promueve la supervivencia celular o la muerte celular.

Las células que entran en contacto con los compuestos de ensayo pueden ser cualquier célula de mamífero. Preferiblemente, la célula es una célula neuronal. Preferiblemente, la célula está implicada en una enfermedad neurodegenerativa. Para los fines de la presente invención, una "enfermedad neurodegenerativa" un "trastorno neurodegenerativo" y una "condición neurodegenerativa" son intercambiables y se usan para describir cualquier enfermedad o trastorno que afecte a células neuronales o células implicadas en el sistema neuronal, incluyendo, aunque sin limitación, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de neuronas moto-

ras, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad cerebrovascular, las condiciones isquémicas, la demencia de SIDA, la epilepsia, la enfermedad de Huntington y las lesiones concusivas o penetrantes del cerebro o de la médula espinal

La actividad de la proteína MLK puede ser determinada por una serie de técnicas. Por ejemplo, se puede determinar la actividad MLK midiendo la actividad de un sustrato de la proteína MLK. Dichos sustratos son bien conocidos y fácilmente discernibles para los expertos en la técnica. Preferiblemente, el sustrato es un miembro de la familia de las quinasas de las proteínas quinasas activadas por mitógenos o familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos o sustratos más abajo en la ruta, que incluye, aunque sin limitación, una proteína seleccionada entre el grupo consistente en JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 y el homólogo en mamíferos de AEX-3, y también sustratos generales de proteínas quinasas Ser/Thr tales como la proteína básica de la mielina ("MBP"). Los reactivos y los métodos de medición de la actividad de los sustratos son también conocidos para los expertos en la técnica. La presencia de MLK puede ser también determinada midiendo la cantidad de la proteína MLK o del ARNm codificante de la proteína MLK. Los reactivos, incluyendo anticuerpos y sondas oligonucleotídicas, así como los métodos de medición de la cantidad de ADN o proteína, incluyendo las transferencias Northern y Western, son bien conocidos para los expertos en la técnica. La actividad de la proteína MLK puede ser también determinada por un ensayo de quinasas *in vitro*. Los ensayos de quinasas *in vitro* son bien conocidos para el experto en la técnica. Otras técnicas para medir la actividad proteica son conocidas para los expertos en la técnica y pretenden quedar amparadas por la presente invención. Así, un experto en la técnica puede determinar si el compuesto de ensayo modula, es decir, aumenta o reduce, la actividad de la proteína MLK.

Se puede determinar si el compuesto de ensayo promueve o no la supervivencia celular o la muerte celular.

de una serie de formas Preferiblemente, la promoción de la supervivencia celular o de la muerte celular es determinada usando células que se hallan en riesgo de morir y comparando la cantidad de células que contactaron con el compuesto de ensayo y que permanecen vivas con la cantidad de células que no contactaron con el compuesto de ensayo y permanecen vivas Preferiblemente, las células son células motoneuronas embrionarias primarias que están preprogramadas para morir Las células motoneuronas embrionarias primarias están descritas en Maroney y col , *J Neurosci* , 1998, 18, 104-111, que es aquí incorporada como referencia en su totalidad Las células motoneuronas embrionarias primarias mueren a no ser que sean rescatadas por el compuesto de ensayo Así, un mayor número de células motoneuronas vivas en la población de células motoneuronas tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células de motoneuronas en la población de células motoneuronas que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto de ensayo que promueve la supervivencia celular Por el contrario, un menor número de células motoneuronas vivas en la población de células motoneuronas tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células motoneuronas vivas en la población de células motoneuronas que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto de ensayo que promueve la muerte celular

En otra realización de la invención, se convierten células normales, o células de tipo salvaje, para que sean células con riesgo de morir por sobreexpresión de la proteína MLK, según se describe más adelante en los Ejemplos, y se las pone luego en contacto con el compuesto de ensayo Las células que sobreexpresan proteínas MLK pueden morir, a menos que sean rescatadas por el compuesto de ensayo Se puede conseguir la sobreexpresión de proteínas MLK usando vectores capaces de expresar la proteína particular en el interior de una célula Los vectores de expresión son bien conocidos para un experto en la técnica Además, los métodos para preparar vectores de expresión son también bien conocidos para los expertos en la técnica Se

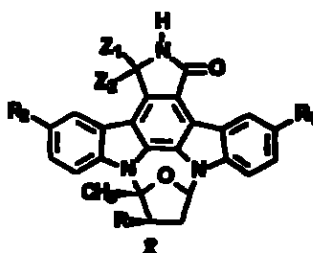
pueden preparar vectores de expresión que expresan cualquiera de las proteínas MLK de un modo similar a los descritos en los Ejemplos. Un mayor número de células vivas en la población de células sobreexpresantes tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células vivas en la población de células sobreexpresantes que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto de ensayo que promueve la supervivencia celular. Por el contrario, un menor número de células vivas en la población de células sobreexpresantes tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células vivas en la población de células sobreexpresantes que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto de ensayo que promueve la muerte celular.

En otra realización de la invención, la promoción de la supervivencia celular es determinada observando o midiendo una reducción de la apoptosis. El encogimiento citoplásmico y la condensación nuclear están asociados a la apoptosis. Así, un experto en la técnica puede medir una reducción en la apoptosis midiendo u observando una reducción en el encogimiento citoplásmico y/o en la condensación nuclear. Además, un experto en la técnica puede medir la apoptosis empleando técnicas de tinción convencionales.

En otras realizaciones de la invención, se pueden usar células neuronales normales de tipo salvaje para identificar compuestos que promueven la muerte celular. Las células neuronales normales sobreviven a menos que se les induzca la muerte con el compuesto de ensayo. Un menor número de células vivas en la población de células normales tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células vivas en la población de células normales que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo es indicativo de un compuesto de ensayo que promueve la muerte celular. Por el contrario, un número mayor o igual de células vivas en la población de células normales tratadas con el compuesto de ensayo en comparación con el número de células vivas en la población de células normales que no fueron tratadas con el compuesto de ensayo no es indicativo de un compuesto de ensayo que promueva la muerte celular.

La presente invención se dirige también, en parte, a métodos para modular la actividad de una proteína MLK, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula G (aquí llamada fórmula I) indicada en la Patente EE UU N° 5 705 511, que fue concedida al titular de la presente solicitud y es aquí incorporada como referencia en su totalidad

La presente invención se dirige también, en parte, a métodos para modular la actividad de una proteína MLK, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula III siguiente



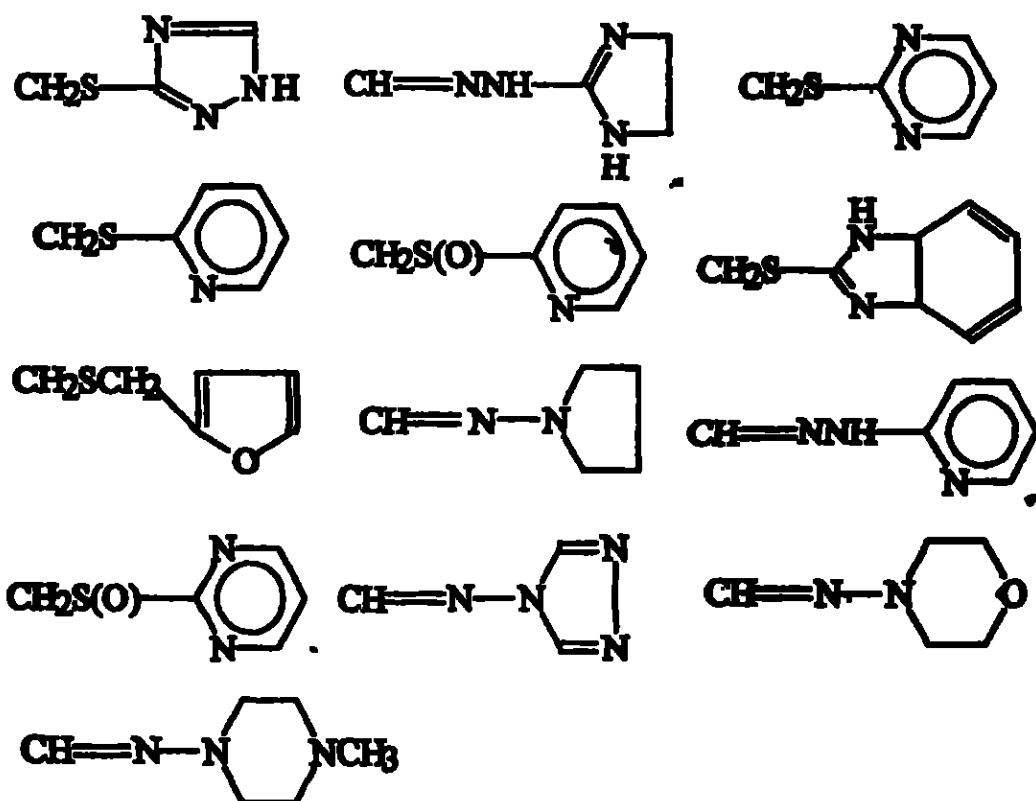
III

15

donde

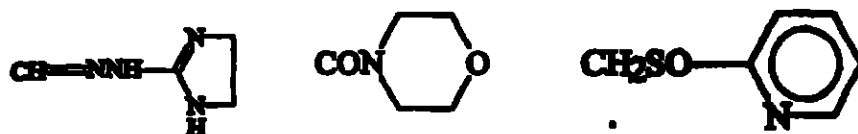
20 Z₁ es H y Z₂ es H o Z₁ y Z₂ forman juntos =O,
R₁ es seleccionado entre el grupo consistente en H, Cl, CH₂SO₂C₂H₅, Br, CH₂S(CH₂)₂NH₂, CH₂S(CH₂)₂N(CH₃)₂, CH₂S(CH₂)₂NH₂n-C₄H₉, NHCONH-C₆H₅, NHCONHC₂H₅, CH₂SC₂H₅, CH₂SC₆H₅, N(CH₃)₂, CH₃, CH₂OCONHC₂H₅, NHCO₂CH₃, CH₂OC₂H₅, CH₂N(CH₃)₂, OH, O-n-propilo, CH=NNH-C(=NH)NH₂, CH=N-N-(CH₃)₂, CH₂S(CH₂)₂NH-n-C₄H₉, CH₂OCH₂OCH₂CH₃, CH₂S-[3-(1,2,4-triazina)], CH₂CH₂SCH₃,

25



y

- 5 R_2 es seleccionado entre el grupo consistente en H, Br, Cl, I, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4-triazina)]$, $CH_2CH_2SCH_3$ y CH_2OH ,
 10 X es seleccionado entre el grupo consistente en H, CH_2OH , $CH_2NH-SerinaH$, CO_2CH_3 , $CONHC_6H_5$, $CH_2NHCO_2C_6H_5$, $CH_2NHCO_2CH_3$, CH_2N_3 , $CONHC_2H_5$, $CH_2NH-Glicina$, $CON(CH_3)_2$, $-CH_2NHCO_2-$, $CONH_2$, $CONHC_3H_7$, $CH_2NH-Serina$, CH_2SOCH_3 , $CH=NOH$, $CH_2NH-Prolina$, $CH_2CH_2(2-piridilo)$, $CH=NNHC(=NH)NH_2$, $CONH-(CH_2)_2OH$, $CH=NNHCONH_2$, CH_2OCOCH_3 , $-CH_2OC(CH_3)_2O-$, $CH_2SC_6H_5$, $CH_2SOC_6H_5$, $CO_2n-hexilo$, $CONHCH_3$ y
 15 $CO_2(CH_2)_4CH_3$ o una de las siguientes fórmulas

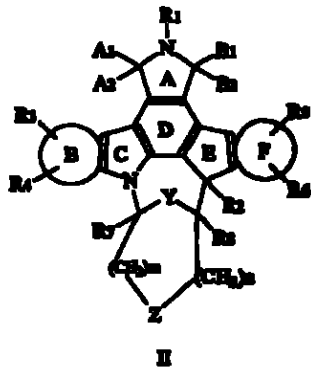


y

- 20 R es seleccionado entre el grupo consistente en OH y OCH_3

En realizaciones preferidas de la invención, Z_1 y Z_2 son H, X es CO_2CH_3 , R_1 es $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, R_2 es $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-piridilo})$ y R es OH. En otras realizaciones preferidas de la invención, Z_1 y Z_2 son H, X es CO_2CH_3 , R_1 y R_2 son $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ y R es OH, o Z_1 y Z_2 son H, X es CO_2CH_3 , R_1 y R_2 son $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, R es OH, o Z_1 , Z_2 , R_1 y R_2 son H, X es CO_2CH_3 y R es OH, o Z_1 , Z_2 , R_1 y R_2 son H, X es $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ y R es OH, o Z_1 , Z_2 y R_1 son H, R_2 es CH_2OH , X es CO_2CH_3 y R es OH, o Z_1 y Z_2 son H, R_1 y R_2 son $\text{H}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazina})]$, X es CO_2CH_3 y R es OH, o Z_1 y Z_2 son H, R_1 es Br, R_2 es I, X es CO_2CH_3 y R es OH, o Z_1 y Z_2 son H, R_1 y R_2 son $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X es CO_2CH_3 y R es OH, o Z_1 , Z_2 , R_1 y R_2 son H, X es CO_2CH_3 y R es OCH_3 , o Z_1 y Z_2 forman juntos $=\text{O}$, R_1 y R_2 son Br, X es CO_2CH_3 y R es OH.

La presente invención se dirige también, en parte, a métodos para modular la actividad de una proteína MLK, consistentes en poner en contacto la proteína o una célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula II siguiente



donde

el anillo B y el anillo F, de manera independiente y cada uno junto con los átomos de carbono a los que están unidos, son seleccionados entre el grupo consistente en

- un anillo aromático carbocíclico de 6 miembros insaturado en el que 1 a 3 átomos de carbono pueden estar substituidos por átomos de nitrógeno,
- un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, y

c) un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, en donde

5 1) o bien un átomo de carbono está substituido con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre,

2) o bien dos átomos de carbono están substituidos con un átomo de azufre y uno de nitrógeno, un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno o dos átomos de nitrógeno,

10 3) o bien tres átomos de carbono están substituidos con tres átomos de nitrógeno,

15 R^1 es seleccionado entre el grupo consistente en

a) H, alquilo substituido o no substituido de 1 a 4 carbonos, arilo substituido o no substituido, arilalquilo substituido o no substituido, heteroarilo substituido o no substituido o heteroarilalquilo substituido o no substituido,

20 b) $-C(=O)R^9$, donde R^9 es seleccionado entre el grupo consistente en alquilo, arilo y heteroarilo,

25 c) $-OR^{10}$, donde R^{10} es seleccionado entre el grupo consistente en H y alquilo de 1 a 4 carbonos,

30 d) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$ y $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, donde p es de 1 a 4 y donde

1) o bien R^{11} y R^{12} son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en H y alquilo de 1 a 4 carbonos,

35 2) o R^{11} y R^{12} forman juntos un grupo de unión de fórmula $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, donde X^1 es escogido entre el grupo consistente en $-O-$, $-S-$ y $-CH_2-$,

R^2 es escogido entre el grupo consistente en H,

- alquilo de 1 a 4 carbonos, -OH, alcoxi de 1 a 4 carbonos, -OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O-(CH₂)_pNR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, arilalquilo sustituido o no sustituido de 6 a 10 carbonos y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en
- 5
- a) H, arilo, heteroarilo, F, Cl, Br, I, -CN, CF₃, -NO₂, -OH, -OR⁹, -O(CH₂)_pNR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR²R⁷, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, -CH₂OR¹⁰, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰S(=O)₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)R⁹,
- 10
- b) -CH₂OR¹⁴, donde R¹⁴ es el residuo de un aminoácido después de eliminar el grupo hidroxilo del grupo carboxilo,
- 15
- c) -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -CO₂R², -C(=O)R², -C(=O)-NR¹¹R¹², -CH=NOR², -CH=NR⁹, -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pNHR¹⁴ o -CH=NNR²R^{2A}, donde R^{2A} es igual a R²,
- 20
- d) -S(O)_yR²-(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -CH₂S(O)_yR¹⁴, donde y es 0, 1 ó 2,
- e) alquilo de 1 a 8 carbonos, alquenilo de 2 a 8 carbonos y alquinilo de 2 a 8 carbonos, donde
- 25
- 1) cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está sin substituir o
- 2) cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está substituido con 1 a 3 grupos seleccionados entre el grupo consistente en arilo de 6 a 10 carbonos, heteroarilo, arilalcoxi, heterocicloalcoxi, hidroxialcoxi, alquiloxialcoxi, hidroxialquiltio, alcoxialquiltio, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂,
- 30
- OH, -OR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹², -X²-(CH₂)_pCO₂R⁹, -X²(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -X²(CH₂)_p-NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahidropiraniilo, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰-
- 35

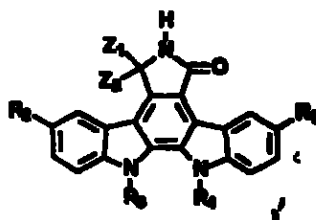
- 5 $C(=O)R^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$,
 $-NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$,
 $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2-OR^{10}$,
 $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$,
 $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P-$
 $(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ y un monosacárido de 5
a 7 átomos de carbono, donde cada grupo
hidroxilo del monosacárido está inde-
pendientemente o bien sin substituir, o
10 bien substituido por H, alquilo de 1 a
4 carbonos, alquilcarboniloxi de 2 a 5
carbonos o alcoxi de 1 a 4 carbonos,
 X^2 es O, S o NR^{10} ,
 R^7 y R^8 son cada uno independientemente selec-
15 cionados entre el grupo consistente en H, al-
quilo de 1 a 4 carbonos, alcoxi de 1 a 4 carbo-
nos, arilalquilo substituido o no substituido
de 6 a 10 carbonos, heteroarilalquilo substi-
tuido o no substituido, $-(CH_2)_pOR^{10}$,
20 $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ y $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, o R^7 y R^8
forman juntos o un grupo de unión de fórmula -
 $CH_2-X^3-CH_2-$, donde X^3 es X^2 o un enlace,
m y n son cada uno independientemente 0, 1 ó 2,
Y es seleccionado entre el grupo consistente en
25 $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$ y -
 CH_2- ,
Z es seleccionado entre el grupo consistente en
un enlace, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$,
 $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$,
30 $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N-$
 $(S(O)_yNR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+$
 $(O^-)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$ y $-CH(O(C=O)R^9)CH-$
 $(OC(=O)R^{9A})-$, donde R^{9A} es igual que R^9 ,
 R^{15} y R^{16} son independientemente seleccionados
35 entre el grupo consistente en H, $-OH$, $-C-$
 $(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, hidroxialquilo y $-CO_2R^{10}$,
 R^{17} es seleccionado entre el grupo consistente
en H, alquilo, arilo y heteroarilo,
 A^1 y A^2 son seleccionados entre el grupo consis-

tente en H, H, H, OR^2 , H, $-SR^2$, H, $-N-(R^2)_2$, y un grupo en el que A^1 y A^2 forman juntos un resto seleccionado entre el grupo consistente en $=O$, $=S$ y NR^2 ,

5 B^1 y B^2 son seleccionados entre el grupo consistente en H, H, H, $-OR^2$, H, $-SR^2$, H, $-N-(R^2)_2$, y un grupo en el que B^1 y B^2 forman juntos un resto seleccionado entre el grupo consistente en $=O$, $=S$ y NR^2 ,

10 con la condición de que al menos uno de los pares A^1 y A^2 o B^1 y B^2 formen $=O$

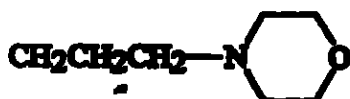
La presente invención se dirige también, en parte, a métodos para modular la actividad de una proteína MLK, consistentes en poner en contacto la proteína o una
15 célula que contiene la proteína con un compuesto que tiene la fórmula IV siguiente



IV

donde

20 Z_1 es H y Z_2 es H o Z_1 y Z_2 forman juntos $=O$,
 R_1 es H o Br,
 R_2 es H,
 R_3 es H, $CH_2CH=CH_2$, $CH_2CH_2CH_2OH$ o



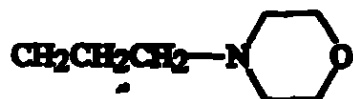
25

y

R_4 es H, $CH_2CH=CH_2$ o $CH_2CH_2CH_2OH$

En realizaciones preferidas de la invención, R_1 , R_2 , R_4 , Z_1 y Z_2 son H y R_3 es $CH_2CH=CH_2$. En otras realizaciones preferidas de la invención, R_1 es Br y R_2 , R_3 , R_4 , Z_1
30 y Z_2 son H, o R_1 , R_2 , Z_1 y Z_2 son H y R_3 y R_4 son $CH_2CH=CH_2$, o

R_1, R_2, R_3, Z_1 y Z_2 son H y R_4 es $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, o R_1, R_2, Z_1 y Z_2 son H y R_3 y R_4 son $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, o R_1, R_2, R_4, Z_1 y Z_2 son H y R_3 es



La presente invención también proporciona métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, consistentes en poner en contacto una célula o extracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple. Las células, y los extractos procedentes de ellas, incluyen las antes descritas. Los compuestos hallados mediante los presentes métodos (es decir, aquellos compuestos que inhiben o reducen la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple) pueden ser útiles para tratar trastornos neurodegenerativos. La proteína es preferiblemente seleccionada entre el grupo consistente en kinasa 1 de linaje múltiple, kinasa 2 de linaje múltiple, kinasa 3 de linaje múltiple, kinasa portadora de cremallera de leucina, kinasa portadora de doble cremallera de leucina y kinasa 6 de linaje múltiple. La célula es contactada *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, la actividad de la proteína es determinada midiendo la actividad o el estado de fosforilación de un sustrato de dicha proteína. Preferiblemente, el sustrato es seleccionado entre el grupo consistente en JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 y el homólogo en mamíferos de AEX-3, y también sustratos generales Ser/Thr tales como, por ejemplo, la proteína básica de la mielina (MBP). La actividad proteica puede ser también determinada midiendo la actividad de un sustrato de la proteína, la cantidad de un sustrato de la proteína o el ARNm codificante del sustrato de la proteína. La actividad de la proteína puede ser también determinada por un ensayo de kinasa o un ensayo de unión *in vitro*. Las células son preferiblemente células motoneuronas embrionarias primarias, células que sobreexpresan una proteína kinasa de linaje múltiple o una célula neuronal, pero puede ser cualquier célula o extracto de

ella Preferiblemente, se identifican compuestos que pueden unirse directamente a la proteína kinasa de linaje múltiple, como se ha descrito anteriormente

La presente invención proporciona también métodos para identificar compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de la inflamación, consistentes en poner en contacto o una célula o extracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con el compuesto y determinar si el compuesto reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple. Las células, y sus extractos, incluyen las descritas anteriormente Los compuestos hallados por los presentes métodos (es decir, aquellos compuestos que inhiben o reducen la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple) pueden ser útiles para tratar la inflamación La proteína es preferiblemente seleccionada entre el grupo consistente en kinasa 1 de linaje múltiple, kinasa 2 de linaje múltiple, kinasa 3 de linaje múltiple, kinasa portadora de cremallera de leucina, kinasa portadora de doble cremallera de leucina y kinasa 6 de linaje múltiple La célula es contactada *in vitro* o *in vivo* Preferiblemente, la actividad de la proteína es determinada midiendo la actividad o el estado de fosforilación de un sustrato de dicha proteína Preferiblemente, el sustrato es seleccionado entre el grupo consistente en JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1) MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 y el homólogo en mamíferos de AEX-3, y también sustratos generales Ser/Thr tales como, por ejemplo, la proteína básica de la mielina (MBP). La actividad de la proteína también puede ser determinada midiendo la actividad de un sustrato de la proteína, la cantidad de un sustrato de la proteína o el ARNm codificante del sustrato de la proteína. La actividad de la proteína puede ser también determinada por un ensayo de kinasa o un ensayo de unión *in vitro*

Las células son preferiblemente células motoneuronas embrionarias primarias, células que sobreexpresan una proteína kinasa de linaje múltiple o una célula neuronal, pero puede ser cualquier célula o extracto de ella Las células también incluyen, aunque sin limitación las im-

plicadas en la inflamación, tales como, por ejemplo, linfocitos, macrófagos y otras células blancas de la sangre conocidas para los expertos en la técnica. Preferiblemente, se identifican compuestos que se unen directamente con la
5 proteína kinasa de linaje múltiple.

La presente invención también proporciona métodos para tratar un mamífero que tiene o se sospecha que tiene un trastorno neurodegenerativo, consistentes en administrar al mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple. Un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple incluye, aunque sin limitación, compuestos que tienen la fórmula I, II, III y IV. Los compuestos preferidos incluyen los que fueron antes descritos
10 con respecto al método de estudio de compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y, o bien promueven la supervivencia de las células, o bien promueven la muerte de las células. Un mamífero preferido es un humano. Un individuo puede ser sospechoso de tener una enfermedad neurodegenerativa si el individuo tiene síntomas de una enfermedad neurodegenerativa particular, si se halla en un grupo de alto riesgo o si tiene una historia familiar de una enfermedad neurodegenerativa.
15 20

La presente invención también ofrece métodos para tratar un mamífero que tiene inflamación, consistentes en administrar a dicho mamífero un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple. Un compuesto que inhibe o reduce la actividad de la proteína kinasa de linaje múltiple incluye, aunque sin limitación, compuestos que tienen la fórmula I, II, III y IV. Los compuestos preferidos incluyen los que fueron antes descritos con respecto al método de estudio de compuestos que modulan la actividad de una proteína kinasa de linaje múltiple y, o bien promueven la supervivencia de las células, o bien promueven la muerte de las células. Un mamífero preferido es un humano.
25 30 35

El contacto con compuestos de las fórmulas I-IV puede tener lugar en tampones o en medios bien conocidos para los expertos en la técnica. Alternativamente, el con-

tacto puede tener lugar por administración de una composición farmacéutica que contenga el compuesto de ensayo y una sal farmacéuticamente aceptable, un vehículo o un diluyente a un animal o mamífero adecuado, tal como, por ejemplo, un

5 ratón u otro animal adecuado conocido para los expertos en la técnica. Además, se pueden usar números variables de células y de concentraciones de compuestos Las células que contactan con los compuestos de ensayo pueden ser cualquier célula de mamífero. Preferiblemente, la célula es una célula

10 la neuronal Preferiblemente, la célula está implicada en una enfermedad neurodegenerativa, tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de neuronas motoras, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad cerebrovascular, las condiciones isquémicas,

15 micas, la demencia de SIDA, la epilepsia, la enfermedad de Huntington y las lesiones concusivas o penetrantes del cerebro o de la médula espinal Los compuestos que tienen la fórmula I, y los métodos de preparación de los mismos, están descritos en la Patente EE UU 5.705.511, aquí incorporada como referencia en su totalidad Los compuestos que

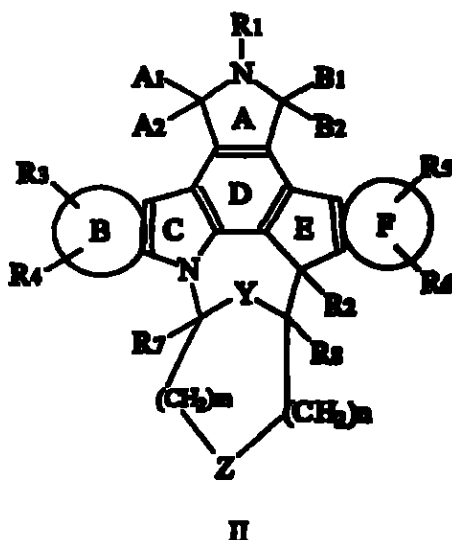
20 tienen la fórmula III, y los métodos para su preparación, están descritos en las Patentes EE UU 5 741 8098, 5 621.100, 5 621.101, 5 461.146 y 5.756 494 y en WO 97/46567, cada una de las cuales es aquí incorporada como referencia en su totalidad Los compuestos que tienen la

25 fórmula IV, y sus métodos de preparación, están descritos en las Patentes EE.UU. 5 741 8098, 5 621 100, 5 621.101, 5 461 146 y 5 756 494 y en WO 97/46567, cada una de las cuales es aquí incorporada como referencia en su totalidad.

30 Los compuestos que tienen la fórmula II incluyen los diastereómeros y los enantiómeros alrededor de los átomos de carbono a los que se unen los sustituyentes R², R⁷ y R⁸

Los indenopirrolocarbazoles con puente preferidos

35 dos están representados por la fórmula II



En algunas realizaciones preferidas de los compuestos de fórmula II, R^1 es H. En otras realizaciones preferidas, R^2 es H, hidroxilo o alquilo sustituido o no sustituido.

En otras realizaciones preferidas, R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido. En otras realizaciones preferidas, R^7 y R^8 son independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones preferidas, Y es O. En otras realizaciones preferidas, Z es un enlace, O, S o N sustituido o no sustituido. En aún más realizaciones preferidas, m y n son independientemente 1 ó 2. En algunas realizaciones especialmente preferidas, Y es O, Z es un enlace u O y m y n son independientemente 1 ó 2.

En otras realizaciones preferidas, A^1A^2 y B^1B^2 son =O o H,H.

En algunas realizaciones especialmente preferidas, R^1 , R^4 , R^6 y R^7 son cada uno H, Y es =O, n es 1, A^1A^2 y B^1B^2 son =O o H,H, R^2 es H, OH o alquilo inferior, R^3 es H o alquilo sustituido, R^5 y R^6 son cada uno H o alcoxi, siendo preferido metoxi, Z es un enlace u O, y m es 1 ó 2.

Algunas realizaciones especialmente preferidas de los compuestos de fórmula II son los compuestos II-1,

II-2, II-3, II-4a, II-4b, II-5, II-6, II-7a, II-7b, II-8, II-9, II-10, II-11 y II-12 indicados en la Tabla 1 que se dará a continuación

Se hará aquí referencia a partir de ahora a los
5 compuestos representados por la fórmula II como Compuesto (II)

Tal como se utiliza aquí, el término "carbocíclico" se refiere a grupos cíclicos en los que una porción del anillo está compuesta únicamente por átomos de carbono
10 Los términos "heterociclo" y "heterocíclico" se refieren a grupos cíclicos en los que la porción del anillo incluye al menos un heteroátomo, tal como O, N o S

Tal como se usa aquí, el término "alquilo" significa un grupo alquilo de cadena lineal, cíclico o ramificado que tiene 1 a 8 átomos de carbono, tal como metilo, 15 tilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isoamilo, neopentilo, 1-etilpropilo, hexilo, octilo, ciclopropilo y ciclopentilo El resto alquilo de los grupos que contienen alquilo, tales como grupos alcoxi, alcoxycarbonilo y alquilaminocarbonilo, tiene 20 el mismo significado que el alquilo definido anteriormente Los grupos alquilo inferior, que son preferidos, son grupos alquilo según se ha definido antes que contienen 1 a 4 carbonos El término "alquenilo" pretende incluir cadenas 25 hidrocarbonadas de cadena lineal o ramificadas que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono Como ejemplos de grupos alquenilo se incluyen grupos etenilo y propenilo Tal como se usa aquí, el término "alquinilo" pretende incluir cadenas hidrocarbonadas de cadena lineal o ramificadas 30 que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono Como ejemplos de grupos alquinilo se incluyen grupos etinilo y propinilo

El resto acilo de los grupos que contienen acilo, tales como grupos aciloxi, pretende incluir un grupo 35 alcanóilo de cadena lineal o ramificado de 1 a 6 átomos de carbono, tal como formilo, acetilo, propanoilo, butirilo, valerilo, pivaloilo o hexanoilo

Tal como se utiliza aquí, el término "arilo" significa un grupo de 6 a 12 átomos de carbono, tal como

- fenilo, bifenilo y naftilo. Como grupos arilo preferidos se incluyen grupos fenilo y naftilo no sustituidos o sustituidos. El término "heteroarilo", tal como se utiliza aquí, representa un grupo arilo en el que uno o más átomos de
- 5 carbono del anillo están sustituidos por un heteroátomo (es decir, un átomo distinto de carbono), tal como grupos imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, quinolilo, isoquinolilo, benzoimidazolilo, tiazolilo, pirazolilo y benzotiazolilo.
- 10 El término "aralquilo" (o "arilalquilo") pretende representar un grupo de 7 a 15 carbonos consistente en un grupo alquilo que lleva un grupo arilo. Como ejemplos de grupos aralquilo se incluyen grupos bencilo, fenetilo, benzhidrilo y naftilmetilo.
- 15 Los grupos alquilo y los restos alquilo contenidos en grupos sustituyentes tales como grupos aralquilo, alcoxi, arilalcoxi, hidroxialcoxi, alcoxialcoxi, hidroxialquiltio, alcoxialquiltio, alquilcarboniloxi, hidroxialquilo y aciloxi pueden estar sustituidos o sin substituir. Un
- 20 grupo alquilo sustituido tiene 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados, preferiblemente hidroxil, alcoxi inferior, alcoxi inferior-alcoxi, arilalcoxi-alcoxi inferior sustituido o no sustituido, heteroarilalcoxi-alcoxi inferior sustituido o no sustituido, arilalcoxi
- 25 sustituido o no sustituido, heterocicloalcoxi sustituido o no sustituido, halógeno, carboxilo, alcoxycarbonilo inferior, nitro, amino, mono- o dialquilamino inferior, dioxolano, dioxano, ditiolano, ditiona, furano, lactona o lactama.
- 30 Los grupos arilo sustituidos, heteroarilo sustituidos y aralquilo sustituidos tienen cada uno de 1 a 3 sustituyentes independientemente seleccionados, que son preferiblemente alquilo inferior, hidroxil, alcoxi inferior, carboxil, alcoxi inferior-carbonilo, nitro, amino, mono-
- 35 no- o dialquilamino inferior y halógeno.
- Los grupos heterocíclicos formados con un átomo de nitrógeno incluyen grupos pirrolidinilo, piperidinilo, piperidino, morfolinilo, morfolino, tiomorfolino, N-metilpiperazinilo, indolilo, isoindolilo, imidazol, imida-

zolina, oxazolina, oxazol, triazol, tiazolina, tiazol, pirazol, pirazolona y triazol. Los grupos heterocíclicos formados con un átomo de oxígeno incluyen grupos furano, tetrahidrofurano, pirano y tetrahidropirano.

5 Los grupos "hidroxialquilo" son grupos alquilo que tienen un grupo hidroxilo unido a los mismos. Los halógenos incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

Tal como se utiliza aquí, el término "heteroarilalquilo" significa un grupo arilalquilo que contiene un heteroátomo. El término "oxi" representa la presencia de un átomo de oxígeno. Así, los grupos "alcoxi" son grupos alquilo que se unen a través de un átomo de oxígeno y los grupos "carboniloxi" son grupos carbonilo que se unen a través de un átomo de oxígeno.

15 El término "heterocicloalcoxi" significa un grupo alcoxi que tiene un grupo heterociclo unido al resto alquilo del mismo y el término "arilalcoxi" significa un grupo alcoxi que tiene un grupo arilo unido a su resto alquilo. El término "alquilcarboniloxi" significa un grupo de fórmula $-O-C(=O)-$ alquilo.

20 Tal como se usa aquí, el término "alquiloxi-alcoxi" denota un grupo alcoxi que contiene un sustituyente alquiloxi unido a su resto alquilo. El término "alcoxialquiltio" significa un grupo alquiltio (es decir, un grupo de fórmula $-S-$ alquilo) que contiene un sustituyente alcoxi unido a su resto alquilo. El término "hidroxialquiltio" significa un grupo alquiltio (es decir, un grupo de fórmula $-S-$ alquilo) que contiene un sustituyente hidroxilo unido a su resto alquilo.

30 Tal como se usa aquí, el término "monosacárido" tiene su significado acostumbrado como azúcar simple.

Tal como se usa aquí, el término "aminoácido" denota una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. Las realizaciones de aminoácidos incluyen α -aminoácidos, es decir, ácidos carboxílicos de fórmula general $HOOC-CH(NH_2)-($ cadena lateral).

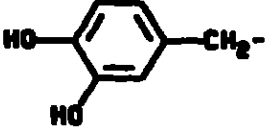
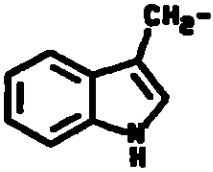
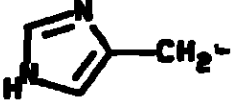
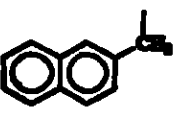
35 Las cadenas laterales de los aminoácidos incluyen restos naturales y no naturales. Las cadenas laterales de aminoácidos que no aparecen de forma natural (es decir,

no naturales) son restos que se utilizan en lugar de las cadenas laterales de los aminoácidos naturales, por ejemplo análogos de aminoácidos Véase, por ejemplo, Lehninger, *Biochemistry*, Segunda Edición, Worth Publishers, Inc ,
5 1975, páginas 73-75, aquí incorporado como referencia

Los α -aminoácidos preferidos incluyen glicina, alanina, prolina, ácido glutámico y lisina, que tienen la configuración D, la configuración L o están en forma de racemato

10 Las cadenas laterales de otros α -aminoácidos representativos están mostradas a continuación en la Tabla I

Tabla I

| | |
|---|--|
| CH_3- | HS-CH_2- |
| HO-CH_2- | $\text{HO}_2\text{C-CH(NH}_2\text{)-CH}_2\text{-S-S-CH}_2-$ |
| $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2-$ | $\text{CH}_3\text{-CH}_2-$ |
| $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2-$ | $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
|  | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
|  | $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
|  | $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-}$ |
|  | $\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-NHC(=O)-CH}_2-$ |
|  | |
| |  |
| | $\text{HO}_2\text{C-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{NH}_2\text{C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_2-$ |
| | $(\text{CH}_2)_3\text{-CH-CH}_2-$ |
| | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{H}_2\text{N-C(=NH)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{H}_2\text{N-C(=O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-}$ |
| | $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |
| | $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ |

5 En algunas realizaciones preferidas, los grupos substituyentes para los compuestos de fórmula II incluyen el residuo de un aminoácido tras la eliminación del resto hidroxilo de su grupo carboxilo, es decir, grupos de fórmula $-\text{C(=O)-CH(NH}_2\text{)-}$ (cadena lateral)

10 Los grupos funcionales presentes en los compuestos de fórmula II pueden contener grupos protectores. Por ejemplo, los substituyentes de cadena lateral de aminoácido de los compuestos de fórmula II pueden estar subs-

tituidos con grupos protectores, tales como grupos benciloxycarbonilo o t-butoxycarbonilo. Los grupos protectores son conocidos per se como grupos funcionales químicos que pueden ser selectivamente anexados a, y eliminados de, funcionalidades, tales como grupos hidroxilo y grupos carboxilo. Estos grupos están presentes en un compuesto químico para que convertir dicha funcionalidad en inerte a las condiciones de reacción química a las que se expone el compuesto. Se puede emplear cualquiera de una variedad de grupos protectores en la presente invención. Uno de tales grupos protectores es el grupo benciloxycarbonilo (Cbz, Z). Se pueden encontrar otros grupos protectores preferidos según la invención en Greene, T W y Wuts, P G M, "Protective Groups in Organic Synthesis", 2ª Ed, Wiley & Sons, 1991.

Los compuestos indenopirrolocarbazol con puente han demostrado importantes actividades farmacológicas funcionales, que encuentran utilidad en una variedad de marcos, incluyendo tanto el campo de la investigación como el terapéutico. Estos derivados son útiles como agentes terapéuticos. Las actividades de los compuestos muestran efectos positivos sobre la función y/o supervivencia de células que responden a factores tróficos. El efecto sobre la función y/o supervivencia de las células que responden a factores tróficos, por ejemplo células de un linaje neuronal, ha sido demostrado usando cualquiera de los ensayos siguientes: (1) ensayo de la colina acetiltransferasa ("ChAT") en médula espinal cultivada o (2) ensayo de la actividad ChAT en neuronas basales del cerebro anterior cultivadas.

Tal como se utiliza aquí, el término "efecto", cuando se usa para modificar los términos "función" y "supervivencia", significa una alteración o cambio positivo o negativo. Se puede hacer aquí referencia a un efecto positivo como una "intensificación" o "intensificar" y se puede hacer aquí referencia a un efecto negativo como una "inhibición" o "inhibir".

Tal como se usan aquí, los términos "intensificación" o "intensificar", cuando se usan para modificar los términos "función" o "supervivencia", significan que la

presencia de un compuesto indenopirrolocarbazol con puente tiene un efecto positivo sobre la función y/o supervivencia de una célula que responde a factores tróficos en comparación con una célula en ausencia del compuesto. Por ejemplo, y no a modo de limitación, con respecto a la supervivencia de, por ejemplo, una neurona colinérgica, el compuesto evidenciaría intensificación de la supervivencia de una población de neuronas colinérgicas en riesgo de muerte (debido, por ejemplo, a lesión, a una condición morbosa, a una condición degenerativa o a progresión natural) cuando se compara con una población de neuronas colinérgicas a las que no se presenta dicho compuesto si la población tratada tiene un período comparativamente mayor de funcionalidad que la población no tratada.

Tal como se usa aquí, "inhibir" e "inhibición" significan que una respuesta especificada de un material designado (por ejemplo, actividad enzimática) es comparativamente menor en presencia de un compuesto indenopirrolocarbazol con puente.

Tal como se usa aquí, el término "trk" se refiere a la familia de receptores de neurotrofinas de alta afinidad que actualmente comprende *trkA*, *trkB* y *trkC* y a otras proteínas asociadas a membranas a las que se puede unir una neurotrofina.

Tal como se usa aquí, la inhibición de VEGFR implica utilidad en, por ejemplo, enfermedades en las que la angiogénesis juega importantes papeles, tales como el cáncer de tumores sólidos, la endometriosis, la retinopatía diabética, la psoriasis y el hemangioblastoma, así como otras enfermedades oculares y cánceres.

La inhibición de *trk* implica utilidad en, por ejemplo, enfermedades de la próstata, tales como el cáncer de próstata y la hiperplasia benigna de próstata, y en el tratamiento del dolor inflamatorio.

La inhibición del Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGFR") implica utilidad en, por ejemplo, diversas formas de neoplasia, la artritis reumatoide, la fibrosis pulmonar, la mielofibrosis, la curación anormal de heridas, enfermedades con puntos finales

cardiovasculares, tales como la aterosclerosis, la re-estenosis, la re-estenosis post-angioplas-tia, etc.

Tal como se usan aquí, los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a cualquier proliferación maligna de células en un mamífero. Como ejemplos se incluyen el
5 cáncer de próstata, la hiperplasia prostática benigna, el cáncer de ovarios, de mama, de cerebro, de pulmón, pancreático, colorrectal, gástrico y de estómago, tumores sólidos, cáncer de cabeza y cuello, neuroblastoma, carcinoma de células
10 renales, linfoma, leucemia, otras malignidades reconocidas de los sistemas hematopoyéticos y otros cánceres reconocidos

Tal como se utilizan aquí, los términos "neurona", "célula de linaje neuronal" y "célula neuronal" incluyen, aunque sin limitarse a éstos, una población heterogénea de tipos neuronales que tienen transmisores singulares o múltiples y/o funciones singulares o múltiples, preferiblemente, éstas son neuronas colinérgicas y sensoriales. Tal como se usa aquí, la expresión "neurona colinérgica"
15 significa neuronas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) cuyo neurotransmisor es la acetilcolina, son ejemplos las neuronas basales del cerebro anterior, las del cuerpo estriado y las de la médula espinal. Tal como se usa aquí, la expresión "neurona sensorial"
20 incluye neuronas que responden a indicaciones ambientales (por ejemplo, temperatura, movimiento) procedentes de, por ejemplo, la piel, el músculo y las articulaciones, es un ejemplo una neurona del ganglio de la raíz dorsal

Una "célula que responde a factores tróficos", tal como se define aquí, es una célula que incluye un receptor al que se puede unir de manera específica un factor trófico, como ejemplos se incluyen neuronas (por ejemplo, neuronas colinérgicas y sensoriales) y células no neuronales (por ejemplo, monocitos y células neoplásicas)
25

Los compuestos indenopirrolocarbazol con puente aquí descritos hallan utilidad tanto en el campo de la investigación como en el de la terapia, en, por ejemplo, la inhibición de la actividad enzimática. Por ejemplo, en un ambiente de investigación, los compuestos pueden ser usados
35

en el desarrollo de ensayos y modelos para mayor comprensión de los papeles que la inhibición de la serina/treonina o tirosina proteína kinasa (por ejemplo, PKC, trk tirosina kinasa) tiene en los aspectos mecanísticos de los trastornos y enfermedades asociadas. En un marco terapéutico, los compuestos que inhiben estas actividades enzimáticas pueden ser usados para inhibir las consecuencias deletéreas de estas enzimas con respecto a trastornos tales como el cáncer.

Como los Ejemplos que se dan a continuación demuestran, la inhibición de la actividad enzimática usando los compuestos indenopirrolocarbazol con puente puede ser determinada usando, por ejemplo, los ensayos siguientes

- 1 Ensayo de inhibición de la actividad trkA tirosina kinasa
- 2 Inhibición de la fosforilación de trk estimulada por NGF en una preparación de células enteras
- 3 Ensayo de inhibición de la kinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGFR")
- 4 Ensayo de inhibición de la actividad PKC
- 5 Ensayo de inhibición del PDGFR.

Los compuestos indenopirrolocarbazol con puente descritos pueden ser usados para intensificar la función y/o supervivencia de células del linaje neuronal en un mamífero, por ejemplo un humano. En estos contextos, los compuestos pueden ser utilizados individualmente o con otros pirrolocarbazoles y/o indenocarbazoles fusionados, o en combinación con otras moléculas beneficiosas que también demuestran capacidad para afectar a la función y/o la supervivencia de una célula designada

Una variedad de trastornos neurológicos se caracterizan por células neuronales que están muriéndose, que están lesionadas, funcionalmente comprometidas, que sufren degeneración axonal, que se hallan en riesgo de muerte, etc. Estos trastornos incluyen, aunque sin limitación enfermedad de Alzheimer, trastornos de neuronas motoras (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica), enfermedad de Parkinson, trastornos cerebrovasculares (por ejemplo, accidente cerebrovascular, isquemia), enfermedad de Huntington,

demencia del SIDA, epilepsia, esclerosis múltiple, neuropatías periféricas (por ejemplo, las que afectan a las neuronas DRG en la neuropatía periférica asociada a la quimioterapia), incluyendo la neuropatía diabética y la neuropatía periférica del SIDA, trastornos inducidos por aminoácidos excitatorios y trastornos asociados a lesiones concusivas o penetrantes del cerebro o de la médula espinal

La ChAT cataliza la síntesis del neurotransmisor acetilcolina y se considera un marcador enzimático para una neurona colinérgica funcional. Una neurona funcional es también capaz de sobrevivir. Se estudia la supervivencia de las neuronas por cuantificación de la captación específica y de la conversión enzimática de un colorante (por ejemplo, calceína AM) por las neuronas vivas.

Debido a sus variadas utilidades, los compuestos aquí descritos, incluidos los compuestos identificados por los métodos aquí descritos, encuentran utilidad en una variedad de campos. Los compuestos pueden ser usados en el desarrollo de modelos *in vitro* de supervivencia, la función o la identificación de las células neuronales, o para el estudio de otros compuestos sintéticos que tienen actividades similares a la de los compuestos aquí descritos, o compuestos identificados por los métodos aquí descritos. Los compuestos aquí descritos, así como los identificados usando los métodos aquí descritos, pueden ser utilizados en un ambiente de investigación para investigar, definir y determinar blancos moleculares asociados a respuestas funcionales. Por ejemplo, radiomarcando un compuesto indenopirrólo-carbazol con puente, o un compuesto identificado por los métodos aquí descritos, asociados a una función celular específica (por ejemplo, mitogénesis), la entidad blanco a la que se une el derivado puede ser identificada, aislada y purificada para su caracterización.

Los compuestos, los aquí descritos así como los identificados usando los métodos aquí descritos, son útiles, entre otros, no sólo para intensificar las actividades inducidas por factores tróficos de neuronas que responden a factores tróficos, por ejemplo, neuronas colinérgicas, sino que también pueden funcionar como agentes promotores de la

supervivencia para otros tipos de células neuronales, por ejemplo, dopaminérgicas o glutamatérgicas. El factor de crecimiento puede regular la supervivencia de neuronas señalizando cascadas aguas debajo de las pequeñas proteínas de unión a GTP que incluyen, aunque sin limitación, ras, rac y cdc42 (Denhardt, *Biochem J*, 1996, 318, 729). Concretamente, la activación de ras da lugar a la fosforilación y activación de la kinasa activada por receptores extracelulares ("ERK"), a la cual se ha asociado a procesos biológicos de crecimiento y diferenciación. La estimulación de rac/cdc42 da lugar a un aumento en la activación de JNK y p38, respuestas que están asociadas al estrés, a la apoptosis y a la inflamación. Aunque las respuestas a los factores de crecimiento se producen primariamente a través de la ruta ERK, los efectos sobre estos últimos procesos pueden dar lugar a mecanismos alternativos de supervivencia neuronal que pueden imitar las propiedades de aumento de la supervivencia de los factores de crecimiento (Xia y col, *Science*, 1995, 270, 1326). Los compuestos pueden funcionar también como agentes promotores de la supervivencia para células neuronales y no neuronales por mecanismos relacionados con, pero también distintos de, la supervivencia mediada por factores de crecimiento, por ejemplo la inhibición de las rutas JNK y p38, que puede dar lugar a supervivencia por inhibición de los procesos de muerte celular apoptótica.

Los presentes compuestos son útiles en el tratamiento de trastornos asociados a una menor actividad ChAT o a la muerte o lesión de motoneuronas de la médula espinal y tienen también utilidad en, por ejemplo, enfermedades asociadas a la muerte celular apoptótica del sistema nervioso central y periférico y del sistema inmune y en enfermedades inflamatorias.

Los compuestos aquí descritos pueden también resultar útiles en el tratamiento de estados de enfermedad que implican la proliferación de células malignas, tales como muchos cánceres.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos aquí descritos, así como de los compuestos iden-

tificados por los presentes métodos, incluyen sales de adición de ácido, sales metálicas, sales de amonio, sales de adición de aminas orgánicas y sales de adición de aminoácidos farmacéuticamente aceptables. Son ejemplos de sales de adición de ácido las sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como clorhidrato, sulfato y fosfato y las sales de adición de ácidos orgánicos, tales como acetato, maleato, fumarato, tartrato, citrato y lactato, son ejemplos de sales metálicas las sales de metales alcalinos, tales como sal de litio, sal de sodio y sal de potasio, las sales de metales alcalinotérreos, tales como sal de magnesio y sal de calcio, sal de aluminio y sal de zinc, son ejemplos de sales de amonio la sal de amonio y la sal de tetrametilamonio, son ejemplos de sales de adición de aminas orgánicas las sales con morfolina y piperidina, y son ejemplos de sales de adición de aminoácidos las sales con glicina, fenilalanina, ácido glutámico y lisina.

Los compuestos aquí presentados, incluidos los identificados por los presentes métodos, pueden ser formulados en composiciones farmacéuticas por mezcla con excipientes y vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden ser preparadas para uso en administración parenteral, particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas, o en administración oral, particularmente en forma de tabletas o cápsulas, o intranasalmente, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles, o dérmicamente, a través de, por ejemplo, parches transdérmicos.

La composición puede ser convenientemente administrada en forma unitaria de dosificación y puede ser preparada por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo como se describe en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub Co, Easton, Pa, 1980). Las formulaciones para administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua o solución salina estéril, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. En particular, el polímero de lactida, el copolímero de lactida/glicolida o los copolímeros de po-

lloxietileno-polioxipropileno biocompatibles y biocompatibles pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos incluyen partículas copoliméricas de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para administración por inhalación contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, polioxietilén-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como gel para aplicación intranasal. Las formulaciones para administración parenteral también pueden incluir glicocolato para administración bucal, un salicilato para administración rectal o ácido cítrico para administración vaginal. Las formulaciones para parches transdérmicos son preferiblemente emulsiones lipofílicas.

Los compuestos de esta invención pueden ser empleados como único agente activo en una composición farmacéutica. Alternativamente, pueden ser usados en combinación con otros componentes activos, por ejemplo otros factores de crecimiento que faciliten la supervivencia neuronal o la regeneración axonal en enfermedades o trastornos.

El compuesto de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser administrados oral o no oralmente, por ejemplo como ungüento o como una inyección. Las concentraciones de los compuestos de esta invención en una composición terapéutica pueden variar. La concentración dependerá de factores tales como la dosificación total del fármaco que ha de ser administrado, las características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) de los compuestos empleados, la vía de administración, la edad, el peso corporal y los síntomas de un paciente, etc. Los compuestos de esta invención son típicamente presentados en una solución tampón fisiológica acuosa que contiene aproximadamente un 0,1 a un 10% p/v de compuesto para administración parenteral. Los rangos típicos de dosis son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal al día, un

rango preferido de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal al día y, preferiblemente, de aproximadamente 0,1 a 20 mg /kg de una a cuatro veces al día. Una dosificación preferida de fármaco a administrar
 5 dependerá probablemente de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o trastorno, del estado general de salud del paciente en particular, de la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado y de la formulación del excipiente del compuesto y de su vía de
 10 administración

Los compuestos de la invención, incluyendo el compuesto de ensayo y compuestos identificados por los métodos de la presente invención, y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden ser administrados solos o en forma
 15 de varias composiciones farmacéuticas, según la actividad farmacológica y el fin de la administración. Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden ser preparadas mezclando uniformemente una cantidad efectiva de un compuesto o de una sal farmacéuticamente aceptable del
 20 mismo, como componente activo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede adoptar un amplio rango de formas según las formas de la composición adecuadas para administración. Se desea preparar dichas composiciones farmacéuticas en una forma de dosis unitaria adecuada para
 25 administración oral o no oral. Las formas para administración no oral incluyen el ungüento y la inyección.

Se pueden preparar tabletas usando excipientes, tales como lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y metilcelulosa, agentes desintegrantes, tales como almidón, alginato
 30 de sodio, carboximetilcelulosa cálcica y celulosa cristalina, lubricantes, tales como estearato de magnesio y talco, ligantes, tales como gelatina, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa y metilcelulosa, surfactantes, tales como éster de sacarosa y ácido graso y
 35 éster de sorbitol y ácido graso, y similares de una forma convencional. Se prefiere que cada tableta contenga de 15 a 300 mg del componente activo.

Se pueden preparar gránulos usando excipientes tales como lactosa y sacarosa, agentes desintegrantes tales

como almidón, ligantes tales como gelatina y similares de una forma convencional. Los polvos pueden ser preparados usando excipientes tales como lactosa y manitol y similares de una forma convencional. Se pueden preparar cápsulas

5 usando gelatina, agua, sacarosa, goma arábiga, sorbitol, glicerina, celulosa cristalina, estearato de magnesio, talco y similares de una forma convencional. Se prefiere que cada cápsula contenga de 15 a 300 mg del componente activo

Se pueden preparar preparaciones de jarabes

10 usando azúcares tales como sacarosa, agua, etanol y similares de un modo convencional

Se prepara un ungüento usando bases para ungüentos, tales como vaselina, parafina líquida, lanolina y macrogol, emulsores, tales como lauril-lactato de sodio,

15 cloruro de benzalconio, éster de sorbitán y ácido monograso, carboximetilcelulosa sódica y goma arábiga, y similares de un modo convencional.

Se pueden preparar preparaciones inyectables usando solventes, tales como agua, solución salina fisiológica, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de oliva y

20 aceite de cacahuete), oleato de etilo y propilenglicol, agentes solubilizantes, tales como benzoato de sodio, salicilato de sodio y uretano, agentes para la isotonicidad, tales como cloruro de sodio y glucosa, conservantes, tales

25 como fenol, cresol, éster p-hidroxibenzoico y clorobutanol, antioxidantes, tales como ácido ascórbico y piro-sulfito de sodio, y similares de un modo convencional

La invención es además ilustrada por medio de los siguientes ejemplos, cuyo fin es elucidar la invención

30 Estos ejemplos no pretenden ser, ni han de ser considerados como, limitantes del alcance de la descripción

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Descripción general de los procedimientos y Ejemplos de síntesis

35 En las Figuras 1 y 2, se muestra la ruta sintética general empleada para preparar los indenopirrolocarbazoles con puente de esta invención que tienen la fórmula II. Los procedimientos generales para la síntesis de los indenopirrolocarbazoles (III)/(VIII) pueden ser llevados a

cabo según se describe en la Patente EE UU N° 5 705 511, cuya descripción es aquí incorporada en su totalidad como referencia. Cuando R^1 es H, el nitrógeno de la lactama de los indenopirrolocarbazoles (III)/(VIII) es protegido con un grupo protector apropiado, dando lugar a (IV)/(IX). Los compuestos protegidos son tratados con una base apropiada en un solvente(s) orgánico(s) anhidro(s), lo que da lugar a la generación de una solución de color rojo oscuro que se cree es el carbanión. La reacción del carbanión con un reactivo bifuncional (V) da lugar a una adición electrofílica al enlace C=Y de (V), lo que conduce al intermediario inicial (VI)/(X). El tratamiento del(de los) intermediario(s) (VI)/(X) y/o (VII)/(XI) con un ácido sulfónico o con un ácido de Lewis, por ejemplo eterato de trifluoruro de boro, proporciona los indenopirrolocarbazoles con puente (I)/(II).

La estrategia de la protección del nitrógeno de la lactama (mostrada en las Figuras 3 y 4) puede ser llevada a cabo en un proceso catalizado por ácido o por base. La reacción catalizada con ácido puede ser llevada a cabo con un reactivo unido a resina que permita la inmovilización del indenopirrolocarbazol (III)/(VIII) a un soporte polimérico, tal como una resina ácida de Rink basada en poliestireno (XII) (Figura 3), dando lugar a (XIII). Alternativamente, la reacción catalizada con ácido puede ser llevada a cabo con un reactivo soluble para obtener un compuesto (XIV) (Figura 4). El compuesto silyl-prottegido (XV) es producido bajo catálisis básica (Figura 4).

La Figura 5 describe varios métodos para preparar el intermediario (V). El procedimiento (a) describe las transformaciones de varios acetales (XVI) a (XVII, Z=enlace). Por ejemplo, el éster-acetal/cetal (XVI, D=COOR) es completamente reducido al correspondiente alcohol y posteriormente oxidado (por ejemplo, oxidación de Swern o de Dess-Martin) al aldehído-acetal/cetal (XVII, $R^8=H$). Alternativamente, se reduce parcialmente el éster-acetal/cetal (XVI, D=COOR) con DIBAL para obtener el aldehído (XVII, $R^8=H$) directamente. De forma similar, la reducción del nitrilo-acetal (XVI, D=CN) con DIBAL da el aldehído (XVII,

$R^B=H$) Se preparan los ceto-acetales/cetal por adición de reactivos de Grignard a amida de Weinreb-acetal/cetal (XVI, $D=CON(OMe)Me$)

- También se puede obtener el intermediario
- 5 (XVII, $Z=$ enlace) mediante un procedimiento en dos etapas representado en el Procedimiento (b) la adición de reactivo organometálico (XIX) al acetal/cetal (XVIII) da el alqueno (XX), que, tras ozonolisis seguida de una operación reductora, da el ceto-acetal/cetal (XVII) La preparación
- 10 del intermediario (XVII, $Z =$ heteroátomo) mediante un procedimiento en dos etapas está representada en el Procedimiento (c). El acoplamiento del acetal (XXII) con el alqueno (XXI), seguido de ozonolisis (con una operación reductora) del alqueno resultante da el ceto-acetal/cetal (XVII)
- 15 Alternativamente, el intermediario (XVII, $Z=$ heteroátomo) es preparado por un procedimiento en dos etapas representado en el Procedimiento (d). La reacción del compuesto (XXIV) con el acetal/cetal (XVIII) da (XXV), que se transforma en el ceto-acetal/cetal (XVII) por los métodos descritos en el
- 20 Procedimiento (a) La condensación del ceto-acetal/cetal (XVII) con hidro- xilaminas, hidrazinas, N-alquil-N-alcoxi-aminas y aminas da el intermediario (XXVI), portador de una funcionalidad electrofílica $C=N$

- El indenopirrolocarbazol unido a resina (XIII)
- 25 (Figura 6, Método A) es tratado con un exceso de un reactivo de Grignard como base, lo que da lugar a la generación de una solución roja oscura del carbanión La posterior reacción con (V) da productos derivados de la adición electrofílica al grupo $C=Y$. La manipulación acuosa y la escisión del(de los) producto(s) con ácido diluido (TFA 1% en
- 30 cloruro de metileno) de la resina da lugar al aislamiento del(de los) compuesto(s) (XXVII) y/o (XXVIII) El tratamiento del(de los) intermediario(s) (XXVII) y/o (XXVIII) con un ácido sulfónico o con un ácido de Lewis, por ejemplo
- 35 eterato de trifluoruro de boro, proporciona los indenopirrolocarbazoles con puente (II)

Se emplea una estrategia similar para la reacción del intermediario protegido con lactama soluble, por ejemplo (XV) (Figura 7, Método B) sin embargo, en este ca-

so el intermediario (XV) es tratado con Tritón B en piridina como base en lugar del reactivo de Grignard. El(los) intermediario(s) (XXIX) y/o (XXX) puede(n) ser aislado(s) con el grupo protector de lactama intacto, el(los) cual(es) puede(n) ser llevado(s) a purificación cromatográfica. Como en el Método A (Figura 6), el tratamiento con un ácido de Lewis (tal como eterato de trifluoruro de boro) proporciona los indenopirrolocarbazoles con puente (II) donde $R^1=H$.

La introducción de grupos R^3 , R^4 , R^5 y R^6 puede ser llevada a cabo como se describe en las Patentes EE.UU N° 5 705 511 y 4 923 986, cuyas descripciones son aquí incorporadas como referencia en su totalidad. Se puede introducir de algún otro modo un sustituyente R^3 después de la construcción de los indenopirrolocarbazoles con puente, tal como se muestra en la Figura 8. La posición 3 del anillo B es bromada con NBS, obteniéndose el compuesto (XXXI). Se introduce a continuación un fragmento carbonado empleando reacciones de Stille, Suzuki, Heck, Kumada o Castro-Stephens catalizadas por paladio para obtener compuestos del tipo (XXXII), (XXXIII), etc. Además, el compuesto (XXXI) puede permitir el acceso a compuestos en los que el grupo bromo es desplazado con un heteroátomo, por ejemplo un grupo basado en amina por utilización de la química de aminación catalizada por paladio de Buchwald.

Mediante un proceso oxidativo, se puede introducir un grupo ligado a oxígeno en el carbono del indeno del anillo E, tal como se muestra en la Figura 9, compuesto (XXXIV). Esta química da también lugar a la oxidación del grupo metileno de la lactama (anillo A), dando lugar a un derivado imida, tal como se muestra.

Ejemplo 2 Preparación de intermediarios unidos a resina de Rink (XIII-A), (XIII-B) y (XIII-C) (Figura 3)

Ejemplo 2-A

Se cargó secuencialmente un matraz de fondo redondo de tres cuellos equipado con un agitador mecánico en posición superior y una trampa de Dean-Stark con resina ácida de Rink XII (10,00 g, 0,64 mmol/g), 1-metil-2-pirolidinona (80 ml), benceno (350 ml), VIII-A ($A^1, A^2=H_2$, $B^1, B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$) (3,00 g) y ácido *p*-toluensulfónico (1,00 g) Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 20 horas y se filtró después Se lavó la resina con THF (5 x 175 ml) y se dejó aparte el filtrado Se lavó la resina entonces secuencialmente con DMSO (4x100 ml), $NaHCO_3$ acuoso al 2% (4x100 ml), agua (4x100 ml), DMSO (2x200 ml), THF (4x100 ml) y acetato de etilo (4x100 ml) Se secó la resina a vacío (24 horas), para obtener 11,70 (0,47 mmol/g) de VIII-A unido a resina (XIII-A)

Se evaporaron los lavados con THF originales, se diluyó el residuo con agua (750 ml) y se filtró el precipitado resultante y se lavó secuencialmente con agua, $NaHCO_3$ acuoso al 2% (4x100 ml) y agua (4x100 ml). Después de secar a vacío, se recuperó VIII-A (1,28 g)

Ejemplo 2-B

De un modo similar, se acopló VIII-B ($A^1, A^2=O$, $B^1, B^2=H_2$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$) (0,5 g) a resina ácida de Rink XII (1,52 g) para obtener 1,58 g de VIII-B unido a resina (XIII-B)

Ejemplo 2-C

De un modo similar, se acopló VIII-C ($A^1, A^2=H_2$, $B^1, B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=H$, $R^6=10-OMe$) (1,02 g) a resina ácida de Rink XII (3,12 g) para obtener 3,70 g (0,46 mmol/g) de compuesto VIII-C unido a resina (XIII-C), junto con compuesto VIII-C recuperado (0,44 g).

Ejemplo 3 Preparación de Compuesto (II-1), Compuesto (II-2), Compuesto (II-3), Compuesto (II-4a), Compuesto (II-4b), Compuesto (II-6) y Compuesto (II-8) (Método A, Figura 6)

Ejemplo 3-A

5 A una suspensión de (XIII-A) (1,25 g) en THF (24 ml), se añadió una solución 1,0 M de EtMgBr (6,25 ml en THF) y se agitó la reacción durante 1 hora antes de añadir HMPA (5,0 ml). Después de agitar durante 10 minutos, se
10 añadió dietoxibutiraldehído (3,0 g) (que había sido preparado según el procedimiento de la literatura de Paquette y col, *J Am Chem Soc*, 1997, 119, 9662-71) y se agitó la reacción durante 20 horas. Se detuvo la reacción con NH₄Cl acuoso al 10% (5 ml) y se filtró. Se lavó sucesivamente la resina con NH₄Cl acuoso al 10% (3x10 ml), agua (3x10 ml),
15 THF (3x10 ml), DMF (3x10 ml), agua (3x10 ml), THF (3x10 ml) y éter (3x10 ml). Se secó la resina a vacío, se la recogió en cloruro de metileno (15 ml) y se la trató con ácido trifluoroacético (0,15 ml). Después de agitar durante 1 hora, se filtró la reacción y se evaporó el filtrado. Se recogió
20 el residuo resultante en cloruro de metileno (20 ml) y se trató con tosilato de piridinio (50 mg) y se agitó la solución resultante durante 4 horas. En este momento, se lavó la reacción con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera y se secó sobre MgSO₄.

25 Después de filtrar y de evaporar el solvente, se purificó el residuo por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 4x25 cm, eluida con MeCN 60%/agua con ácido trifluoroacético al 0,1%). Se neutralizaron las fracciones apropiadas con NaHCO₃ y se extrajeron con cloruro de metileno (3x50 ml) y
30 se secaron sobre MgSO₄. Después de la filtración y de la evaporación del solvente, se obtuvieron 70,2 mg de compuesto II-1 en forma de polvo blanco, que tenía las siguientes características ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ 171,8, 143,3, 142,4, 141,4, 140,1, 140,0, 136,6, 129,2, 127,9, 127,4, 127,1,
35 126,8, 124,1 (2C), 122,7, 121,6, 121,5, 118,3, 112,1, 88,1, 79,2, 56,6, 45,6, 33,4, 24,8,
¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,21 (d, J= 7,5, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, J=7,7, 1H), 7,86 (d, J=8,3, 1H), 7,71 (d, J=7,3, 1H), 7,49 (dd, J=7,9, 7,4, 1H), 7,41 (dd, J= 7,5, 7,4, 1H),

7,36-7,27 (m, 2H), 6,86 (d, $J=6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,53 (d, $J=3,3$, 1H), 2,23-2,14 (m, 1H), 1,96-1,92 (m, 1H), 0,96-0,88 (m, 1H), 0,60-0,57 (m, 1H), MS m/z (M+H) calc. 379, observ 379.

5 También se aisló por HPLC preparatoria de esta mezcla de productos de reacción el compuesto II-2 (0,5 mg), que tenía las siguientes características ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 9,17 (d, $J=8,1$, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, $J=7,0$, 1H), 7,85 (d, $J=6,8$, 1H), 7,57 (d, $J=6,8$, 1H), 7,49 (dd, $J=7,9$,
10 7,4, 1H), 7,44-7,26 (m, 3H), 6,81 (d, $J=6,0$, 1H), 5,43-5,33 (m, 1H), 4,43 (s, 2H), 2,23-2,14 (m, 1H), 1,96-1,92 (m, 1H), 1,45-1,55 (m, 2H), 0,96-0,88 (m, 1H), 0,60-0,57 (m, 1H), 0,29 (t, $J=7,0$, 3H), MS m/z (M+H) calc 407, observ 407

15 Ejemplo 3-B

De un modo similar, como se ha descrito antes para el compuesto II-1, se trató resina (XIII-A) (70,3 mg) con 1,1-dietoxi-2-pentanona (0,75 ml) (que había sido preparada según el procedimiento de la literatura de Sworn y
20 col, *J Org Chem*, 1988, 53, 4894-6), para obtener el compuesto II-3 (3,5 mg), que fue aislado por TLC preparatoria (gel de sílice, eluyendo con EtOAc 50%/tolueno) y tenía las siguientes propiedades ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 9,42 (d, $J=8,2$, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,95 (d, $J=7,4$, 1H), 7,79 (d, $J=8,3$, 1H), 7,71 (d, $J=7,1$, 1H), 7,50-7,20 (m, 4H), 6,81 (d, $J=5,9$, 1H), 4,90 (s, 2H), 4,46 (s, 1H), 2,35-2,20 (m, 1H),
25 1,98 (s, 3H), 1,75-1,60 (m, 1H), 1,25-1,00 (m, 1H), 0,35-0,15 (m, 1H), MS m/z (M+H) calc 393, observ 393

Ejemplo 3-C

De un modo similar, se trató (XIII-A) (74,3 mg) con 1,1-dietoxi-2-hexanona (que fue preparada según el procedimiento de la literatura de Brenner, *J Org Chem*, 1961, 26, 22-7) (0,75 ml), para obtener el compuesto II-4a (2,10 mg) y el compuesto II-4b (1,06 mg), que fueron individualmente aislados por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 4x25 cm, MeCN 65%/agua con ácido 0,1% de ácido trifluoroacético) El Compuesto II-4a tenía las siguientes propiedades ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,30 (d, ³J=8,3, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,97 (d, ¹J=7,2, 1H), 7,65 (d, ³J=8,5, 1H), 7,59 (d, ⁵J=7,5), 7,48 (dd, ^{HF}J=7,8, 7,2, 1H) 7,39-7,15 (m, 3H), 6,31 (dd, ^JJ=5,9, 5,5, 1H), 5,02 (s, 1H), 4,88 (s, 2H), 0,88 (s, 3H), otras señales alifáticas perdidas bajo los picos del solvente, MS m/z (M+H) calc 407, observ. 407 El Compuesto II-4b tenía las siguientes propiedades ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,43 (d, ^JJ=8,1, 1H), 8,59 (s, 1H), 7,99 (d, ³J=7,3, 1H), 7,75-7,65 (m, 2H), 7,49 (dd, ^JJ=7,0, 6,4, 1H), 7,43 (dd, ^JJ=8,2, 8,1, 1H), 7,36-7,25 (m, 2H), 6,75 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,50 (s, 1H), 1,95 (s, 3H), otras señales alifáticas perdidas bajo los picos del solvente, MS m/z (M+H) calc 407, observ 407

Ejemplo 3-D

De un modo similar, se trató (XIII-C) (1,00 mg) con dietoxibutiraldehído (3,65 g), para obtener el compuesto II-6 (87,8 mg), que fue aislado por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, MeCN 65%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético) y tenía las siguientes propiedades ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,09 (d, ⁵J=8,6, 1H), 8,60 (s, 1H), 7,95 (d, ³J=7,4, 1H), 7,84 (d, ³J=8,3, 1H), 7,47 (dd, ^JJ=7,2, 7,0, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (dd, ^JJ=7,0, 7,0, 1H), 6,98 (dd, ^JJ=8,6, 1,9, 1H), 6,83 (d, ^JJ=6,0, 1H), 5,65-5,55 (m, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,48 (d, ^JJ=3,9, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,25-2,10 (m, 1H), 2,08-1,85 (m, 1H), 0,96-0,75 (m, 1H), 0,65-0,50 (m, 1H), MS m/z (M+Na) calc. 431, observ. 431

Ejemplo 3-E

De un modo similar, se trató resina (XIII-B) (153,2 mg) con dietoxibutiraldehído (1,5 ml), para obtener el compuesto II-8 (3,6 mg), que fue aislado por HPLC prepa-

ratoria (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, MeCN 65%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético) y tenía las siguientes propiedades ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 9,09 (d, $J=7,9$, 1H), 8,81 (s, 1H), 7,81-7,73 (m, 3H), 7,48-7,35 (m, 3H), 7,24 (dd, $J=7,6$, 7,5, 1H), 6,85 (d, $J=6,2$, 1H), 5,63-5,59 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,61 (d, $J=3,6$, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,21-2,13 (m, 1H), 1,96-1,90 (m, 1H), 0,87-0,79 (m, 1H), 0,61-0,56 (m, 1H), MS m/z (M+H) calc 379, observ 379.

Ejemplo 4 Preparación del Compuesto II-7a y del Compuesto II-7b (Método A, Figura 6)

Ejemplo 4-A

Preparación de (1,1-dietoxietoxi)acetona

A una suspensión fría (0°C) de NaH (2,68 g, 60%) en THF (150 ml) se le añadió una solución de 1,1-dietoxietanol (que fue preparada según el procedimiento de la literatura de Zirkle y col, *J Org Chem*, 1961, 26, 395-407) (9,00 g) en THF (20 ml) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora antes de añadir cloruro de metalilo (8,0 ml). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante la noche, se enfrió y se filtró a través de un tapón de celita. Se eliminó el solvente por evaporación rotatoria y se purificó el residuo por cromatografía en columna (sílice, éter 20%/hexano), para obtener 1,1-dietoxietil metalil éter (11,5, 90%). Se llevó a cabo la ozonólisis de una solución helada (-30°C) de este éter (6,00 g) en EtOAc (80 ml) hasta que no se pudo detectar material de partida por TLC (1 hora). En ese momento, se purgó la reacción con oxígeno, se trató con $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (150 mg) y se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. Se filtró el catalizador y se concentró el filtrado por evaporación rotatoria. Se purificó el residuo resultante por cromatografía en columna (sílice, EtOAc 20%/hexano), para obtener el compuesto del título (4,53 g, 82%).

Ejemplo 4-B

Según el Método A (Figura 6), se trató resina (XIII-A) (230,2 mg) con EtMgBr (1,25 ml), seguido de (1,1-dietoxietoxi)acetona (Ejemplo 3-A) (1,2 ml). Después de la manipulación y de la escisión de la resina, se recogió una porción de la mezcla bruta de productos de reacción (10,5

mg) en cloruro de metileno (20 ml) y se trató con éterato de BF_3 (20 μl) Después de agitar durante 2,5 horas, se lavó la solución con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera antes de secar sobre MgSO_4 Después de la filtración y de la eliminación del solvente, se purificó el residuo resultante por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 4x25 cm, MeCN 65%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético), para obtener el compuesto II-7a (2,34 mg) y el compuesto II-7b (1,34 mg) El compuesto (II-7a) tenía las siguientes propiedades ^1H RMN (CDCl₃) δ 9,35-9,20 (m, 1H), 7,87 (d, $J=7,6$, 1H), 7,62 (d, $J=7,0$, 1H), 7,60-7,45 (m, 1H), 7,49 (dd, $J=7,7$, 7,5, 1H), 7,40 (d, $J=8,1$, 1H), 7,37-7,26 (m, 3H), 6,22 (s, 1H), 5,20-4,85 (m, 1H), 4,47 (s, 1H), 3,67 (d, $J=12,7$, 1H) 3,52 (d, $J=11,8$, 1H), 3,40 (d, $J=12,7$, 1H), 3,38 (d, $J=11,8$, 1H), 1,91 (s, 3H), MS m/z (M+H) calc 409, observ. 409 El compuesto II-7b tenía las siguientes propiedades ^1H RMN (CDCl₃) δ 9,58-9,22 (m, 1H), 7,82 (d, $J=7,4$, 1H), 7,60-7,40 (m, 3H), 7,37-7,27 (m, 3H), 7,21 (d, $J=8,1$, 1H), 5,81 (s, 1H), 5,21 (s, 1H), 5,10-4,80 (m, 1H), 4,59 (d, $J=13,5$, 1H), 4,38 (dd, $J=13,5$, 5,3, 1H), 4,21 (d, $J=13,1$, 1H), 3,82 (d, $J=13,2$, 1H), 1,13 (s, 3H), MS m/z (M+H) calc 409, observ 409

Ejemplo 5. Preparación del Compuesto II-5 (Figura 8)

A una solución de compuesto II-1 (8,1 mg) en THF (2 ml) se añadió NBS (4,6 mg) y se agitó la reacción durante la noche. Se añadió NBS adicional (4,5 mg) y se agitó la reacción durante 2,5 horas Se filtró el material insoluble y se concentró el filtrado por evaporación rotatoria. Se purificó el residuo resultante por cromatografía en columna (C-18, MeCN 65%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético) Se neutralizaron las fracciones apropiadas con NaHCO_3 y se extrajeron en cloruro de metileno (3x20 ml) y se secaron sobre MgSO_4 Después de filtrar y de evaporar el solvente, se obtuvo el compuesto II-5 (5,1 mg) como un polvo blanco que tenía las siguientes características ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 9,22 (d, $J=7,4$, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,14 (s, 1H), 7,86 (d, $J=8,7$, 1H), 7,72 (d, $J=7,0$, 1H), 7,63 (d, $J=7,8$, 1H), 7,42 (dd, $J=7,5$, 7,3, 1H), 7,35 (dd, $J=7,3$, 7,2, 1H), 6,86 (d, $J=6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,94 (s,

2H), 4,54 (d, $J=3,1$, 1H), 2,30-2,14 (m, 1H), 2,00-1,82 (m, 1H), 0,96-0,88 (m, 1H), 0,62-0,50 (m, 1H), MS m/z (M+H) calc 457/9 (1 1), observ 457/9 (1 1)

Ejemplo 6 Preparación del Intermediario XV (Figura 4)

- 5 A una solución de VIII-A [$A^1, A^2=H_2$, $B^1, B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$] (1,05 g) en DMF (25 ml), se añadió trietilamina (0,75 ml) y cloruro de t-butildimetilsililo (TBS-Cl) (0,65 g). Después de agitar durante 3 horas, se detuvo la reacción con $NaHCO_3$ acuoso saturado y se extrajo en EtOAc.
- 10 Se lavó la capa orgánica con agua y salmuera y se secó sobre $MgSO_4$. Después de filtrar y de evaporar el solvente, se trituró el residuo resultante con éter, para obtener el compuesto XV (848 mg). Se evaporaron los lavados, para obtener un residuo que fue purificado por cromatografía en
- 15 columna (sílice, EtOAc 1%/CH₂Cl₂) y dio producto adicional (502 mg, rendimiento combinado del 94%), que tenía las siguientes propiedades espectrales ^1H RMN (DMSO- d_6) δ 11,94 (s, 1H), 9,32 (d, $J=7,6$, 1H), 8,03 (d, $J=7,7$, 1H), 7,64 (d, $J=7,2$, 1H), 7,58 (d, $J=8,1$, 1H), 7,44 (dd, $J=7,7$, 7,6, 1H),
- 20 7,39 (dd, $J=7,7$, 7,6, 1H), 7,32 (d, $J=7,3$, 1H), 7,25 (dd, $J=7,6$, 7,3, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,14 (s, 2H), 0,99 (s, 9H), 0,46 (s, 6H), MS m/z (M+H) calc 425, observ 425

Ejemplo 7 Preparación del Compuesto II-1 por el Método B (Figura 7)

- 25 Se preparó una solución de Tritón B en piridina (0,45 M) disolviendo una solución al 40% de Tritón B en metanol (10 ml) en piridina (10 ml). Se eliminó el solvente a presión reducida (20 mm Hg) a un volumen final de ~8 ml. Se diluyó el residuo con piridina a 50 ml, se filtró y se
- 30 guardó bajo nitrógeno. Se lavó una solución de XV (20,3 mg) en piridina (2,0 ml) con argón y se trató con 300 μ l de Tritón B (0,45 M en piridina) y dietoxibutiraldehído (50 μ l). Después de agitar durante 2 horas, se extrajo la reacción en EtOAc, se lavó con HCl acuoso 1 N y salmuera y se
- 35 secó sobre $MgSO_4$. Después de filtrar y de evaporar el solvente, se recogió el aducto en CH₂Cl₂ (10 ml) y se trató con éterato de BF_3 (10 μ l). Después de agitar durante 2,0 h, se lavó la solución con $NaHCO_3$ acuoso saturado y salmuera antes de secar sobre $MgSO_4$. La eliminación del solvente por

evaporación rotatoria dio un residuo, que fue purificado por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, MeCN 65%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético) Se neutralizaron las fracciones apropiadas con NaHCO_3 y se extrajeron con cloruro de metileno (3x20 ml) y se secaron sobre MgSO_4 . Después de filtrar y de evaporar el solvente, se obtuvo II-1 (11,8 mg, rendimiento del 65%), cuyos espectros de ^1H RMN y de MS y cuyo tiempo de retención por HPLC eran idénticos al material preparado y aislado por el método A y descrito en el Ejemplo 3-A

Ejemplo 8 Preparación del Compuesto II-9 (Figura 8)

A una suspensión del bromocompuesto II-5 (6,2 mg) en 1-propanol (4,0 ml), se añadió ácido 3-aminofenilbórico (3,8 mg). Después de agitar durante 0,25 horas, se añadieron secuencialmente $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (2,0 mg), Ph_3P (4,8 mg), Na_2CO_3 (2,8 mg) y agua (2,0 ml). Se calentó la mezcla a reflujo durante 0,75 horas, se enfrió, se extrajo con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre MgSO_4 y se eliminó el solvente por evaporación rotatoria, para obtener un residuo que fue purificado por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, MeCN 50%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético). Se neutralizaron las fracciones apropiadas con NaHCO_3 y se extrajeron con cloruro de metileno (3x20 ml) y se secaron sobre MgSO_4 . Después de la filtración y de la evaporación del solvente, se obtuvo el compuesto II-9 (3,1 mg, rendimiento del 49%) y éste tenía las siguientes propiedades espectrales ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) δ 9,22 (d, $J=7,5$, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,00-7,25 (m, 8H), 7,12 (dd, $J=7,1$, 7,0, 1H), 6,95-6,80 (m, 3H), 6,53 (d, $J=6,0$, 1H), 5,63-5,58 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 4,55 (s, 1H), 2,25-2,10 (m, 1H), 1,95-1,90 (m, 1H), 0,98-0,88 (m, 1H), 0,65-0,57 (m, 1H), MS m/z ($M+H$) calc 470, observ 470

Ejemplo 9 Preparación del Compuesto II-10 (Figura 9)

A una solución del compuesto II-1 (5,0 mg) en DMSO (1 ml) se le añadió NaCN (4,3 mg) y se calentó la mezcla a 145°C durante 1 hora. Se enfrió la mezcla, se extrajo con EtOAc y se lavó con agua (3x20 ml) y salmuera. Se secó la capa orgánica sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó, para obtener un residuo, que fue purificado por HPLC preparato-

ria (Zorbax RX-8, 2,5x25 cm, MeCN 55%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético) Se neutralizaron las fracciones apropiadas con NaHCO₃, se extrajeron con cloruro de metileno (3x20 ml) y se secaron sobre MgSO₄. Después de la filtración y de la evaporación del solvente, se obtuvo el compuesto II-10 (2,7 mg, rendimiento del 50%) y éste tenía las siguientes propiedades espectrales ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 11,4 (s, 1H), 8,86 (d, J=7,9, 1H), 8,79 (d, J=7,6, 1H), 7,90 (d, J=8,3, 1H), 7,62-7,55(m, 2H), 7,49 (dd, J=7,6, 7,4, 3H), 7,40 (dd, J=7,4, 7,3 1H), 7,35 (dd, J=7,5, 7,4, 1H), 6,86 (d, J=6,0, 1H), 6,03 (s, 1H), 5,40-5,30 (m, 1H), 2,25-2,14 (m, 1H), 2,03-1,90 (m, 1H), 1,10-0,98 (m, 1H), 0,82-0,77 (m, 1H)

Ejemplo 10 Preparación del Compuesto II-11 (Método A, Figura 6)

Según el Método A, se hizo reaccionar resina (XIIIa) (150,2 mg) con EtMgBr (1,0 ml), seguido de 2,5-dioxopentanoato de etilo (Schmidt y col , *Synthesis*, 1993, 809) (1,5 ml). Después de la manipulación y de la escisión de la resina, se recogió la mezcla bruta de productos de reacción con cloruro de metileno (20 ml) y se trató con eterato de BF₃ (20 µl) Después de agitar durante 2,5 horas, se lavó la solución con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera antes de secar sobre MgSO₄. Después de la filtración y de la eliminación del solvente, se purificó el residuo resultante por HPLC preparatoria (Zorbax RX-8, 4x25 cm, gradiente de MeCN del 55%-75%/agua con 0,1% de ácido trifluoroacético), para obtener el compuesto II-11 (6,4 mg), el cual tenía las siguientes propiedades ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,36 (d, J=7,7, 1H), 8,68 (s, 1H), 8,00 (d, J=7,7, 1H), 7,83 (d, J=8,3, 1H), 7,58-7,15 (m, 5H), 6,97 (d, J=5,9, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,82 (s, 1H), 4,48 (c, J=7,1, 2H), 2,42-1,91 (m, 2H), 1,37 (t, 3H, J=7,1), 1,25-0,63 (m, 2H)

Ejemplo 11 Preparación del Compuesto II-12

Se trató una solución del compuesto II-11 (3,4 mg) en THF (2 ml) con una solución 2 M de LiBH₄ (1,0 ml en THF) y se agitó la reacción durante 1,5 h Se detuvo la reacción mediante la adición de HCl acuoso 1 N (4 ml) Des-

pués de agitar durante 20 minutos, se añadió NaOH acuoso al 10% (15 ml) y se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3x10 ml) Después de secar sobre MgSO₄, se filtró la mezcla y se evaporó el solvente, para obtener el compuesto II-
 5 12 (0,32 mg), que tenía las siguientes propiedades ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 9,35 (d, J=7,7, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,98 (d, J=7,7, 1H), 7,83 (d, J=8,2, 1H), 7,75 (d, J=8,2, 1H), 7,50-7,25 (m, 4H), 6,84 (d, J=7,7, 1H), 6,11 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 4,71 (s, 1H), 4,50-4,40 (m, 1H), 4,30-4,20 (m, 1H),
 10 2,42-1,91 (m, 2H), 1,25-0,63 (m, 2H), MS m/z (M+H) calc 409, observ 409.

Ejemplo 12 Intensificación de la actividad de la ChAT de la médula espinal

La ChAT es un marcador bioquímico específico
 15 para neuronas colinérgicas funcionales Las neuronas colinérgicas representan una entrada colinérgica mayor en la formación del hipocampo, en el núcleo olfatorio, en el núcleo interpeduncular, en el córtex, en la amígdala y en partes del tálamo En la médula espinal, las motoneuronas
 20 son neuronas colinérgicas que contienen ChAT (Phelps y col , *J Comp Neurol* , 1988, 273, 459-472). La actividad de la ChAT ha sido utilizada para estudiar los efectos de las neurotrofinas (por ejemplo, NGF o NT-3) sobre la supervivencia y/o la función de las neuronas colinérgicas El
 25 ensayo de la ChAT también sirve como indicación de la regulación de los niveles de ChAT en las neuronas colinérgicas

Métodos Se disociaron células de la médula espinal de fetos de rata y se realizaron experimentos según se ha descrito (Smith y col., *J Cell Biology*, 1985, 101, 1608-1621, Glickman y col , *J Neurochem* , 1993, 61, 210-221) Se prepararon células disociadas de médulas espinales disecadas de ratas (día embrionario 14-15) por técnicas estándar de disociación con tripsina (Smith y col , antes citado). Se plaquearon las células a 6x10⁵ células/cm² en pocillos de cultivo de tejidos de plástico revestidos de poli-l-ornitina en medio N2 libre de suero suplementado con un 0,05% de seroalbúmina bovina ("BSA") (Bottenstein y col , *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 514-517) Se incubaron los cultivos a 37°C en una atmósfera humidificada

de un 5% de CO₂/95% de aire durante 48 horas Se midió la actividad de la ChAT después de 2 días *in vitro* usando una modificación del procedimiento de Fonnum (Fonnum, *Neurochem*, 1975, 24, 407-409) según McManaman y col y Glicksman y col (McManaman y col, *Develop Biol*, 1988, 125, 311-320, Glicksman y col., *J Neurochem*, antes citado)

En la Tabla 2 se da una lista de los compuestos que tienen la fórmula II y que han sido descritos en los ejemplos Los valores para R₁, R₄, R₅ y R₇ son H, Y es O, y n es 1

Tabla 2

| Comp | A ₁ A ₂ | B ₁ B ₂ | R ₂ | R ₃ | R ₅ | R ₆ | Z | m |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------|----------------|---------------------|--------|---|
| II-1 | O | H,H | H | H | H | H | enlace | 1 |
| II-2 | O | H,H | Et | H | H | H | enlace | 1 |
| II-3 | O | H,H | H | H | H | Me | enlace | 1 |
| II-4a | O | H,H | H | H | H | Me | enlace | 2 |
| II-4b | O | H,H | H | H | H | Me | enlace | 2 |
| II-5 | O | H,H | H | Br | H | Me | enlace | 1 |
| II-6 | O | H,H | H | H | 10-OMe | H | enlace | 1 |
| II-7a | O | H,H | H | H | H | Me | O | 1 |
| II-7b | O | H,H | H | H | H | Me | O | 1 |
| II-8 | H,H | O | H | H | H | H | enlace | 1 |
| II-9 | O | H,H | H | 3'-NH ₂ -Ph | H | H | enlace | 1 |
| II-10 | O | O | OH | H | H | H | enlace | 1 |
| II-11 | O | H,H | H | H | H | CO ₂ -Et | enlace | 1 |
| II-12 | O | H,H | H | H | H | CH ₂ -OH | enlace | 1 |

Ejemplo 13 pCDNA3-EE-MLK3, pCDNA3-EE-MLK3(K144R)

Se clonó MLK3 según se ha descrito (Lee y col, *Oncogene*, 1993, 8, 3403-3410, Ezoe y col., *Oncogene*, 1994, 9, 935-938). Se preparó ADNc a partir de 200 ng de ARNm de melanocitos poliadenilado y se usó el 5% de la reacción como plantilla para amplificar un repertorio de ADNc PTK usando mezclas de dos o de cuatro cebadores oligonucleotídicos altamente degenerados derivados de las secuencias

consenso de los subdominios VIb y IX conservados de PTK conocidas PTK1, 5'-CGGATCCACMGIGAYYT-3' (SEC ID N° 1), PTK2, 5'-GGAATTCACAWAGGACCASACRTC-3' (SEC ID N° 2), PTK3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYYTIGCIGCIMGIAA-3' (SEC ID N° 3),
5 PTK4, 5'-GGAATTIAYIGGAWAIGWCCAIACRTCISW-3' (SEC ID N° 4)
Se realizaron 40 ciclos de PCR usando ADN polimerasa Taq (AmpliTaq, Perkin-Elmer/Cetus) y un ciclador térmico de ADN automatizado, cada ciclo consistía en 40 seg. a 94°C, 2 min a 37°C y 3 min a 63°C los productos de ocho PCR fueron
10 reunidos, tratados con ADN polimerasa (Klenow), escindidos con BamHI más EcoRI y sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5% La tinción con bromuro de etidio identificó una banda predominante de 200-230 pb, que fue escindida, eluida y clonada en M13mp18 En un experimento,
15 parte del ADNc amplificado por PCR no fue escindido, sino en lugar de ello clonado como en M13mp18 escindido con SmaI Se determinaron las secuencias nucleotídicas por el método de secuenciación de finalización de cadena

Se usó un ADNc, identificado como PTK1, como
20 sonda para estudiar librerías de ADNc de melanoma y melanocitos humanos Un clon, denominado PTK1-3 2, incluía todo el marco abierto de lectura de 2 541 nt, codificante de una proteína de 847 aminoácidos Se cortó este ADNc con NcoI, se hizo como con ADN polimerasa (Klenow), se cortó de nuevo
25 con EcoRI y se ligó en el vector pCDNA3-EE cortado con BamHI, se hizo como y se cortó entonces con EcoRI El vector pCDNA3-EE fue construido insertando en el sitio HindIII/BamHI un oligo que codifica para un codon de iniciación, seguido del epitopo EE, MEEEEYMPME (SEC ID N° 5)
30 (Grussenmeyer y col , *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82, 7952-7954) Se hizo la versión de kinasa muerta de MLK3 haciendo la mutación K144R utilizando PCR con el empleo de una técnica previamente publicada (Chen y col , *Biotechniques*, 1994, 17, 657-659) El primer oligo mutagénico era
35 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCGCCAG-3' (SEC ID N° 6) y el segundo oligo era 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (SEC ID N° 7). Usando MLK3 como plantilla, se usaron estos oligos en PCR para generar un fragmento de 806 pb y se emplearon en una segunda reacción PCR usando un cebador T7 como el otro amplímero

y MLK3 como la plantilla para generar un fragmento de 1 285 pb. Se separó el fragmento por electroforesis en gel de agarosa, se aisló, se clonó en pGEM-5 (Promega) y se secuenció. Se cortó el fragmento con HindIII y HpaI y se insertó en pCDNA3-EE-MLK3 cortado con HindIII y HpaI. Se detectó una mutación puntual adicional en el nucleótido 1 342. Para corregirla, se cortó un fragmento PflM1 (nt 1.093-1 418) de la MLK3 de tipo salvaje y se usó para substituir el fragmento idéntico en la MLK3 mutada con K144R.

10 **Ejemplo 14 pFB-FLAG-MLK3**

Para obtener proteína MLK3, se clonó el ADNc en el vector de expresión baculovírico pFB-FLAG. Se cortó MLK3 de PTK1-3 2 por digestión con NcoI, se hizo romo con ADN polimerasa (Klenow), se cortó de nuevo con NotI y se ligó en pFB-FLAG digerido con StuI y NotI. pFB-FLAG deriva de pFB (Life Technologies) y tiene la secuencia codificante para el epitopo FLAG (Hopp y col., *Biotechnology*, 1988, 6, 1205-1210) con un codon de iniciación, MDYKDDDDK (SEC ID N° 8), añadido al poliligante en el sitio BamHI.

20 **Ejemplo 15 pFB-GST-MLK3(KD)**

Se consiguió la expresión baculovírica del dominio de kinasa de MLK3 cortando el fragmento MLK3 de pGEXKG-MLK3(KD) usando EcoRI y XhoI y ligándolo en un vector pFB cortado con EcoRI y XhoI en el que se había clonado aguas arriba la secuencia codificante para la glutatión S-transferasa (GST). Se hizo esto obteniendo la secuencia codificante de la GST y el poliligante del vector pGEXKG por PCR usando el vector como plantilla (Guan y col., *Anal Bioch.*, 1991, 192, 262-267). El 5' oligo para la PCR creó un sitio de restricción Bgl2 en el extremo 5' del fragmento. Este fragmento aislado fue entonces digerido con Bgl2 y Hind3 y ligado en pFB digerido con BamHI y Hind3.

Ejemplo 16 pGEXKG-MLK3(KD)

Se obtuvo un fragmento de ADNc que incluía tanto el dominio de kinasa MLK3 como una porción de la cremallera de leucina (nt 736-1 791) por PCR usando el ADNc PTK1. Se digirió el fragmento aislado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, sitios que fueron incluidos en los oligos de la PCR, y clonado en pGEX-KG digerido con

EcoR1 y Xho1 Este fragmento en pGEX-KG fue entonces acortado por PCR para que incluyera sólo el dominio de kinasa (nt 736-1 638)

Ejemplo 17 pKH3-MLK2, pKH3-MLK2(KA)

5 Se clonó MLK2 usando PCR degenerada (Dorow y col., *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710, Dorow y col, *Eur J Biochem*, 1995, 234, 492-500) Se amplificaron segmentos de ADNc codificantes de subdominios catalíticos de proteínas kinasas expresadas en la línea de células tumorales
10 epiteliales Colo 16 a partir de ARN por PCR de transcriptasa inversa. Los cebadores de la PCR degenerada estaban basados en secuencias codificantes de motivos conservados en los subdominios V1b y VIII de los dominios catalíticos de kinasas de la familia de receptores de factores de
15 crecimiento epidérmico Las secuencias de los cebadores eran las siguientes cebador hacia delante, 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G(A)ACC(T)T-3' (SEC ID N° 9), cebador inverso, 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTCCAG(C)ACATC-3' (SEC ID N° 10) Se clonaron varios productos de PCR en M13
20 y se secuenciaron usando un kit de secuenciación T7 Super-Base (Bresatec) Se usó un producto de PCR de 216 pb como sonda para estudiar una librería de ADNc λ gt11 de colon humano (Clontech, catálogo #HL10346) Se marcó el fragmento con cebado aleatorio, se llevó a cabo la hibridación a 65°C
25 y se lavaron los filtros hasta una estrictez de NaCl/Citrato 0,2X (cloruro de sodio 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7,0) y 0,5% de SDS a 65°C Se autorradiografiaron los filtros durante 16 h a -70°C en una película Kodak XAR-5 Se aislaron cuatro clones y se usó el más largo
30 de ellos, de 1,2 kb, para volver a sondear la misma librería usando las mismas condiciones Se seleccionaron cuatro clones más y uno de estos clones representaba un fragmento de MLK2 de 1 034 pb Se usó este clon para sondear una librería λ gt10 de cerebro humano. Se estudiaron aproximadamente
35 500 000 clones y se aisló un clon de 3 454 pb, que representaba toda la región codificante de MLK2.

Se clonó MLK2, desde el ATG hasta la cola poliA, en el vector pKH3 entre los sitios BamH1 y EcoR1 en dos etapas, ya que hay un sitio BamH1 en el medio de la se-

cuencia de MLK2 El vector pKH3 fue construido insertando tres copias del marcaje epitópico HA, seguido de un sitio BamH1 entre los sitios Xba1 y EcoR1 del poliligante pRK7 Para hacer la versión mutagenizada, K125A, se clonó el
5 fragmento de MLK2 5' BamH1 en el vector pAlter de Promega y se mutó según las recomendaciones del fabricante Se clonó entonces de nuevo el fragmento en el vector MLK2 pKH3

Ejemplo 18 pcDNA3-HA-JNK1

Se obtuvo ADNc JNK1 como se ha descrito (Coso y
10 col , *Cell*, 1995, 81, 1137-1146) Se obtuvo el ADNc por PCR usando como plantilla ADNc de músculo esquelético humano (Invitrogen) y se clonó en los sitios Bgl2/Sal1 de pcDNA3-HA, un plásmido de expresión pcDNA3 modificado codificante del epitopo HA (Wilson y col , *Cell*, 1984, 37, 767-778) Se
15 cortó éste entonces de pcDNA3, incluyendo el epitopo HA, y se ligó en pGEX-4T3 (Pharmacia) Se cortó el ADNc JNK1 de la construcción pGEX-4T3 como un fragmento Bgl2/Sal1 y se ligó en pcDNA-3-HA, un vector con el epitopo HA añadido en el sitio Hind3/BamH1 de pcDNA3

20 Ejemplo 19 pFLAG-DLK

Se clonó DLK en el vector de expresión pcDNA3 con el epitopo FLAG añadido como se ha descrito (Holzman y col., *J Biol Chem* , 1994, 269, 30808-30817) Se aisló un
25 fragmento del ADNc para DLK por clonación por PCR basada en oligonucleótidos degenerados. Se extrajo el ARN total de riñones del día embrionario 13,5 (32 órganos) y de riñones del día embrionario 17,5 (16 órganos) usando un método con reactivos de fenol/isotiocianato de guanidina comercialmente preparados según las directrices del fabricante (TRIzol
30 Reagent, Life Technologies, Inc) Después de la digestión con ADNasa I libre de ARNasa, se hizo una transcripción inversa del ARN total con ARNasa H-transcriptasa inversa (Superscript, Life Technologies, Inc) a partir de un cebador oligonucleotídico sintético oligo(dT) a ADNc de una sola
35 hebra Se modificaron cebadores oligonucleotídicos degenerados correspondientes a los subdominios catalíticos de la proteína tirosina kinasa Vlb y IX originalmente diseñados por Wilks (Wilks, *Proc Natl Acad Sci USA* , 1989, 86, 1603-1607) a sitios 5' EcoRI y HindIII, respectivamente

(5'-ATAATTC (GT) GC (TAGC) GCCA (GA) GTC (TAGC) CGGTG-3' (SEC ID N° 11), 5'-ATAAGCTTCC (TC) (AG) T (GC) AAGTGGA (TC) (GC) GC (AGC) CC- (CT) GA-3') (SEC ID N° 12) Se realizaron 40 ciclos de PCR durante 1,5 min a 94°C, 2 min a 37°C y 3 min a 63°C Se añadieron reactivos frescos y se completaron 40 ciclos adicionales antes de una extensión final de 10 min a 72°C El producto de amplificación de ADN resultante de 200-210 pb fue aislado por gel, subclonado en un plásmido pGEM7zf(+) preparado (Promega) y transformado en *Escherichia coli* Se preparó ADN plasmídico miniprep a partir de bacterias transformadas y se digirió una porción con endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, se secuenciaron los clones que contenían insertos

Se radiomarcó el fragmento de ADNc DLK de 195 pb obtenido de la PCR degenerada y se utilizó para estudiar aproximadamente 1×10^6 recombinantes de una librería de ADNc de cerebro de ratón adulto cebado con oligo(dT) Uni-ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA) (Holzman y col., *Mol Cell Biol*, 1990, 10, 5830-5838). Se hibridaron los filtros en un tampón consistente en 50% de formamida, 5xSSC, 3x solución de Denhardt, 0,25% de SDS, 1 mg/ml de ácido poliadenílico y 200 mg/ml de ADN de esperma de salmón a 42°C Se lavaron los filtros una vez a temperatura ambiente en 2xSSC, 0,2% de SDS y dos veces durante 30 min a 65°C Se identificaron 25 clones únicos, 10 clones fueron purificados hasta la homogeneidad, cortados *in vivo* según el protocolo del fabricante y mapeados por restricción. Se secuenciaron los dos clones más largos (3 401 y 3 397 pb, respectivamente, difiriendo sólo en sus extremos 5') a lo largo de ambas bandas en toda su longitud.

Se subclonó el fragmento de ADNc DLK NotI-XhoI de longitud completa (3 401 pb) en el vector de expresión eucariótico basado en el promotor de citomegalovirus pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) (construcción denominada pcDNA3-DLK) A continuación, se hizo una construcción marcada con el epitopo NH₄-Met FLAG (DYKDDDDK) (SEC ID N° 13) (pFLAG-DLK) Se usó la PCR para amplificar los fragmentos de ADNc que codificaban para un sitio 5' *HindIII*, para una

secuencia consenso de Kozak de DLK que incluía el ATG de iniciación, para el epitopo FLAG y para una secuencia de marco abierto de lectura de ADNc DLK que se extendía desde el nucleótido 88 hasta un sitio interno *EcoRI* en el nucleótido 758 (Oligonucleótidos sintéticos purificados por HPLC usados en cantidades equimolares 5'-ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACTACAAGGACGACGATG-ACAAGGCCTGCCTCCATGAAACCCGAACA-3' (SEC ID N° 14) para el cebador sentido de la construcción FLAG y 5'-GACAGGGCGGC-CGGCTCT-3' (SEC ID N° 15) para el cebador antisentido) Se subclonaron los fragmentos amplificados digeridos con *HindIII* y *EcoRI* y purificados por gel en el *HindIII-EcoRI* para preparar el plásmido pcDNA3-DLK Se secuenciaron las construcciones a lo largo de ambas bandas para asegurar la fidelidad de la polimerasa Taq y el mantenimiento del marco de lectura

Ejemplo 20. pcDNA3-MLK1

Se obtuvo la porción 5' de MLK1 de la base de datos EST (acceso # AA160611). Este clon era una fusión entre MLK1 y otro ADNc de identidad desconocida. Contenía la secuencia 5' no publicada previamente de MLK1 junto con parte del dominio de kinasa previamente publicado de MLK1 (Dorow y col , *Eur J Biochem* , 1993, 213, 701-710) La secuencia del ADNc MLK1 del clon EST es la siguiente

GAATTCGGCAGCAGAGGACTCGCAGGTGTCCGGCGACGAGGGCTGGTGGACCGGG-CAGCTGAACCAGCGGGTGGGCATCTTCCCCAGCAACTACGTGACCCCG-CGCAGCGCCTTCTCCAGCCGCTGCCAGCCCGGCGGCGAGGACCCAGTTGCTACCC-GCCCATTCAGTTGTTAGAAATTGATTTTGC GGAGCTCACCTTGGAAGAGATTATTG-GCATCGGGGGCTTTGGGAAGGTCTATCGTGCTTTCTGGATAGGGGATGAGGTTGCTGT-GAAAGCAGCTCGCCACGACCCTGATGAGGACATCAGCCAGACCATAGAGAATGT-TCGCCAAGAGGCCAAGCTCTTCGCCATGCTGAAGCACCCCAACATCATTGCCCTAA-GAGGGGTATGTCTGAAGGAGCCCAACCTCTGCTTGGTCATGGAGTTTGCTCGTGAG-GACCTTTGAATAGAGTGTTATCTGGGAAAAGGATTCCCCCAGACATCCTGGTGAA-TTGGGCTGTGCAGATTGCCAGAGGGATGAACTACTTACATGATGAGGCAATTGTTCC-CATCATCCACCGCGACCTTAAGTCCAGC AAC (SEC ID N° 16) Ésta se traduce en NSAREDSQVS GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTPRSAFSS RCQPGGEDPS CYPPIQLLEI DFAELTLEEI IGIGGFVKVY RAFWIGDEVA VKAARHDPDE DISQTIENVR QEAKLFAMLK HPNIIALRGV CLKEPNLCLV ME-FARGGPLN RVLSGKRIPP DILVNWAVQI ARGMNYLHDE AIVPIIHRDL KSSN

(SEC ID N° 17).

La porción 3' de MLK1 fue inicialmente clonada por PCR degenerada como se ha publicado previamente (Dorow y col , *Eur J Biochem* , 1993, 213, 701-710) El protocolo para la clonación de la porción 3' de MLK1 era como se ha descrito anteriormente para MLK2, con las siguientes excepciones De los cuatro clones obtenidos al volver a estudiar la librería con el clon de 1,2 kb, tres de los cuatro clones representaban MLK1. Ninguno de los clones incluía el dominio completo de kinasa, que fue obtenido por PCR

Se lisaron fagos a partir de alícuotas de 1 µl de librerías amplificadas (ADNc de epitelio colónico humano normal y de la línea T84 de células de carcinoma de colon humano en λ Uni-ZAPXR (Stratagene, cat. #937204)) suspendiendo en 20 µl de agua y congelando de manera ultrarrápida Se usó una muestra de 5 µl del fago lisado como plantilla de PCR en dos reacciones para cada librería Se tomaron cebadores que representaban los vectores de las secuencias nucleotídicas flanqueantes de los sitios de clonación. En el caso de la librería de la línea celular de colon T84, se usaron los cebadores de secuenciación T3 y T7 (Promega). En cada reacción, un cebador procedía de la hebra 3'-5' del gen MLK1, aproximadamente 100 pb desde el extremo 5' de la secuencia conocida El segundo cebador era uno de los dos cebadores vectores Las reacciones de PCR contenían tampón PCR 1x, cloruro de magnesio 2,5 mM, 1 U de polimerasa Taq (todos de Bresatec), dNTP 0,2 mM y 0,4 mM de cada cebador en un total de 50 µl Las condiciones de reacción eran 60 seg a 95°C, 90 seg a 52°C, 90 seg a 72°C durante 30 ciclos, con un tiempo de prolongación de 15 min en el ciclo final. Se clonaron y secuenciaron los productos de la PCR como se ha descrito anteriormente Se ligaron entre sí el clon más largo del estudio de la librería y un fragmento de PCR que incluía secuencia MLK1 adicional para crear un ADNc MLK1 de 1,08 kb en pUC18

El clon MLK1 de la base de datos EST fue proporcionado en el vector pBluescript (Stratagene) Se ligó el ADNc MLK1 de la librería de colon en el clon EST por digestión del primero con EcoRI, se hizo como con Klenow y

cortó luego con AflIII. Se clonó este fragmento aislado en el ADNc MLK1 de la base de datos EST cortado con XhoI, se hizo romo con Klenow y se cortó con AflIII. Se cortó entonces esta nueva construcción de pBluescript por digestión con NotI y ApaI y se ligó en pCDNA3-EE también cortado con NotI y ApaI. Todas las uniones de clonación fueron verificadas en cuanto a secuencia.

Ejemplo 21 Expresión en *E. coli* de GST-MLK3_{MD}

- Se transformó pGEXKG-MLK3(KD) en la cepa BL21 de *E. coli* por electroporación. Se inocularon bacterias que contenían el plásmido en un fermentador Applikon de 15 litros en un volumen de 10 litros del siguiente medio rico: 1,95 g/l de K₂HPO₄, 0,9 g/l de KH₂PO₄, 0,1 g/l de ampicilina, 0,3 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,92 g/l de MgSO₄ 7H₂O, 42,7 mg/l de citrato de sodio, 21,8 mg/l de FeSO₄ 7H₂O, 0,5 ml de metales traza de Pichia (Higgins y col., *Methods Molecular Biology*, 1998, 103, 149-177), 20 g/l de casaminoácidos, 40 g/l de glicerol, 22,5 mg/l de CaCl₂. Las bacterias crecieron durante la noche a 800 rpm/68% de oxígeno disuelto/30°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ = 4,4. Se indujo la producción de proteína recombinante por adición de 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido, con fermentación continuada a 25°C durante hasta 6 h. Se recuperaron entonces las bacterias por centrifugación y se guardó la pasta celular congelada a -20°C hasta su purificación.

Ejemplo 22 Purificación de la GST-MLK3_{MD} bacteriana

Se preparó GST-MLK3_{MD} parcialmente purificada sonicando 100 g de pasta de células bacterianas en Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitól (DTT) 5 mM, pH 7,5 (tampón A). Se llevó la solución al 1% con Tritón X-100 y se agitó luego sobre hielo durante 1 h. Se mezcló la solución de sobrenadante tras centrifugación durante 45 min a 20.000 x g durante 1 h sobre hielo con 10 ml de resina de glutatión Sepharose 4B (Pharmacia) equilibrada en tampón A. Se lavó la pella de resina dos veces con un volumen 12,5x de tampón A y se eluyó después con 20 ml de Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM (tampón B), que contenía glutatión 20 mM, pH 7,5. Se dializó la proteína durante la noche frente a tampón B y se guardó en alícuotas a -80°C.

Ejemplo 23 Expresión en baculovirus de FLAG-MLK3 y GST-MLK3_{KD}

Se produjeron baculovirus recombinantes que expresaban FLAG-MLK3 y GST-MLK3_{KD} a partir de sus respectivos
 5 vectores de transferencia, pFB-FLAG-MLK3 y pFB-GST-MLK3_{KD} usando el sistema BAC-TO-BAC (Life Technologies) según el manual de instrucciones. Se hicieron crecer cultivos en suspensión de células Sf21 (Vaughn y col., *In Vitro*, 1977, 13, 213-217) a 27°C/120 rpm en medio de Grace suplementado
 10 (Hink, *Nature*, 1970, 226, 466-467) con suero bovino fetal ("FBS") inactivado por calor al 10%. Para producir FLAG-MLK3 recombinante, se infectaron células Sf21 a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml de medio de Grace suplementado que contenía un 5% de FBS con una multiplicidad de infección ("MOI") de 3,1 y se cosecharon a las 39 h de la infección.
 15 Para producir GST-MLK3_{KD} recombinante, se infectaron células Sf21 a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml de medio de Grace suplementado que contenía un 5% de FBS con una MOI de 2 y se cosecharon a las 41 h de la infección. En ambos
 20 casos, se resuspendió la pella celular en tampón constituido por HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, Pefabloc SC 0,5 mM, pepstatina 5 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, pH 7,4. Se reajustó la solución de sobrenadante después de centrifugar durante 1 h a 147 000 x g a pH 7,4 con base
 25 Tris 3 M y se guardó después a -70°C antes de su purificación.

Ejemplo 24 Purificación de GST-MLK3_{KD} baculovírica

Se preparó GST-MLK3_{KD} baculovírica parcialmente purificada por cromatografía de afinidad con glutatión. Para
 30 10 ml de extracto celular (26,6 mg de proteína total), se añadió 1 ml de resina de glutatión Sepharose 4B (Pharmacia) equilibrada en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (tampón C) y se dejó que la proteína se uniera durante 45 min a 4°C. Se lavó entonces la resina en formato de columna con
 35 30 volúmenes de columna de tampón C y se eluyó después con 5 volúmenes de columna de tampón C que contenía glutatión 20 mM. Se dializó el producto final reunido durante la noche frente a tampón C y se guardó en alícuotas a -70°C.

Ejempl 25 Purificación de FLAG-MLK3 baculovírica

Se preparó FLAG-MLK3 baculovirica parcialmente purificada por cromatografía de afinidad con anticuerpos. Se unió proteína de 15 ml de extracto (19,5 mg de proteína total) con NaCl 0,1 M adicional sobre una columna de 0,25 ml de anticuerpo peptídico FLAG monoclonal M2 acoplado a resina de agarosa (Sigma) por carga repetida (tres veces en total). La resina había sido equilibrada con un lavado de 5 volúmenes de columna de Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (TBS), un lavado de 3 volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 3,5, seguido de otro lavado con 5 volúmenes de columna con TBS, antes de la cromatografía. La proteína recombinante fue primariamente eluida con 5 volúmenes de columna de péptido FLAG (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (SEC ID N° 18) 0,2 mM en TBS. Se guardó la proteína en alícuotas a -80°C antes del ensayo.

81
24

Ejemplo 26 Mutante negativo dominante Un mutante negativo dominante de la familia MLK bloquea la muerte en células PC12 diferenciadas tras la eliminación del factor de crecimiento de los nervios

5 Se ha utilizado extensamente la línea de células PC-12 derivada de un tumor feocromocitoma de rata como modelo de células neuronales para examinar los fenómenos moleculares que conducen a la muerte de las neuronas (para una revisión, véase Troy y col , *Adv Neurology*, 1997, 103-
10 111) El factor de crecimiento de los nervios ("NGF") induce a las células PC-12 a diferenciarse en un fenotipo neuronal simpático (Greene, *Cell Biol* , 1978, 78, 747-755) Las células PC-12 diferenciadas con NHG son dependientes de NGF para su supervivencia y sufren una muerte apoptótica
15 morfológicamente descrita tras la eliminación del NGF del medio de cultivo Se desarrolló un sistema celular para determinar el efecto de los miembros de la familia de kinasas de linaje mixto sobre la muerte de las células PC-12 después de retirar el NGF Se transfectaron células PC-12 con
20 ADNc codificante de un mutante negativo dominante ("DN") de MLK-3 usando el sistema de transferencia de lípidos Pfx según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA) Se seleccionó un pool estable de transfectante que expresaba DN-MLK-3 usando sulfato G418 (Mediatech Inc ,
25 Herndon, VA) Aproximadamente un 30% de las células de estos pools expresan DN MLK3, según se determina por inmunohistoquímica. Los pools de células que expresan de forma estable la kinasa mutante fueron plaqueados sobre placas de cultivo de tejidos en formato de 96 pocillos revestidas con
30 poliornitina/laminina (10 µg/ml de cada en solución salina tamponada con fosfatos) a una densidad de 2×10^4 células/pocillo y se trataron con 100 ng/ml de NGF durante 7 días Se retiró el medio que contenía el NGF, se lavó la monocapa celular con solución salina tamponada con fosfatos
35 y se substituyó con medio que contenía anticuerpo NGF neutralizante (cat #N6655, Sigma, St Louis, MO) a una dilución final de 1:1 000 durante 1-5 días. Se cuantificó la viabilidad celular mediante un ensayo de viabilidad celular usando la conversión de la sal de tetrazolio, MTS, en un

formazano coloreado, que fue leído a una absorbancia de 570 nm en un CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) según las recomendaciones del fabricante (Promega, Madison, WI) Se rescataron parcialmente los pools estables que expresaban DN-MLK-3 de la muerte celular causada por la retirada del NGF (Figura 10)

Ejemplo 27 Ensayo de la actividad enzimática de la proteína MLK recombinante

Con objeto de demostrar que la proteína MLK expresada en el sistema de expresión baculovírico o en el bacteriano es enzimáticamente activa, se pueden utilizar varios formatos de ensayo. La proteína MLK puede ser una construcción de longitud completa o un dominio de kinasa expresado en un sistema de expresión en baculovirus o en bacterias. El ensayo puede estar basado en anticuerpos, tal como el ensayo inmunsorbente ligado a enzimas ("ELISA"), la fluorescencia resuelta en el tiempo ("TRF") o la polarización de la fluorescencia ("FP") El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal con reactividad hacia fosfoserina, fosfotreonina o sustrato fosfoespecífico. Alternativamente, se puede usar un método no basado en anticuerpos, tal como el ensayo basado en gel radiactivo (véase la Figura 11), el ensayo de precipitación con ácido tricloroacético ("TCA") de multiensayo (Figura 13), el ensayo de proximidad de centelleo ("SPA"), el método de placa instantánea o el formato de ensayo de filtros de fosfocelulosa (Figura 13) El ensayo puede estar diseñado para monitorizar la fosforilación directa de un sustrato o un sistema de ensayo acoplado utilizando las kinasas aguas abajo en la ruta de señalización El sustrato puede ser un sustrato específico, tal como SEK-1, o un sustrato relativamente inespecífico, tal como proteína básica de la mielina ("MBP")

Ejemplo 28 Ensayos de kinasas

(1) ensayo de kinasa basado en gel radiactivo

Se estudió la actividad kinasa de MLK-3 monitorizándola incorporación de ³²P a partir de [γ -³²P]-ATP en un sustrato de MLK (por ejemplo, SEK-1 muerto con kinasa, proteína básica de la mielina) La mezcla de ensayo de 50 μ l contenía Tampón A (MOPS 20 mM, pH 7,2, fosfato de β -

glicerol 25 mM, EGTA 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, di-
tiotreitól 1 mM), MgCl_2 15 mM, ATP 100 μM , 10 μCi de $[\gamma$ -
 $^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ y 0,1 μg de sustrato SEK-1 muerto con kinasa
(Stressgen, Inc , se liberó glutatión S-transferasa-SEK-1
5 (GST-SEK-1) unido de perlas de glutatión-agarosa con gluta-
tión 10 mM, pH 8,0) ó 25 μg de MBP (Sigma Chemical Co) Se
inició la reacción añadiendo proteína MLK (dominio de kina-
sa o preparación que contenía tanto la longitud completa
como el dominio de kinasa) o proteína control Se incubó la
10 mezcla durante 30 min a 30°C Al final de la reacción, se
añadió tampón de muestras reductor 2x Se hirvió la mezcla
durante 5 min , se cargó en un gel de SDS-PAGE al 12%
(usando MBP como sustrato) o en un gel al 8% (SEK-1 como
sustrato) Tras la electroforesis, se secó el gel. La
15 cuantificación de la incorporación de fosfato en el subs-
trato, SEK-1, fue realizada en un Phosphorimager de Molecu-
lar Dynamics (Sunnyvale, CA) Los resultados de los experi-
mentos diseñados para mostrar las actividades enzimáticas
de MLK-3 expresada en baculovirus (longitud completa marca-
da con FLAG o dominio de kinasa marcado con GST) usando
20 GST-SEK-1 muerto con kinasa o MBP como sustrato son mos-
trados en las Figuras 11A y 11B

(2) Análisis de transferencia de Western

Se examinó la actividad kinasa de MLK-3 expre-
25 sada en baculovirus por análisis de inmunotransferencia La
mezcla de ensayo de 20 μl contenía Tampón A, MgCl_2 15 mM,
ATP 100 μM y 0,1 μg de sustrato SEK-1 muerto con kinasa
Se dejó que la reacción procediera durante 30 min. a 30°C y
se detuvo después con 10 μl de tampón de muestra reductor
30 4x Se separaron las proteínas en un gel de Tris-glicina al
8% y se transfirieron electroforéticamente a una membrana
Immobilon PVDF. Se incubó la membrana con anticuerpo SEK-1
fosfoespecífico (Thr223) (New England Biolabs, Inc), se-
guido de IgG de cabra anti-conejo marcada con peroxidasa de
35 rábano picante (Bio-Rad). La detección de las bandas inmu-
noreactivas fue realizada a través del aumento en la qui-
moluminiscencia (Amersham) La fosforilación de GST-SEK-1
muerto con kinasa por la proteína FLAG-MLK-3 (preparación
en baculovirus que contenía tanto la longitud completa como

el dominio de kinasa) está ilustrada en la Figura 12

(3) Ensayo de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) de multiensayo

Se valoró la actividad kinasa del dominio de kinasa de GST-MLK-3 expresada en bacterias usando el ensayo "en-placa" con ácido tricloroacético (TCA) de multiensayo de Millipore descrito por Pitt y col., *J. Biomol. Screening*, 1996, 1, 47-51) Los ensayos fueron realizados en placas Multiscreen Durapore de 96 pocillos (Millipore) Cada 50 µl de mezcla de ensayo contenían Hepes 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 20 mM, DTT 2 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, 1 µCi de [γ-³²P]-ATP y 30 µg de sustrato MBP Se inició la reacción añadiendo proteína MLK y dejando proceder durante 15 min a 37°C Se detuvo la reacción con 25 µl de TCA al 50% Se dejó que las placas se equilibraran durante 30 min a 4°C y se lavaron luego con TCA al 25% helado Se añadió cóctel de centelleo a las placas y se determinó la radiactividad usando un contador de centelleo Wallac MicroBeta 1450 PLUS. En la Figura 13, se muestra la dosis-respuesta de la proteína frente a la formación de MBP marcado con ³²P

(4) Ensayo de filtros de fosfocelulosa

Se realizó el ensayo de kinasa en 50 µl de mezcla de reacción que contenía Hepes 20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 20 mM, DTT 2 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, 1 µCi de [γ-³²P]-ATP y 30 µg de MBP Se inició la reacción añadiendo proteína MLK y dejando proceder durante 15 min a 37°C. Se detuvo la reacción con 75 µl de ácido fosfórico 75 mM Se cargó una alícuota de la solución apagada directamente sobre la membrana de fosfocelulosa (Pierce). Alternativamente, se puede usar la placa de multiensayo de fosfocelulosa de 96 pocillos (Millipore) Se lavaron las membranas con H₃PO₄ 75 mM Se eluyó el MBP fosforilado marcado con ³²P unido en tubos de recogida añadiendo hidróxido de sodio 1 M Se determinó la radiactividad por conteo de Cerenkov en un contador de centelleo Beckman (Somerset, NJ) En la Figura 13, se muestra la formación de MBP fosforilado con concentraciones crecientes del dominio de kinasa de GST-MLK-3 expresada en bacterias

Ejempl 29. Ensayo para determinar la unión de compuestos a

la familia de MLK recombinantes

K-252a (Compuesto III-3, véase la Tabla 4), un metabolito indolocarbazol de especies de *Nocardia*, se une a una variedad de serina/treonina y tirosina kinasas (Angeles y col, *Anal Biochem*, 1996, 236, 49-55, Knight y col., *Anal Biochem*, 1997, 247, 376-381). Se usó un ligando de K-252a tritiado para determinar la unión a MLK-3 de longitud total recombinante humana a partir de una preparación bruta de células infectadas con baculovirus. Se marcó [³H]K-252a específicamente con tritio en las posiciones 3 y 9 a través de un contrato con NEN Research Products (Billerica, MA) y tenía una actividad específica de 40 Ci/mmol. Se llevaron a cabo reacciones de unión en 1 ml en una placa de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía tampón MOPS 50 mM, pH 7, NaCl 150 mM, MnCl₂ 5 mM, BSA 1 mg/ml, 1% de DMSO y [³H]K252a 0,25 nM. Se realizaron las muestras por triplicado con una concentración de 5 µg/ml de MLK-3 derivada de baculovirus bruta. Se definió la unión no específica como la unión en presencia de K252a 1,2 µM no marcado y se restó de la unión total para dar la unión específica. A esta dilución, un 12-15% de las cuentas totales estaban unidas no específicamente a proteína y un 75-85% de estas cuentas estaban unidas específicamente a MLK-3 (Figura 14). Todos los experimentos fueron llevados a cabo durante 2 h a 4°C. Se recogieron los complejos [³H]K252a/MLK-3 en filtros Whatman GF/C usando un cosechador Brandel, se lavaron con tampón MOPS/NaCl frío y se contaron en un contador Wallac Micro Beta. Se realizó un experimento de unión en saturación para obtener una K_d para K252a. Se muestra un ejemplo de los resultados de uno de estos experimentos (Figura 14). Se obtuvo una K_d de 0,89 nM (Límites de confianza 0,2 a 1,5 nM).

Ejemplo 30 Ensayos con células intactas

(A) Sistema de sobreexpresión en Cos 7

35 Materiales

K-252a y los derivados de este compuesto fueron proporcionados por Kyowa-Hakko Kogyo Co, Ltd (Tokyo, Japón) (Kaneko y col, 1997). Los compuestos fueron disueltos en sulfóxido de dimetilo ("DMSO") de grado de cultivo celu-

lar y guardados en oscuridad a 4°C. Todas las diluciones de los compuestos fueron realizadas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía un 1% de seroalbúmina bovina. Se compró el anticuerpo hemaglutinina (HA) a BAbCO (Richmond, CA). Se compró el sustrato AP-1 (c-jun) a Promega (Madison, WI) Se compró [γ -³²P]ATP (6 000 Ci/mmol) a Amersham (Arlington Heights, IL)

Cultivo de células Cos7

Se obtuvieron células Cos7 de riñón de mono verde de ATCC, Rockville, Maryland (CRL 1651) y se las mantuvo en DMEM que contenía un 10% de suero bovino, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM u 50 U/ml de penicilina/es-treptomicina a 37°C en una atmósfera de un 10% de CO₂ y un 90% de aire. Se desprendieron las células Cos 7 para su pase añadiendo un 0,25% de tripsina.

(1) Sobreexpresión de miembros de la familia MLK y JNK1 en células Cos7

Se plaquearon células Cos7 a un 80% de confluencia y se transfectaron con 2 µg de cada de construcciones de ADNc utilizando lipofectamina según las recomendaciones del fabricante (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Se subclonaron un ADNc de longitud completa de MLK-3 o MLK-2 humanas o DLK de ratón o una MLK-1 humana parcial según se ha descrito antes y una JNK1 humana marcada con hemaglutinina A de longitud completa, amablemente facilitadas por J Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD), en el vector pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). Después de una transfección de 48 h, se trataron las células con DMSO al 0,025% o 500 nM de los compuestos indicados durante 2 h, seguido de lisis en 0,4 ml de tampón Tritón (Tritón X-100 al 1%, cloruro de sodio 50 mM, Tris 10 mM (pH 7,6), seroalbúmina bovina al 0,1%, pirofosfato de sodio 30 µM, fluoruro de sodio 50 mM, 20 µg/ml de aprotinina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, vanadato de sodio 1 mM). Se estudió la actividad JNK del lisado por un ensayo de inmunoprecipitación/kinasa según se describe a continuación.

(2) Ensayo de inmunoprecipitación y kinasa con células enteras

Se midió el lisado de células Cos7 en cuanto a la concentración de proteína usando el kit Micro BCA de Pierce (Rockford, IL) y se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteína con el anticuerpo Ha durante 1 h a 4°C. Se hizo una pella de los inmunoprecipitados por centrifugación en una centrífuga microfuga durante 20 seg, se resuspendió en tampón Tritón y se lavó por centrifugación 2 veces más, seguido de un lavado final en tampón Kinasa (Hepes

20 mM, pH 7,4, MgCl₂ 20 mM, ditioneitol 2 mM, vanadato de sodio 0,1 mM). Se resuspendió el inmunoprecipitado en tampón de kinasa que contenía ATP 1 µM y 5 µCi de [γ-³²P]ATP y sustrato (1 µg/muestra de AP-1) y se incubó durante 15 min. a 30°C. Se detuvo la reacción de la kinasa por adición de tampón de muestra reductor (Laemmli, Nature 1970, 227 680-685) Se calentaron las muestras a 80°C durante 5 min y se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. Se separaron las proteínas por electroforesis. Se secó el gel y se realizó la cuantificación de la radiactividad en el sustrato AP-1 en un Phosphorimager de Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA). Los resultados de experimentos en los que se coexpresan MLK-3, MLK-2 y DLK con HA-JNK1 y se incuban en ausencia o presencia de K-252a están mostrados en las Figuras 15A y 15B. Por el contrario, un derivado del compuesto parental K-252a denominado Compuesto III-3 (véase la Tabla 4), que es un inhibidor más selectivo de la kinasa, no interfería con la ruta JNK activada por otras MAPKKK aguas arriba de JNK, MEKK1 (Figura 15C).

(B) Ensayo informador de células enteras para JNK activado por MLK

Los intentos de derivar clones que expresen constitutivamente la familia MLK no han tenido éxito, lo que sugiere que la sobreexpresión de las MLK puede afectar a la supervivencia celular (Bergeron y col, Biochem Biophys Res Commun, 1997, 231, 153-155, Nataga y col, EMBO J, 1998, 17, 149-158). Por lo tanto, al desarrollar un ensayo de células enteras para rastrear fenómenos bioquímicos inducidos por MLK, puede ser necesaria una línea celular que contenga un sistema de expresión inducible de ingeniería genética de la kinasa de interés. Por ejemplo, una línea celular PC-12 transfectada con un transactivador controlado por tetraciclina. Cuando se transfectan además las células con un gen de interés dirigido por el promotor inducible tetO, la expresión de ese gen está estrechamente controlada por tetraciclina en el medio (Shockett y col, Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92, 6522).

Para cuantificar la activación de MLK, se puede medir la fosforilación de sustratos aguas abajo, tales co-

mo MEK4, JNK o c-jun, en formatos de múltiples ensayos según se ha descrito antes Otra aproximación para cuantificar la activación de MLK en células enteras es usar una actividad de enzimas informadoras, tal como el sistema informador de la c-jun luciferasa comercializado a través del sistema PathDetect™ (Stratagene, La Jolla, CA). En este sistema, se transfecta la línea celular inducible por tetraciclina con dos plásmidos Un plásmido expresa constitutivamente una fusión del dominio de transactivación NH₂-terminal de cJun con el dominio de unión a ADN GAL4 de levaduras (proteína de fusión cJun-DBD) El otro plásmido lleva las secuencias codificantes de la luciferasa de luciérnaga dirigido por cinco repeticiones tándem del sitio de unión GAL4 Tras la activación de MLK, el substrato aguas debajo de JNK, la proteína de fusión cJun-DBD, se fosforila, se une a los sitios de unión GAL4 e induce la transcripción del gen de luciferasa La luciferasa es fácilmente estudiada en lisados celulares por adición de su substrato (Promega, Madison, WI) y medición de la quimioluminiscencia

Ejemplo 31. Asociación de la inhibición de los miembros de la familia MLK con supervivencia de las motoneuronas
Supervivencia de cultivos de médula espinal de rata enriquecidos con motoneuronas

5 Se disecaron médulas espinales de fetos de ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) de una edad embrionaria (E) de 14,5-15. Se disociaron las células de sólo la porción ventral de la médula espinal y se enriquecieron aún más en motoneuronas por centrifugación en un gradiente en etapas de metrizamida al 6,5%, según se ha descrito previamente (Henderson y col., 1993) y se analizaron en cuanto a pureza por tinción con anticuerpo para el receptor de neurotrofina de baja afinidad (IgG-192, Boehringer-Mannheim) (datos no mostrados). Se sembraron las
10 células en placas de 96 pocillos previamente revestidas con poli-L-ornitina y laminina (5 µg/pocillo de cada) a una densidad de 6×10^4 células/cm² en medio N2 libre de suero químicamente definido (Bottenstein y col., 1979, antes citado). Para separar la unión de los efectos sobre la supervivencia, se hizo la adición de los compuestos a los cultivos después de un período inicial de unión de 1-3 h. Se valoró la supervivencia neuronal después de 4 días usando calceína AM (Molecular Probes, Eugene, OR) en un ensayo de viabilidad fluorométrica (Bozyczko-Coyne y col., 1993, antes citado). Los recuentos microscópicos de las neuronas guardaba una correlación directa con los valores de fluorescencia relativa. Resumiendo, se diluyó seriadamente el medio de cultivo en DPBS (solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco) y se añadió entonces una concentración final de stock de calceína AM 6 µM a cada uno de los
15 96 pocillos. Se incubaron las placas durante 30 min a 37°C, seguido de lavados en diluciones seriadas en DPBS. Se leyó la señal fluorescente usando un fluorímetro lector de placas de Millipore (Cytofluor 2350) a excitación=485 nm y
20 emisión=538 nm. Para cada placa, se restó el fondo medio derivado de los pocillos que recibieron calceína AM, pero que no contenían células, de todos los valores. Se verificó la linealidad de la señal de fluorescencia para la concentración y el tiempo de incubación para el rango de densida-
25
30
35

des celulares en estos experimentos. En la Tabla 3, se muestra un ejemplo del porcentaje de supervivencia sobre el control de las motoneuronas en presencia de los compuestos de ensayo a 250 nM

5 *Supervivencia de las neuronas corticales*

Se disecaron las cortezas cerebrales de fetos de ratas del día embrionario 18 y se digirieron enzimáticamente para obtener una suspensión de células solas. Se sembraron las células a una densidad de $1,56 \times 10^5/\text{cm}^2$ sobre
 10 placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos revestidas de poliornitina/laminina en medio basal neuronal libre de suero que contenía suplementos B27. Se revistieron las placas con una solución de poliornitina/laminina ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$ de cada en PBS durante al menos dos horas a 37°C). Los días *in vitro*
 15 5-7, se expuso a las neuronas corticales a Ab25-35 ($20 \mu\text{M}$) en presencia o en ausencia de los compuestos de ensayo. Se prepararon las soluciones stock de Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) (1 mM) en H_2O estéril desionizada-destilada. Se determinó la supervivencia neuronal relativa a las 48 h de
 20 la adición de los péptidos usando lactato deshidrogenasa ("LDH") como indicador de la integridad de la membrana plasmática/viabilidad celular. Se midió la LDH usando el kit de detección de la citotoxicidad (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) según las instrucciones del fabricante.
 25 Los datos son expresados como porcentaje de inhibición de la DLH liberada en relación a cultivos tratados con Ab25-35 solo.

Tabla 3

| Fórmula | Supervivencia
neuronas
corticales
% Control
@ 250 nm | Motoneuronas | | Células Cos-7 | | | |
|------------------|--|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | Supervi-
vencia
% Control
@ 250 nm | % Inhibi-
ción JNK @
500 nm | DLK
% Inhib
JNK @ 500
nm | MLK3
% Inhib
JNK @ 500
nm | MLK2
% Inhib
JNK @ 500
nm | MLK1
% Inhib
JNK @ 500
nm |
| III ¹ | 46,56 | 300 | 65 | 63,73 | 98,99 | 89,67 | 97,96 |
| III ² | 47,80 | 315 | 88 | 36,22,42 | 94,94 | 69,44 | 92,64 |
| I ³ | 22,54 | 177 | 88 | 20,25 | 94,93 | 0 | 79,29 |
| I ⁴ | 29,39 | 165 | 97 | 58,13,52,8 | 84,92,90 | 0 | 63,38 |

- 5
- ¹ El compuesto tiene la fórmula III en donde Z₁, Z₂, R₁ y R₂ son H, X es CO₂CH₃, y R es OH

² El compuesto tiene la fórmula III en la que Z₁ y Z₂ son H, X es CO₂CH₃, R₁ y R₂ son CH₂SCH₂CH₃, y R es OH

³ El compuesto tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂OAc, R₄ es CH₂CH₂(2-piridilo), y X es CH₂

⁴ El compuesto tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es H, R₄ es CH₂CH₂(2-pirimidinilo), y X es CH₂
- 10

Ejemplo 32. Inmunoprecipitación de la actividad JNK endógena de cultivos de motoneuronas en ausencia o en presencia de indolocarbazoles o de pirrolocarbazoles fusionados

Se plaquearon motoneuronas purificadas a una
5 densidad de 6×10^4 células/cm² en pocillos de 16 mm de
diámetro. Se dejó que las células se adhirieran durante 2
horas antes del tratamiento. Se trataron las células con
un 0,0125% de DMSO o con 500 nM de compuesto durante 2 h
en medio definido N2. Se lavaron entonces las células con
10 solución salina tamponada con fosfatos helada, seguido de
lisis en 0,4 ml de tampón Tritón según se ha descrito an-
tes en el Ejemplo 30. Se normalizó el lisado de los cul-
tivos de motoneuronas al número de células y se immuno-
precipitó con un anticuerpo JNK1 (cat # sc-474) comprado
15 a Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se estudió
la actividad JNK de los inmunoprecipitados en presencia
de ³²P-ATP y sustrato c-jun como se ha descrito ante-
riormente. Se comparó el perfil de la actividad inhibito-
ria de los 4 compuestos de ensayo en motoneuronas y en
20 células Cos7 que sobreexpresaban DLK, MLK-1, MLK-2 o MLK-
3 (Tabla 3).

**Ejemplo 33. Correlación entre la inhibición de la activi-
dad JNK inducida por MLK3 en células Cos7 y la actividad
colinacetil transferasa en cultivos embrionarios prima-
rios**

Para determinar si la inhibición de la ruta
JNK regulada por estas kinasas guardaba correlación con
los compuestos neurotróficos, evaluamos el efecto de los
compuestos sobre la actividad JNK en células Cos7 que so-
30 breexpresaban HA-JNK y MLK3. Después de un período de
transfección de 48 h, se incubaron las células con los
compuestos a 500 nM durante 2 h, seguido de lisis celu-
lar. Se inmunoprecipitó el lisado y se midió la actividad
kinasa como se ha descrito previamente. Se dan los resul-
35 tados como porcentaje de inhibición de la muestra con-

100
97

trol, donde el control es la actividad JNK en presencia de DMSO. Como puede verse por la Tabla 4, la mayoría de los compuestos que eran activos en cuanto a la actividad ChAT de la médula espinal y/o del cerebro anterior basal
5 eran potentes inhibidores de la activación por MLK-3 de JNK

Tabla 4
Efecto de los indolo- e indenocarbazoles sobre la actividad JNK en células Cos7 que sobreexpresan MLK3

10

| Compuesto | Actividad colinacetil transferasa | | % Inhibición de la actividad JNK (media) |
|----------------------|-----------------------------------|------------------|--|
| | Médula espinal | Cerebro anterior | MLK3 en células Cos7 |
| III-1 ¹ | + | + | 84 |
| III-2 ² | + | + | 96 |
| III-3 ³ | + | + | 94 |
| I-1 ⁴ | + | + | 93 |
| I-2 ⁵ | + | + | 85 |
| I-3 ⁶ | + | + | 93,5 |
| I-4 ⁷ | - | + | 95 |
| I-5 ⁸ | - | + | 97 |
| I-6 ⁹ | - | + | 58 |
| I-7 ¹⁰ | - | + | 85,5 |
| III-4 ¹¹ | - | + | 66 |
| III-5 ¹² | - | + | 96 |
| III-7 ¹³ | - | + | 54 |
| I-8 ¹⁴ | + | - | 89 |
| III-8 ¹⁵ | + | - | 94 |
| III-9 ¹⁶ | + | + | 98,5 |
| III-10 ¹⁷ | + | - | 78 |
| I-9 ¹⁸ | + | - | 88 |
| I-10 ¹⁹ | + | - | 94 |
| III-11 ²⁰ | - | - | 92,5 |
| 1-11 ²¹ | - | + | 33 |

| | | | |
|--------------------|---|---|----|
| I-12 ²² | - | - | 11 |
| I-13 ²³ | - | - | 1 |

- ¹ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z₁ y Z₂ son H, X es CO₂CH₃, R₁ es NHCONHC₂H₄, R₂ es CH₂CH₂(2-piridilo), y R es OH
- 5 ² Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z₁ y Z₂ son H, x es CO₂CH₃, R₁ y R₂ son CH₂OCH₂OCH₂CH₃, y R es OH
- 10 ³ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z₁ y Z₂ son H, X es CO₂CH₃, R₁ y R₂ son CH₂SCH₂CH₃, y R es OH.
- ⁴ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃ y R₄ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂OH, R₅ y R₆ son OCH₃ y X es CH₂
- 15 ⁵ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂OAc, R₄ es Br, y X es CH₂
- ⁶ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂OAc, R₄ es CH₂CH₂(2-piridilo), y X es CH₂
- 20 ⁷ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂OH, y X es CH₂
- ⁸ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂CH₂OH, y X es CH₂
- 25 ⁹ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₂, R₃, R₄ R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, y X es S
- ¹⁰ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅ y R₆ son H, B₁ y B₂ representan juntos O, R₂ es CH₂CH₂CH₂NHCO(4-(OH)Ph), y X es CH₂
- 30 ¹¹ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z₁, Z₂, R₁ y R₂ son H, X es CO₂(CH₂)₄CH₃ y R es OH

- ¹² Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 , Z_2 y R_1 son H, R_2 es CH_2OH , X es CO_2CH_3 , y R es OH
- ¹³ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 y Z_2 juntos forman =O, R_1 y R_2 son Br, X es CO_2CH_3 y R es OH
- ¹⁴ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_2 es H, R_4 es $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-pirimidinilo})$, y X es CH_2
- ¹⁵ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 y Z_2 son H, R_1 es Br, R_2 es I, X es CO_2CH_3 y R es OH
- ¹⁶ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 , Z_2 , R_1 y R_2 son H, X es CO_2CH_3 y R es OH
- ¹⁷ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 y Z_2 son H, R_1 y R_2 son $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X es CO_2CH_3 y R es OH
- ¹⁸ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_4 es $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-piridazinilo})$, y X es CH_2
- ¹⁹ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_2 es H, R_4 es $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-piridilo})$, y X es CH_2
- ²⁰ Compuesto que tiene la fórmula III en donde Z_1 , Z_2 , R_1 y R_2 son H, X es CO_2CH_3 y R es OCH_3
- ²¹ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_2 es $(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C(=O)-3,5-dihidroxifenilo}$, y X es CH_2 .
- ²² Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_2 es benzoílo, y X es CH_2 .
- ²³ Compuesto que tiene la fórmula I en donde A_1 , A_2 , R_1 , R_2 , R_3 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 representan juntos O, R_4 es $\text{CH=CH-C}\equiv\text{N}$, y X es CH_2

Ejemplo 34. Ensayo de cambio en gel para la activación de la MLK

La activación de las MLK puede conducir a inducción de la transcripción de *c-jun*, dando como resultado un aumento en la proteína c-Jun. La mayor cantidad de proteína c-Jun puede ser medida por un ensayo estándar, identificado como ensayo de cambio en gel. Garner y col, *Nucleic Acids Res*, 1981, 9, 3047-3060, aquí incorporada como referencia en su totalidad. Se incuban oligómeros de ADN de doble hebra radiomarcados, que codifican para un sitio de unión a ADN de c-Jun, con un extracto celular nuclear, seguido de electroforesis en gel de acrilamida y cuantificación del ADN radiomarcado cambiado a una más lenta movilidad. Éste representa la porción de ADN que se une a la proteína c-Jun y es directamente proporcional a la cantidad de proteína c-Jun en el extracto.

La activación de las MLK puede también inducir la fosforilación de c-Jun. Ésta puede ser detectada usando anticuerpos que reconocen específicamente la forma fosforilada de la proteína en sistemas de detección tales como, por ejemplo, las transferencias Western o los ELISA.

Ejemplo 35 Supervivencia de neuronas embrionarias de pollo

25 Materiales

El medio L15 de Leibovitz, la glucosa, el bicarbonato de sodio, la tripsina y los antibióticos eran de Gibco. Se preparó extracto de músculo como se ha descrito (Henderson y col, *Nature*, 1983, 302, 609-611, aquí incorporada como referencia en su totalidad). Todos los demás reactivos eran de sigma, a menos que se indique algo diferente.

Cultivo celular

Se aislaron las motoneuronas (día embrionario 5,5) con un método inmunológico según el procedimiento

104
101

indicado en Bloch-Gallego y col , *Development*, 1991, 111, 221-232, aquí incorporada como referencia en su totalidad, con las modificaciones descritas en Weng y col., *NeuroReport*, 1996, 7, 1077-1081, aquí incorporada como
5 referencia en su totalidad Se sembraron motoneuronas purificadas en placas de cultivo de tejidos de 35 mm (Nunc) prerrevestidas con poli-DL-ornitina y laminina (1 µg/ml, Upstate Biotech) El medio de cultivo era L15 con bicarbonato de sodio (22,5 mM), glucosa (20 mM), progesterona
10 (2×10^{-8} M), selenito de sodio (3×10^{-8} M), conalbúmina (0,1 mg/ml), insulina (5 µg/ml), penicilina-estreptomicina y un 10% de suero de caballo inactivado por calor Se suplementó el extracto de músculo a 30 µg/ml Se preparó el
15 Compuesto III-3 como una solución stock 4 mM en DMSO y se guardó protegida de a luz a 4°C. La concentración final de DMSO en los cultivos tratados y en los controles era del 0,125%

Se disecaron os ganglios simpáticos paravertebrales ("SG", día embrionario 12 (E12)), los ganglios
20 de las raíces dorsales ("DRG", E9) y los ganglios ciliares ("CG", E8) de embriones de pollo el día embrionario indicado según han descrito Lindsay y col , *Dev Biol* , 1985, 112, 319-328, aquí incorporada como referencia en su totalidad Después de la tripsinización y de la disociación, se plaquearon las suspensiones de células nerviosas sobre placas de cultivo revestidas de poliornitina-laminina en medio de cultivo F14 de Ham suplementado con un 10% de suero de caballo Inmediatamente después del plaqueo, se añadieron factores de supervivencia a las
25 siguientes concentraciones factor de crecimiento de los nervios (NGF), 20 ng/ml, factor neurotrófico ciliar (CNTF), 10 ng/ml Los cultivos fueron mantenidos a 37°C y un 5% de CO₂ en un ambiente humidificado

Recuento celular

35 Se plaquearon las neuronas en placas de cul-

tivo de 35 mm con cuadrículas (Nunc). Se hizo un barrido de áreas seleccionadas de cada placa que constituían en conjunto aproximadamente un 10% de la superficie para detectar la presencia de células con brillo de fase inmediata después de plaquear y de nuevo después de 48 h, para valorar los porcentajes de supervivencia. Se confirmó la supervivencia celular por tinción vital con azul tripán (no mostrado)

DRG intactos

10 Se pusieron los ganglios en placas de 96 pocillos previamente revestidas con poli-L-ornitina y laminina (5 µg de cada/ml de solución salina tamponada con fosfatos) en medio N2 libre de suero (Bottenstein y col, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 514-517, aquí incorporada como referencia en su totalidad) que contenía un 0,05% de seroalbúmina bovina (BSA) y se mantuvieron durante 48 h a 37°C y un 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Los ganglios tratados recibieron 250 nM del Compuesto III-3 ó 20 ng/ml de NGF 2 h después de plaquear.

20 *El Compuesto III-3 soporta la supervivencia de las neuronas periféricas embrionarias de pollo de un modo dependiente de concentración*

La retirada del NGF de cultivos disociados de neuronas sensoriales de ganglios de las raíces dorsales (DRG) E9 y de neuronas de ganglios simpáticos (SG) E12 les hace sufrir PCD en 48 h. Esto se evitaba por adición de Compuesto III-3 al medio de cultivo en el momento de la retirada del NGF. A 1 µM, el Compuesto III-3 mantenía un 94% de las neuronas SG y un 890% de las neuronas DRG vivas al cabo de 48 h (control tratado con NGF SG 65%, DRG 66%). De forma similar, el Compuesto III-3 promovía la supervivencia del 76% de las neuronas de los ganglios ciliares (CG) dependientes de CNTF al cabo de 24 h (control tratado con CNTF 67%). En presencia de un 10% de suero, los efectos de supervivencia del Compuesto III-3 eran de-

pendientes de la concentración, alcanzando una meseta a
alrededor de 1 μ M para las tres poblaciones neuronales
(Fig 16A-C) Las neuronas supervivientes mostraban un
extenso crecimiento de las neuritas, con neuritas más es-
5 pesas y más curvadas en comparación con lo cultivos con-
trol. (Fig 17E-H) Al cabo de cuatro días, la actividad
promotora de la supervivencia estaba aún intacta DRG
Compuesto III-3 52%, control tratado con factor de creci-
miento 41%, SG Compuesto III-3 83%, control tratado con
10 NGF 55%, CG Compuesto III-3 58%, control tratado con
CNTF 50% En condiciones óptimas, los cultivos podían ser
mantenidos con el Compuesto III-3 durante una semana y
durante más tiempo (no mostrado)

*El Compuesto III-3 soporta la supervivencia de motoneuro-
15 nas embrionarias de pollo de un modo dependiente de con-
centración*

Las motoneuronas de pollo cultivadas pueden
sobrevivir y proyectar procesos en presencia de extracto
de músculo, mientras que mueren rápidamente en su ausen-
20 cia En nuestros experimentos, después de 48 h, un 65% de
las motoneuronas sobrevivían en presencia de extracto
muscular, a diferencia del 14% de los controles no trata-
dos En condiciones libres de suero, el efecto de super-
vivencia del Compuesto III-3 era máximo a 300 nM y era
25 algo superior (79%) al inducido por el extracto muscular
La dependencia de concentración del efecto de superviven-
cia del Compuesto III-3 en este sistema es diferente con
respecto a las neuronas periféricas, ya que concentracio-
nes del Compuesto III-3 superiores a 300 nM mostraban un
30 efecto progresivamente reducido (Fig 16A). Esto podría
indicar una sensibilidad particular de las motoneuronas a
algún aspecto de la actividad del Compuesto III-3. Morfo-
lógicamente, las motoneuronas rescatadas con el Compuesto
III-3 exhibían cuerpos celulares con brillo de fase y
35 eran capaces de proyectar largas neuritas, que aparecían

ligeramente más espesas que las inducidas por el extracto muscular (Fig 179 Después de cuatro días en cultivo, el 56% de las motoneuronas estaban vivas con el Compuesto III-3, en comparación con el 42% del extracto muscular A 300 nM, las neuronas tratadas con Compuesto III sobrevivían in vitro durante al menos una semana (no mostrado)

El Compuesto III-3 promueve el crecimiento de las neuritas de ganglios de las raíces dorsales intactos

Los resultados de los experimentos anteriores demuestran que el Compuesto III-3 no sólo promueve la supervivencia de las neuronas embrionarias de los sistemas nerviosos periférico y central, sino que también da lugar a un gran crecimiento de las neuritas Muchas de estas proyecciones parecían ser más espesas que las provocadas en presencia de factores de crecimiento (compárese las Fig 17A-D con las Fig 17 E-H) Este efecto fue también observado en el crecimiento neurítico provocado en los ganglios de las raíces dorsales embrionarios intactos cultivados en presencia de 250 nM de Compuesto III-3 (Fig 18C) Las neuritas crecían en respuesta tanto a NGF (Fig 18B) como al Compuesto III-3, las provocadas por el NGF eran mucho más finas y más ramificadas que las que crecían en presencia de Compuesto III-3, que aparecían espesas y posiblemente fasciculadas

25 **Ejemplo 36. Tratamiento in vivo**

Muerte de las motoneuronas regulada por el desarrollo en embrión de pollo

El presente ejemplo se describe con detalle en Glicksman y col , *J Neurobiol* , 1998, 35, 361-370, que es aquí incorporada como referencia en su totalidad. En E6, se practicó una ventana en la cáscara de huevos de pollo (Spafas, Preston, CT) y se aplicó directamente vehículo (5% de Solutol[™] HS 15, hidroxiestearato de polietilenglicol 660, BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Alemania (en solución salina tamponada con fosfatos, pH

7,2)) o la dosis especificada de Compuesto III-3 en el vehículo sobre la membrana corioalantoidea vascularizada una vez al día desde E6 hasta E9, según describen Oppenheim y col , *Science*, 1991, 251, 1616-1617, aquí incorporada como referencia en su totalidad Se sacrificaron los embriones en E10 y se extrajeron sus médulas espinales, se fijaron en solución de Carnoy (10% de ácido acético glacial/60% de etanol absoluto, 30% de cloroformo), se procesaron para secciones seriadas en parafina y se tiñeron con tiónina Se contó cada 20ª sección de los segmentos lumbares 1-8 según criterios previamente descritos (Clarke y col., *Methods in Cell Biology Cell Death*, 1995, Schwart & Osborne, Eds , Academic Press, New York, pp 277-321, aquí incorporada como referencia en su totalidad)

Muerte de las motoneuronas regulada por el desarrollo en la rata neonata

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley en periodo de gestación no cronometrada de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN) Se inyectó diariamente a los cachorros hembra de las ratas por vía subcutánea (SC) en los músculos blanco del perineo con el Compuesto III-3 en un 5% de Solutol™ HS 15 o en vehículo solo comenzando el día del nacimiento (P1) y continuando durante 5 días (P5) En P10 o P60, los cachorros fueron decapitados, se recogió la sangre en tubos capilares heparinizados y se disecaron la región de la médula espinal que contenía el núcleo espinal con dimorfismo sexual del bulbocavernoso ("SNB") y el área perineal que contenía el bulbocavernoso (BC) y los músculos elevadores del ano ("LA") después de perfundir a los animales con solución salina/formalina Se post-fijó la región de la médula espinal que contenía el SNB, se embebió en Paraplast, se seccionó a 10 µm y se tiñó con violeta de Cresylecht (Nordeen y col , *Science*, 1985, 229, 671-673, aquí incorporada como referencia en su to-

talidad) Se contaron las neuronas motoras a X500 en secciones seriadas de la región lumbar 5 a sacra 1 de la médula espinal según se ha descrito previamente (Nordeen y col , antes citado). Se hizo la enumeración microscópica sobre secciones codificadas por un observador ciego a los grupos de tratamiento. Se corrigieron los recuentos de motoneuronas en cuanto al tamaño celular y al grosor de la sección (Konisgsmark, *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, Nauta & Ebbesson, Eds., 1970, Springer-Verlag, New York, pp. 315-340, aquí incorporada como referencia en su totalidad) y se hizo el análisis estadístico por el análisis de una vía de la varianza (ANOVA) Se post-fijó la musculatura del perineo, se descalcificó, se embebió en Paraplast, se seccionó a 10 μ m y se tiñó con Tricrómico de Milligan Utilizando microscopía de campo brillante (X250), se identificaron positivamente los músculos BC y LA en hembras normales y en hembras tratadas con Compuesto III-3 (405 animales/grupo) tanto por su localización como por la presencia de fibras estriadas. Se trazó el contorno del tejido muscular de secciones alternas usando un microscopio de proyección (62 5) y se midió el área de la sección transversal usando una almohadilla digitalizadora y un sistema de morfometría basado en ordenador (Sigmascan, Jandel Scientific) Se calculó el volumen muscular tomando el área total de la sección transversal y multiplicándola por el grosor de la sección y se corrigió en cuanto al porcentaje de la estructura muestreada.

Se centrifugó la sangre recogida durante 5 min. a temperatura ambiente, se retiró luego el plasma y se congeló a -20°C Se midieron los niveles de testosterona en suero (6-7 animales/grupo) por radioinmunoensayo siguiendo los procedimientos expuestos en Wingfield y col , *Steroids*, 1975, 26, 311-327, aquí incorporada como referencia en su totalidad

Desdiferenciación de neuronas motoras inducida por axotomía en la rata adulta

Se hizo una sección transversal del nervio hipogloso izquierdo en el cuello de ratas Sprague-Dawley hembras adultas (120-180 g) bajo anestesia con Neumbutol y se aplicaron 50 µl de Compuesto III-3 o su vehículo (5% de Solutol[™] HS 15) a una pieza de Gelfoam[™] (AJ Buck, Owings Mills, MD) y se envolvió después alrededor del extremo proximal del nervio transectado. Después de 7 días, los animales fueron anestesiados y perfundidos con paraformaldehído al 4% en tampón de Sorenson, fosfato 0,07 M, pH 7,2. Se extrajo el tallo cerebral y se cortaron secciones coronales seriadas de 40 µm de grosor en un criostat (Chiu y col, *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, aquí incorporada como referencia en su totalidad). Se procesó cada quinta sección para la inmunohistoquímica de la ChAT según se ha descrito previamente (Chiu y col., *J Comp Neurol*, 1993, 328, 351-363, aquí incorporada como referencia en su totalidad) usando una dilución 1:350 de un anticuerpo monoclonal anti-ChAT obtenido de Chemicon. Las células que se teñían claramente por encima del fondo fueron contadas en secciones teñidas, se expresó el número de células enumeradas como la razón del número de células inmunorreactivas con ChAT en el lado axotomizado del núcleo hipogloso frente al número de células inmunorreactivas en el lado control (no lesionado).

El Compuesto III-3 rescataba las neuronas motoras del embrión de rata de la muerte apoptótica e inhibía una ruta de señalización, dando como resultado la activación de JNK1 en estas células (Maroney y col, *J Neurosci*, 1998, 18, 104-111, aquí incorporada como referencia en su totalidad). Para determinar la actividad potencial *in vivo*, se valoró el Compuesto III-3 en dos modelos de muerte de neuronas motoras programada regulada por el desarrollo y en un modelo de desdiferenciación in-

ducida por axotomía en neuronas motoras de adulto En pollos, aproximadamente el 50% de las motoneuronas de la médula espinal sufren PCD durante E5-10 (Hamburger y col., *J Neurosci*, 1982, 1, 38-55, Purves y col., *Body and Brain A Trophic Theory of Neural Connections*, 1988, Harvard University Press, Cambridge, MA, ambas aquí incorporadas como referencia en su totalidad) La aplicación del Compuesto III-3 a la membrana corioalantoidea durante este período evitaba la muerte de las neuronas motoras de un modo dosis-dependiente (Fig. 19) El 40% de las neuronas motoras que normalmente hubieran muerto eran rescatadas a las dos dosis más altas estudiadas (2,3 y 7 $\mu\text{g}/\text{día}$), mientras que el 25% de las neuronas motoras eran rescatadas a dosis inferiores (1,2 y 1,8 $\mu\text{g}/\text{día}$) (Fig 19)

Durante la vida perinatal temprana de las ratas hembras (desde el último estadio embrionario hasta el día postnatal (PN) 4), más del 50% de las motoneuronas en el SNB son eliminadas a través de PCD (Breedlove, *J Neurobiol*, 1986, 17, 157-176, aquí incorporada como referencia en su totalidad) En los machos, las motoneuronas en este núcleo inervan a los músculos estriados del pene implicados en los reflejos copulatorios La secreción testicular de los esteroides androgénicos reducen la muerte de las motoneuronas SNB en los machos y previene gran parte de la atrofia de los músculos BC y LA inervados por las neuronas. La administración de testosterona a cachorros hembras daba lugar a un número totalmente masculino de motoneuronas SNB (Nordeen y col., antes citado) y prevenía la atrofia de los músculos BC y LA (Waiman y col., *Endocrinology*, 1941, 29, 955-978, aquí incorporada como referencia en su totalidad) La administración diaria SC del Compuesto III-3 (PN 1-5) a ratas hembra atenúa significativamente la muerte de las motoneuronas (Fig 20A) El rescate de la muerte de las neuronas moto-

ras SNB por el Compuesto III-3 se producía a dos dosis (0,5 y 1 mg/kg al día) A las dosis máximamente efectivas de 0,5 y 1 mg/kg al día, la administración del Compuesto III-3 daba lugar a un aumento del 70% en la supervivencia de las neuronas motoras, que igualaba al efecto de la testosterona (Fig 20A). El Compuesto III-3 no alteraba los niveles plasmáticos de testosterona de las hembras tratadas La medición radioinmune de los niveles de testosterona en plasma en el grupo de 1 mg/kg al día no dio ninguna diferencia significativa al compararlos con el grupo del control de vehículo ($0,016 \pm 0,008$ ng/ml y $0,029 \pm 0,015$ ng/ml de error estándar de la media ("S.E M"), respectivamente).

Para determinar si el tratamiento con el Compuesto III-3 era efectivo en el mantenimiento a largo plazo de la supervivencia de las motoneuronas, se trataron hembras con el Compuesto III-3 (0,5 y 1 mg/kg al día) durante el mismo período de tiempo PN(1-5) Se sacrificó a la mitad de los animales del grupo del vehículo y de los dos grupos de tratamiento en PN10 Se mantuvo entonces al resto de los animales sin tratamiento adicional con el Compuesto III-3 hasta su sacrificio en PN60. Como se ha observado previamente (Fig 20A), el tratamiento con el Compuesto III-3 daba como resultado un aumento del 70% en la supervivencia de las motoneuronas (Fig. 20B) Más aún, el 100% de estas motoneuronas rescatadas eran identificables morfológicamente 55 días después del último tratamiento con el Compuesto III-3 (Fig 20B) la inhibición por el Compuesto III-3 de la muerte de las motoneuronas durante el período neonatal permitía la supervivencia de las motoneuronas hasta la vida de adulto

A pesar de la clara demostración y de los efectos devastadores de la pérdida de neuronas motoras en las enfermedades humanas de adultos, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, las neuronas motoras del adul-

to en la mayor parte de los modelos animales de lesión de motoneuronas son resistentes a la muerte. Sin embargo, la lesión axonal sí resulta en cambios morfológicos (Oppenheim y col , antes citado), así como bioquímicos (Oppenheim y col., antes citado, Rende y col , *J Comp Neurol* , 1992, 319, 285-298, aquí incorporada como referencia en su totalidad, Chiu y col , *J Comp Neurol* , 1993, 328, 351-363, aquí incorporada como referencia en su totalidad) en las motoneuronas de adultos que pueden imitar el cambio degenerativo que precede a la muerte en motoneuronas enfermas y en degeneración Un ejemplo de este tipo de cambio se produce como resultado de la axotomía del nervio hipogloso, que inerva la lengua La transección unilateral de este nervio en la rata adulta daba lugar a la pérdida del 95% de las neuronas motoras hipoglósicas inmunorreactivas a ChAT en el núcleo ipsilateral después de 7 días (Chiu y col , *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, aquí incorporada como referencia en su totalidad) La pérdida de inmunorreactividad a ChAT no era permanente Cuatro semanas después de la axotomía, el 100% de las motoneuronas habían recuperado los niveles control de inmunorreactividad a ChAT (Borke y col., *J Neurocytol* , 1993, 22, 141-153, aquí incorporada como referencia en su totalidad) La inmunorreactividad a ChAT en las neuronas motoras hipoglósicas contralaterales no estaba afectada (Chiu y col , antes citado) (Fig 21 y Tabla 5)

Cuando se aplica en Gelfoam[™] al extremo proximal del nervio hipogloso, el Compuesto III-3 atenúa de forma dosis-dependiente la reducción de la inmunorreactividad a ChAT en las motoneuronas hipoglósicas ipsilaterales valorada 7 días después de la axotomía La dosis máximamente efectiva (50 µg) daba lugar a un 40% más de neuronas motoras inmunorreactivas a ChAT en comparación con el control no tratado axotomizado (Fig 21B y Tabla 5) Había una dependencia de la dosis en forma de

114
///

campana tanto con la dosis inferior como con la superior, dando lugar a una mayor supervivencia que en el control no tratado, pero menor que la conseguida a 50 μ g. Como era cierto con el modelo SNB, no hubo pérdida de peso asociada, mortalidad o daños tisulares macroscópicos en estos animales a ninguna de las dosis estudiadas

En tres modelos independientes de degeneración de motoneuronas *in vivo*, el Compuesto III-3 demostró actividad neuroprotectora en la PCD regulada por el desarrollo de las motoneuronas de la médula espinal lumbar en embriones (Fig. 19), en la muerte sensible a andrógenos de las motoneuronas SNB postnatales (Fig. 20) y en la pérdida inducida por axotomía de un marcador funcional, la ChAT, en neuronas motoras hipoglósicas de adultos (Fig. 21 y Tabla 5). El Compuesto III-3 era eficaz cuando se administraba periféricamente por inyección SC, cuando se aplicaba localmente al extremo del corte de un nervio o cuando se depositaba directamente sobre la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. Contrariamente a la molécula parental K-252a, el Compuesto III-3 era aproximadamente cinco veces más potente en la mediación de la supervivencia en cultivos enriquecidos en motoneuronas (datos no mostrados) y no exhibía actividad inhibitoria frente a la tirosina kinasa trkA y varias serina treonina kinasas (Maroney y col., antes citada, Kaneko y col., *J Med Chem*, 1997, 49, 1863-1869, aquí incorporada como referencia en su totalidad).

11/2

Tabla 5
Efecto del Compuesto III-3 sobre la inmunorreactividad a la colina acetiltransferasa en motoneuronas hipoglósicas axotomizadas

5

| Tratamiento | n | Motoneuronas positivas a ChAT | | |
|------------------------|---|-------------------------------|--------|-------------|
| | | Experimental/control | % | Media/Grupo |
| Vehículo | 2 | 20/544 | 3,68 | 4,01 |
| | | 19/437 | 4,35 | |
| 3,6 µg III-3 | 2 | 55/420 | 13,10 | 12,84* |
| | | 72/572 | 12,59 | |
| 25 µg III-3 | 2 | 95/597 | 15,91 | 19,01* |
| | | 142/642 | 22,12 | |
| 30 µg III-3 | 2 | 188/484 | 38,84 | 41,34* |
| | | 278/637 | 43,85 | |
| 100 µg III-3 | 4 | 465/920 | 50,54 | 32,61* |
| | | 235/784 | 29,98 | |
| | | 178/770 | 23,12 | |
| | | 182/679 | 26,80 | |
| 20 µg III-3 | 2 | 99/461 | 21,48 | 24,96* |
| | | 159/559 | 28,44 | |
| simulacro de operación | 2 | 350/335 | 104,48 | 101,24 |
| | | 292/298 | 98,00 | |

Se añadió el Compuesto III-3 o el vehículo en espuma de gel al extremo proximal del nervio hipogloso inmediatamente después de su transección. Al cabo de 7 días, se sacrificó a los animales y se les seccionó seriamente a través del núcleo hipogloso y se inmunotizó cada quinta sección con anticuerpos anti-ChAT. Se hicieron los recuentos de neuronas positivas a ChAT en los lados ipsilateral (experimental) y contralateral (control) del núcleo.

* $p < 0,05$, estadísticamente significativo en

comparación con los animales tratados con el vehículo control

Un inhibidor de la ruta MLK-3 demuestra eficacia in vivo y bloquea los fenómenos de fosforilación aguas debajo de

5 *MLK-3 en el modelo MPTP*

Se administró MPTP a una dosis (40 mg/kg) que produce pérdida de los terminales dopaminérgicos del estriado y los cuerpos celulares en la sustancia nigra se usó tirosina hidroxilasa como marcador para los terminales de los nervios dopaminérgicos en la sustancia nigra El Compuesto III-3 administrado sistémicamente atenuaba la pérdida de neuronas inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra después de la lesión en MPTP (Fig 22A, Saporito y col , 1999) Como el Compuesto 15 III-3 es un conocido inhibidor de MLK-3, se midió la activación de un sustrato aguas debajo de MLK-3 en ratones tratados con MPTP Se midieron los niveles de MKK4 fosforilada usando un anticuerpo específico de fosfo-MKK4 (New England Biolabs, Beverly, MA) que reconoce la forma monofosforilada de MKK4 por inmunotransferencia (Fig. 22B) o por ELISA (Fig. 22C) La administración de MPTP elevaba los niveles de MKK4 fosforilada en la sustancia nigra en hasta 5 veces por encima de los niveles control (Fig 22B) Se producían picos de elevaciones a las 4 h de la 25 administración de MPTP y coincidían con los niveles pico en el SNC de MPP⁺ La fosforilación de MKK4 mediada por MPTP era atenuada por pretratamiento con 1-deprenilo, lo que indica que estos sucesos de fosforilación estaban mediados por MPP⁺ (Fig. 22C) Más aún, la fosforilación de 30 MKK4 era parcialmente inhibida por pretratamiento con el Compuesto III-3 a una dosis (1 mg/kg) que produce protección frente a la pérdida dopaminérgica nigroestriada inducida por MPTP (Fig 22C) Estos datos demuestran que MPTP (MPP⁺) activa MKK4, un sustrato aguas debajo de 35 MLK-3 Más aún, estos datos demuestran que un conocido

inhibidor de MLK-3 inhibe la activación de esta ruta de kinasa *in vivo*.

Ejemplo 37 Inflamación

Inducción de IL-1 y TNF- α por LPS en células THP-1 y efecto de los indolocarbazoles y de los pirrolocarbazoles sobre su inducción

Se eligieron células del sistema inmune, ya que muchas kinasas están implicadas en la regulación de numerosas funciones inmunológicas, por ejemplo la inducción de la síntesis de citokinas y la inducción de una respuesta biológica de las citokinas. Una publicación reciente (Hambleton y col, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 2774-2778, aquí incorporada como referencia en su totalidad) mostraba que el tratamiento de líneas celulares derivadas de monocitos con LPS causaba una rápida activación de la actividad JNK. Cuando los monocitos entran en contacto con endotoxinas bacterianas, tales como el lipopolisacárido (LPS), producen las citokinas inflamatorias, IL-1 y TNF- α . La inhibición de la producción de estas dos citokinas puede ser un tratamiento útil de ciertos trastornos inflamatorios del sistema inmune. Estas citokinas pueden ser fácilmente medidas por kits comerciales de ELISA. Diseñamos experimentos para determinar (1) si los indolocarbazoles y los pirrolocarbazoles fusionados pueden inhibir la síntesis de IL-1 y TNF- α en nuestra línea de células monocíticas THP-1, (2) si JNK se activa por LPS en células THP-1 y (3) si la activación de JNK por LPS puede resultar inhibida por indolocarbazoles y pirrolocarbazoles fusionados.

Procedimientos experimentales

Se hicieron crecer células THP-1 en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. Se compró el LPS (E coli serotipo 0111 B4, extraído con TCA) a sigma y se disolvió en PBS. Se compraron los kits ELISA para determinar IL-1 y TNF- α a Boehringer-Mannheim.

y se realizaron los ensayos en medio de cultivo de THP-1 según las directrices del fabricante. Se obtuvieron curvas estándar según las directrices con cada ensayo.

Se llevaron a cabo los experimentos en placas de cultivo de 12 pocillos con 1 ó 2 ml de células THP-1 a 4×10^5 células/ml. Se indujeron IL-1 y TNF- α mediante la adición de LPS al medio de cultivo y se recogió el medio a varios tiempos después para el ensayo de citokinas. Se retiraron las células por centrifugación y se congelaron los sobrenadantes a -70°C hasta su estudio. Para minimizar los costes, se realizaron los experimentos en cultivos por duplicados y se reunieron los sobrenadantes duplicados tras la centrifugación. Cada sobrenadante junto fue estudiado por duplicado. Se diluyeron soluciones stock de indolocarbazoles y pirrolocarbazoles fusionados en 100% de DMSO hasta las concentraciones deseadas en medio que contenía un 10% de suero bovino fetal o en medio que contenía 0,5 mg/ml de BSA. A menos que se indique otra cosa, los compuestos fueron añadidos a las células THP-1 1 h antes de la adición del LPS.

Se realizaron los ensayos para la actividad JNK después de inmunoprecipitar la proteína JNK de un extracto de células THP-1 lisadas. La pella de células THP-1 fue lisada sobre hielo durante 15 min en 500 μl de tampón Frac (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, pirofosfato de sodio 30 μM , 1 mg/ml BSA, 1% de Tritón-X-100). Se centrifugó el extracto durante 10 min a 14K y se añadieron 5 μl de anticuerpo JNK (Santa Cruz) al sobrenadante. Se rotó el extracto durante 60 min. a 4°C , se añadieron 75 μl de proteína A Sepharose (20% p/v en Frac) lavada y se rotó el extracto durante otros 30 min para unir el complejo de anticuerpo a la proteína A Sepharose. Se lavó dos veces la proteína A Sepharose con tampón Frac y una vez con Hepes 20 mM, pH 7,6, MgCl_2 20 mM, DTT 2 mM y se incubó luego durante 15 min a 30°C en 30 μl de tampón de

kinasa (Hepes 20 mM, MgCl_2 20 mM, DTT 2 mM, 1 μg de c-jun recombinante y ATP- γ - ^{32}P 2 μM , 2 μCi . Se finalizó la reacción por adición de 10 μl de tampón de carga de gel SDS 4x, se calentó durante 3 min a 80°C y se analizaron las proteínas en un gel de SDS al 10%. Se secó el gel, se expuso a una placa de Phosphorimager y se analizaron las bandas radiactivas en un Phosphorimager

Los resultados de los experimentos iniciales indicaron que el LPS a 2 $\mu\text{g/ml}$ daba el rendimiento máximo de IL-1 y se usó esta concentración de LPS en todos los experimentos a partir de ahí. Se determinó el tiempo máximo tras la adición de LPS para obtener el rendimiento máximo de las citokinas tomando alícuotas de medio para ensayo a diversos tiempos tras la adición de LPS. El primer experimento indicó que tanto IL-1 como TNF- α alcanzaban un máximo rendimiento a menos de 5 h después de la adición de LPS. Como el tiempo de recogida más temprano fue de 2,4 h en el primer experimento, se realizó un segundo experimento comenzando las recogidas de medio a los 15 de la adición de LPS. Los resultados de este experimento, donde sólo se estudiaba el TNF- α , mostraron que alcanzaba un rendimiento máximo a las 3 h de la adición del LPS. No se halló TNF- α significativo en el medio hasta los 90 min. después de la adición de LPS

El rápido alcance del rendimiento máximo indicaba una muy estrecha regulación de la síntesis de las 2 citokinas -rápida síntesis y rápida regulación a menos. Se trataron cultivos de células durante 30 min antes de añadir LPS con Actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de ARN, o con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Se recogió medio 3 h después de la adición de LPS y se estudió el TNF- α . Se requiere la síntesis tanto de nuevo ARN como de nueva proteína para la inducción del TNF- α , ya que no se halló TNF- α en el medio de células tratadas con cualquiera de los inhibidores. Se

realizaron los siguientes experimentos para determinar si el Compuesto III-3 inhibiría la inducción de IL-1 y TNF- α . El Compuesto III-3 inhibía la inducción tanto de IL-1 como de TNF- α , con valores de CI_{50} de 267 nM y 139 nM, respectivamente. Los resultados de estos experimentos fueron obtenidos con células en medio que contenía un 10% de suero fetal bovino. Como los ensayos con tejido de médula espinal y tejido de cerebro anterior basal para la actividad neurotrófica de los compuestos son llevados a cabo en medio libre de suero (500 μ g/ml de BSA), era interesante determinar los valores de la CI_{50} para la inhibición de IL-1 y TNF- α en medio libre de suero. Cuando se trataron células THP-1 con Compuesto III-3 en medio libre de suero (500 μ g/ml de BSA), la CI_{50} se redujo 10 veces, desde 269 nM hasta 23 nM. A menos que se indique algo diferente, todos los experimentos realizados a continuación fueron realizados en medio libre de suero. La inhibición por el Compuesto III-3 de la inducción de IL-1 y TNF- α en células THP-1 sugiere que el Compuesto III-3 podría ser útil como agente terapéutico en el tratamiento de condiciones patológicas causadas por la producción de cantidades superiores a las normales de estas citokinas. El shock séptico es una de tales condiciones. El shock séptico está causado por el crecimiento de bacterias gram negativas en la circulación, que, a su vez, liberan grandes cantidades de la endotoxina, el LPS. El LPS estimula entonces primariamente a los monocitos y a los macrófagos para producir grandes cantidades de IL-1 y de TNF- α , que producen entonces una lesión tisular masiva y en muchos casos la muerte.

Se estudiaron varios compuestos en cuanto a su capacidad para inhibir el TNF- α y se compararon con la capacidad para inhibir la JNK. Los resultados son mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6

| | Células THP-1 | | MLK3 sobreexpresada
en células Cos7 |
|-----------|-----------------------------------|---------------------|--|
| Compuesto | TNF- α CI ₅₀ nM | JNK % Inh
500 nM | JNK % Inh
500 nM |
| III-1 | 49,5 | 93,5 | 83,8 |
| III-3 | 29 | 93 | 94 |
| I-2 | >5 000 | 78,5 | 85 |
| I-3 | 366 | 80,5 | 93,7 |
| I-4 | 75,5 | 79,5 | 95 |
| I-5 | 514 | 89 | 97,2 |
| I-6 | 817,5 | 77,5 | 57,8 |
| I-7 | 1 009 | 74 | 85,5 |
| III-4 | 462,5 | 81 | 66 |
| III-5 | 4 | 84,5 | 96 |
| III-7 | 590,5 | 11,5 | 54 |
| III-8 | 11,5 | 51 | 94 |
| III-10 | 4 298 | 48 | 59 |
| I-10 | 4 500 | 62 | 94 |
| I-11 | 686 | 51 | 92,5 |

5 **Efecto del Compuesto III-3 sobre la inducción de IL-2 en células Jurkat**

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si el compuesto III-3 inhibía la inducción de IL-2 en células Jurkat

Procedimientos experimentales

10 Se hicieron crecer células Jurkat en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal El TNF- α era de Promega y los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 eran de Pharmigen Se realizaron los experimentos Jurkat en 200 μ l en una placa de 96 pocillos. Se midió la
15 IL-2 con un kit de ELISA comprado a Boehringer-Mannheim. Se dejó que los anticuerpos para CD3 y CD28 se unieran al

plástico de la placa de 96 pocillos (18 h en PBS) antes de añadir las células Jurkat. Se trataron las células con los compuestos 1 h antes de añadirlas a la placa revestida de anticuerpos. Se usaron los anticuerpos para CD3 y CD28 para activar los receptores de las células T e inducir la IL-2. Se liberó IL-2 de las células Jurkat entre 6 h y 24 h después de la iniciación de la inducción (Fig 23A). No se produjo IL-2 constitutivamente (Fig 23A CNT). Se determinó a continuación el efecto del Compuesto III-3 (1 h de tratamiento con Compuesto III-3 antes de la inducción) sobre la inducción de IL-2 (Fig 23B). Una concentración de Compuesto III-3 de 500 nM inhibía la inducción de IL-2 en más del 80% (Fig 23B). Se realizó un experimento de dosis-respuesta más extenso con el Compuesto III-3 y el Compuesto I-4, el cual dio valores de CI_{50} de 139 nM para el Compuesto III-3 y de 207 nM para el Compuesto I-4 (Fig 23C).

Se pretende que cada una de las patentes, solicitudes y publicaciones impresas citadas en este documento de patente queden aquí incorporadas a modo de referencia en su totalidad.

Como los expertos en la técnica apreciarán, se pueden hacer numerosos cambios y modificaciones en las realizaciones preferidas de la invención sin desviarse del espíritu de la invención. Se pretende que todas esas variaciones queden dentro del alcance de la invención.

125
120

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un compuesto útil en el tratamiento de la neuropatía periférica del SIDA, consistente en poner en contacto una célula o ex-
5 tracto celular que contiene una proteína kinasa de linaje múltiple con un compuesto y determinar si dicho compuesto reduce la actividad de dicha proteína kinasa de linaje múltiple

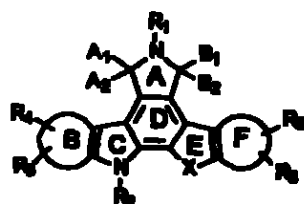
2 El método de la reivindicación 1, donde
10 dicha proteína kinasa de linaje múltiple es seleccionada entre el grupo consistente en kinasa 1 de linaje múltiple, kinasa 2 de linaje múltiple, kinasa 3 de linaje múltiple, kinasa portadora de cremallera de leucina, kinasa portadora de doble cremallera de leucina y kinasa 6 de
15 linaje múltiple

3 El método de la reivindicación 2, donde dicha actividad proteica es determinada midiendo la actividad o el estado de fosforilación de un sustrato de dicha proteína, donde dicho sustrato es seleccionado entre
20 el grupo consistente en JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1) MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1 y el homólogo en mamíferos de AEX-3.

4 El método de la reivindicación 2, donde
25 dicha actividad proteica es determinada midiendo la actividad de un sustrato de dicha proteína, la cantidad de un sustrato de dicha proteína o el ARNm codificante de dicho sustrato de dicha proteína

5 Un método de tratamiento de la neuropatía
30 periférica del SIDA, consistente en administrar a un humano un compuesto que inhibe una proteína kinasa de linaje múltiple en una sal o diluyente farmacéuticamente aceptable

6 El método de la reivindicación 5, donde
35 dicho compuesto tiene la fórmula



donde

- 5 B y anillo F, de manera independiente y cada uno junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman
- 10 un anillo aromático carbocíclico de 6 miembros insaturado en el que uno a tres átomos de carbono pueden estar substituidos por átomo(s) de nitrógeno, o
- un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, en donde
- 15 o bien un átomo de carbono está substituido con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre,
- o bien dos átomos de carbono están substituidos con un átomo de azufre y uno de nitrógeno o un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno,
- 20 A¹ y A² representan juntos O y B¹ y B² representan juntos O,
- R¹ es H, alquilo de 1 a 4 carbonos (inclusive), arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo, C(=O)R⁹, donde R⁹ es alquilo
- 25 d3 1-4 carbonos (inclusive) o arilo, preferiblemente fenilo o naftilo, -OR¹⁰, donde R¹⁰ es H o alquilo de 1 a 4 carbonos (inclusive), -CO-NH₂, -NR⁷R⁸, -(CH₂)_nNR⁷R⁸, donde n es de 1 a 4 (inclusive), o -O(CH₂)_nNR⁷R⁸, y donde
- 30 o bien R⁷ y R⁷ son cada uno independientemente H o alquilo de 1 a 4 car-

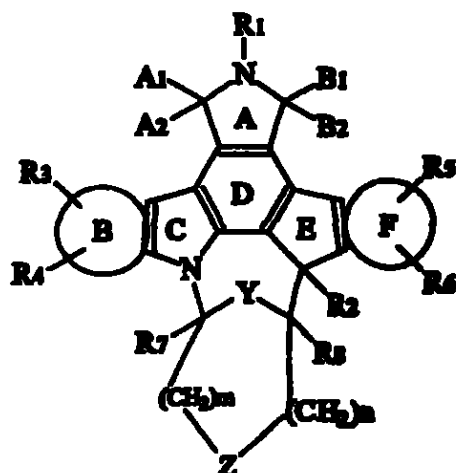
- bonos (inclusive),
o bien R^7 y R^8 se combinan entre sí
para formar un grupo de unión de fórmula
general $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, donde
5 X^1 es O, S o CH_2 ,
 R_2 es H, $-SO_2R_3$, $-CO_2R_3$, $-COR_3$, alquilo de 1 a
8 carbonos (inclusive), alqueno de 1-8 car-
bonos (inclusive), preferiblemente un alque-
nilo de 1-4 carbonos (inclusive), o alquino
10 de 1-8 carbonos (inclusive), preferiblemente
un alquino de 1-4 carbonos (inclusive), o
un monosacárido de 5-7 carbonos (inclusive)
donde cada grupo hidroxilo del monosacárido
está independientemente sin substituir o
15 substituido por H, alquilo de 1-4 carbonos
(inclusive), alquilcarboniloxi de 2-5 carbo-
nos (inclusive) o alcoxi de 1-4 carbonos (in-
clusive), y
o bien cada alquilo de 1-8 carbonos (in-
20 clusive), alqueno de 1-8 carbonos (inclusi-
ve) o alquino de 1-8 carbonos (inclusive)
está sin substituir,
o bien cada alquilo de 1-8 carbonos (in-
25 clusive), alqueno de 1-8 carbonos (inclusi-
ve) o alquino de 1-8 carbonos (inclusive)
está independientemente substituido por 1-3
arilos de 6-10 carbonos (inclusive), preferi-
blemente fenilo o naftilo, heteroarilo, F,
Cl, Br, I, $-CN$, $-NO_2$, OH, $-OR^9$, $-O(CH_2)_nNR^7R^8$,
30 $-OCOR^9$, $-OCONHR^9$, O-tetrahidropirano, NH_2 ,
 $-NR^7R^8$, $-NR^{10}COR^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}CONR^7R^8$,
 $-NHC-(=NH)NH_2$, $-NR^{10}SO_2R^9$, $-S(O)_yR^{11}$, donde R^{11}
es H o alquilo de 1-4 carbonos, arilo de 6-10
carbonos, preferiblemente fenilo o naftilo, o
35 heteroarilo e y es 1 ó 2, $-SR^{11}$, $-CO_2R^9$, $-CON-$

- 5 R^7R^8 , $-CHO$, COR^9 , $-CH_2OR^7$, $-CH=NNR^{11}R^{12}$,
 $-CH=NOR^{11}$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-SO_2N-$
 $R^{12}R^{13}$, $PO(OR^{11})_2$ o OR^{14} , donde R^{14} es el resi-
duo de un aminoácido después de eliminar el
grupo hidroxilo del grupo carboxilo, y o bien
 R^{12} y R^{13} son independientemente H, alqui-
lo de 1-4 carbonos (inclusive), arilo de 6-10
carbonos, preferiblemente fenilo o naftilo, o
heteroarilo, o bien
- 10 R^{12} y R^{13} se combinan entre sí para formar
un grupo de unión, preferiblemente $-(CH_2)_2-X_1-$
 $(CH_2)_2$,
cada uno de R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son independiente-
mente H, arilo, preferiblemente un arilo de
- 15 6-10 carbonos (inclusive), más preferiblemen-
te fenilo o naftilo, heteroarilo, F, Cl, Br,
I, $-CN$, CF_3 , $-NO_2$, OH, $-OR_9$, $-O(CH_2)_nNR_7R_8$,
 $-OCOR^9$, $-OCONHR^9$, NH_2 , $-CH_2OH$, $-CH_2OR^{14}$, $-NR^7R^8$,
 $-NR^{10}COR^9$, $-NR^{10}CONR^7R^8$, $-SR^{11}$, $-S(O)_yR^{11}$, donde
- 20 y es 1 ó 2, $-CO_2R^9$, $-COR^9$, $-CONR^7R^8$, $-CHO$,
 $-CH=NOR^{11}$, $-CH=NR^9$, $-CH=NNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_nSR^9$,
donde n es un número entero de 1-4 (inclusi-
ve), $-(CH_2)_nS(O)_yR^9$, $-CH_2SR^{15}$, donde R^{15} es al-
- 25 quilo de 1-4 carbonos (inclusive), $-CH_2S-$
 $(O)_yR^{14}$, $-(CH_2)_nNHR^{14}$, alquilo de 1-8 carbonos
(inclusive), preferiblemente alquilo de 1-4
carbonos (inclusive), alquenilo de 1-8 carbo-
- 30 nos (inclusive), preferiblemente alquenilo de
1-4 carbonos (inclusive), alquinilo de 1-8
carbonos (inclusive), preferiblemente alqui-
- 35 nilo de 1-4 carbonos (inclusive), y o bien
cada alquilo de 1-8 carbonos (inclusive),
alquenilo de 1-8 carbonos (inclusive) o al-
quinilo de 1-8 carbonos (inclusive) está sin
substituir,

- o bien cada alquilo de 1-8 carbonos (inclusive), alqueno de 1-8 carbonos (inclusive) o alquino de 1-8 carbonos (inclusive) está independientemente substituido como se ha descrito antes en d)2),
- 5 X es o bien
- un alqueno no substituido de 1-3 carbonos (inclusive), o bien
- 10 X es un alqueno de 1-3 carbonos (inclusive) substituido por un grupo R^2 , preferiblemente OR^{10} , $-SR^{10}$, R^{15} , donde R^{15} es un alquilo de 1-4 carbonos (inclusive), fenilo, naftilo, arilalquilo de 7-14 carbonos (inclusive), preferiblemente bencilo, o
- 15 bien
- X es $-CH=CH-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(=O)-$, $-S(=O)_2-$, $-C(R^{10})_2-$, $-C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})-$, $-C(OR^{11})(R^{11})-$, $-C(=O)CHR^{15}-$, $-CH-R^{15}C(=O)-$, $-C(=NOR^{11})CHR^{15}-$, $CHR^{15}C(=NOR^{11})-$, $-CH_2Z-$, $-Z-CH_2-$, $-CH_2ZCH_2-$, donde Z es $C(OR^{11})(R^{11})$, O, S, $C(=O)$, $C(=NOR^{11})$ o NR^{11} ,
- 20 o
- A^1 y A^2 juntos son cada uno independientemente H, H, H, $-OR^{11}$, H, $-SR^{11}$, H, $-N(R^{11})_2$, o
- 25 juntos representan =S o $=NR^{11}$, B^1 y B^2 representan juntos O, y cada R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y X son como se ha definido antes,
- o
- A^1 y A^2 juntos representan O y B^1 y B^2 juntos
- 30 son cada uno independientemente H, H, H, $-OR^{11}$, H, $-SR^{11}$, H, $-N(R^{11})_2$, o juntos representan =S o $=NR^{11}$, y cada R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y X son como se ha definido antes
- 7 El método de la reivindicación 6, donde
- 35 A_1 , A_2 , R_1 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 son H, B_1 y B_2 juntos represen-

tan O, R_2 es $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, y X es CH_2 .

8 El método de la reivindicación 5, donde dicho compuesto tiene la fórmula



5

donde

el anillo B y el anillo F, de manera independiente y cada uno junto con los átomos de carbono a los que están unidos, son seleccionados entre el grupo consistente en

10

a) un anillo aromático carbocíclico de 6 miembros insaturado en el que 1 a 3 átomos de carbono pueden estar substituidos por átomos de nitrógeno,

15

b) un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, y

c) un anillo aromático carbocíclico de 5 miembros insaturado, en donde

20

1) o bien un átomo de carbono está substituido con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre,

2) o bien dos átomos de carbono están substituidos con un átomo de azufre y uno de nitrógeno, un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno o dos átomos de

25

nitrógeno,

3) o bien tres átomos de carbono están substituidos con tres átomos de nitrógeno,

5 R^1 es seleccionado entre el grupo consistente en

10 a) H, alquilo substituido o no substituido de 1 a 4 carbonos, arilo substituido o no substituido, arilalquilo substituido o no substituido, heteroarilo substituido o no substituido o heteroarilalquilo substituido o no substituido,

15 b) $-C(=O)R^9$, donde R^9 es seleccionado entre el grupo consistente en alquilo, arilo y heteroarilo,

c) $-OR^{10}$, donde R^{10} es seleccionado entre el grupo consistente en H y alquilo de 1 a 4 carbonos,

20 d) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pO-R^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ y $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, donde p es de 1 a 4 y donde

25 1) o bien R^{11} y R^{12} son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en H y alquilo de 1 a 4 carbonos,

2) o bien R^{11} y R^{12} forman juntos un grupo de unión de fórmula $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, donde X^1 es escogido entre el grupo consistente en $-O-$, $-S-$ y $-CH_2-$

30 ,
 R^2 es escogido entre el grupo consistente en H, alquilo de 1 a 4 carbonos, $-OH$, alcoxi de 1 a 4 carbonos, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, arilalquilo substituido o no substituido de 6 a 10 carbonos y

35

heteroarilalquilo substituido o no substituido,

R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en

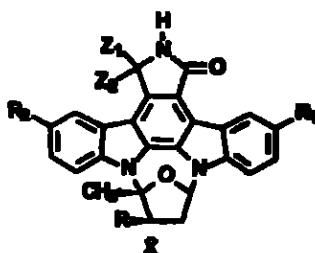
- 5 a) H, arilo, heteroarilo, F, Cl, Br, I, -CN, CF_3 , $-NO_2$, -OH, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$,
- 10 b) $-CH_2OR^{14}$, donde R^{14} es el residuo de un aminoácido después de eliminar el grupo hidroxilo del grupo carboxilo,
- 15 c) $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)-NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$ o $-CH=NNR^2R^{2A}$, donde R^{2A} es igual a R^2 ,
- 20 d) $-S(O)_yR^2-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$, donde y es 0, 1 ó 2,
- 25 e) alquilo de 1 a 8 carbonos, alquenilo de 2 a 8 carbonos y alquinilo de 2 a 8 carbonos, donde
 - 1) cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está sin substituir o
 - 2) cada grupo alquilo, alquenilo o alquinilo está substituido con 1 a 3 grupos seleccionados entre el grupo consistente en arilo de 6 a 10 carbonos, heteroarilo, arilalcoxi, heterocicloalcoxi, hidroxialcoxi, alquiloalcoxi, hidroxialquiltio, alcoxiarquiltio, F, Cl, Br, I, -CN, -
30 NO_2 ,
 $-OH$, $-OR^9$, $-X^2(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-X^2-$
35

- 5 $(CH_2)_pCO_2R^9$, $-X^2(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-X^2(CH_2)_p-$
 $NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OCONHR^2$,
 $-O$ -tetrahidropiraniilo, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}-$
 $C(=O)R^9$, $-NR^{10}CO_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$,
 $-NHC(=NH)NH_2$, $NR^{10}S(O)_2R^9$, $-S(O)_yR^9$,
 $-CO_2R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-C(=O)R^2$, $-CH_2-$
 OR^{10} , $-CH=NNR^2R^{2A}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$,
 $-CH=NNHCH(N=NH)NH_2$, $-S(=O)_2NR^2R^{2A}$, $-P-$
 $(=O)(OR^{10})_2$, $-OR^{14}$ y un monosacárido de
10 5 a 7 átomos de carbono, donde cada
grupo hidroxilo del monosacárido está
independientemente o bien sin substi-
tuir, o bien substituido por H, al-
quilo de 1 a 4 carbonos, alquilcarbo-
15 niloxi de 2 a 5 carbonos o alcoxi de
1 a 4 carbonos,
 X^2 es O, S o NR^{10} ,
 R^7 y R^8 son cada uno independientemente se-
leccionados entre el grupo consistente en H,
20 alquilo de 1 a 4 carbonos, alcoxi de 1 a 4
carbonos, arilalquilo substituido o no subs-
tituido de 6 a 10 carbonos, heteroarilalquilo
substituido o no substituido, $-(CH_2)_pOR^{10}$,
 $-(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$ y $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, o R^7 y R^8
25 forman juntos o un grupo de unión de fórmula
 $-CH_2-X^3-CH_2-$, donde X^3 es X^2 o un enlace,
m y n son cada uno independientemente 0, 1 ó
2,
Y es seleccionado entre el grupo consistente
30 en $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O^-)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$
y $-CH_2-$,
Z es seleccionado entre el grupo consistente
en un enlace, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$,
 $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$,
35 $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_yR^9)-$, $-N-$

5 (S(O)_yNR¹¹R¹²)-, -N(C(=O)R¹⁷)-, -C(R¹⁵R¹⁶)-, -N⁺(O⁻)(R¹⁰)-, -CH(OH)-CH(OH)- y -CH(O(C=O)R⁹)CH-(OC(=O)R^{9A})-, donde R^{9A} es igual que R⁹,
R¹⁵ y R¹⁶ son independientemente seleccionados
entre el grupo consistente en H, -OH, -C(=O)R¹⁰, -O(C=O)R⁹, hidroxialquilo y -CO₂R¹⁰,
R¹⁷ es seleccionado entre el grupo consisten-
te en H, alquilo, arilo y heteroarilo,
A¹ y A² son seleccionados entre el grupo con-
sistente en H, H, H, OR², H, -SR², H, -N-
10 (R²)₂, y un grupo en el que A¹ y A² forman
juntos un resto seleccionado entre el grupo
consistente en =O, =S y NR²,
B¹ y B² son seleccionados entre el grupo con-
sistente en H, H, H, -OR², H, -SR², H, -N-
15 (R²)₂, y un grupo en el que B¹ y B² forman
juntos un resto seleccionado entre el grupo
consistente en =O, =S y NR²,

con la condición de que al menos uno de los pares A¹ y A²
20 o B¹ y B² formen =O

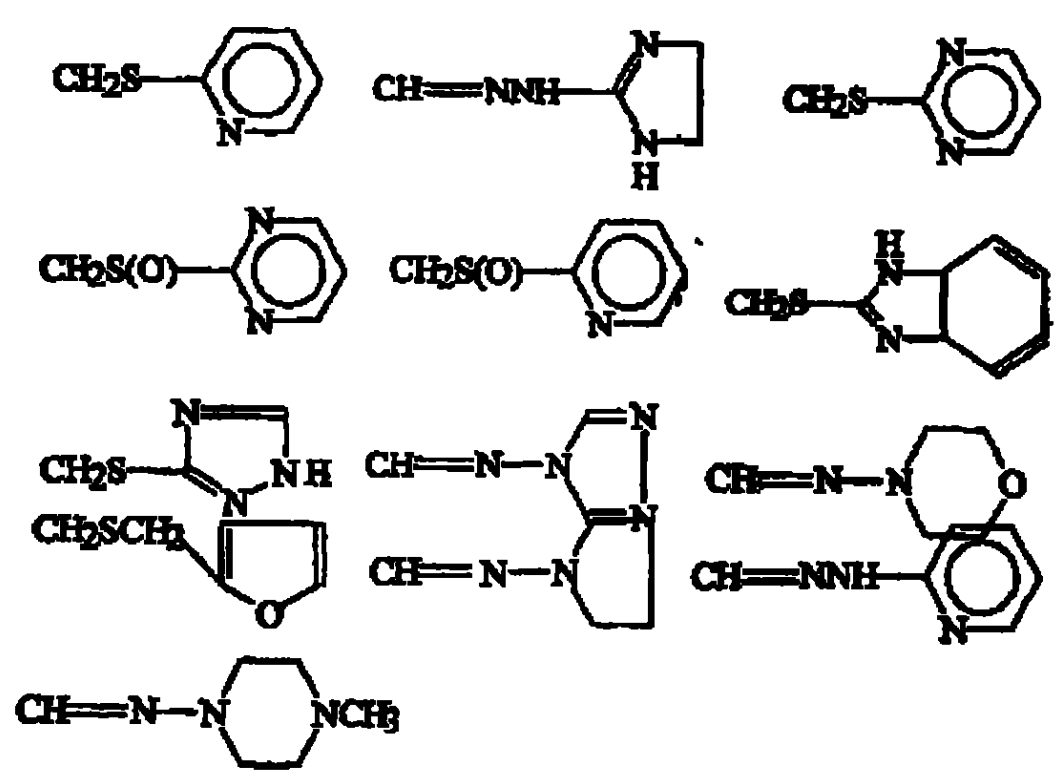
9 El método de la reivindicación 5, donde
dicho compuesto tiene la fórmula



25 donde

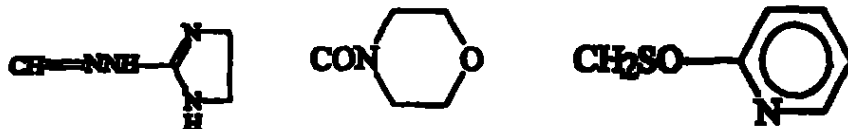
Z₁ es H y Z₂ es H o Z₁ y Z₂ forman juntos =O,
R₁ es seleccionado entre el grupo consistente
en H, Cl, CH₂SO₂C₂H₅, Br, CH₂S(CH₂)₂NH₂,
CH₂S(CH₂)₂N(CH₃)₂, CH₂S(CH₂)₂NH₂n-C₄H₉, NHCONH-
30 C₆H₅, NHCONHC₂H₅, CH₂SC₂H₅, CH₂SC₆H₅, N(CH₃)₂,

5 CH₃, CH₂OCONHC₂H₅, NHCO₂CH₃, CH₂OC₂H₅,
CH₂N(CH₃)₂, OH, O-n-propilo, CH=NNH-C(=NH)NH₂,
CH=N-N-(CH₃)₂, CH₂S(CH₂)₂NH-n-C₄H₉,
CH₂OCH₂OCH₂CH₃, CH₂S-[3-(1,2,4-triazina)],
CH₂CH₂SCH₃,



Y
10 R₂ es seleccionado entre el grupo consistente
en H, Br, Cl, I, CH₂S(CH₂)₂N(CH₃)₂,
NHCONHC₂H₅, CH₂SC₂H₅, CH₂OCH₂OCH₂CH₃, CH₂S[3-
(1,2,4-triazina)], CH₂CH₂SCH₃ y CH₂OH,
X es seleccionado entre el grupo consistente
15 en H, CH₂OH, CH₂NH-SerinaH, CO₂CH₃, CONHC₆H₅,
CH₂NHCO₂C₆H₅, CH₂NHCO₂CH₃, CH₂N₃, CONHC₂H₅,
CH₂NH-Glicina, CON(CH₃)₂, -CH₂NHCO₂-, CONH₂,
CONHC₃H₇, CH₂NH-Serina, CH₂SOCH₃, CH=NOH,
CH₂NH-Prolina, CH₂CH₂(2-piridilo),
CH=NNHC(=NH)NH₂, CONH-(CH₂)₂OH, CH=NNHCONH₂,
20 CH₂OCOCH₃, -CH₂OC(CH₃)₂O-, CH₂SC₆H₅, CH₂SOC₆H₅,

CO₂n-hexilo, CONHCH₃, CO₂(CH₂)₄CH₃,



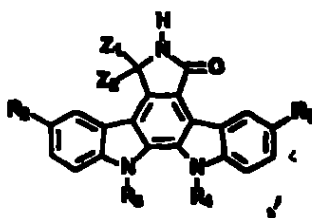
y

5 R es seleccionado entre el grupo consistente en OH y OCH₃

10 El método de la reivindicación 9, donde Z₁ y Z₂ son H, X es CO₂CH₃ y R es OH

11 El método de la reivindicación 9, donde
10 Z₁ y Z₂ son H, X es CO₂CH₃, R₁ y R₂ son CH₂SCH₂CH₃, y R es OH

12 El método de la reivindicación 5, donde dicho compuesto tiene la fórmula



15

donde

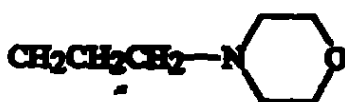
Z₁ es H y Z₂ es H o Z₁ y Z₂ forman juntos =O,

R₁ es H o Br,

R₂ es H,

20

R₃ es H, CH₂CH=CH₂, CH₂CH₂CH₂OH o



y

R₄ es H, CH₂CH=CH₂ o CH₂CH₂CH₂OH

25

**MÉTODOS PARA MODULAR PROTEÍNAS KINASA DE LINAJE MÚLTIPLE
Y PARA ESTUDIAR COMPUESTOS QUE MODULAN PROTEÍNAS KINASA
DE LINAJE MÚLTIPLE**

RESUMEN

5 Se presentan métodos para identificar com-
puestos que modulan la actividad de una proteína kinasa
de linaje múltiple y promueven la supervivencia celular o
la muerte celular, consistentes en las etapas de poner en
contacto la célula que contiene la proteína de linaje
10 múltiple con el compuesto, determinar si el compuesto re-
duce la actividad de la proteína de linaje múltiple y de-
terminar si el compuesto promueve la supervivencia celu-
lar Se presentan también métodos para identificar com-
puestos que pueden ser útiles en el tratamiento de tras-
15 tornos neurodegenerativos y/o de la inflamación. Se pre-
sentan también métodos para modular la actividad de una
proteína kinasa de linaje múltiple, consistentes en poner
en contacto la proteína o una célula que contiene la pro-
teína con un compuesto indeno o indolo de la invención
20 También se presentan métodos de tratamiento de trastornos
neurodegenerativos y/o de la inflamación

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Cephalon, Inc
Maroney, Anna
Walton, Kevin M
Dionne, Craig A
Neff, Nicola
Knight, Jr , Ernest
Glicksman, Marcie A

10 <120> Métodos para modular proteínas kinasa de linaje múltiple y
para estudiar compuestos que modulan las proteínas kinasa de
linaje múltiple

15 <130> CEPH2018

<150> 60/097 980
<151> 26-08-1998

20 <150> 09/376 894
<151> 18-08-1999

<150> 09/637 054
<151> 11-08-2000

25 <150> PCT/US01/24822
<151> 08-08-2001

30 <160> 18
<170> PatentIn versión 3 2

<210> 1
<211> 17
35 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

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

Thr

45 <210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

55 Ala Ser Ala Cys Arg Thr Cys
20

431
134

5 <210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 3

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

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

15 Ala

15 <210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 4

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

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

30 <210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 5

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

40 <210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <400> 6
gtggctgtgc gggcagctcg ccag
24

50 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 7
gagaccctgg atctcgcgct t
21

55 <210> 8

158
135

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

10 <210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 9
cggatccgtg acaccagtcg gaacctt
27

20 <210> 10
<211> 28
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10

25 ggaattcacc agtaagctcc agcacatc
28

<210> 11
<211> 33

30 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

35 ataattcgtg ctagcgccag agtctagccg gtg
33

<210> 12
<211> 39
<212> ADN

40 <213> Homo sapiens

<400> 12

ataagcttcc tcagtgcaag tggatcgcgc agcccctga
39

45 <210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50 <400> 13

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

55 <210> 14

138
136

<211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 14
ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa
60

10 acccgaaca
69

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens
<400> 15
gacagggcgg ccggctct
18

20 <210> 16
<211> 583
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 16
gaattcggca cgagaggact cgcagggtgc cggcgacgag ggctggtgga ccgggcagct
60

30 gaaccagcgg gtgggcatct tccccagcaa ctacgtgacc ccgcgcagcg ccttctccag
120

ccgctgccag cccggcggcg aggaccccag ttgctaccg ccatttcagt tgtagaaat
180

35 tgattttgcg gagctcacct tggaagagat tattggcatc gggggctttg ggaaggctca
240

40 tctgtctttc tggatagggg atgaggttgc tgtgaaagca gctcgccacg accctgatga
300

ggacatcagc cagaccatag agaatgttcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctgaa
360

45 gcaccccaac atcattgccc taagaggggt atgtctgaag gagccaacc tctgcttggt
420

catggagttt gctcgtggag gacctttgaa tagagtgtta totgggaaa ggattcccc
480

50 agacatcctg gtgaattggg ctgtgcagat tgccagaggg atgaactact tacatgatga
540

ggcaattggt cccatcatcc accgcgacct taagtccagc aac
583

55 <210> 17

+40
137

<211> 194
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 17

Asn Ser Ala Arg Glu Asp Ser Gln Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp Trp
1 5 10 15

10 Thr Gly Gln Leu Asn Gln Arg Val Gly Ile Phe Pro Ser Asn Tyr Val
20 25 30

Thr Pro Arg Ser Ala Phe Ser Ser Arg Cys Gln Pro Gly Gly Glu Asp
35 40 45

15 Pro Ser Cys Tyr Pro Pro Ile Gln Leu Leu Glu Ile Asp Phe Ala Glu
50 55 60

20 Leu Thr Leu Glu Glu Ile Ile Gly Ile Gly Gly Phe Gly Lys Val Tyr
65 70 75 80

Arg Ala Phe Trp Ile Gly Asp Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg His
85 90 95

25 Asp Pro Asp Glu Asp Ile Ser Gln Thr Ile Glu Asn Val Arg Gln Glu
100 105 110

Ala Lys Leu Phe Ala Met Leu Lys His Pro Asn Ile Ile Ala Leu Arg
115 120 125

30 Gly Val Cys Leu Lys Glu Pro Asn Leu Cys Leu Val Met Glu Phe Ala
130 135 140

35 Arg Gly Gly Pro Leu Asn Arg Val Leu Ser Gly Lys Arg Ile Pro Pro
145 150 155 160

Asp Ile Leu Val Asn Trp Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Asn Tyr
165 170 175

40 Leu His Asp Glu Ala Ile Val Pro Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser
180 185 190

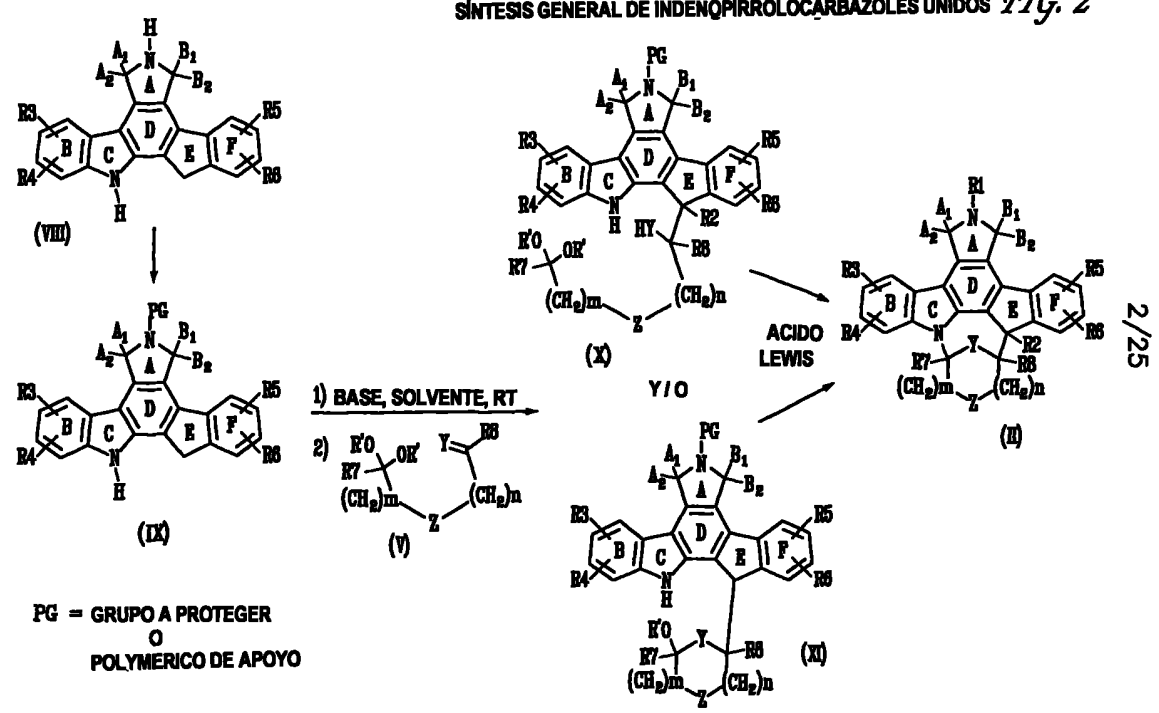
Ser Asn

<210> 18
45 <211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

50 Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Cys
1 5 10

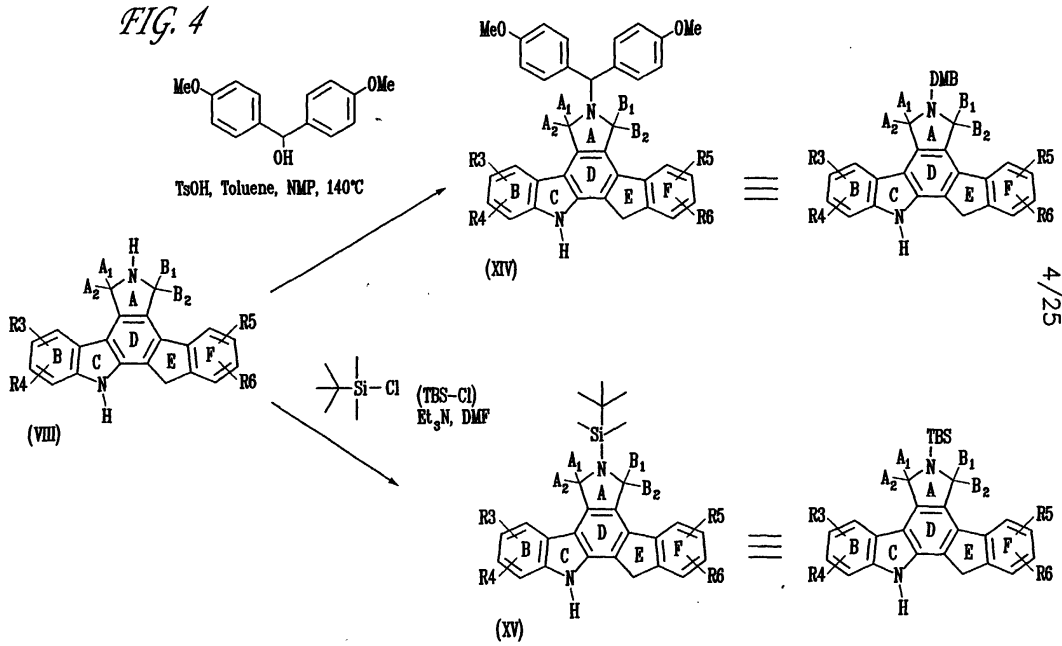
SÍNTESIS GENERAL DE INDENOPIRROLOCARBAZOLES UNIDOS *FIG. 2*



2/25

PREPARACIÓN DE PROTECCIÓN, INDENOPIRROLOCARBAZOLES SOLUBLE

FIG. 4



WO 02/14536

PCT/US01/24822

F2

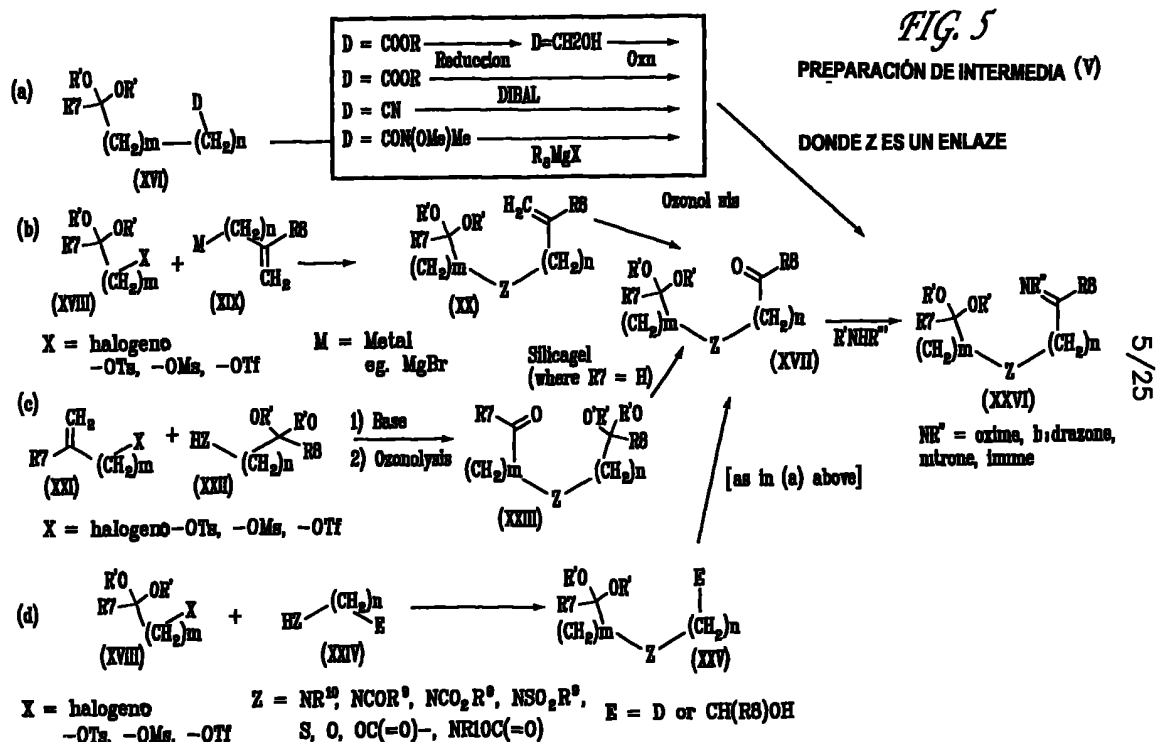
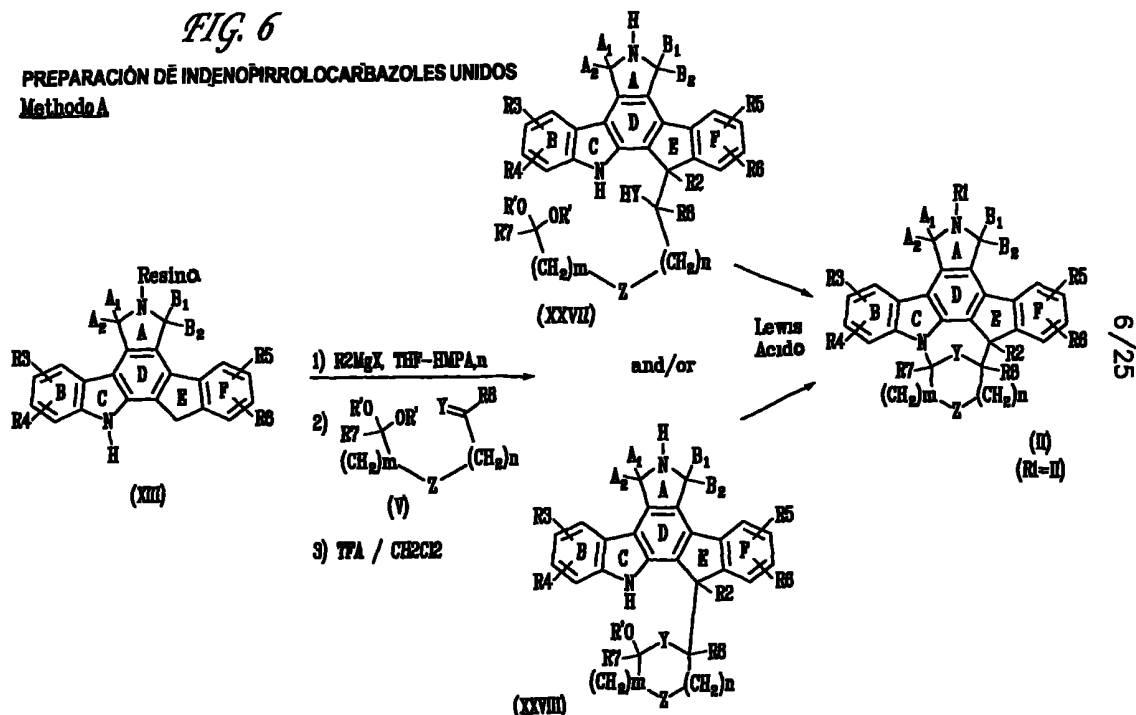


FIG. 6
PREPARACIÓN DE INDENOPIRROLOCARBAZOLES UNIDOS
Método A

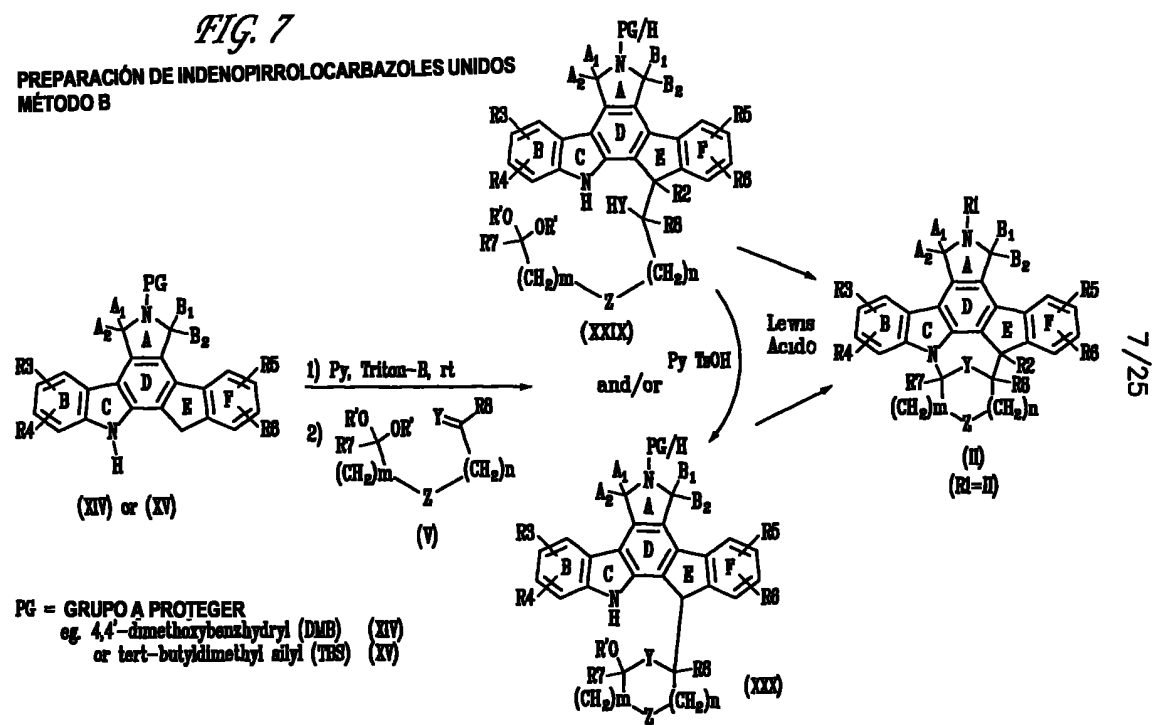


6/25

14

FIG. 7

PREPARACIÓN DE INDENOPIRROLOCARBAZOLES UNIDOS
MÉTODO B



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

7/25

Handwritten mark

8/25

FIG. 8

PREPARACIÓN DEL ANILLO B - INDENOPIRROLOCARBAZOLES
SUSTITUTOS UNIDOS

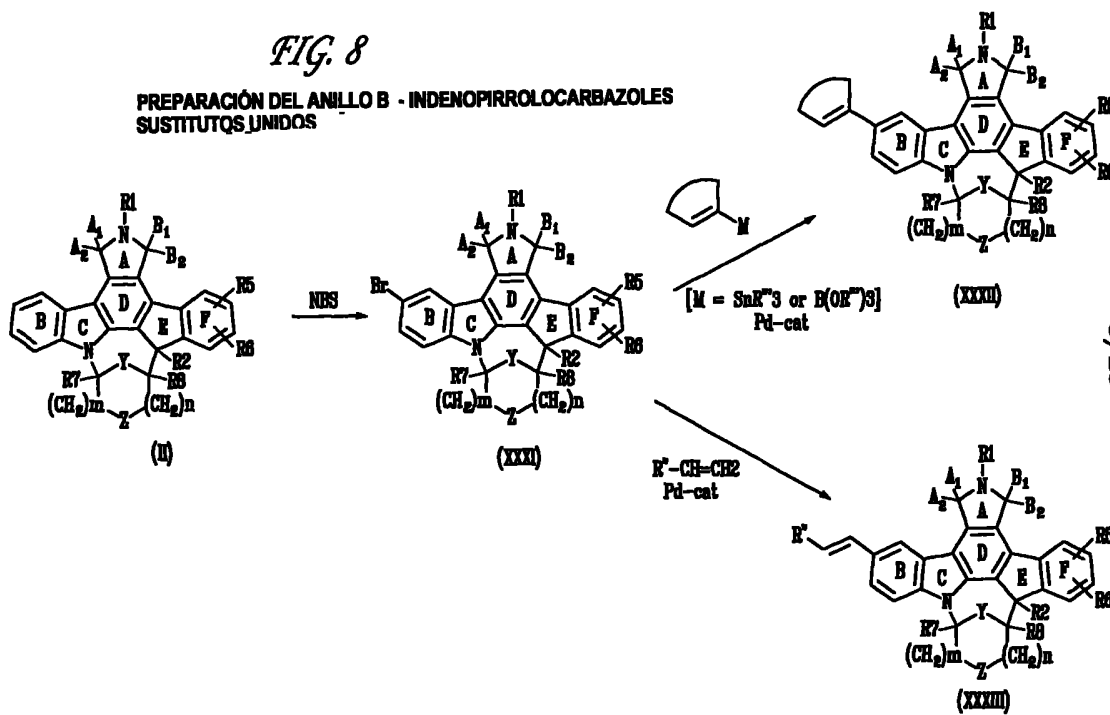


FIG. 9

DERIVATIZATION DEL ANILLO E DE INDENOPIRROLOCARBAZOLES UNIDOS



when

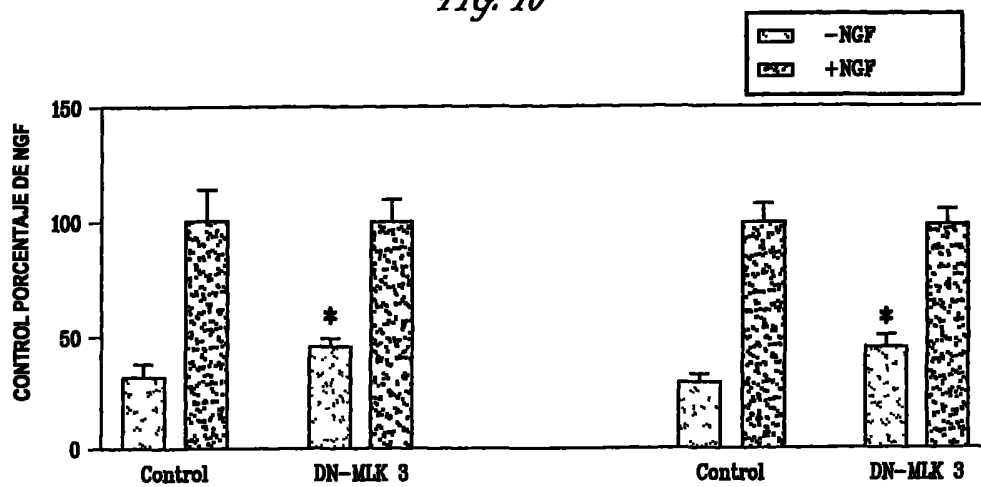
$$A_1 \text{ \& } A_2 = H_2, \quad B_1 \text{ \& } B_2 = 0$$

or

$$A_1 \text{ \& } A_2=0, \quad B_1 \text{ \& } B_2=H_2$$

10/25

FIG. 10



* ESTADÍSTICA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE EL CONTROL Y DN-MLK-3 EN LA AUSENCIA DE NGF (p<0.05 T-test 2-tail analysis)

11/25

199

FIG. 11A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

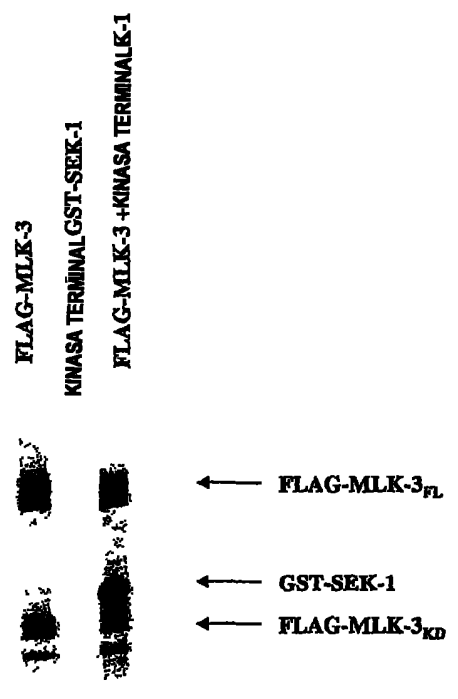
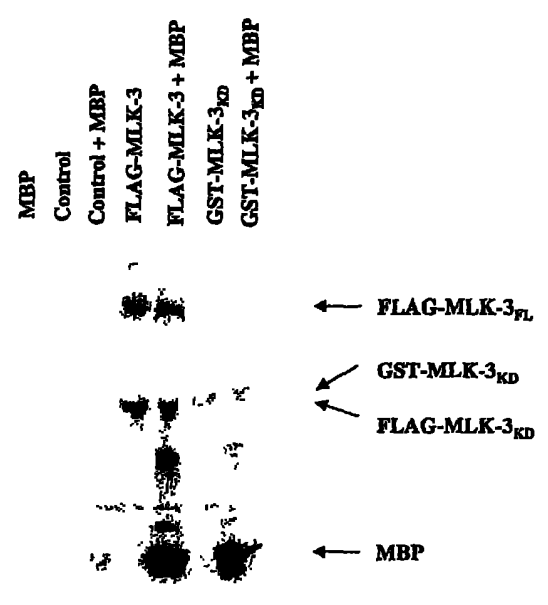


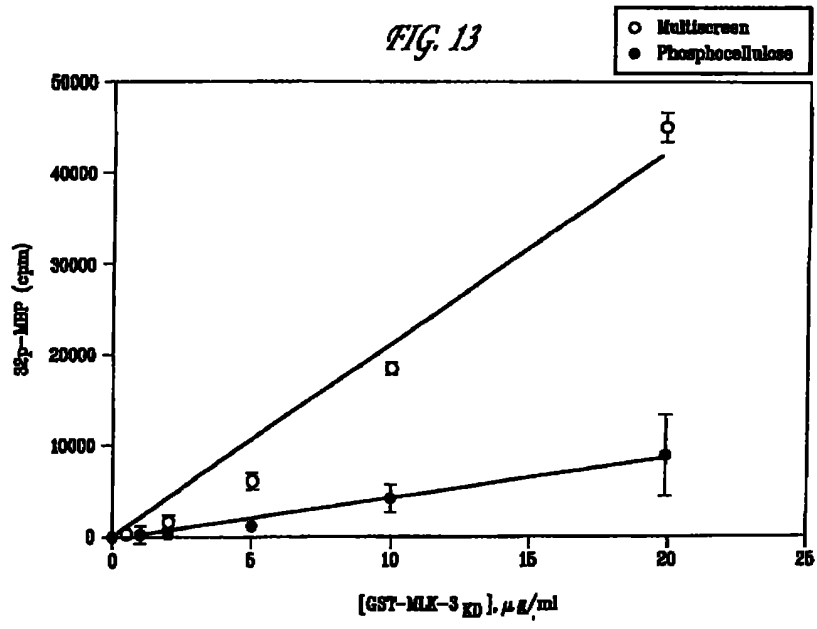
FIG. 11B



12/25

FIG. 12

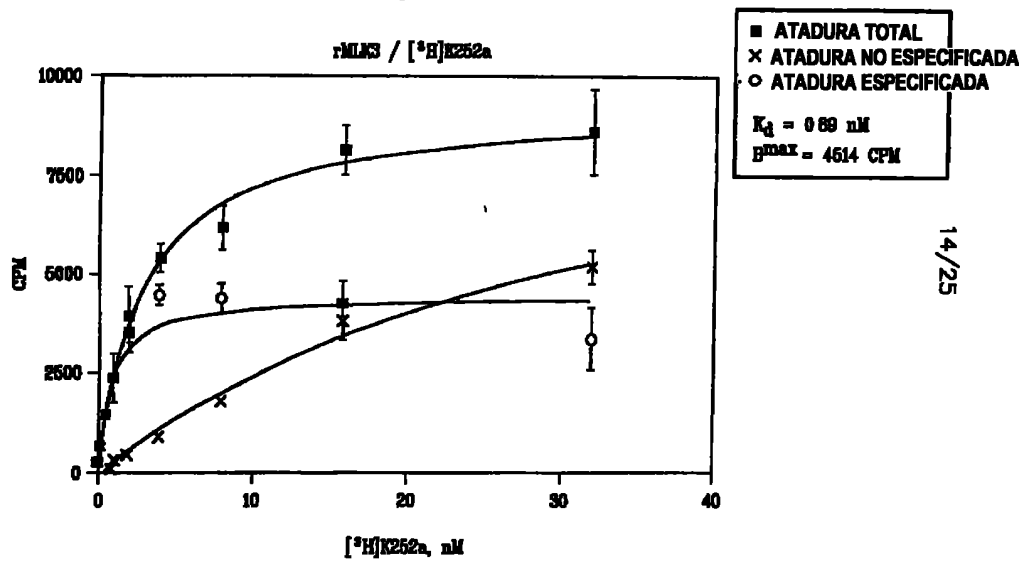




13/25

148

FIG. 14



15/25

FIG. 15A

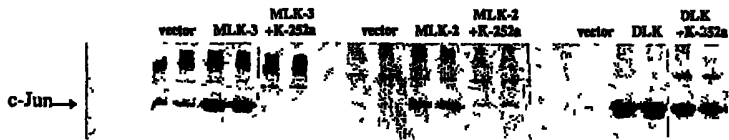
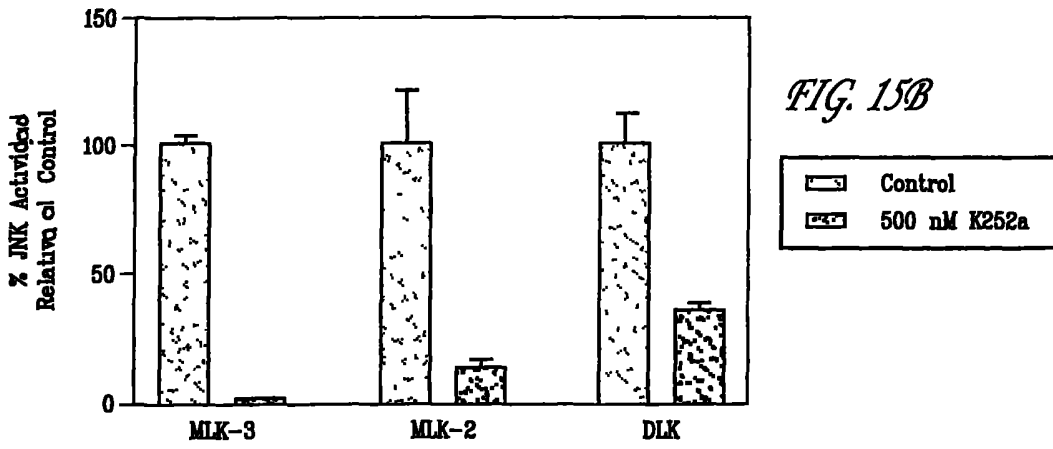
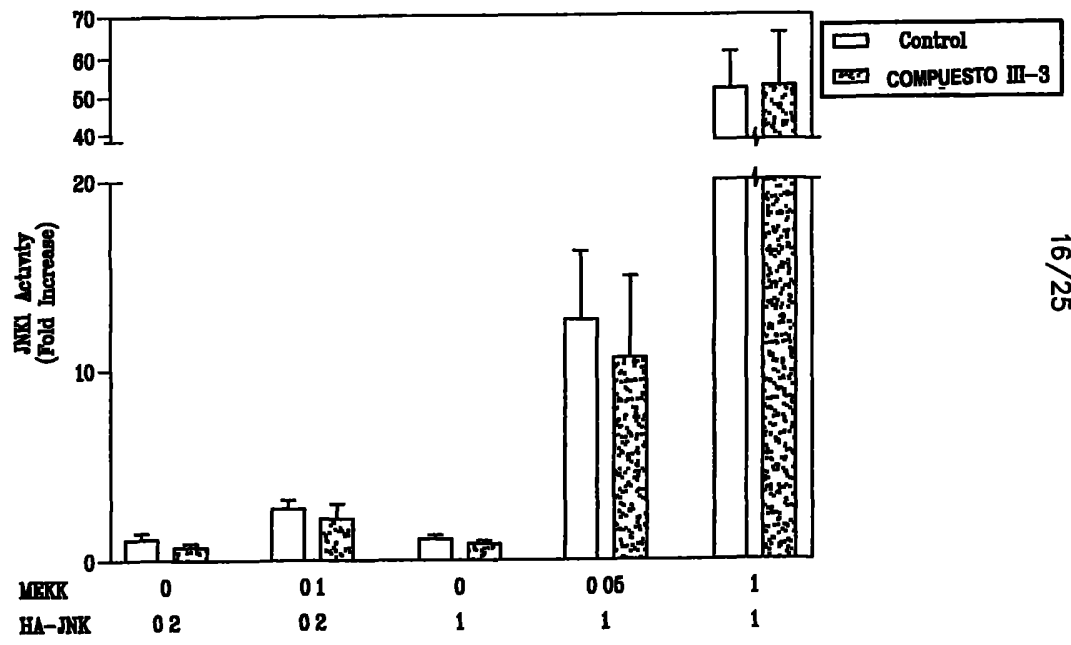


FIG. 15B



16/25

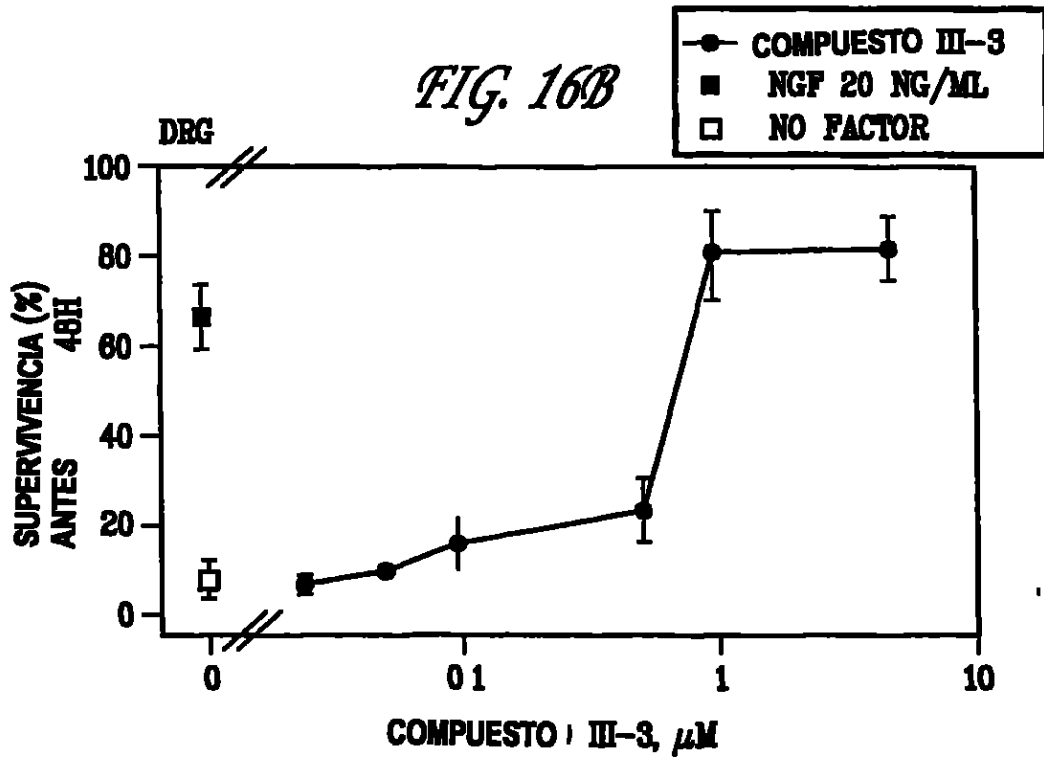
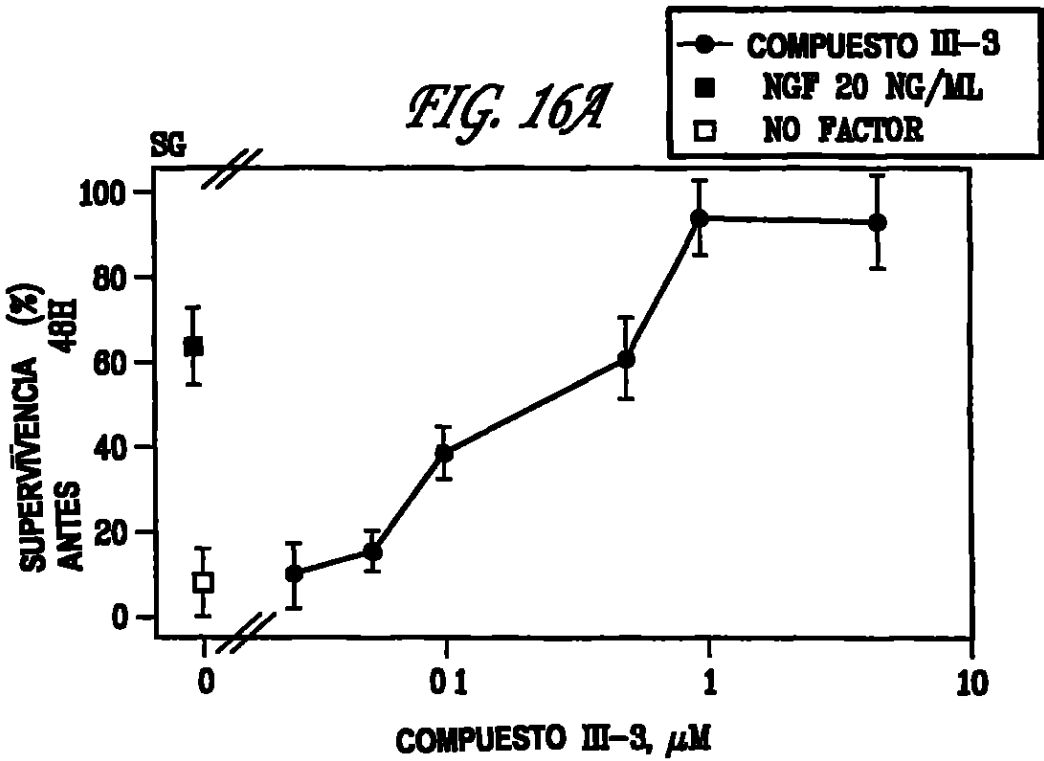
FIG. 15C



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

155
152

17/25



153

18/25

FIG. 16C

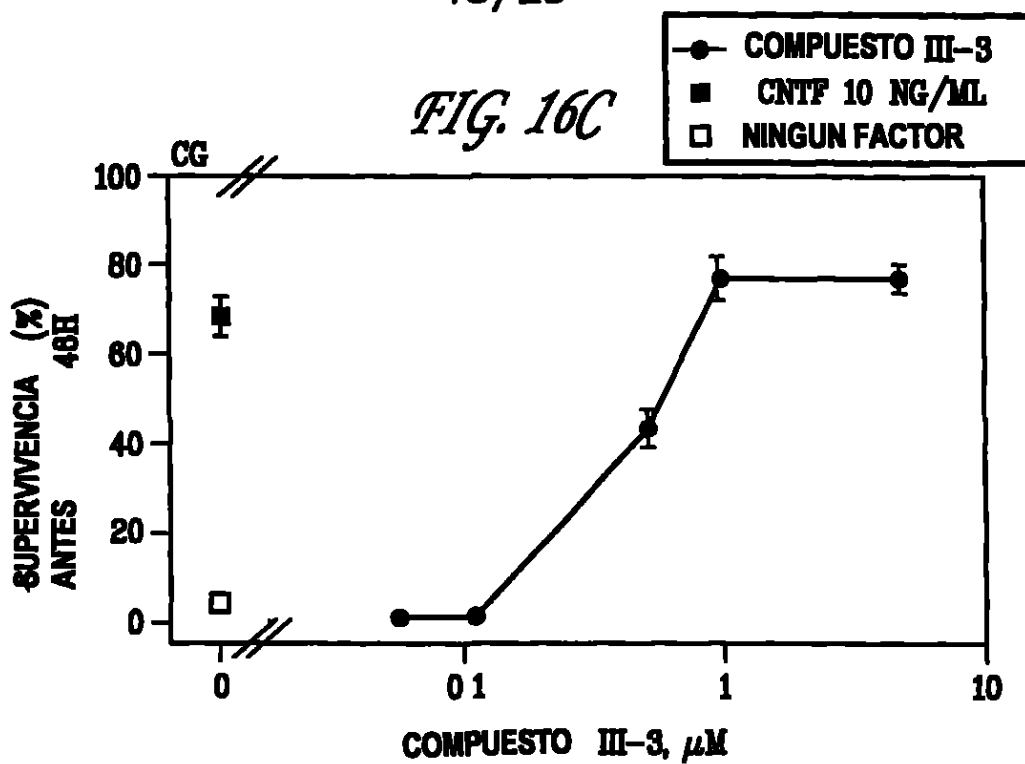


FIG. 16D

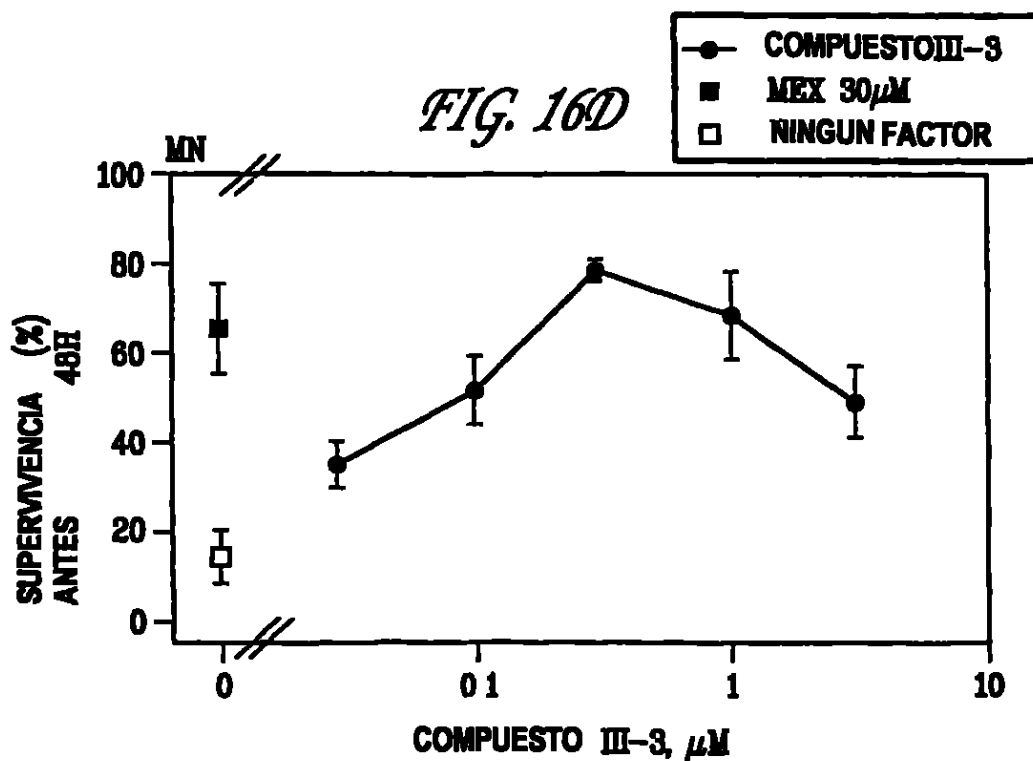
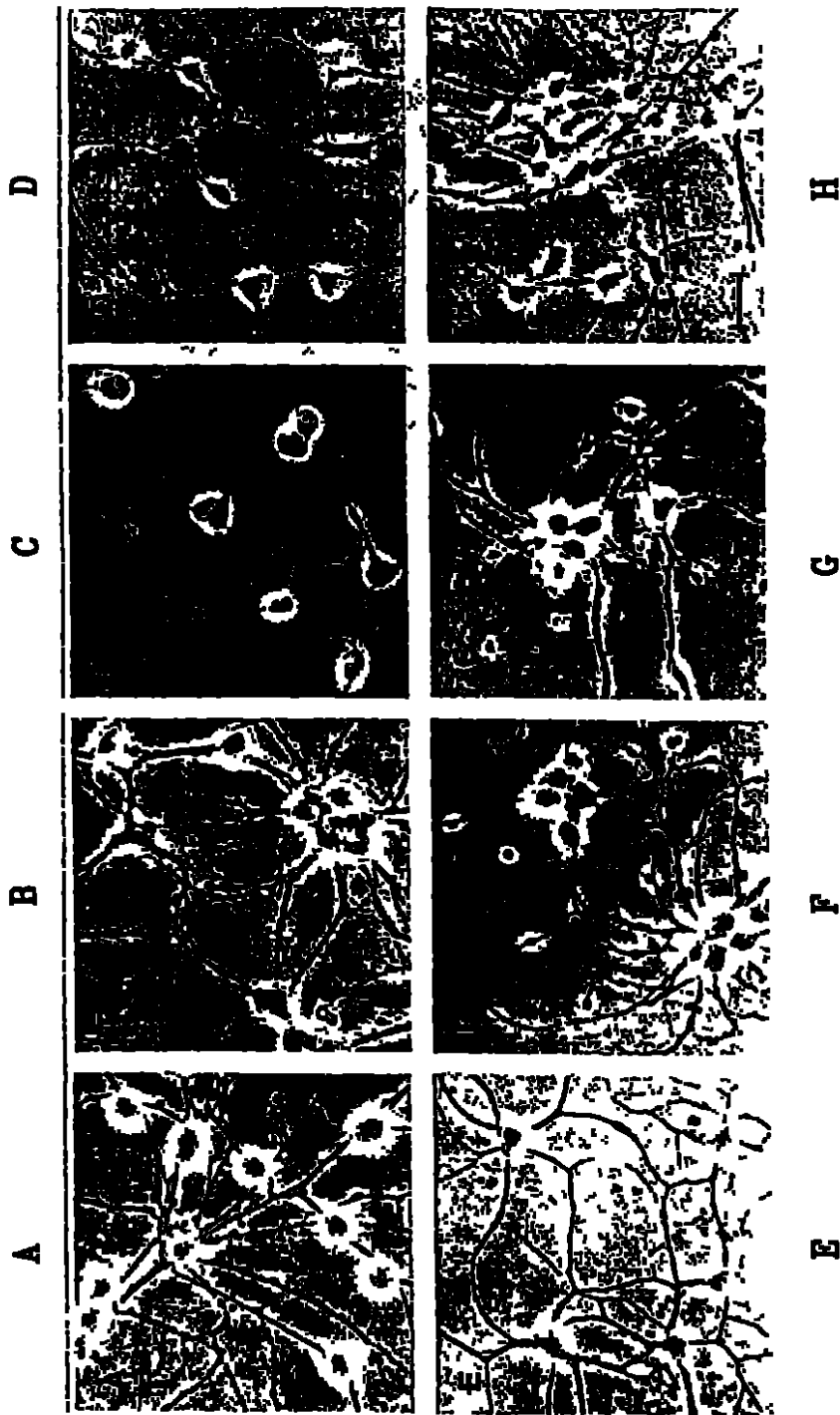


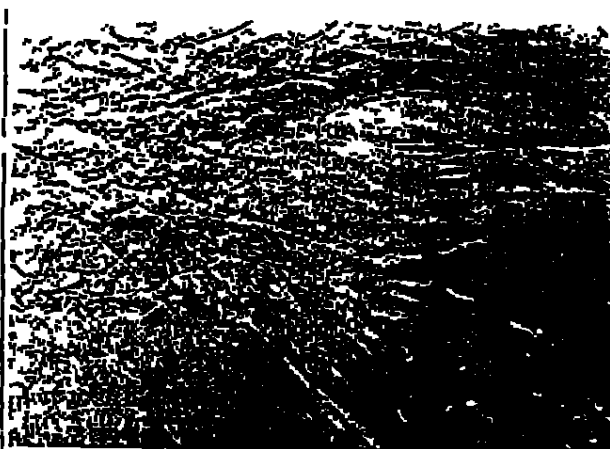
FIG. 17



158
155

20/25

FIG. 18



Control

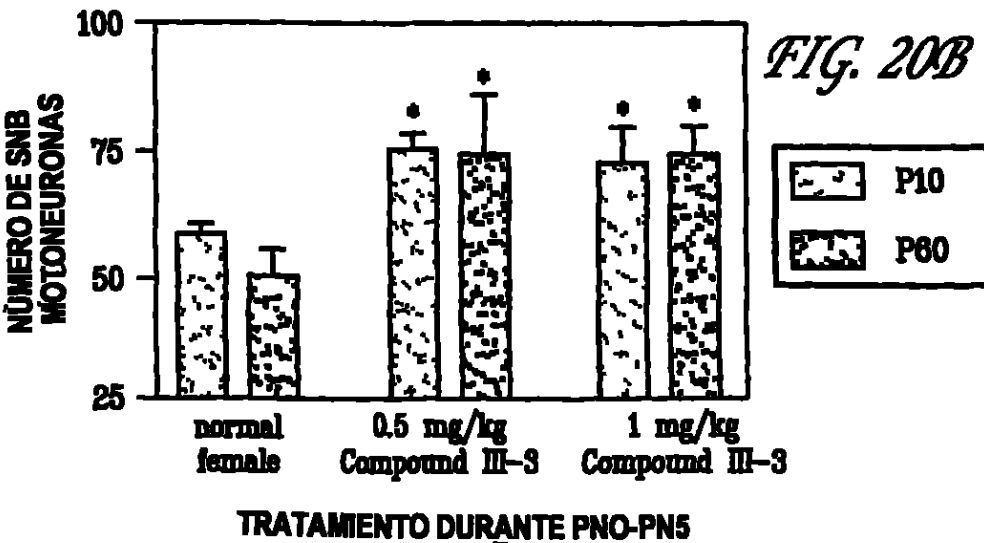
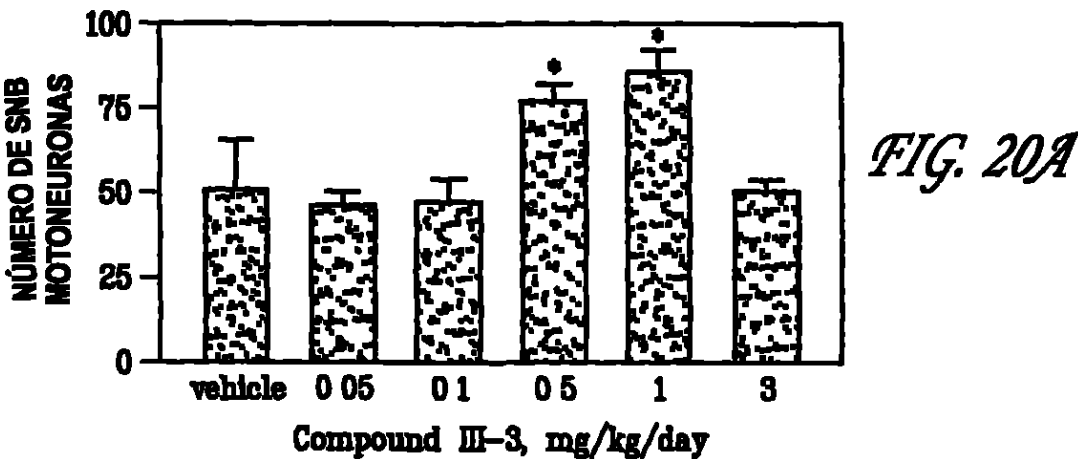
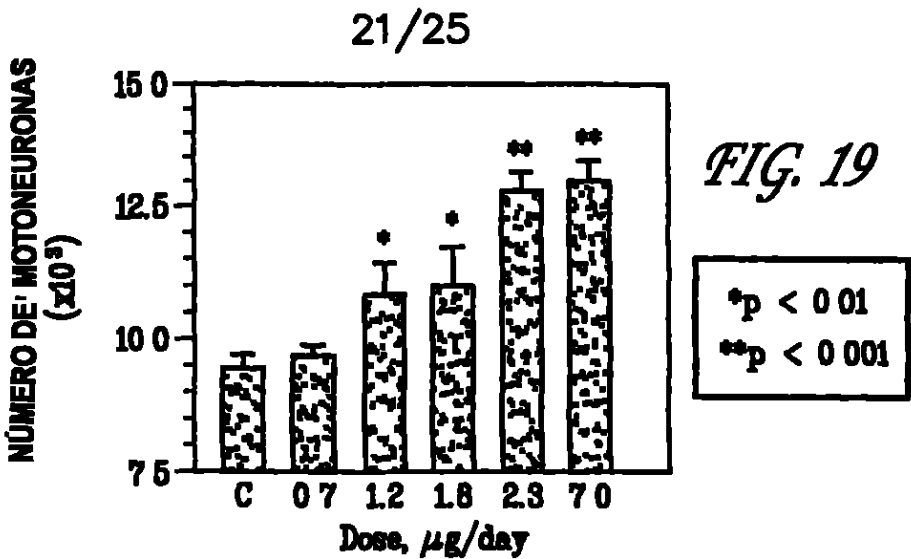


NGF



Composite III-3

156



22/25

158
157

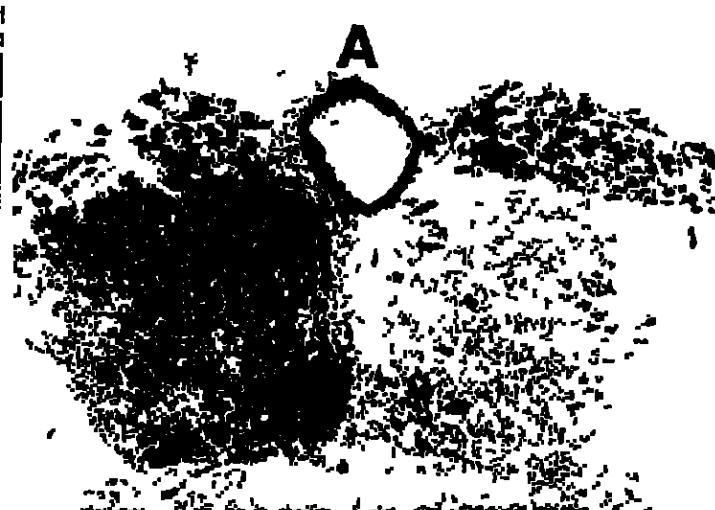


FIG. 21A

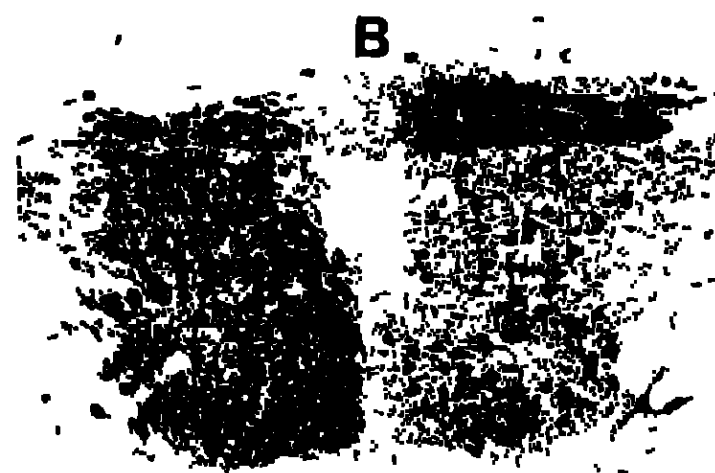


FIG. 21B

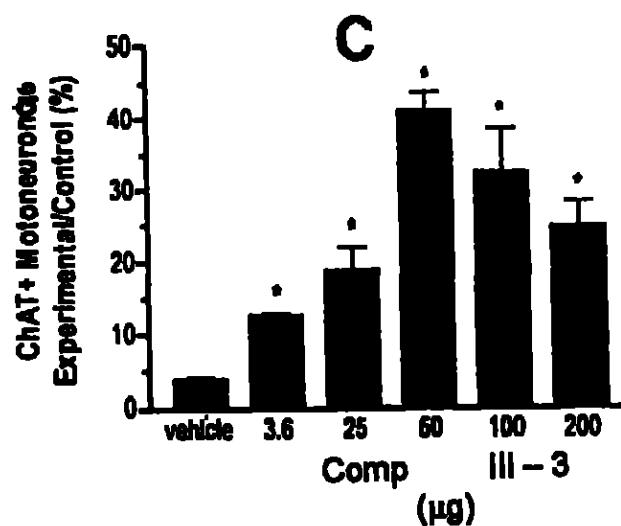


FIG. 21C

46+
158

23/25

Substantia Nigra TH Positive Cell Counts

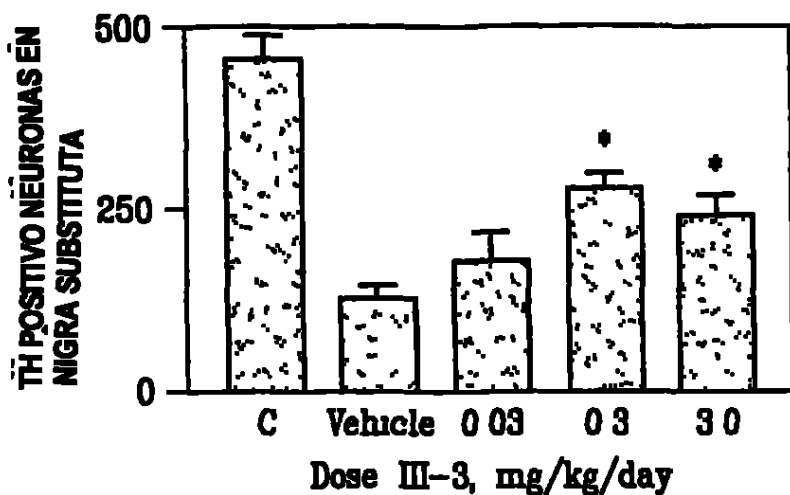


FIG. 22A

* INDICA DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS ($P < 0.05$) DE MPTP - CONTROLA LOS VEHÍCULOS

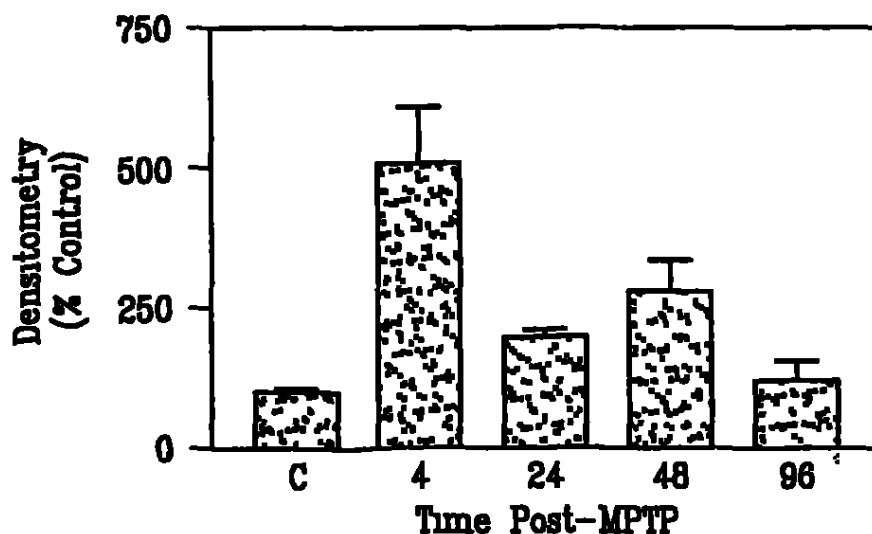
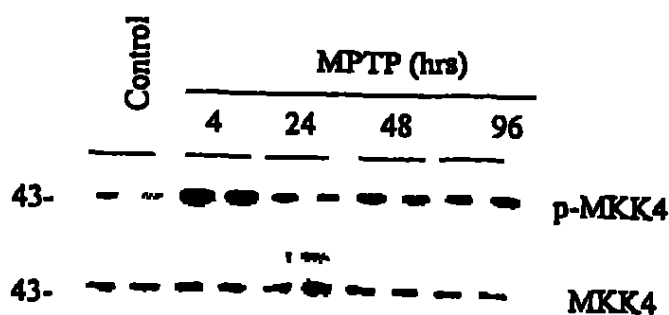
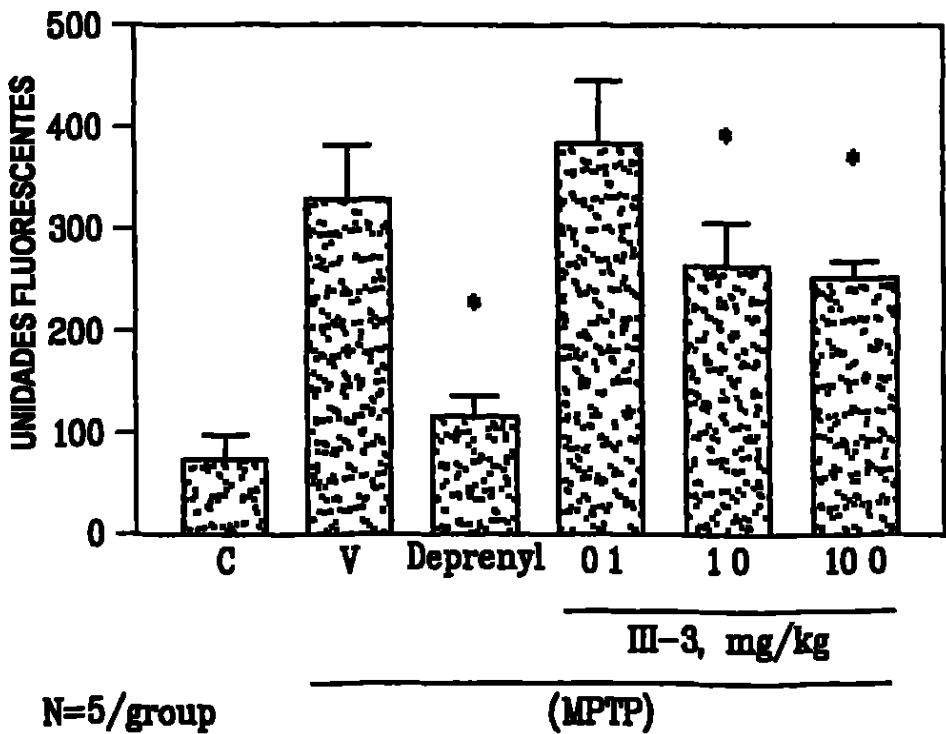


FIG. 22B

24/25

| NIGRA SUBSTITUTA | | | | | |
|------------------|---------|------------|-------------|-----|----|
| MPTP (40 mg/kg) | | | | | |
| Control | Vehicle | L-deprenyl | III-3 | | |
| | | | (mg/kg, sc) | | |
| | | | 0.1 | 1.0 | 10 |

FIG. 22C



N=5/group
*P < 0.05
ANOVA post-hoc Dunnett's test

25/25

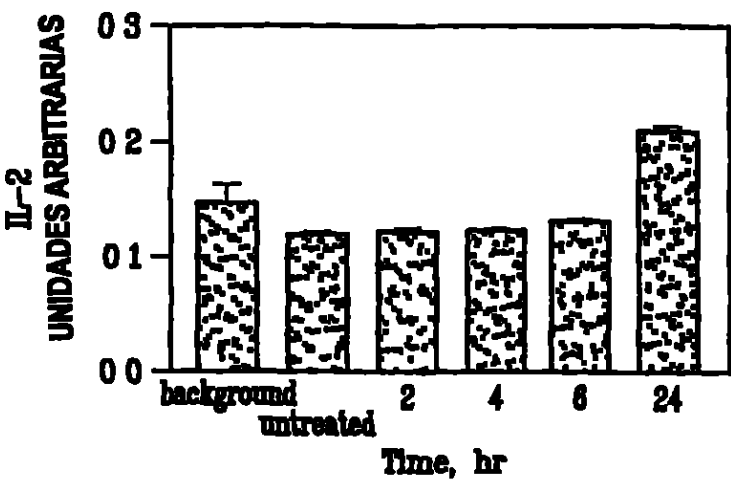


FIG. 23A

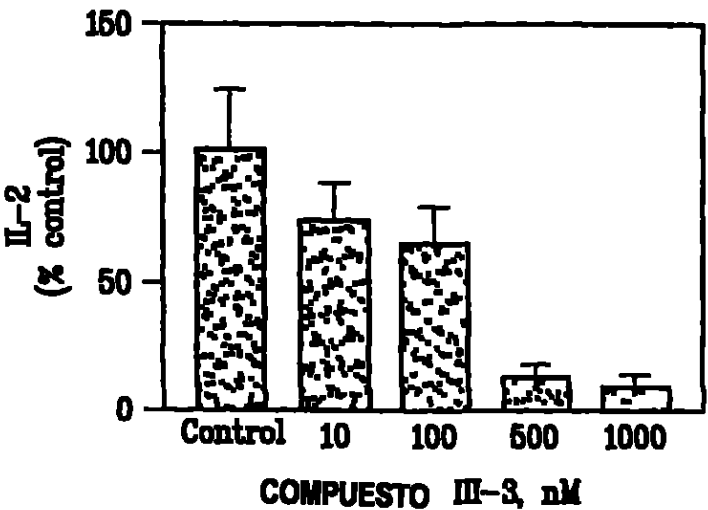


FIG. 23B

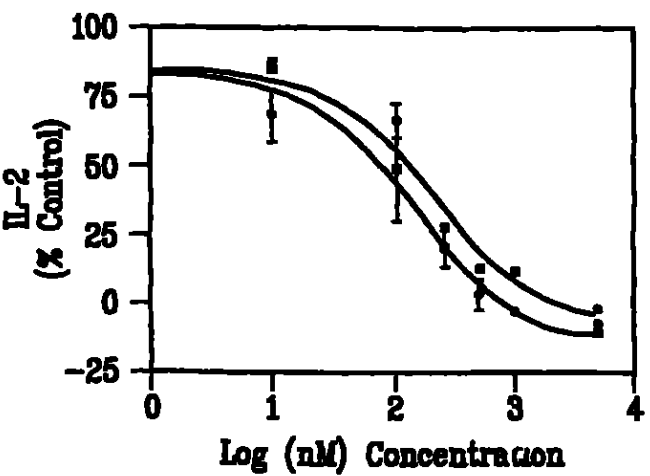


FIG. 23C

| | IC50 |
|--------------|--------|
| • Cmpd III-3 | 139 nM |
| • Cmpd 1-4 | 207 nM |

PCT
REQUEST

The undersigned requests that the present
International application be processed
according to the Patent Cooperation Treaty

For receiving Office use only

International Application No

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) CEPH 1437

Box No. I TITLE OF INVENTION
METHODS FOR MODULATING MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS AND SCREENING COMPOUNDS WHICH MODULATE
MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address (Furnish name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must
include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (i.e. country)
of residence if no State of residence is indicated below.)

CEPHALON INC
145 Brandywine Parkway
West Chester Pennsylvania 19380
US

Telephone No

Facsimile No

Teleprinter No

Applicant's registration No. with the
Office

State (that is, country) of nationality US

State (that is, country) of residence US

This person is applicant ☒ all designated ☐ all designated States except ☐ the United States ☐ the States indicated in
for the purposes of States the United States of America of America only the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

Name and address (Furnish name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must
include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (i.e. country)
of residence if no State of residence is indicated below.)

MARONEY Anna
696 Meadowbrook Lane
Media, Pennsylvania 19063
US

This person is

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☒ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the
Office

State (that is, country) of nationality

State (that is, country) of residence

This person is applicant ☐ all designated ☐ all designated States except ☐ the United States ☐ the States indicated in
for the purposes of States the United States of America of America only the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE, OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as ☒ agent ☐ common representative

Names and address (Furnish name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address
must include postal code and name of country.)

MILLER, Suzanne E. LEGAARD Paul K.
WOODCOCK WASHBURN KURTZ MACKIEWICZ & NORRIS LLP
One Liberty Place 46th Floor
Philadelphia, Pennsylvania 19103 US

Telephone No (215) 568-3100

Facsimile No (215) 568-3439

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a
special address to which correspondence should be sent

485
162

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

| | |
|---|---|
| <p>Name and address (Family name followed by given name for a legal entity; full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>WALTON Kevin M.
6 Rock Ridge Drive
Old Saybrook, Connecticut 06475
US</p> | <p>This person is</p> <p>☐ applicant only</p> <p>☐ applicant and inventor</p> <p>☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
|---|---|

| | |
|--|---------------------------------------|
| State (that is, country) of nationality | State (that is, country) of residence |
| <p>This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box</p> | |

| | |
|--|---|
| <p>Name and address (Family name followed by given name for a legal entity; full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>DIONNE Craig A
106 Victoria Court
Downingtown, Pennsylvania 19335
US</p> | <p>This person is</p> <p>☐ applicant only</p> <p>☐ applicant and inventor</p> <p>☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
|--|---|

| | |
|--|---------------------------------------|
| State (that is, country) of nationality | State (that is, country) of residence |
| <p>This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box</p> | |

| | |
|---|---|
| <p>Name and address (Family name followed by given name for a legal entity; full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>NEFF Nicola
59 Todmorden Drive
Wallingford, Pennsylvania 19086
US</p> | <p>This person is</p> <p>☐ applicant only</p> <p>☐ applicant and inventor</p> <p>☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
|---|---|

| | |
|--|---------------------------------------|
| State (that is, country) of nationality | State (that is, country) of residence |
| <p>This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box</p> | |

| | |
|---|--|
| <p>Name and address (Family name followed by given name for a legal entity; full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>KNIGHT Ernest, Jr
2604 Calibogue Club
Hilton Head Island, South Carolina 29928
US</p> | <p>This person is:</p> <p>☐ applicant only</p> <p>☐ applicant and inventor</p> <p>☒ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.)</p> <p>Applicant's registration No. with the Office</p> |
|---|--|

| | |
|--|---------------------------------------|
| State (that is, country) of nationality | State (that is, country) of residence |
| <p>This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box</p> | |

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

55
163

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.

Name and address. (Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

GLICKSMAN, Marcie A.
6 Chesterford Terrace
Winchester Massachusetts 01890
US

This person is

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor

☒ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality

State (that is, country) of residence

This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address. (Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality

State (that is, country) of residence

This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address. (Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality

State (that is, country) of residence

This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address. (Family name followed by given name for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

Applicant's registration No. with the Office

State (that is, country) of nationality

State (that is, country) of residence

This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

See Notes to the request form

Box No. V DESIGNATION OF STAT

Mark the applicable che. boxes below at least one must be marked

The following designations are hereby made under Rule 4 9(a)

Regional Patent

☒ AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT☒ EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT☒ EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH & LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LJ Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, TR Turkey and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT☒ OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GQ Equatorial Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

| | | |
|---|--|--|
| ☒ AE United Arab Emirates. | ☒ GH Ghana. | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ AG Antigua and Barbuda. | ☒ GM Gambia | ☒ NO Norway |
| ☒ AL Albania. | ☒ HR Croatia. | ☒ NP Nepal |
| ☒ AM Armenia. | ☒ HU Hungary | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ AT Austria. | ☒ ID Indonesia | ☒ PL Poland |
| ☒ AU Australia. | ☒ IL Israel | ☒ PT Portugal |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ IN India | ☒ RO Romania |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina. | ☒ IS Iceland | ☒ RU Russian Federation. |
| ☒ BB Barbados | ☒ JP Japan. | |
| ☒ BG Bulgaria. | ☒ KE Kenya. | ☒ SD Sudan |
| ☒ BR Brazil | ☒ KG Kyrgyzstan. | ☒ SE Sweden |
| ☒ BY Belarus. | ☒ KP Democratic People's Republic of | ☒ SG Singapore |
| ☒ BZ Belize. | Korea | ☒ SI Slovenia. |
| ☒ CA Canada | ☒ KR Republic of Korea. | ☒ SK Slovakia. |
| ☒ CH & LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ KZ Kazakhstan. | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ CN China. | ☒ LC Saint Lucia | ☒ TJ Tajikistan. |
| ☒ CO Colombia | ☒ LK Sri Lanka | ☒ TM Turkmenistan. |
| ☒ CR Costa Rica. | ☒ LR Liberia. | ☒ TO Tonga. |
| ☒ CU Cuba. | ☒ LS Lesotho | ☒ TR Turkey |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ LT Lithuania | ☒ TT Trinidad and Tobago. |
| ☒ DE Germany | ☒ LU Luxembourg | |
| ☒ DK Denmark. | ☒ LV Latvia | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ DM Dominica | ☒ MA Morocco. | ☒ UA Ukraine |
| ☒ DZ Algeria. | ☒ MD Republic of Moldova. | ☒ UG Uganda. |
| ☒ EC Ecuador | | ☒ US United States of America. |
| ☒ EE Estonia. | ☒ MG Madagascar | |
| ☒ ES Spain. | ☒ MK The former Yugoslav Republic | ☒ UZ Uzbekistan. |
| ☒ FI Finland | of Macedonia | ☒ VN Viet Nam. |
| ☒ GB United Kingdom | ☒ MN Mongolia | ☒ YU Yugoslavia. |
| ☒ GD Grenada | ☒ MW Malawi | ☒ ZA South Africa. |
| ☒ GE Georgia. | ☒ MX Mexico. | ☒ ZW Zimbabwe. |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designations Statement In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4 9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

168
165

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed

| Filing Date
of earlier application
(day/month/year) | Number
of earlier
application | Where earlier application is | | |
|---|-------------------------------------|------------------------------------|--|---|
| | | national
application
country | regional
application *
regional Office | international application
receiving Office |
| Item (1) 11 August 2000
(11 08 00) | 09/637 054 | US | | |
| Item (2) | | | | |
| Item (3) | | | | |
| Item (4) | | | | |
| Item (5) | | | | |

___ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the international application is the receiving Office) identified above as item(s)

___ (all items) ☒ items 1 ___ items 2 ___ items 3 ___ items 4 ___ items 5 ___ other see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4 10(b)(ii))

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen the two-letter code may be used)

ISA/EP

Request to use results of earlier search reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)

Number of
declaration

___ Box No. VII (i) Declaration as to the identity of the inventor

☒ Box No. VII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent

1

___ Box No. VII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application

___ Box No. VII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)

___ Box No. VII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty

166

Box No. VIII(ii) DECLARATION ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standard wording provided for in Section 212 see Notes to Boxes Nos VIII VIII(i) to (v) in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii) If this Box is not used this sheet should not be included in the request

Declaration as to the applicant's entitlement as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis 1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

Cephalon, Inc. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following

an assignment from

MARONEY Anna of 696 Meadowbrook Lane, Media, Pennsylvania 19063 to CEPHALON INC dated 18 May 2001
 WALTON Kevin of 6 Rock Ridge Drive, Old Saybrook, Connecticut 06475 to CEPHALON INC dated 25 May 2001
 DIONNE, Craig A. of 106 Victoria Court, Downingtown, Pennsylvania 19335 to CEPHALON INC dated 18 May 2001
 NEFF Nicola of 59 Todmorden Drive, Wallingford, Pennsylvania 19086 to CEPHALON INC dated 16 May 2001
 KNIGHT Ernest, Jr of 2604 Callibogue Club, Hilton Head Island, South Carolina 29928 to CEPHALON INC dated 17 May 2001
 GLICKSMAN Marcie A. of 6 Chesterford Terrace, Winchester Massachusetts 01890 to CEPHALON INC dated 17 May 2001

and recorded in the United States Patent and Trademark Office on June 6, 2001 on Reel 011642 Frame 0601-0625

This declaration is made for the purposes of all designations but the United States.

This Declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)"

Box No. EX CHECK LIST LANGUAGE OF FILING

| This international application contains | This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item) | Number of items |
|--|---|-----------------|
| (a) the following number of sheets in paper form request (including declaration sheets) 7 | 1 ☒ Fee calculation sheet | 1 |
| description (excluding sequence listing part) 82 | 2 ☐ Original separate power of attorney | |
| claims 9 | 3 ☐ Original general power of attorney | |
| abstract 1 | 4 ☒ Copy of general power of attorney reference number if any | 1 |
| drawings 26 | 5 ☐ Statement explaining lack of signature | |
| Sub-total number of sheets 125 | 6 ☐ Priority document(s) identified in Box No. VI as item(s) | |
| sequence listing part of description (actual number of sheets if filed in paper form whether or not also filed in computer readable form see (b) below) 4 | 7 ☐ Translation of international application into (language) | |
| Total number of sheets 129 | 8 ☐ Separate indications concerning deposited microorganism or other biological material | |
| (b) sequence listing part of description in computer readable form | 9 ☐ Sequence listing in computer readable form (indicate also type and number of carriers (diskette CR ROM CD-R or other)) | |
| (i) ☐ only (under Section 801(a)(1)) | (i) ☐ Copy submitted for the purpose of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) | |
| (ii) ☐ in addition to being filed in paper form (under Section 801(a)(1)) | (ii) ☐ (Only where check-boxes (b)(i) or (b)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter | |
| Type and number of carriers (diskette, CD-ROM CD-R or other) on which the sequence listing part is containing (additional copies to be indicated under item 9(ii) in right column) | (iii) ☐ Together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing part mentioned in left column | |
| | 10 ☒ Other (specify) transmittal return-receipt postcard | |

Figure of the drawings which should accompany the abstract 0

Language of filing of the international application ENGLISH

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).


LEGAARD Paul K.

| | |
|---|--|
| 1 Date of actual receipt of the purported international application | 2 Drawings |
| 3 Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application | ☐ received |
| 4 Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2) | ☐ not received |
| 5 International Searching Authority specified by the applicant ISA/ | 6 ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid |
| For International Bureau use only | |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau | |

121
168

SEQUENCE LISTING

<110> Cephalon, Inc
Maroney, Anna
Walton, Kevin M
Dionne, Craig A
Neff, Nicola
Knight, Jr , Ernest
Glicksman, Marcie A

<120> Methods For Modulating Multiple Lineage Kinase Proteins And
Screening Compounds Which Modulate Lineage Kinase Proteins

<130> CEHP1989

<150> 60/097,980
<151> 1998-08-26

<150> 09/376,894
<151> 1999-08-18

<150> 09/637,054
<151> 2000-08-11

<150> PCT/US01/24822
<151> 2001-08-08

<160> 18

<170> PatentIn version 3 2

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ala Ser Ala Cys Arg Thr Cys
20

<210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

122
169

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

Ala

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
gtggctgtgc gggcagctcg ccag 24

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gagaccctgg atctcgcgct t 21

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cggatccgtg acaccagtcg gaacctt 27

123
170

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
ggaattcacc agtaagctcc agcacatc 28

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
ataattcgtg ctagcgccag agtctagccg gtg 33

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
ataagcttcc tcagtgcgaag tggatcgcgc agccccctga 39

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 14
<211> 69
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ataaagcttc cagaggccat ggactacaag gacgacgatg acaaggcctg cctccatgaa 60
acccgaaca 69

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gacagggcgg ccggctct 18

<210> 16
<211> 583
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
gaattcggca cgagaggact cgcaggtgtc cggcgacgag ggctggtgga ccgggcagct 60
gaaccagcgg gtgggcatct tccccagcaa ctacgtgacc ccgcgcagcg ccttctccag 120
ccgctgccag cccggcggcg aggacccccag ttgctaccg ccatttcagt tgtagaaat 180

724
131

tgattttgcg gagctcacct tggaagagat tattggcatc gggggctttg ggaaggtcta 240
tcgtgctttc tggatagggg atgaggttgc tgtgaaagca gctcgccacg accctgatga 300
ggacatcagc cagaccatag agaatgttcg ccaagaggcc aagctcttcg ccatgctgaa 360
gcacccaac atcattgcc taagaggggt atgtctgaag gagccaacc tctgcttggc 420
catggagttt gctcgtggag gacctttgaa tagagtgtta tctgggaaaa ggattcccc 480
agacatcctg gtgaattggg ctgtgcagat tgccagaggg atgaactact tacatgatga 540
ggcaattggt cccatcatcc accgcgacct taagtccagc aac 583

<210> 17
<211> 194
<212> FRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

~~125~~
172

Ser Asn

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Asp | Tyr | Lys | Asp | Asp | Asp | Asp | Lys | Cys |
| 1 | | | 5 | | | | | | 10 |

226
173

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCTNOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To

WOODCOCK WASHBURN KURTZ MACKIEWICZ
& NORRIS LLP
Attn: Miller, Suzanne E
One Liberty Place
46th Floor
Philadelphia, PA 19103
UNITED STATES OF AMERICADate of mailing
(day/month/year)

21/10/2002

Applicant's or agent's file reference

CEPH-1553

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No

PCT/US 01/24822

International filing date
(day/month/year)

08/08/2001

Applicant

CEPHALON, INC

- 1
- ☒
- The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46)

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No. (41-22) 740 14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

- 2
- ☐
- The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

- 3
- ☐
- With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made

- 4 Further action(s): The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the International Application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International Application or of the priority claim must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority

European Patent Office P B 5818 Patenlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Joannes Vergoosen

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, Article, Rule and Section refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g., the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b))

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English. If the language of the international application is French, the letter must be in French.

148
135

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped) whether

- (i) the claim is unchanged,
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added"
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11"
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]
"Claims 1, 10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. References to citations relevant to a given claim contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Office, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PCT

128
176

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| | | |
|---|--|--|
| Applicant's or agent's file reference
CEPH-1553 | FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as where applicable item 5 below | |
| International application No
PCT/US 01/ 24822 | International filing date (day/month/year)
08/08/2001 | (Earliest) Priority Date (day/month/year)
11/08/2000 |
| Applicant
CEPHALON, INC | | |

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

- a With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

- 2 ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

- 3 ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4 With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

MODULATING MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS

5 With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established according to Rule 38.2(b) by this Authority as it appears in Box III. The applicant may within one month from the date of mailing of this international search report submit comments to this Authority.

6 The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☒ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1
☐ None of the figures.

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| International Application No
PCT/US 01/24822 | | | | |
| A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/48 601N33/68 | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | |
| B FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q 601N | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data | | | | |
| C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | |
| Category | Citation of document, with indication where appropriate of the relevant passages | Relevant to claim No | | |
| X | WO 00 13015 A (CEPHALON INC)
9 March 2000 (2000-03-09)
the whole document | 1-12 | | |
| X | WO 99 58982 A (LIU YA FANG)
18 November 1999 (1999-11-18)
the whole document | 1-12 | | |
| X | US 5 756 494 A (KANEKO MASAMI ET AL)
26 May 1998 (1998-05-26)
abstract | 1-12 | | |
| P,X | WO 00 47583 A (CEPHALON INC)
17 August 2000 (2000-08-17)
the whole document | 6-12 | | |
| ---
-/-- | | | | |
| ☒ Further documents are listed in the continuation of box C ☒ Patent family members are listed in annex | | | | |
| Special categories of cited documents | | | | |
| <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 E earlier document but published on or after the international filing date
 L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 X document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 & document member of the same patent family </td> </tr> </table> | | | A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
E earlier document but published on or after the international filing date
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
X document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
& document member of the same patent family |
| A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
E earlier document but published on or after the international filing date
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
X document of particular relevance the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
& document member of the same patent family | | | |
| Date of the actual completion of the international search
<div style="text-align: center; font-weight: bold;">14 October 2002</div> | | Date of mailing of the international search report
<div style="text-align: center; font-weight: bold;">21/10/2002</div> | | |
| Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer
<div style="text-align: center; font-weight: bold;">Moreno, C</div> | | |

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|---------------------------|
| Category | Citation of document with indication where appropriate of the relevant passages | Relevant to claim No. 178 |
| X | US 5 705 511 A (HUDKINS ROBERT L ET AL)
6 January 1998 (1998-01-06)
the whole document | 6-12 |
| A | FANGER G R ET AL "MEKKs, GCKs, MLKs,
PAKs, TAKs, and tp1s upstream regulators
of the c-Jun amino-terminal kinases?"
CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT
CURRENT BIOLOGY LTD, XX,
vol 7, February 1997 (1997-02), pages
67-74, XP000867511
ISSN 0959-437X
the whole document | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US 01/24822

#52
179

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

- 1 ☒ Claims Nos
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority namely

Although claim 5 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
- 2 ☐ Claims Nos
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out specifically
- 3 ☐ Claims Nos
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows

- 1 ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims
- 2 ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee this Authority did not invite payment of any additional fee
- 3 ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.
- 4 ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claim: it is covered by claims Nos.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

| Patent document
cited in search report | | Publication
date | Patent family
member(s) | Publication
date |
|---|---|---------------------|--|--|
| WO 0013015 | A | 09-03-2000 | AU 5679399 A
BG 105360 A
BR 9913190 A
CA 2339539 A1
CN 1314999 T
CZ 20010701 A3
EP 1105728 A1
HU 0103079 A2
JP 2002523780 T
NO 20010389 A
PL 346246 A1
TR 200100589 T2
WO 0013015 A1 | 21-03-2000
31-10-2001
11-12-2001
09-03-2000
26-09-2001
17-04-2002
13-06-2001
28-12-2001
30-07-2002
02-04-2001
28-01-2002
23-07-2001
09-03-2000 |
| WO 9958982 | A | 18-11-1999 | CA 2331680 A1
EP 1078268 A1
JP 2002514767 T
US 2002058245 A1
WO 9958982 A1
US 2002006606 A1 | 12-11-1999
28-02-2001
21-05-2002
16-05-2002
18-11-1999
17-01-2002 |
| US 5756494 | A | 26-05-1998 | US 5621100 A
US 5461146 A
AT 218571 T
AU 704314 B2
AU 3951695 A
BR 9509480 A
CA 2203767 A1
DE 69526956 D1
EP 1125938 A1
EP 0788501 A1
JP 10510514 T
NZ 295871 A
WO 9613506 A1
US 5741808 A
US 5621101 A
AT 152111 T
AT 196142 T
AU 675236 B2
AU 4688193 A
BR 9306789 A
CA 2140924 A1
DE 69310178 D1
DE 69310178 T2
DE 69329397 D1
DE 69329397 T2
DK 651754 T3
DK 768312 T3
EP 0651754 A1
EP 0768312 A2
EP 1002534 A1
ES 2101331 T3
ES 2151629 T3
GR 3023817 T3
HU 71239 A2
JP 8501080 T
KR 276008 B1
NO 950242 A | 15-04-1997
24-10-1995
15-06-2002
22-04-1999
23-05-1996
30-09-1997
09-05-1996
11-07-2002
22-08-2001
13-08-1997
13-10-1998
28-09-2001
09-05-1996
21-04-1998
15-04-1997
15-05-1997
15-09-2000
30-01-1997
14-02-1994
08-12-1998
25-01-1994
28-05-1997
25-09-1997
12-10-2000
15-03-2001
27-10-1997
11-12-2000
10-05-1995
16-04-1997
24-05-2000
01-07-1997
01-01-2001
30-09-1997
28-11-1995
06-02-1996
15-12-2000
07-03-1995 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No.

PCT/US 01/24822

| Patent document
cited in search report | Publication
date | Patent family
member(s) | Publication
date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5756494 | A | NO 990542 A | 05-02-1999 |
| | | NZ 254662 A | 26-11-1996 |
| | | NZ 286198 A | 29-06-2001 |
| | | PT 768312 T | 30-03-2001 |
| | | WO 9402488 A1 | 03-02-1994 |
| WO 0047583 | A 17-08-2000 | AU 3360400 A | 29-08-2000 |
| | | BG 105890 A | 28-06-2002 |
| | | BR 0008056 A | 09-04-2002 |
| | | CN 1350537 T | 22-05-2002 |
| | | EP 1165562 A1 | 02-01-2002 |
| | | HR 20010583 A1 | 31-08-2002 |
| | | NO 20013887 A | 11-10-2001 |
| | | TR 200102338 T2 | 22-07-2002 |
| | | WO 0047583 A1 | 17-08-2000 |
| US 5705511 | A 06-01-1998 | US 5594009 A | 14-01-1997 |
| | | US 5591855 A | 07-01-1997 |
| | | US 5475110 A | 12-12-1995 |
| | | AT 211472 T | 15-01-2002 |
| | | AU 705306 B2 | 20-05-1999 |
| | | AU 3998695 A | 06-05-1996 |
| | | BR 9509348 A | 04-11-1997 |
| | | DE 69524882 D1 | 07-02-2002 |
| | | DE 69524882 T2 | 12-09-2002 |
| | | DK 785938 T3 | 22-04-2002 |
| | | EP 1088823 A1 | 04-04-2001 |
| | | EP 0785938 A1 | 30-07-1997 |
| | | ES 2170812 T3 | 16-08-2002 |
| | | FI 971479 A | 11-06-1997 |
| | | JP 2001509775 T | 24-07-2001 |
| | | NO 971677 A | 11-06-1997 |
| | | NZ 296244 A | 25-11-1998 |
| | | NZ 332253 A | 28-07-2000 |
| | | PT 785938 T | 28-06-2002 |
| | | WO 9611933 A1 | 25-04-1996 |

182

RECEIVED

OCT 26 2002

WOODCOCK WASHBURN KURTZ
Mackiewicz & Morris LLP

DEPT 15537

RECEIVED

OCT 28 2002

DOCKET DEPT
WWWKMN

WOODCOCK WASHBURN KURTZ MACKIEWICZ
& MORRIS LLP
Attn: Miller, Suzanne E
One Liberty Place
46th Floor
Philadelphia, PA 19103
UNITED STATES OF AMERICA

Date 21/10/2002

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

183

To

SUZANNE E MILLER
WOODCOCK WASHBURN KURTZ MACKIEWICZ &
NORRIS LLP
ONE LIBERTY PLACE 46TH FLOOR
PHILADELPHIA PA 19103

JUN 14 2002

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rule 59.3(e) and 61.1(b) first sentence
and Administrative Instructions Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year) 10 JUN 2002

| | | | |
|--|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference
CEPH-1553 | | IMPORTANT NOTIFICATION | |
| International application No
PCT/US01/24822 | International filing date (day/month/year)
08 AUG 01 | Priority date (day/month/year)
11 AUG 00 | |
| Applicant
CEPHALON INC | | | |

- 1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application

08 March 02 (08.03.02)

- 2 That date of receipt is

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b))
- ☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e))
- ☐ the date on which this Authority has in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404) received the required corrections

- 3 ☐ **ATTENTION** That date of receipt is **AFTER** the expiration of 19 months from the priority date. Consequently the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details see the *PCT Applicant's Guide* Volume II

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on

- 4 Only where paragraph 3 applies a copy of this notification has been sent to the International Bureau

| | | |
|--|--|--|
| Name and mailing address of the IPEA/US
Assistant Commissioner for Patents
Box PCT
Washington D C 20231
Facsimile No | | Authorized officer
BY Juce
Telephone No (703) 308-8336 |
|--|--|--|

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To

MILLER, Suzanne, E
Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz
& Norris LLP
46th floor
One Liberty Place
Philadelphia, PA 19103
United States of America

RECEIVED

NOV 01 2002

Woodcock Washburn Kurtz
Mackiewicz & Norris LLP

Date of mailing (day/month/year)
17 October 2002 (17 10 02)

Applicant's or agent's file reference
CEPH-1553

IMPORTANT INFORMATION

International application No.
PCT/US01/24822

International filing date (day/month/year)
08 August 2001 (08 08 01)

Priority date (day/month/year)
11 August 2000 (11 08 00)

Applicant
CEPHALON, INC

1 The applicant is hereby informed that the International Bureau has according to Article 31(7) notified each of the following Offices of its election

EP AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR
National AU,BG,CA,CN,DE,GB,IL,JP,KP,KR,MN,NO,PL,RO,RU,SK

2 The following Offices have waived the requirement for the notification of their election the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request

AP GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EA AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National AE,AG,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,BZ,CH,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,
ES,FI,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,
MK,MW,MX,MZ,NZ,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3 The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing if prescribed a translation of the international application (Article 38(1)(a)) as well as where applicable by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 38(3)(b) and Rule 74.1)

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

RECEIVED

NOV 01 2002

DOCKET DEPT.
WWKMN

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Isabelle COLIN

Facsimile No. (41 22) 740 14.35

Telephone No. (41 22) 338.83.38

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/14536 A2

(51) International Patent Classification⁷ C12Q 1/00

(21) International Application Number PCT/US01/24822

(22) International Filing Date 8 August 2001 (08.08.2001)

(25) Filing Language English

(26) Publication Language English

(30) Priority Data
09/637,054 11 August 2000 (11.08.2000) US

(71) Applicant CEPHALON INC [US/US] 145 Brandy
wine Parkway West Chester PA 19380 (US)

(72) Inventors MARONEY Anna 696 Meadowbrook Lane,
Media, PA 19063 (US); WALTON Kevin M 6 Rock
Ridge Drive Old Saybrook CT 06475 (US); DIONNE,
Craig, A. 106 Victoria Court, Downingtown PA 19335
(US); NEFF Nicola 59 Tudmorden Drive Wallingford,
PA 19086 (US); KNIGHT Ernest Jr 2604 Calibogue
Club, Hilton Head Island SC 29928 (US); GLICKSMAN
Marcie, A 6 Chesterford Terrace Winchester MA 01890
(US)

(74) Agents MILLER, Suzanne E. et al Woodcock Wash
burn Kurtz Mackiewicz & Norris LLP 46th floor One Lib
erty Place Philadelphia, PA 19103 (US)

(81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)

Declaration under Rule 4.17

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LA, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MZ, NA, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZW ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SE,
SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR);
OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GH,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title METHODS FOR MODULATING MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS AND SCREENING COMPOUNDS
WHICH MODULATE MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS

(57) Abstract Methods for identifying compounds which modulate activity of a multiple lineage kinase protein and promotes cell
survival or cell death comprising the steps of contacting the cell containing the multiple lineage protein with the compound deter-
mining whether the compound decreases activity of the multiple lineage protein and determining whether the compound promotes
cell survival are provided. Methods for identifying compounds which may be useful in the treatment of neurodegenerative disorders
and/or inflammation are also provided. Methods for modulating the activity of a multiple lineage kinase protein comprising contact-
ing the protein or a cell containing the protein with an indeno- or indolo-compound of the invention are also provided. Methods of
treating neurodegenerative disorders and/or inflammation are also provided.

WO 02/14536 A2

484
186

**METHODS FOR MODULATING MULTIPLE LINEAGE KINASE PROTEINS
AND SCREENING COMPOUNDS WHICH MODULATE MULTIPLE
LINEAGE KINASE PROTEINS**

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention is directed, in part, to methods for modulating members of the multiple lineage kinase (MLK) family, methods for identifying compounds which modulate a multiple lineage kinase protein and either promote cell survival or promote cell death, methods for identifying compounds which may be useful in the treatment of neurodegenerative disorders and/or inflammation, and methods of treating neurodegenerative disorders with compounds which inhibit a multiple lineage kinase protein.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

 The MLK family comprises a group of proteins in which the protein sequence of the kinase domains of the family members closely resemble the MAPKKKs but have greater similarity to each other than to other MAPKKKs. MLK family members comprise a portion of very complex kinase cascades such as, for example, the stress-signaling cascade, which involves modulation of, *inter alia*, the c-Jun N-terminal kinase (JNK), which in turn modulates, *inter alia*, transcription factors including c-Jun, ATF2, and ELK-1. JNK is described in U S Patents 5,534,426, 5,593,884, 5,605,808, and WO 95/03324, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

15

20 The MLK family includes, in part, the following groups 1) multiple lineage kinase 1

-2-

(MLK1), 2) multiple lineage kinase 2 (MLK2), 3) multiple lineage kinase 3 (MLK3), 4) leucine zipper bearing kinase (LZK), 5) dual leucine zipper bearing kinase (DLK), and 6) multiple lineage kinase 6 (MLK6) MLK1 has a catalytic domain similar to both kinases specific for Tyr and Ser/Thr Dorow, *et al*, *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710 MLK2 also has a catalytic domain similar to both kinases specific for Tyr or Ser/Thr Dorow, *et al*, *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710 MLK2 is also known as MST Katoh, *et al*, *Oncogene*, 1995, 10, 1447-1451 MLK3 comprises a protein that, in addition to the kinase domain, contains two leucine zippers with an adjacent carboxy-terminal basic region, and a proline rich region. Ing, *et al*, *Oncogene*, 1994, 9, 1745-1750 MLK3 is also known as SPRK (Gallo, *et al*, *J Biol Chem*, 1994, 269, 15092-15100), and PTK1 (Ezoe, *et al*, *Oncogene*, 1994, 9, 935-938) LZK is a leucine zipper bearing kinase Sakuma, *et al*, *J Biol Chem*, 1997, 272, 28622-28629 DLK has a kinase domain and two putative leucine zipper motifs Holzman, *et al*, *J Biol Chem*, 1994, 269, 30808-30817 DLK is also known as ZPK (Reddy, *et al*, *Biochem Biophys Res Comm*, 1994, 202, 613-620) and MUK (Hirai, *et al*, *Oncogene*, 1996, 12, 641-650) Members of the MLK family are also described in, for example, U S Patents 5,676,945, 5,554,523, WO 93/15201, Canadian Patent 2,148,898, Diener, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 9687-9692, DeAizpurua, *et al*, *J Biol Chem*, 1997, 272, 16364-16373, Tung, *et al*, *Oncogene*, 1997, 14, 653-659, Sells, *et al*, *Trends in Cell Biol*, 1997, 7, 161-167, Mata, *et al*, *J Biol Chem*, 1996, 271, 16888-16896, Hirai, *et al*, *J Biol Chem*, 1997, 272, 15167-15173, Fan, *et al*, *J Biol Chem*, 1996, 271, 24788-24793, Bloun, *et al*, *DNA and Cell Biol*, 1996, 15, 631-642, Pombo, *et al*, *Nature*, 1995, 377, 750-754, Kiefer, *et al*, *EMBO J*, 1996, 15, 7013-7025, Hu, *et al*, *Genes & Dev*, 1996, 10, 2251-2264, Su, *et al*, *EMBO J*, 1997, 16, 1279-1290, and Dorow, *et al*, *Eur J Biochem*, 1995, 234, 492-500 Recently, another MLK-related kinase was identified in the EST database The DNA sequence of this clone, MLK6, is described by seven overlapping entries Their clone ID numbers are 1007489, 1460085, 510915, 666323, F5555, 482188 and 178522, the sequences of each which are incorporated herein by reference in their entirety Each of the references cited in the present paragraph is incorporated herein by reference in its entirety

Recently, stable expression of ZPK has been shown to reduce the proliferative capacity of NIH 3T3 fibroblasts as measured by a colony formation assay Bergeron, *et al*, *Biochem Biophys Res Comm*, 1997, 231, 153-155 Bergeron, *et al*, however, failed to provide any

198
187

-3-

data showing that ZPK modulated the activity of a ZPK substrate or whether ZPK promoted cell death.

Expression of a construct encoding Myc-MLK2 in Swiss 3T3 cells has been shown to lead to apoptosis approximately 20 hours after injection. Nagata, *et al*, *EMBO J*, 1998, 17, 149-158

Applicants have developed numerous indolo and indeno compounds which, *inter alia*, inhibit cell growth associated with hyperproliferative states and inhibit death in a variety of embryonic cultures, such as dorsal root ganglion, striatal, superior cervical ganglia and motoneurons. U.S. Patents 5,475,110, 5,591,855, 5,594,009, 5,461,146, 5,621,100, 5,621,101, 5,705,511, and 5,756,494, each of which is assigned to the assignee of the present application, and each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Compounds recited in U.S. Patent 5,705,511 having formula G are referred to in the present application as having formula I. Applicants have also shown that motoneuron apoptosis is inhibited by a derivative of K-252a, an indolocarbazole which also modulates the stress-signaling cascade. Maroney, *et al*, *J Neurosci*, 1998, 18, 104-111, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Due to the inadequacies of screening compounds which modulate members of the stress signaling cascade and promote either cell death or cell survival, there continues to be a need for new, selective methods of screening compounds. In addition, there continues to be a need for screening assays for therapeutics which may be useful in treating inflammation and neurodegenerative disorders. The present invention is directed to these, as well as other, important ends.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods for identifying compounds which modulate activity of a multiple lineage kinase protein and promote cell survival comprising the steps of contacting the cell containing the multiple lineage kinase protein with the compound, determining whether the compound decreases activity of the multiple lineage kinase protein, and determining whether the compound promotes cell survival.

The present invention also provides methods for identifying compounds which modulate activity of a multiple lineage kinase protein and promote cell death comprising the

steps of contacting the cell containing the multiple lineage kinase protein with the compound, determining whether the compound increases activity of the multiple lineage kinase protein, and determining whether the compound promotes cell death.

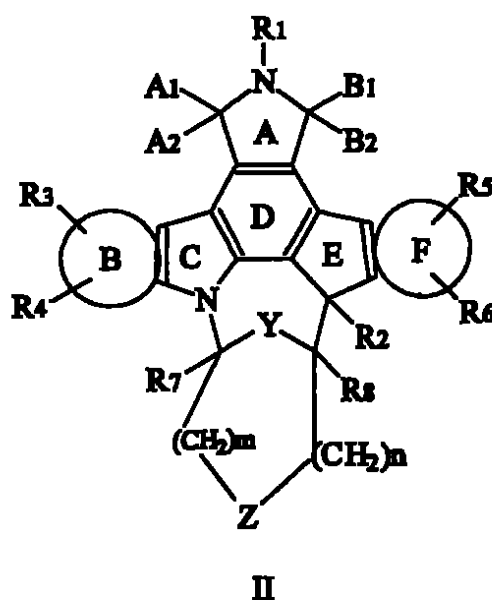
The present invention also provides methods for identifying compounds which may be useful in treating neurodegenerative disorders comprising contacting a cell or cell extract containing a multiple lineage kinase protein with the compound and determining whether the compound decreases activity of the multiple lineage kinase protein.

The present invention also provides methods for identifying compounds which may be useful in treating inflammation comprising contacting a cell or cell extract containing a multiple lineage kinase protein with the compound and determining whether the compound decreases activity of the multiple lineage kinase protein.

The present invention also provides methods for treating a mammal having or suspected of having a neurodegenerative disorder comprising administering to said mammal a compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity

The present invention also provides methods for treating a mammal having inflammation comprising administering to said mammal a compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity

The present invention also provides methods for modulating the activity of a multiple lineage kinase protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula II



-5-

wherein

ring B and ring F, independently, and each together with the carbon atoms to which they are attached, are selected from the group consisting of

an unsaturated 6-membered carbocyclic aromatic ring in which from 1 to 3 carbon atoms may be replaced by nitrogen atoms,

an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring, and

an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring in which either

one carbon atom is replaced with an oxygen, nitrogen, or sulfur atom,

two carbon atoms are replaced with a sulfur and a nitrogen atom, an

oxygen and a nitrogen atom, or two nitrogen atoms, or

three carbon atoms are replaced with three nitrogen atoms,

R¹ is selected from the group consisting of

H, substituted or unsubstituted alkyl having from 1 to 4 carbons, substituted or unsubstituted aryl, substituted or unsubstituted arylalkyl, substituted or unsubstituted heteroaryl, or substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,

-C(=O)R⁹, where R⁹ is selected from the group consisting of alkyl, aryl and heteroaryl,

-OR¹⁰, where R¹⁰ is selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons,

-C(=O)NH₂, -NR¹¹R¹², -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pOR¹⁰, -O(CH₂)_pOR¹⁰ and -O(CH₂)_pNR¹¹R¹², wherein p is from 1 to 4, and wherein either

R¹¹ and R¹² are each independently selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons, or

R¹¹ and R¹² together form a linking group of the formula -(CH₂)_x-X¹-(CH₂)_x, wherein X¹ is selected from the group consisting of -O-, -S-, and -CH₂-,

R² is selected from the group consisting of H, alkyl having from 1 to 4 carbons, -OH, alkoxy having from 1 to 4 carbons, -OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O(CH₂)_pNR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, substituted or unsubstituted arylalkyl having from 6 to 10 carbons, and substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,

R^3 , R^4 , R^5 and R^6 are each independently selected from the group consisting of

H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, -CN, CF_3 , -NO₂, -OH, -OR⁹, -O(CH₂)_pNR¹¹R¹²,
-OC(=O)R⁹, -OC(=O)NR²R⁷, -OC(=O)NR¹¹R¹², -O(CH₂)_pOR¹⁰, -CH₂OR¹⁰, -NR¹¹R¹²,
-NR¹⁰S(=O)₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)R⁹,

5 -CH₂OR¹⁴, wherein R¹⁴ is the residue of an amino acid after the hydroxyl group of the carboxyl group is removed,

-NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -CO₂R², -C(=O)R², -C(=O)NR¹¹R¹², -CH=NOR²,
-CH=NR⁹, -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pNHR¹⁴, or -CH=NNR²R^{2A} wherein R^{2A} is the same as R²,

10 -S(O)_yR² -(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -CH₂S(O)_yR¹⁴ wherein y is 0, 1 or 2,

alkyl having from 1 to 8 carbons, alkenyl having from 2 to 8 carbons, and alkynyl having 2 to 8 carbons, wherein

each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is unsubstituted, or

15 each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is substituted with 1 to 3 groups selected from the group consisting of aryl having from 6 to 10 carbons,

heteroaryl, arylalkoxy, heterocycloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkoxy-alkoxy, hydroxyalkylthio, alkoxy-alkylthio, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂, -OH, -OR⁹,

-X²(CH₂)_pNR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹²,
-X²(CH₂)_pCO₂R⁹, -X²(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹²,

20 -OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahydropyranyl, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰C(=O)R⁹,
-NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -NHC(=NH)NH₂, NR¹⁰S(O)₂R⁹, -S(O)_yR⁹,

-CO₂R², -C(=O)NR¹¹R¹², -C(=O)R², -CH₂OR¹⁰, -CH=NNR²R^{2A}, -CH=NOR²,
-CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -S(=O)₂NR²R^{2A}, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -OR¹⁴,

25 and a monosaccharide having from 5 to 7 carbons wherein each hydroxyl group of the monosaccharide is independently either unsubstituted or is replaced by H, alkyl having from 1 to 4 carbons, alkylcarbonyloxy having from 2 to 5 carbons, or alkoxy having from 1 to 4 carbons,

X² is O, S, or NR¹⁰,

30 R⁷ and R⁸ are each independently selected from the group consisting of H, alkyl having from 1 to 4 carbons, alkoxy having from 1 to 4 carbons, substituted or unsubstituted arylalkyl having from 6 to 10 carbons, substituted or unsubstituted heteroarylalkyl, -(CH₂)_pOR¹⁰, -

-7-

$(CH_2)_pOC(=O)NR^{11}R^{12}$, and $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, or R^7 and R^8 together form a linking group of the formula $-CH_2-X^3-CH_2-$, wherein X^3 is X^2 or a bond,

m and n are each independently 0, 1, or 2,

Y is selected from the group consisting of $-O-$, $-S-$, $-N(R^{10})-$, $-N^+(O)(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, and $-CH_2-$,

Z is selected from the group consisting of a bond, $-O-$, $-CH=CH-$, $-S-$, $-C(=O)-$, $-CH(OR^{10})-$, $-N(R^{10})-$, $-N(OR^{10})-$, $CH(NR^{11}R^{12})-$, $-C(=O)N(R^{17})-$, $-N(R^{17})C(=O)-$, $-N(S(O)_2R^9)-$, $-N(S(O)_2NR^{11}R^{12})-$, $-N(C(=O)R^{17})-$, $-C(R^{15}R^{16})-$, $-N^+(O)(R^{10})-$, $-CH(OH)-CH(OH)-$, and $-CH(O(C(=O)R^9)CH(OC(=O)R^{9A})-$, wherein R^{9A} is the same as R^9 ,

R^{15} and R^{16} are independently selected from the group consisting of H , $-OH$, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C(=O)R^9)$, hydroxyalkyl, and $-CO_2R^{10}$,

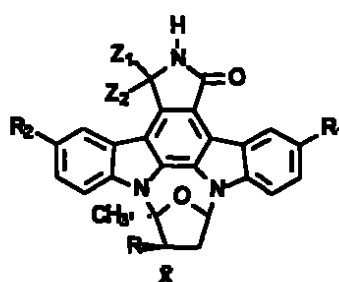
R^{17} is selected from the group consisting of H , alkyl, aryl, and heteroaryl,

A^1 and A^2 are selected from the group consisting of H , H , H , OR^2 , H , $-SR^2$, H , $-N(R^2)_2$, and a group wherein A^1 and A^2 together form a moiety selected from the group consisting of $=O$, $=S$, and $=NR^2$,

B^1 and B^2 are selected from the group consisting of H , H , H , $-OR^2$, H , $-SR^2$, H , $-N(R^2)_2$, and a group wherein B^1 and B^2 together form a moiety selected from the group consisting of $=O$, $=S$, and $=NR^2$,

with the proviso that at least one of the pairs A^1 and A^2 , or B^1 and B^2 , form $=O$

The present invention also provides methods for modulating the activity of a multiple lineage kinase protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula III



III

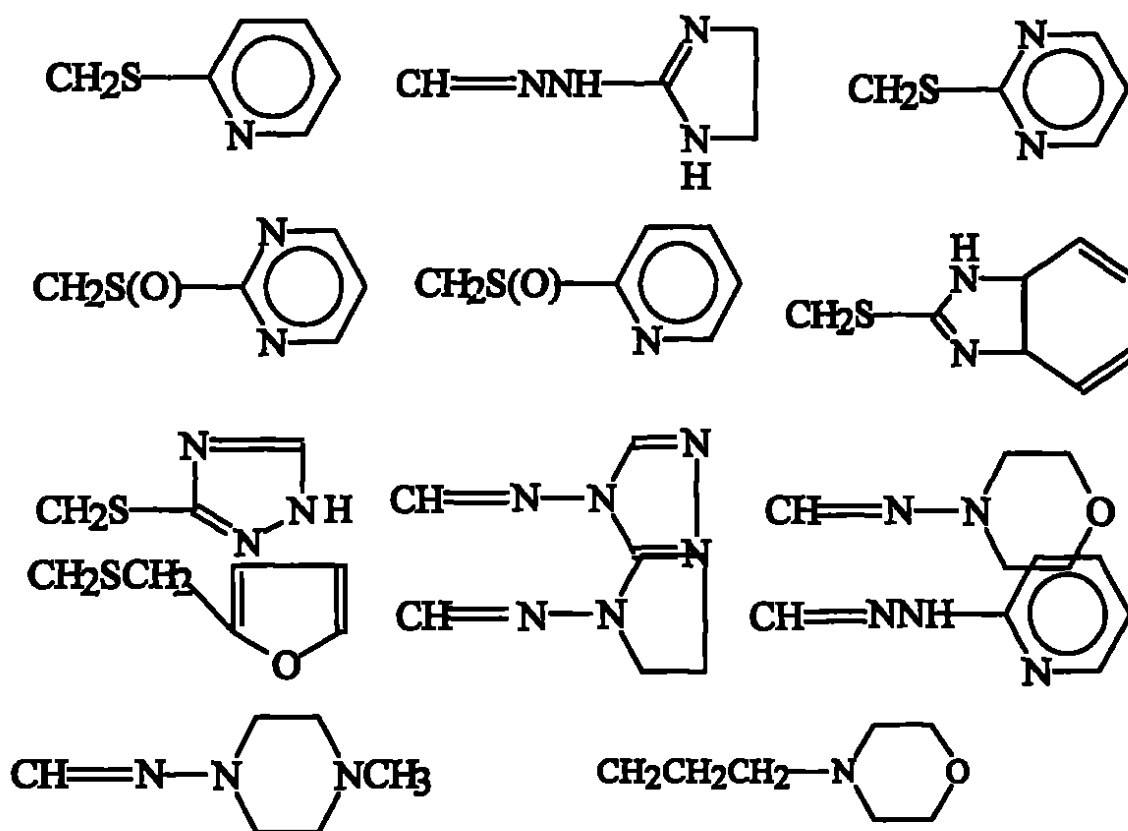
wherein

-8-

Z_1 is H and Z_2 is H or Z_1 and Z_2 together form =O,

R_1 is selected from the group consisting of H, Cl, $\text{CH}_2\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, Br, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\text{-n-C}_4\text{H}_9$, $\text{NHCONHC}_6\text{H}_5$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH_3 , $\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$, NHCO_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, OH, O-n-propyl, CH=NNH-C(=NH)NH_2 , $\text{CH=N-N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH-n-C}_4\text{H}_9$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$,

5



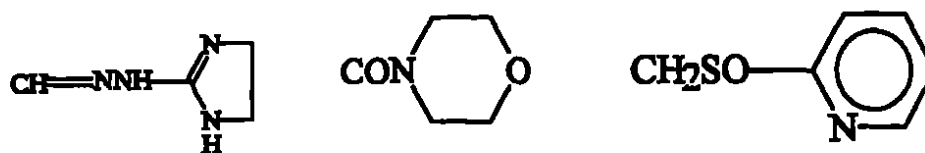
R_2 is selected from the group consisting of H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, and CH_2OH ,

10

X is selected from the group consisting of H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerineH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycine}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serine}$, CH_2SOCH_3 , CH=NOH , $\text{CH}_2\text{NH-Proline}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, CH=NNHC(=NH)NH_2 , $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, CH=NNHCONH_2 , $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O-}$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2\text{n-hexyl}$, CONHCH_3 , and $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, or one of the following formulas

15

-9-

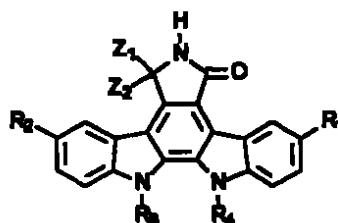


a n

d

R is selected from the group consisting of OH, and OCH₃

5 The present invention also provides methods of modulating the activity of a multiple lineage kinase protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula IV



IV

wherein

10

Z₁ is H and Z₂ is H or Z₁ and Z₂ together form =O,

R₁ is H or Br,

R₂ is H,

R₃ is H, CH₂CH=CH₂, CH₂CH₂CH₂OH, CH₂CH₂CH₂-N-morpholine

or

15

and

R₄ is H, CH₂CH=CH₂ or CH₂CH₂CH₂OH

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20

For the purpose of illustrating embodiments of the present invention, there are shown in the drawings certain features. It should be understood, however, that this invention is not limited to the precise embodiments shown.

Figure 1 is a schematic drawing showing a general preparation of bridged indenopyrrolo carbazoles

Figure 2 is a schematic drawing showing a general preparation of bridged indenopyrrolo carbazoles

-10-

Figure 3 is a schematic drawing showing a preparation of resin-bound indenopyrrolocarbazoles

Figure 4 is a schematic drawing showing the preparation of protected, soluble indenopyrrolocarbazoles

5 Figure 5 is a schematic drawing showing the preparation of intermediate V

Figure 6 is a schematic drawing showing the preparation of bridged indenopyrrolocarbazoles using method A

Figure 7 is a schematic drawing showing the preparation of bridged indenopyrrolocarbazoles using method B

10 Figure 8 is a schematic drawing showing the preparation of B ring-substituted bridged indenopyrrolocarbazoles

Figure 9 is a schematic drawing showing the derivatization of the E ring of bridged indenopyrrolocarbazoles

15 Figure 10 shows a graph of two separate experiments depicting the amount of viable neuronally differentiated PC-12 cells remaining after 5 days of culturing in the absence of NGF. Results are expressed as percent of NGF control within each group (vector control in the absence of NGF, n=12, all other groups, n=3). The difference between vector control and stable pools of cells expressing a dominant negative MLK-3 mutant in the absence of NGF is statistically significant as determined by a two-sided T-test ($p < 0.05$).

20 Figure 11A shows the phosphorylation of kinase-dead GST-SEK-1 by baculovirus-expressed FLAG-MLK-3 (mixture of full-length and kinase domain) using a radioactive gel-based assay.

25 Figure 11B shows ^{32}P -labeled phosphorylated myelin basic protein product formed as a result of a kinase reaction catalyzed by baculovirus-expressed FLAG-MLK-3 (mixture of full-length and kinase domain) or GST-MLK-3 kinase domain.

Figure 12 is an immunoblot analysis showing the phosphorylation of kinase-dead GST-SEK-1 by baculovirus-expressed FLAG-MLK-3 (mixture of full-length and kinase domain) as detected by a phospho-specific SEK-1 antibody.

30 Figure 13 shows the phosphorylation of myelin basic protein by bacterially-expressed GST-MLK-3 kinase domain using the (o) multiscreen trichloroacetic acid precipitation assay, or the (s) phosphocellulose membrane method.

Figure 14 shows a saturation binding curve of [³H]K252a incubated with lysate of MLK-3 baculovirus infected insect cells

Figure 15A shows the amount of ³²P-labelled c-jun in an immunoprecipitation/kinase reaction from cells overexpressing MLK-3, MLK-2 or DLK and treated with either 0.025% DMSO (control) or 500 nM K-252a.

Figure 15B shows a graph quantifying the percent activity remaining in immunoprecipitate/kinase reactions from samples described in FIG. 15A. Columns represent the average of duplicate samples where the error bar indicates the range of the mean.

Figure 15C shows the amount of ³²P-labelled c-jun in an immunoprecipitation/kinase reaction from cells overexpressing HA-JNK1 alone or with MEKK1 at various amounts of cDNA as indicated and treated with either 0.025% DMSO (control) or 500 nM of Compound III-3 (see, Table 3). Columns represent the average of duplicate samples where the error bar indicates the range of the mean.

Figure 16 shows that Compound III-3 promotes neuronal survival in a concentration-dependent fashion. Dissociated neurons were cultured from sympathetic ganglia (SG) (A), dorsal root ganglia (DRG) (B), ciliary ganglia (CG) (C), and motoneurons (MN) (D), in the presence or absence of the indicated trophic factors. Cells were counted 48 h after plating as described in materials and methods. Data represent means ± SD of triplicate or quadruplicate determinations. Shown is one of three experiments.

Figure 17 shows phase-contrast micrographs of cultures of E12 DRG (A, E), E9 sympathetic (B, F), E8 ciliary (C, G) and E5.5 motor neurons (D, H) after 48 h in culture (24 h for ciliary neurons) in the presence of the respective neurotrophic factor (20 ng/ml NGF for sympathetic and sensory neurons, 10 ng/ml CNTF for ciliary neurons, 30 µg/ml muscle extract (MEX) for motoneurons (A-D) or in the presence of 1 µM Compound III-3 (E-H). Bar = 200 µm.

Figure 18 shows a photomicrograph of dorsal root ganglia explants in vitro. Explants from chick DRG (E9) were plated in 96-well plates medium containing 0.05% BSA. After a 2 h attachment period, additions were made: (A) control DMSO, (B) 20 ng/ml NGF, (C) 250 nM Compound III-3. Forty-eight h later, medium was removed and explants were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline.

Figure 19 shows the number of chick lumbar motor neurons surviving on E10 after

daily treatment (E5-9) with specified doses of Compound III-3. Presented data are the mean $\pm$ S D of 5-6 animals/treatment group. The reported experiment was repeated two times. The data are from one representative experiment and represent one side of the lumbar column. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, Student t test between Compound III-3 and control groups with Bonferroni correction.

Figure 20 shows the number of motor neurons in the female rat spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) surviving on PN10 or PN60 after daily treatment (PN1-5) with Compound III-3, or control vehicle (5% Solutol™). On PN10 (A, B) or PN 60 (B), rats were sacrificed and the region of the spinal cord containing the SNB was dissected and processed for histology. Cresylecht violet-stained motor neurons were then counted in serial section of the lumbar 5-sacral 1 region of the spinal cord as described previously (Wingfield, *et al*, *Steroids*, 1975, 26, 311-327). Experimental data are the means $\pm$ S E M from 4-8 animals/treatment group.

Figure 21 shows loss of ChAT immunoreactivity after hypoglossal axotomy in the adult rat after treatment with Compound III-3. Photomicrographs of the hypoglossal nucleus after transection of the hypoglossal nerve and treatment with (A) vehicle solution along (5% Solutol™) and (B) 200 μ g of Compound III-3 applied at the site of the transection. (C) Number of ChAT-immunoreactive hypoglossal motor neurons after treatments described in (A) and (B) above. Results are expressed as the percentage of ChAT-immunoreactive motor neurons with 100% defined as that number of ChAT-immunoreactive motor neurons in the contralateral, unlesioned hypoglossal nucleus.

Figure 22 shows inhibition of the MLK-3 pathway demonstrates *in vivo* efficacy and blockage of phosphorylation events downstream. Figure 22A shows increase of substantia nigra tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons after MPTP lesion upon systematic administration of Compound III-3. Figure 22B is a representative immunoblot showing MPTP induced increase in levels of phosphorylated MKK4. Figure 22C depicts a representative immunoblot and ELISA showing attenuation of MPTP induced phosphorylated MKK4 in the presence of Compound III-3.

Figure 23 shows the induction of IL-2 in Jurkat cells. Figure 23A shows the time course of IL-2 induction. Figure 23B shows inhibition of IL-2 induction by Compound III-3. Figure 23C shows inhibition of IL-2 induction by Compound III-3 and Compound I-4.

DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

As employed above and throughout the disclosure, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings

5 "Apoptosis" refers to a specific morphological form of cell death characterized by fragmentation of cells and their nuclei into membrane-bound particles. Apoptosis can be triggered by, for example, treatment with apoptosis-inducing compounds such as etoposide, staurosporine, tumor necrosis factor- α , ceramide, and the like, or by conditions such as x-irradiation.

10 The term "cell death" refers to death of cells by apoptosis, necrotic, or other means widely known to those skilled in the art. "Cell death" can be characterized, for example, as a decrease in total cell numbers of cells or a decrease in cell viability compared to untreated control populations of cells. Compounds which "promote cell death" result in a decrease in cell numbers or a decrease in cell viability as compared to control populations. In contrast, compounds which "promote cell survival" result in an increase in cell numbers or cell viability, or which slow or reduce the rate of cell death.

15 The terms "reacts selectively" or "binds specifically" describe compounds which physically or chemically interact directly with an MLK protein. In contrast, compounds which do not "react selectively" or "bind specifically" may effect proteins downstream or upstream of the MLK protein, and thus may effect the activity of MLK proteins, but do not physically or chemically interact directly with an MLK protein.

20 The term "modulates" refers to increasing or decreasing an activity of a particular protein or substrate thereof

The present invention is directed, in part, to methods for identifying compounds which modulate activity of a MLK protein and promote either cell survival or cell death. Compounds which result in increased MLK protein activity may promote cell death, whereas compounds which result in decreased MLK protein activity may promote cell survival

25 The MLK protein can be any protein identified as belonging to the MLK class of proteins. Preferably, the MLK protein is selected from the group consisting of MLK1, MLK2, MLK3 (SPRK, PTK1), LZK, DLK (ZPK, MUK), and MLK6 which are described above. In preferred embodiments of the invention, the methods identify compounds which directly

interact or bind with the MLK protein as determined by binding assays, kinase assays, or other equivalent assays

In order to identify compounds which modulate MLK protein activity and promote cell survival or cell death, a cell or cells containing the MLK protein is contacted with the test compound. The contacting can take place in buffers or media well known to those skilled in the art. Alternately, the contacting can take place *in vivo*, in which an animal, such as, for example, a mouse or other suitable animal known to those skilled in the art, is contacted by administering a pharmaceutical composition comprising the test compound and pharmaceutically acceptable salt, carrier, or diluent. In addition, varying numbers of cells and concentrations of test compounds can be used. Whether the test compound increases or decreases activity of the MLK protein is determined. In addition, whether the test compound promotes cell survival or cell death is also determined.

The cells which are contacted with the test compounds can be any mammalian cell. Preferably, the cell is a neuronal cell. Preferably, the cell is involved in a neurodegenerative disease. For purposes of the present invention, a "neurodegenerative disease," a "neurodegenerative disorder," and a "neurodegenerative condition" are interchangeable and are used to describe any disease or disorder involving neuronal cells or cells involved in the neuronal system, including, but not limited to, Alzheimer's disease, motor neuron disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, cerebrovascular disease, ischemic conditions, AIDS dementia, epilepsy, Huntington's disease, and concussive or penetrating injuries to the brain or spinal cord.

MLK protein activity can be determined by a number of techniques. For example, MLK activity can be determined by measuring the activity of a substrate of the MLK protein. Such substrates are well known and readily discernable to those skilled in the art. Preferably, the substrate is a member of the mitogen activated protein kinase kinase family or mitogen activated protein kinase family or substrates further down the pathway which includes, but is not limited to, a protein selected from the group consisting of JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1, and the mammalian homolog of AEX-3, and also general substrates of Ser/Thr protein kinases such as myelin basic protein (MBP). Reagents and methods for measuring the activity of the substrates are also known to those skilled in the art.

426
193

-15-

The presence of MLK can also be determined by measuring the amount of the MLK protein or mRNA encoding the MLK protein. Reagents, including antibodies and oligonucleotide probes, as well as methods of measuring the amount of DNA or protein, including Northern and Western blots, are well known to those skilled in the art. MLK protein activity can also be determined by an *in vitro* kinase assay. *In vitro* kinase assays are well known to the skilled artisan. Other techniques for measuring protein activity are known to those skilled in the art and are intended to be covered by the present invention. Thus, one skilled in the art can determine whether the test compound modulates, *i.e.*, increases or decreases, MLK protein activity.

Whether or not the test compound promotes cell survival or cell death can be determined in a number of ways. Preferably, promotion of cell survival or cell death is determined by using cells at risk of dying and comparing the amount of cells which were contacted with the test compound and remain alive with the amount of cells which were not contacted with the test compound and remain alive. Preferably, the cells are primary embryonic motoneuron cells which are pre-programmed to die. Primary embryonic motoneuron cells are described in Maroney, *et al*, *J Neurosci*, 1998, 18, 104-111, which is incorporated herein by reference in its entirety. Primary embryonic motoneuron cells will die unless rescued by the test compound. Thus, a greater number of living motoneuron cells in the population of motoneuron cells treated with the test compound as compared to the number of motoneuron cells in the population of motoneuron cells which were not treated with the test compound is indicative of a test compound which promotes cell survival. In contrast, a lesser number of living motoneuron cells in the population of motoneuron cells treated with the test compound as compared to the number of living motoneuron cells in the population of motoneuron cells which were not treated with the test compound is indicative of a test compound which promotes cell death.

In another embodiment of the invention, normal cells, or wild-type cells, are converted to be cells at risk of dying by overexpressing the MLK protein, as described below in the Examples, and then contacted with the test compound. Cells overexpressing MLK proteins may die unless rescued by the test compound. Overexpression of MLK proteins can be accomplished using vectors capable of expressing the particular protein inside a cell. Expression vectors are well known to those skilled in the art. In addition, methods of

preparing expression vectors are also well known to those skilled in the art. Expression vectors which express any of the MLK proteins can be prepared in a manner similar to those described in the Examples. A greater number of living cells in the population of overexpressing cells treated with the test compound as compared to the number of living cells in the population of overexpressing cells which were not treated with the test compound is indicative of a test compound which promotes cell survival. In contrast, a lesser number of living cells in the population of overexpressing cells treated with the test compound as compared to the number of living cells in the population of overexpressing cells which were not treated with the test compound is indicative of a test compound which promotes cell death.

In another embodiment of the invention, promotion of cell survival is determined by observing or measuring a decrease in apoptosis. Cytoplasmic shrinkage and nuclear condensation are associated with apoptosis. Thus, one skilled in the art can measure a decrease in apoptosis by measuring or observing a decrease in cytoplasmic shrinkage and/or nuclear condensation. In addition, one skilled in the art can measure apoptosis by employing conventional staining techniques.

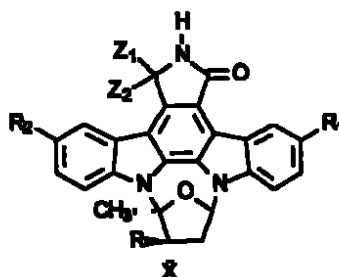
In other embodiments of the invention, normal, wild-type neuronal cells can be used to identify compounds which promote cell death. Normal neuronal cells will survive unless they are induced to die by the test compound. A lesser number of living cells in the population of normal cells treated with the test compound as compared to the number of living cells in the population of normal cells which were not treated with the test compound is indicative of a test compound which promotes cell death. In contrast, a greater or equal number of living cells in the population of normal cells treated with the test compound as compared to the number of living cells in the population of normal cells which were not treated with the test compound is not indicative of a test compound which promotes cell death.

The present invention is also directed, in part, to methods for modulating the activity of an MLK protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula G (denoted formula I herein) set forth in U.S. Patent No. 5,705,511, which is assigned to the assignee of the present application and is incorporated herein by reference in its entirety.

The present invention is also directed, in part, to methods for modulating the activity of an MLK protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a

-17-

compound having formula III below



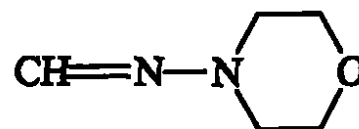
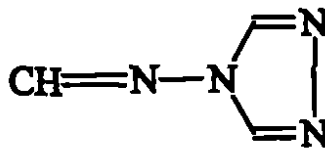
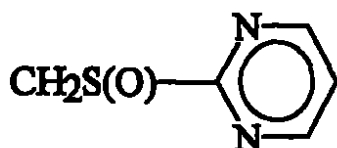
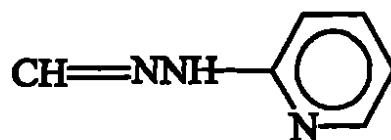
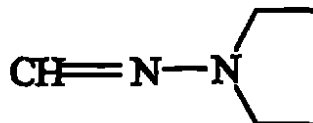
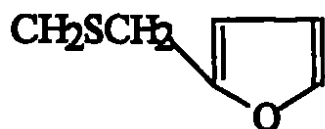
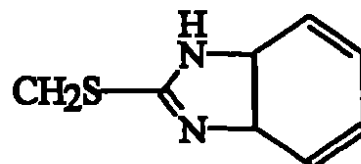
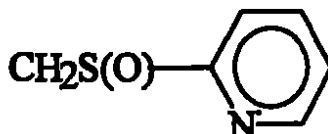
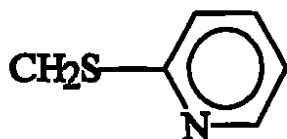
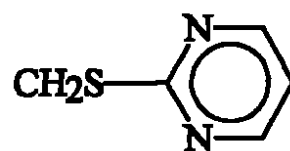
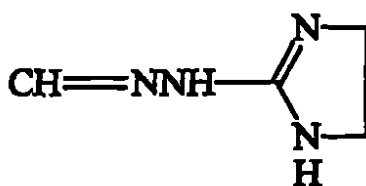
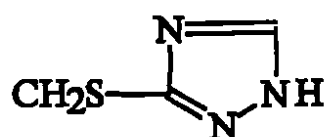
III

wherein

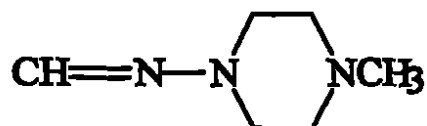
 Z_1 is H and Z_2 is H or Z_1 and Z_2 together form =O,

5

R_1 is selected from the group consisting of H, Cl, $\text{CH}_2\text{SO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, Br, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ -n-C₄H₉, $\text{NHCONHC}_6\text{H}_5$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, CH₃, $\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$, NHCO_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, OH, O n-propyl, $\text{CH}=\text{NNH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CH}=\text{N}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}-\text{n-C}_4\text{H}_9$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$,



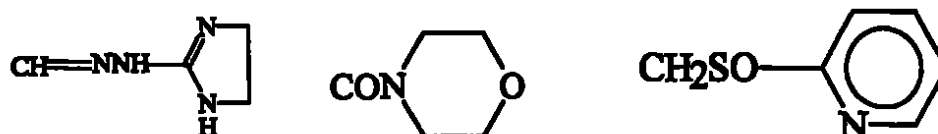
10



and

R_2 is selected from the group consisting of H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, and CH_2OH ,

X is selected from the group consisting of H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerineH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycine}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 , CONHC_3H_7 , $\text{CH}_2\text{NH-Serine}$, CH_2SOCH_3 , $\text{CH}=\text{NOH}$, $\text{CH}_2\text{NH-Proline}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{CH}=\text{NNHCONH}_2$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2n\text{-hexyl}$, CONHCH_3 , and $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, or one of the following formulas



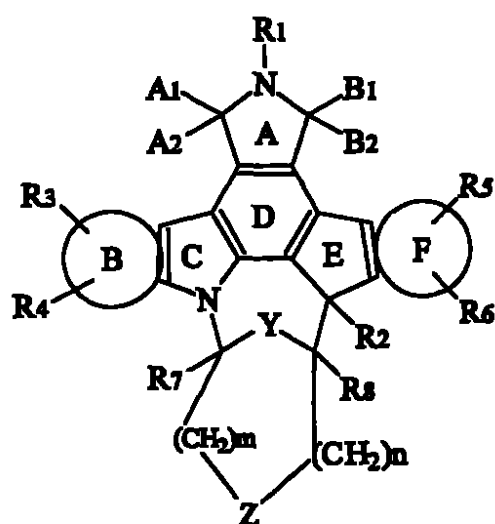
and

R is selected from the group consisting of OH, and OCH_3

In preferred embodiments of the invention, Z_1 and Z_2 are H, X is CO_2CH_3 , R_1 is $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, and R is OH. In other preferred embodiments of the invention, Z_1 and Z_2 are H, X is CO_2CH_3 , R_1 and R_2 are $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, and R is OH, or Z_1 and Z_2 are H, X is CO_2CH_3 , R_1 and R_2 are $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, and R is OH, or Z_1 , Z_2 , R_1 , and R_2 are H, X is CO_2CH_3 , and R is OH, or Z_1 , Z_2 , R_1 , and R_2 are H, X is $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, and R is OH, or Z_1 , Z_2 , and R_1 are H, R_2 is CH_2OH , X is CO_2CH_3 , and R is OH, or Z_1 , and Z_2 are H, R_1 and R_2 are $\text{H}_2\text{S}[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, X is CO_2CH_3 , and R is OH, or Z_1 , and Z_2 are H, R_1 is Br, R_2 is I, X is CO_2CH_3 , and R is OH, or Z_1 , and Z_2 are H, R_1 and R_2 are $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X is CO_2CH_3 , and R is OH, or Z_1 , Z_2 , R_1 , and R_2 are H, X is CO_2CH_3 , and R is OCH_3 , or Z_1 and Z_2 together form $=\text{O}$, R_1 and R_2 are Br, X is CO_2CH_3 , and R is OH.

The present invention is also directed, in part, to methods for modulating the activity of an MLK protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula II below

-19-



II

wherein

ring B and ring F, independently, and each together with the carbon atoms to which they are attached, are selected from the group consisting of

- a) an unsaturated 6-membered carbocyclic aromatic ring in which from 1 to 3 carbon atoms may be replaced by nitrogen atoms,
- b) an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring, and
- c) an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring in which either
 - 1) one carbon atom is replaced with an oxygen, nitrogen, or sulfur atom,
 - 2) two carbon atoms are replaced with a sulfur and a nitrogen atom, an oxygen and a nitrogen atom, or two nitrogen atoms, or
 - 3) three carbon atoms are replaced with three nitrogen atoms,

R¹ is selected from the group consisting of

- a) H, substituted or unsubstituted alkyl having from 1 to 4 carbons, substituted or unsubstituted aryl, substituted or unsubstituted arylalkyl, substituted or unsubstituted heteroaryl, or substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,
- b) -C(=O)R⁹, where R⁹ is selected from the group consisting of alkyl, aryl and heteroaryl,
- c) -OR¹⁰, where R¹⁰ is selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons,
- d) -C(=O)NH₂, -NR¹¹R¹², -(CH₂)_pNR¹¹R¹², -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOR¹⁰ and

$-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, wherein p is from 1 to 4, and wherein either

- 1) R^{11} and R^{12} are each independently selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons, or
- 2) R^{11} and R^{12} together form a linking group of the formula $-(\text{CH}_2)_r\text{X}^1-(\text{CH}_2)_r$, wherein X^1 is selected from the group consisting of $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, and $-\text{CH}_2-$,

R^2 is selected from the group consisting of H, alkyl having from 1 to 4 carbons, $-\text{OH}$, alkoxy having from 1 to 4 carbons, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, substituted or unsubstituted arylalkyl having from 6 to 10 carbons, and substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,

R^3 , R^4 , R^5 and R^6 are each independently selected from the group consisting of

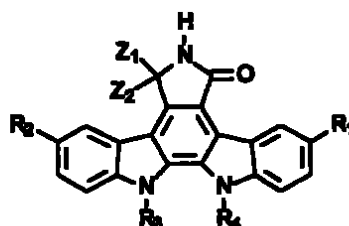
- a) H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, CF_3 , $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^9$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^2\text{R}^7$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-\text{CH}_2\text{OR}^{10}$, $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NR}^{10}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$,
- b) $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$, wherein R^{14} is the residue of an amino acid after the hydroxyl group of the carboxyl group is removed,
- c) $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CO}_2\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{CH}=\text{NOR}^2$, $-\text{CH}=\text{NR}^9$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$, or $-\text{CH}=\text{NNR}^2\text{R}^{2A}$ wherein R^{2A} is the same as R^2 ,
- d) $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^3-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$ wherein y is 0, 1 or 2,
- e) alkyl having from 1 to 8 carbons, alkenyl having from 2 to 8 carbons, and alkynyl having 2 to 8 carbons, wherein

- 1) each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is unsubstituted, or
- 2) each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is substituted with 1 to 3 groups selected from the group consisting of aryl having from 6 to 10 carbons, heteroaryl, arylalkoxy, heterocycloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkyloxy-alkoxy, hydroxyalkylthio, alkoxy-alkylthio, F, Cl, Br, I, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{CO}_2\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$, $-\text{X}^2(\text{CH}_2)_p\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{OCONHR}^2$, $-\text{O-tetrahydropyranyl}$, $-\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$, $-\text{NR}^{10}\text{C}(=\text{O})\text{R}^9$, $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$,

-22-

with the proviso that at least one of the pairs A¹ and A², or B¹ and B², form =O

The present invention is also directed, in part, to methods for modulating the activity of an MLK protein comprising contacting the protein or a cell containing the protein with a compound having formula IV below



IV

wherein

Z₁ is H and Z₂ is H or Z₁ and Z₂ together form =O,

R₁ is H or Br,

10 R₂ is H,

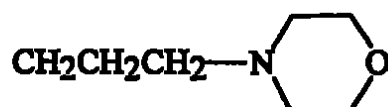
R₃ is H, CH₂CH=CH₂, CH₂CH₂CH₂OH, CH₂CH₂CH₂—N—

or

and

R₄ is H, CH₂CH=CH₂ or CH₂CH₂CH₂OH

15 In preferred embodiments of the invention, R₁, R₂, R₄, Z₁, and Z₂ are H and R₃ is CH₂CH=CH₂. In other preferred embodiments of the invention, R₁ is Br and R₂, R₃, R₄, Z₁, and Z₂ are H, or R₁, R₂, Z₁, and Z₂ are H and R₃ and R₄ are CH₂CH=CH₂, or R₁, R₂, R₃, Z₁, and Z₂ are H and R₄ is CH₂CH=CH₂, or R₁, R₂, Z₁, and Z₂ are H, and R₃ and R₄ are CH₂CH₂CH₂OH, or R₁, R₂, R₄, Z₁, and Z₂ are H, and R₃ is



20 The present invention also provides methods for identifying compounds which may be useful in treating neurodegenerative disorders comprising contacting a cell or cell extract containing a multiple lineage kinase protein with the compound and determining whether the compound decreases activity of the multiple lineage kinase protein. The cells, and extracts therefrom, include those described above. Compounds which are found by the present

methods (*i.e.*, those compounds which inhibit or reduce the activity of a multiple lineage kinase protein) may be useful to treat neurodegenerative disorders. The protein is preferably selected from the group consisting of multiple lineage kinase 1, multiple lineage kinase 2, multiple lineage kinase 3, leucine zipper bearing kinase, dual leucine zipper bearing kinase, and multiple lineage kinase 6. The cell is contacted *in vitro* or *in vivo*. Preferably, the protein activity is determined by measuring the activity or phosphorylation state of a substrate of said protein. Preferably, the substrate is selected from the group consisting of JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1, and the mammalian homolog of AEX-3, as well as general Ser/Thr substrates, such as, for example, myelin basic protein (MBP). The protein activity may also be determined by measuring the activity of a substrate of the protein, amount of a substrate of the protein, or mRNA encoding the substrate of the protein. Protein activity may also be determined by an *in vitro* kinase assay or binding assay. Cells are preferably primary embryonic motoneuron cells, cells which overexpress a multiple lineage kinase protein, or a neuronal cell, but can be any cell or extract therefrom. Preferably, compounds which directly bind the multiple lineage kinase protein are identified, as described above.

The present invention also provides methods for identifying compounds which may be useful in treating inflammation comprising contacting a cell or cell extract containing a multiple lineage kinase protein with the compound and determining whether the compound decreases activity of the multiple lineage kinase protein. The cells, and extracts therefrom, include those described above. Compounds which are found by the present methods (*i.e.*, those compounds which inhibit or reduce the activity of a multiple lineage kinase protein) may be useful to treat inflammation. The protein is preferably selected from the group consisting of multiple lineage kinase 1, multiple lineage kinase 2, multiple lineage kinase 3, leucine zipper bearing kinase, dual leucine zipper bearing kinase, and multiple lineage kinase 6. The cell is contacted *in vitro* or *in vivo*. Preferably, the protein activity is determined by measuring the activity or phosphorylation state of a substrate of said protein. Preferably, the substrate is selected from the group consisting of JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1, and the mammalian homolog of AEX-3, as well as general Ser/Thr substrates, such as, for example, myelin basic protein (MBP). The protein activity may also be

determined by measuring the activity of a substrate of the protein, amount of a substrate of the protein, or mRNA encoding the substrate of the protein. Protein activity may also be determined by an *in vitro* kinase assay or binding assay

5 Cells are preferably primary embryonic motoneuron cells, cells which overexpress a multiple lineage kinase protein, or a neuronal cell, but can be any cell or extract therefrom. Cells also include, but are not limited to, those involved in inflammation such as, for example, lymphocytes, macrophages and other white blood cells well known to those skilled in the art. Preferably, compounds which directly bind the multiple lineage kinase protein are identified

10 The present invention also provides methods for treating a mammal having or suspected of having a neurodegenerative disorder comprising administering to the mammal a compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity. A compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity includes, but is not limited to, compounds having formula I, II, III, and IV. Preferred compounds include those described above with respect to the method for screening compounds which modulate the activity of a multiple lineage kinase protein and either promote cell survival or cell death. A preferred mammal is a human. An individual may be suspected of having a neurodegenerative disease if the individual has symptoms of a particular neurodegenerative disease, is in a high-risk group, or has a family history of a neurodegenerative disease

15 The present invention also provides methods for treating a mammal having inflammation comprising administering to said mammal a compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity. A compound which inhibits or reduces multiple lineage kinase protein activity includes, but is not limited to, compounds having formula I, II, III, and IV. Preferred compounds include those described above with respect to the method for screening compounds which modulate the activity of a multiple lineage kinase protein and either promote cell survival or cell death. A preferred mammal is a human.

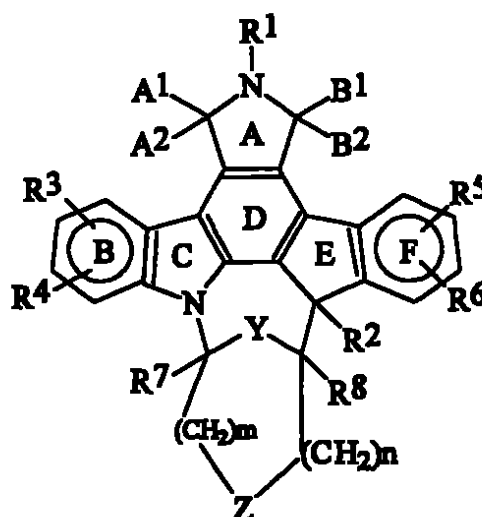
20 The contacting with compounds having formulas I-IV can take place in buffers or media, which are well known to those skilled in the art. Alternately, the contacting can take place by administration of a pharmaceutical composition containing the test compound and a pharmaceutically acceptable salt, carrier, or diluent to a suitable animal or mammal, such

-25-

as, for example, a mouse or other suitable animal known to those skilled in the art. In addition, varying numbers of cells and concentrations of compounds can be used. The cells which are contacted with the test compounds can be any mammalian cell. Preferably, the cell is a neuronal cell. Preferably, the cell is involved in a neurodegenerative disease, such as, for example, Alzheimer's disease, motor neuron disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, cerebrovascular disease, ischemic conditions, AIDS dementia, epilepsy, Huntington's disease, and concussive or penetrating injuries to the brain or spinal cord. Compounds having formula I, and methods of making the same, are described in U S Patent 5,705,511, which is incorporated herein by reference in its entirety. Compounds having formula III, and methods of making the same, are described in U S Patents 5,741,8098, 5, 621,100, 5,621,101, 5,461,146, and 5,756,494, and WO 97/46567, each of which is incorporated herein by reference in its entirety. Compounds having formula IV, and methods of making the same, are described in U S Patents 5,741,8098, 5, 621,100, 5,621,101, 5,461,146, and 5,756,494, and WO 97/46567, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Compounds having formula II include diastereomers and enantiomers around the carbon atoms to which the substituents R^2 , R^7 , and R^8 are attached.

Preferred bridged indenopyrrolocarbazoles are represented by formula II.



II

In some preferred embodiments of the compounds of formula II, R^1 is H. In further preferred embodiments, R^2 is H, hydroxyl, or substituted or unsubstituted alkyl.

-26-

In other preferred embodiments, R^3 , R^4 , R^5 , and R^6 are independently H, substituted or unsubstituted alkyl, halogen, substituted or unsubstituted alkoxy, substituted or unsubstituted amino, or substituted or unsubstituted aryl. In further preferred embodiments, R^7 and R^8 are independently H, or substituted or unsubstituted alkyl.

5 In some preferred embodiments, Y is O. In further preferred embodiments Z is a bond, O, S, or substituted or unsubstituted N. In still further preferred embodiments, m and n are independently 1 or 2. In some especially preferred embodiments, Y is O, Z is a bond or O, and m and n are independently 1 or 2.

In further preferred embodiments, A^1A^2 and B^1B^2 are =O or H,H.

10 In some especially preferred embodiments, R^1 , R^4 , R^6 , and R^7 are each H, Y is =O, n is 1, A^1A^2 and B^1B^2 are =O or H,H, R^2 is H, OH or lower alkyl, R^3 is H or substituted alkyl, R^5 and R^8 are each H or alkoxy, with methoxy being preferred, Z is a bond or O, and m is 1 or 2.

15 Some especially preferred embodiments of the compounds of formula II are compounds II-1, II-2, II-3, II-4a, II-4b, II-5, II-6, II-7a, II-7b, II-8, II-9, II-10, II-11, and II-12 set forth in Table 1, *infra*.

The compounds represented by formula II are hereinafter referred to as Compound (II).

20 As used herein, the term "carbocyclic" refers to cyclic groups in which the ring portion is composed solely of carbon atoms. The terms "heterocyclo" and "heterocyclic" refer to cyclic groups in which the ring portion includes at least one heteroatom such as O, N, or S.

25 As used herein, the term "alkyl" means a straight-chain, cyclic, or branched alkyl group having 1 to 8 carbon atoms, such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, isoamyl, neopentyl, 1-ethylpropyl, hexyl, octyl, cyclopropyl, and cyclopentyl. The alkyl moiety of alkyl-containing groups, such as alkoxy, alkoxycarbonyl, and alkylaminocarbonyl groups, has the same meaning as alkyl defined above. Lower alkyl groups, which are preferred, are alkyl groups as defined above which contain 1 to 4 carbons. The term "alkenyl" is intended to include straight-chain or branched hydrocarbon chains having at least one carbon-carbon double bond. Examples of alkenyl groups include ethenyl and propenyl groups. As used herein, the term "alkynyl" is intended to include straight-chain or branched hydrocarbon chains having at least one carbon-carbon triple bond. Examples of alkynyl groups include ethynyl and propynyl groups.

252
199

-27-

The acyl moiety of acyl-containing groups such as acyloxy groups is intended to include a straight-chain or branched alkanoyl group having 1 to 6 carbon atoms, such as formyl, acetyl, propanoyl, butyryl, valeryl, pivaloyl or hexanoyl

As used herein the term "aryl" means a group having 6 to 12 carbon atoms such as phenyl, biphenyl and naphthyl. Preferred aryl groups include unsubstituted or substituted phenyl and naphthyl groups. The term "heteroaryl" as used herein denotes an aryl group in which one or more ring carbon atom is replaced by a hetero (i.e., non-carbon) atom such as O, N or S. Preferred heteroaryl groups include pyridyl, pyrimidyl, pyrrolyl, furyl, thienyl, imidazolyl, triazolyl, tetrazolyl, quinolyl, isoquinolyl, benzimidazolyl, thiazolyl, pyrazolyl, and benzothiazolyl groups.

The term "aralkyl" (or "arylalkyl") is intended to denote a group having from 7 to 15 carbons, consisting of an alkyl group that bears an aryl group. Examples of aralkyl groups include benzyl, phenethyl, benzhydryl and naphthylmethyl groups.

Alkyl groups and alkyl moieties contained within substituent groups such as aralkyl, alkoxy, arylalkoxy, hydroxyalkoxy, alkoxy-alkoxy, hydroxy-alkylthio, alkoxy-alkylthio, alkylcarbonyloxy, hydroxyalkyl and acyloxy groups may be substituted or unsubstituted. A substituted alkyl group has 1 to 3 independently-selected substituents, preferably hydroxy, lower alkoxy, lower alkoxy-alkoxy, substituted or unsubstituted arylalkoxy-lower alkoxy, substituted or unsubstituted heteroarylalkoxy-lower alkoxy, substituted or unsubstituted arylalkoxy, substituted or unsubstituted heterocycloalkoxy, halogen, carboxyl, lower alkoxycarbonyl, nitro, amino, mono- or di-lower alkylamino, dioxolane, dioxane, dithiolane, dithione, furan, lactone, or lactam.

Substituted aryl, substituted heteroaryl and substituted aralkyl groups each have 1 to 3 independently-selected substituents that are preferably lower alkyl, hydroxy, lower alkoxy, carboxy, lower alkoxycarbonyl, nitro, amino, mono- or di-lower alkylamino, and halogen.

Heterocyclic groups formed with a nitrogen atom include pyrrolidinyl, piperidinyl, piperidino, morpholinyl, morpholino, thiomorpholino, N-methylpiperazinyl, indolyl, isoindolyl, imidazole, imidazoline, oxazoline, oxazole, triazole, thiazoline, thiazole, pyrazole, pyrazolone, and triazole groups. Heterocyclic groups formed with an oxygen atom includes furan, tetrahydrofuran, pyran, and tetrahydropyran groups.

"Hydroxyalkyl" groups are alkyl groups that have a hydroxyl group appended thereto

Halogens include fluorine, chlorine, bromine and iodine

As used herein, the term "heteroarylalkyl" means an arylalkyl group that contains a heteroatom. The term "oxy" denotes the presence of an oxygen atom. Thus, "alkoxy" groups are alkyl groups that are attached through an oxygen atom, and "carbonyloxy" groups are carbonyl groups that are attached through an oxygen atom.

The term "heterocycloalkoxy" means an alkoxy group that has a heterocyclo group attached to the alkyl moiety thereof, and the term "arylalkoxy" means an alkoxy group that has an aryl group attached to the alkyl moiety thereof. The term "alkylcarbonyloxy" means an group of formula $-O-C(=O)-alkyl$

As used herein, the term "alkyloxy-alkoxy" denotes an alkoxy group that contains an alkyloxy substituent attached to its alkyl moiety. The term "alkoxy-alkylthio" means an alkylthio group (i.e., a group of formula $-S-alkyl$) that contains an alkoxy substituent attached to its alkyl moiety. The term "hydroxy-alkylthio" means an alkylthio group (i.e., a group of formula $-S-alkyl$) that contains a hydroxy substituent attached to its alkyl moiety.

As used herein, the term "monosaccharide" has its accustomed meaning as a simple sugar.

As used herein, the term "amino acid" denotes a molecule containing both an amino group and a carboxyl group. Embodiments of amino acids include α -amino acids, i.e., carboxylic acids of general formula $HOOC-CH(NH_2)-(side\ chain)$

Side chains of amino acids include naturally occurring and non-naturally occurring moieties. Non-naturally occurring (i.e., unnatural) amino acid side chains are moieties that are used in place of naturally occurring amino acid side chains in, for example, amino acid analogs. See, for example, Lehninger, *Biochemistry*, Second Edition, Worth Publishers, Inc., 1975, pages 73-75, incorporated by reference herein.

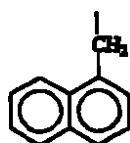
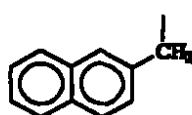
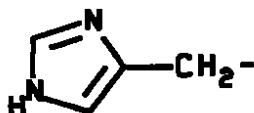
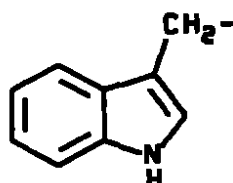
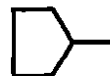
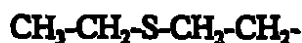
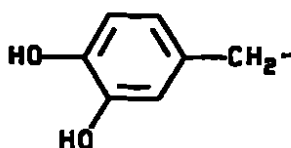
Preferred α -amino acids include glycine, alanine, proline, glutamic acid, and lysine, having the D configuration, the L configuration, or as a racemate.

The sidechains of further representative α -amino acids are shown below in Table 1

Table 1

| | |
|----------------|---------------------------------|
| CH_3- | $HS-CH_2-$ |
| $HO-CH_2-$ | $HO_2C-CH(NH_2)-CH_2-S-S-CH_2-$ |
| $C_6H_5-CH_2-$ | CH_3-CH_2- |

-29-



5

In some preferred embodiments, substituent groups for the compounds of formula II include the residue of an amino acid after removal of the hydroxyl moiety of the carboxyl group thereof, i.e., groups of formula $\text{-C(=O)-CH(NH}_2\text{)-(side chain)}$

Functional groups present on the compounds of formula II may contain protecting groups. For example, the amino acid sidechain substituents of the compounds of formula II can be substituted with protecting groups such as benzyloxycarbonyl or *t*-butoxycarbonyl groups. Protecting groups are known *per se* as chemical functional groups that can be selectively appended to and removed from functionalities, such as hydroxyl groups and

-30-

carboxyl groups These groups are present in a chemical compound to render such functionality inert to chemical reaction conditions to which the compound is exposed. Any of a variety of protecting groups may be employed with the present invention. One such protecting group is the benzyloxycarbonyl (Cbz, Z) group. Other preferred protecting groups according to the invention may be found in Greene, T W and Wuts, P G.M., *"Protective Groups in Organic Synthesis"* 2d. Ed, Wiley & Sons, 1991

The bridged indenopyrrolocarbazole compounds have evidenced important functional pharmacological activities which find utility in a variety of settings, including both research and therapeutic arenas. These derivatives are useful as therapeutic agents. The activities of the compounds show positive effects on the function and/or survival of trophic factor responsive cells. Effect on the function and/or survival of trophic factor responsive cells, e.g., cells of a neuronal lineage, has been demonstrated using any of the following assays: (1) cultured spinal cord choline acetyltransferase ("ChAT") assay, or (2) cultured basal forebrain neuron ChAT activity assay.

As used herein, the term "effect" when used to modify the terms "function" and "survival" means a positive or negative alteration or change. An effect which is positive can be referred to herein as an "enhancement" or "enhancing" and an effect which is negative can be referred to herein as "inhibition" or "inhibiting."

As used herein, the terms "enhance" or "enhancing" when used to modify the terms "function" or "survival" means that the presence of a bridged indenopyrrolocarbazole compound has a positive effect on the function and/or survival of a trophic factor responsive cell compared with a cell in the absence of the compound. For example, and not by way of limitation, with respect to the survival of, e.g., a cholinergic neuron, the compound would evidence enhancement of survival of a cholinergic neuronal population at risk of dying (due to, e.g., injury, a disease condition, a degenerative condition or natural progression) when compared to a cholinergic neuronal population not presented with such compound, if the treated population has a comparatively greater period of functionality than the non-treated population.

As used herein, "inhibit" and "inhibition" mean that a specified response of a designated material (e.g., enzymatic activity) is comparatively decreased in the presence of a bridged indenopyrrolocarbazole compound.

201

-31-

As used herein, the term "*trk*" refers to the family of high affinity neurotrophin receptors presently comprising *trkA*, *trkB*, and *trkC*, and other membrane associated proteins to which a neurotrophin can bind

5 As used herein, inhibition of VEGFR implies utility in, for example, diseases where angiogenesis plays important roles, such as cancer of solid tumors, endometriosis, diabetic retinopathy, psoriasis, hemangioblastoma, as well as other ocular diseases and cancers

Inhibition of *trk* implies utility in, for example, diseases of the prostate such as prostate cancer and benign prostate hyperplasia, and treatment of inflammatory pain

10 Inhibition of Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) implies utility in, for example, various forms of neoplasia, rheumatoid arthritis, pulmonary fibrosis, myelofibrosis, abnormal wound healing, diseases with cardiovascular end points, such as atherosclerosis, restenosis, post-angioplasty restenosis, etc

15 As used herein, the terms "cancer" and "cancerous" refer to any malignant proliferation of cells in a mammal. Examples include prostate, benign prostate hyperplasia, ovarian, breast, brain, lung, pancreatic, colorectal, gastric, stomach, solid tumors, head and neck, neuroblastoma, renal cell carcinoma, lymphoma, leukemia, other recognized malignancies of the hematopoietic systems, and other recognized cancers

20 As used herein the terms "neuron," "cell of neuronal lineage" and "neuronal cell" include, but are not limited to, a heterogeneous population of neuronal types having singular or multiple transmitters and/or singular or multiple functions, preferably, these are cholinergic and sensory neurons. As used herein, the phrase "cholinergic neuron" means neurons of the Central Nervous System (CNS) and Peripheral Nervous System (PNS) whose neurotransmitter is acetylcholine, exemplary are basal forebrain, striatal, and spinal cord neurons. As used herein, the phrase "sensory neuron" includes neurons responsive to
25 environmental cues (e.g., temperature, movement) from, e.g., skin, muscle and joints, exemplary is a neuron from the dorsal root ganglion

A "trophic factor-responsive cell," as defined herein, is a cell which includes a receptor to which a trophic factor can specifically bind, examples include neurons (e.g., cholinergic and sensory neurons) and non-neuronal cells (e.g., monocytes and neoplastic cells)

30 The bridged indenopyrrolocarbazole compounds described herein find utility in both research and therapeutic settings in, for example, inhibition of enzymatic activity. For

example, in a research environment, the compounds can be used in the development of assays and models for further enhancement of the understanding of the roles that inhibition of serine/threonine or tyrosine protein kinase (e g , PKC, *trk* tyrosine kinase) play in the mechanistic aspects of the associated disorders and diseases. In a therapeutic setting, the compounds which inhibit these enzymatic activities can be used to inhibit the deleterious consequences of these enzymes with respect to disorders such as cancer

As the Examples below demonstrate, inhibition of enzymatic activity using the bridged indenopyrrolocarbazole compounds can be determined using, for example, the following assays

- 1 *trkA* Tyrosine Kinase Activity inhibition assay,
- 2 Inhibition of NGF-stimulated *trk* phosphorylation in a whole cell preparation,
- 3 Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) kinase inhibition assay,
- 4 PKC Activity inhibition assay,
- 5 PDGFR inhibition assay

The disclosed bridged indenopyrrolocarbazole compounds can be used to enhance the function and/or survival of cells of neuronal lineage in a mammal, e g , a human. In these contexts, the compounds can be utilized individually or with other fused pyrrolocarbazoles and/or indolocarbazoles, or in combination with other beneficial molecules which also evidence the ability to effect the function and/or survival of a designated cell

A variety of neurological disorders are characterized by neuronal cells which are dying, injured, functionally compromised, undergoing axonal degeneration, at risk of dying, etc. These disorders include, but are not limited to Alzheimer's disease, motor neuron disorders (e g amyotrophic lateral sclerosis), Parkinson's disease, cerebrovascular disorders (e g., stroke, ischaemia), Huntington's disease, AIDS dementia, epilepsy, multiple sclerosis, peripheral neuropathies (e g , those affecting DRG neurons in chemotherapy-associated peripheral neuropathy) including diabetic neuropathy and AIDS peripheral neuropathy, disorders induced by excitatory amino acids, and disorders associated with concussive or penetrating injuries of the brain or spinal cord.

ChAT catalyzes the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine, and it is considered an enzymatic marker for a functional cholinergic neuron. A functional neuron is also capable

-33-

of survival Neuron survival is assayed by quantitation of the specific uptake and enzymatic conversion of a dye (e g , calcein AM) by living neurons

Because of their varied utilities, the compounds described herein, including those compounds identified by the methods described herein, find utility in a variety of settings

5 The compounds can be used in the development of *in vitro* models of neuronal cell survival, function, identification, or for the screening of other synthetic compounds which have activities similar to that of the compounds described herein, or compounds identified by the methods described herein. The compounds described herein, as well as those identified using the methods described herein, can be utilized in a research environment to investigate, define

10 and determine molecular targets associated with functional responses For example, by radiolabelling a bridged indenopyrrolocarbazole compound, or a compound identified by the methods described herein, associated with a specific cellular function (e g , mitogenesis), the target entity to which the derivative binds can be identified, isolated, and purified for characterization.

15 The compounds, those described herein as well as those identified by using the methods described herein, are useful, *inter alia*, not only for enhancing trophic factor-induced activities of trophic responsive cells, e g , cholinergic neurons, but also may function as survival promoting agents for other neuronal cell types, e g , dopaminergic or glutamatergic

20 Growth factor may regulate survival of neurons by signaling cascades downstream of the small GTP binding proteins that include, but are not limited to, ras, rac, and cdc42 (Denhardt, *Biochem J*, 1996, 318, 729) Specifically, activation of ras leads to phosphorylation and activation of extracellular receptor-activated kinase (ERK), which has been linked to biological growth and differentiation processes Stimulation of rac/cdc42 leads to an increase in activation of JNK and p38, responses that are associated with stress, apoptosis, and

25 inflammation. Although growth factor responses are primarily via the ERK pathway, affecting these latter processes may lead to alternative mechanisms of neuronal survival which may mimic growth factor enhancing survival properties (Xia et al , Science, 1995, 270, 1326)

The compounds may also function as survival promoting agents for neuronal and non-neuronal cells by mechanisms related to, but also distinct from, growth factor mediated

30 survival, for example, inhibition of the JNK and p38 pathways which may lead to survival by inhibition of apoptotic cell death processes

The present compounds are useful in the treatment of disorders associated with decreased ChAT activity or the death, injury to spinal cord motoneurons, and also have utility in, for example, diseases associated with apoptotic cell death of the central and peripheral nervous system, immune system and in inflammatory diseases.

5 The compounds described herein may also find utility in the treatment of disease states involving malignant cell proliferation, such as many cancers

10 The pharmaceutically acceptable salts of the compounds described herein, as well as those compounds identified by the present methods, include pharmaceutically acceptable acid addition salts, metal salts, ammonium salts, organic amine addition salts, and amino acid addition salts. Examples of the acid addition salts are inorganic acid addition salts such as hydrochloride, sulfate and phosphate, and organic acid addition salts such as acetate, maleate, fumarate, tartrate, citrate and lactate, examples of the metal salts are alkali metal salts such as lithium salt, sodium salt and potassium salt, alkaline earth metal salts such as magnesium salt and calcium salt, aluminum salt, and zinc salt; examples of the ammonium salts are
15 ammonium salt and tetramethylammonium salt, examples of the organic amine addition salts are salts with morpholine and piperidine, and examples of the amino acid addition salts are salts with glycine, phenylalanine, glutamic acid and lysine

20 Compounds provided herein, including those identified by the present methods, can be formulated into pharmaceutical compositions by admixture with pharmaceutically acceptable nontoxic excipients and carriers. Such compositions can be prepared for use in parenteral administration, particularly in the form of liquid solutions or suspensions, or oral administration, particularly in the form of tablets or capsules, or intranasally, particularly in the form of powders, nasal drops, or aerosols, or dermally, via, for example, trans-dermal patches

25 The composition can be conveniently administered in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the pharmaceutical art, for example, as described in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub Co, Easton, PA, 1980). Formulations for parenteral administration may contain as common excipients sterile water or saline, polyalkylene glycols such as polyethylene glycol, oils and vegetable origin, hydrogenated naphthalenes and the like. In particular, biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may
30

-35-

be useful excipients to control the release of the active compounds. Other potentially useful parenteral delivery systems for these active compounds include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes. Formulations for inhalation administration contain as excipients, for example, lactose, or may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or oily solutions for administration in the form of nasal drops, or as a gel to be applied intranasally. Formulations for parenteral administration may also include glycocholate for buccal administration, a salicylate for rectal administration, or citric acid for vaginal administration. Formulations for trans-dermal patches are preferably lipophilic emulsions.

The compounds of this invention can be employed as the sole active agent in a pharmaceutical composition. Alternatively, they can be used in combination with other active ingredients, e.g., other growth factors which facilitate neuronal survival or axonal regeneration in diseases or disorders.

The compounds of the invention and pharmaceutically acceptable salts thereof can be administered orally or non-orally, e.g., as an ointment or an injection. The concentrations of the compounds of this invention in a therapeutic composition can vary. The concentration will depend upon factors such as the total dosage of the drug to be administered, the chemical characteristics (e.g., hydrophobicity) of the compounds employed, the route of administration, the age, body weight and symptoms of a patient, etc. The compounds of this invention typically are provided in an aqueous physiological buffer solution containing about 0.1 to 10% w/v compound for parenteral administration. Typical dose ranges are from about 1 µg/kg to about 1 g/kg of body weight per day, a preferred dose range is from about 0.01 mg/kg to 100 mg/kg of body weight per day, and preferably about 0.1 to 20 mg/kg once to four times per day. A preferred dosage of drug to be administered is likely to depend on variables such as the type and extent of progression of the disease or disorder, the overall health status of the particular patient, the relative biological efficacy of the compound selected, and formulation of the compound excipient, and its route of administration.

The compounds of the invention, including test compound and compounds identified by the methods of the present invention, and pharmaceutically acceptable salts thereof can be administered alone, or in the form of various pharmaceutical compositions, according to the

pharmacological activity and the purpose of administration. The pharmaceutical compositions in accordance with the present invention can be prepared by uniformly mixing an effective amount of a compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof, as an active ingredient, with a pharmaceutically acceptable carrier. The carrier may take a wide range of forms according to the forms of composition suitable for administration. It is desired that such pharmaceutical compositions are prepared in a unit dose form suitable for oral or non-oral administration. The forms for non-oral administration include ointment and injection.

Tablets can be prepared using excipients such as lactose, glucose, sucrose, mannitol and methyl cellulose, disintegrating agents such as starch, sodium alginate, calcium carboxymethyl cellulose and crystalline cellulose, lubricants such as magnesium stearate and talc, binders such as gelatin, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, hydroxypropyl cellulose and methyl cellulose, surfactants such as sucrose fatty acid ester and sorbitol fatty acid ester, and the like in a conventional manner. It is preferred that each tablet contains 15-300 mg of the active ingredient.

Granules can be prepared using excipients such as lactose and sucrose, disintegrating agents such as starch, binders such as gelatin, and the like in a conventional manner. Powders can be prepared using excipients such as lactose and mannitol, and the like in a conventional manner. Capsules can be prepared using gelatin, water, sucrose, gum arabic, sorbitol, glycerin, crystalline cellulose, magnesium stearate, talc, and the like in a conventional manner. It is preferred that each capsule contains 15-300 mg of the active ingredient.

Syrup preparations can be prepared using sugars such as sucrose, water, ethanol, and the like in a conventional manner.

Ointment can be prepared using ointment bases such as vaseline, liquid paraffin, lanolin and macrogol, emulsifiers such as sodium lauryl lactate, benzalkonium chloride, sorbitan mono-fatty acid ester, sodium carboxymethyl cellulose and gum arabic, and the like in a conventional manner.

Injectable preparations can be prepared using solvents such as water, physiological saline, vegetable oils (e.g., olive oil and peanut oil), ethyl oleate and propylene glycol, solubilizing agents such as sodium benzoate, sodium salicylate and urethane, isotonicity agents such as sodium chloride and glucose, preservatives such as phenol, cresol, p-hydroxybenzoic ester and chlorobutanol, antioxidants such as ascorbic acid and sodium

pyrosulfite, and the like in a conventional manner

The invention is further illustrated by way of the following examples which are intended to elucidate the invention. These examples are not intended, nor are they to be construed, as limiting the scope of the disclosure

5 **EXAMPLES**

Example 1 General Description of the Synthetic Processes and Examples

10 The general synthetic route employed to prepare the bridged indenopyrrolocarbazoles of this invention having formula II is shown in Figures 1 and 2. The general procedures for synthesis of the indenopyrrolocarbazoles (III)/(VIII) can be performed as described in U S Patent No. 5,705,511, the disclosure of which is hereby incorporated by reference in its entirety. When R¹ is H, the lactam nitrogen of the indenopyrrolocarbazoles (III)/(VIII) is protected with an appropriate protecting group leading to (IV)/(IX). The protected compounds are treated with an appropriate base in anhydrous organic solvent(s), which results in the generation of a dark red solution which is believed to be the carbanion. Reaction of the
15 carbanion with a bi-functional reagent (V) results in an electrophilic addition to the C=Y bond of (V) leading to the initial intermediate (VI)/(X). Treatment of intermediate(s) (VI)/(X) and/or (VII)/(XI) with either a sulphonic acid or a Lewis acid, e.g. boron trifluoride etherate, provides the bridged indenopyrrolocarbazoles (I)/(II).

20 The lactam nitrogen protection strategy (shown in Figures 3 and 4) can be carried out by either an acid or a base-catalyzed process. The acid-catalyzed reaction can be carried out with a resin-bound reagent allowing immobilization of the indenopyrrolocarbazole (III)/(VIII) to a polymeric support, such as a polystyrene-based, Rink acid resin (XII) (Figure 3), providing (XIII). Alternatively, the acid-catalyzed reaction can be carried out with a soluble reagent to yield a compound (XIV) (Figure 4). The silyl-protected compound (XV) is
25 produced under base catalysis (Figure 4).

Figure 5 describes several methods for preparing intermediate (V). Procedure (a) describes the transformations of various acetals (XVI) to (XVII, Z=bond). For example, ester-acetal/ketal (XVI, D = COOR) is completely reduced to the corresponding alcohol and subsequently oxidized (e.g., Swern or Dess-Martin oxidation) to the aldehyde-acetal/ketal
30 (XVII, R² = H). Alternatively, ester-acetal/ketal (XVI, D = COOR) is partially reduced with

DIBAL to afford aldehyde (XVII, $R^3 = H$) directly. Similarly, reduction of nitrile-acetal (XVI, $D = CN$) with DIBAL gives aldehyde (XVII, $R^3 = H$). Keto-acetals/ketal are prepared by addition of Grignard reagents to Weinreb amide-acetal/ketal (XVI, $D = CON(OMe)Me$).

Intermediate (XVII, $Z = \text{bond}$) can also be obtained by a two step procedure outlined in Procedure (b). Addition of organometallic reagent (XIX) to acetal/ketal (XVIII) gives alkene (XX) which upon ozonolysis followed by a reductive workup affords keto-acetal/ketal (XVII). Preparation of intermediate (XVII, $Z = \text{heteroatom}$) by a two step procedure is outlined in Procedure (c). Coupling acetal (XXII) with alkene (XXI) followed by ozonolysis (with a reductive workup) of the resulting alkene gives keto-acetal/ketal (XVII). Alternatively, intermediate (XVII, $Z = \text{heteroatom}$) is prepared by a two step procedure outlined in Procedure (d). Reaction of compound (XXIV) with acetal/ketal (XVIII) gives (XXV) which is transformed to keto-acetal/ketal (XVII) by the methods described in Procedure (a). Condensation of keto-acetal/ketal (XVII) with hydroxylamines, hydrazines, N-alkyl-N-alkoxyamines, and amines gives intermediate (XXVI) bearing an electrophilic $C=N$ functionality.

The resin-bound indenopyrrolocarbazole (XIII) (Figure 6, Method A) is treated with an excess of a Grignard reagent as a base, which results in the generation of a dark red solution of the carbanion. Subsequent reaction with (V) leads to products derived from electrophilic addition to the $C=Y$ group. Aqueous workup and cleavage of the product(s) with dilute acid (1% TFA in methylene chloride) from the resin result in isolation of compound(s) (XXVII) and/or (XXVIII). Treatment of intermediate(s) (XXVII) and/or (XXVIII) with either a sulphonic acid or a Lewis acid, e.g. boron trifluoride etherate, provides the bridged indenopyrrolocarbazoles (II).

A similar strategy is employed for reaction of the soluble lactam protected intermediate, e.g. (XV) (Figure 7, Method B). However, in this case intermediate (XV) is treated with Triton B in pyridine as a base instead of the Grignard reagent. Intermediate(s) (XXIX) and/or (XXX) can be isolated with the lactam protecting group intact, which is amenable to chromatographic purification. As in method A, (Figure 6), treatment with a Lewis acid (such as boron trifluoride etherate) provides the bridged indenopyrrolocarbazoles (II), where $R^1 = H$.

The introduction of groups R^3 , R^4 , R^5 and R^6 can be carried out as described in US

Patents Nos 5,705,511 and 4,923,986, the disclosures of which are incorporated by reference in their entirety. An R^3 substituent can otherwise be introduced after the construction of the bridged indenopyrrolocarbazoles, as shown in Figure 8. The 3 position of the B ring is brominated with NBS providing compound (XXXI). A carbon fragment is subsequently introduced by employing palladium-catalyzed Stille, Suzuki, Heck, Kumada or Castro-Stephens reactions to provide compounds of the type (XXXII), (XXXIII), etc. In addition, compound (XXXI) can provide access to compounds where the bromine group is displaced with a heteroatom, e.g. an amine-based group by utilization of Buchwald's palladium catalyzed amination chemistry.

By an oxidative process, an oxygen linked group can be introduced at the indene carbon of the E ring, as shown in Figure 9, compound (XXXIV). This chemistry also results in oxidation of the methylene group of the lactam (A ring) providing an imide derivative, as shown.

Example 2 Preparation of Rink Resin-bound intermediates (XIII-A), (XIII-B) and (XIII-C), (Figure 3)

Example 2-A

A three neck round bottom flask fitted with an overhead mechanical stirrer and a Dean-Stark trap was sequentially charged with Rink acid resin XII (10.00 g, 0.64 mmol/g), 1-methyl-2-pyrrolidone (80 mL), benzene (350 mL), VIII-A ($A^1, A^2=H_2$, $B^1, B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$) (3.00 g) and *p*-toluenesulfonic acid (1.00 g). The reaction mixture was warmed to reflux for 20 hours, and then filtered. The resin was washed with THF (5 x 175 mL) and the filtrate set aside. The resin was then sequentially washed with DMSO (4 x 100 mL), 2% aqueous $NaHCO_3$ (4 x 100 mL), water (4 x 100 mL), DMSO (2 x 200 mL), THF (4 x 100 mL) and ethyl acetate (4 x 100 mL). The resin was dried under vacuum (24 hours) to afford 11.70 (0.47 mmol/g) of resin bound VIII-A, (XIII-A).

The original THF washings were evaporated, the residue was diluted with water (750 mL), and the resulting precipitate was filtered and sequentially washed with water, 2% aqueous $NaHCO_3$ (4 x 100 mL), and water (4 x 100 mL). After drying under vacuum, VIII-A (1.28 g) was recovered.

Example 2-B

In a similar manner, VIII-B ($A^1, A^2=O$, $B^1, B^2=H_2$, $R^3=R^4=R^5=R^6=H$), (0.5 g) was coupled to Rink acid resin XII (1.52 g) to afford 1.58 g of resin bound VIII-B, (XIII-B)

Example 2-C

5 In a similar manner, VIII-C ($A^1, A^2=H_2$, $B^1, B^2=O$, $R^3=R^4=R^5=H$, $R^6=10-OMe$), (1.02 g) was coupled to Rink acid resin XII (3.12 g) to afford 3.70 (0.46 mmol/g) of resin bound compound VIII-C, (XIII-C) along with recovered compound VIII-C (0.44 g)

Example 3 Preparation of Compound (II-1), Compound (II-2), Compound (II-3), Compound (II-4a), Compound (II-4b), Compound (II-6) and Compound (II-8) (Method A, Figure 6)

Example 3-A

To a suspension of (XIII-A), (1.25 g) in THF (24 mL) was added a 1.0 M solution of EtMgBr (6.25 mL in THF) and the reaction was stirred for 1 hour prior to the addition of HMPA (5.0 mL). After stirring for 10 minutes, diethoxybutyraldehyde (3.0 g) (which was prepared according to the literature procedure of Paquette, *et al*, *J Am Chem Soc*, 1997, 119, 9662-71), was added, and the reaction was stirred for 20 hours. The reaction was quenched with 10% aqueous NH_4Cl (5 mL) and filtered. The resin was successively washed with 10% aqueous NH_4Cl (3 x 10 mL), water (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), DMF (3 x 10 mL), water (3 x 10 mL), THF (3 x 10 mL), and ether (3 x 10 mL). The resin was dried under vacuum, taken up in methylene chloride (15 mL), and treated with trifluoroacetic acid (0.15 mL). After stirring for 1 hour, the reaction was filtered, and the filtrate was evaporated. The resulting residue was taken up in methylene chloride (20 mL) and treated with pyridinium tosylate (50 mg), and the resulting solution was stirred for 4 hours. At this time the reaction was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine, and dried over $MgSO_4$.

25 After filtration and solvent evaporation, the residue was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, eluted with 60% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid). The appropriate fractions were neutralized with $NaHCO_3$ and extracted into methylene chloride (3 x 50 mL) and dried over $MgSO_4$. After filtration and solvent evaporation, 70.2 mg of compound II-1 was obtained as a white powder which had the following characteristics ^{13}C

-41-

NMR (DMSO- d_6) δ 171.8, 143.3, 142.4, 141.4, 140.1, 140.0, 136.6, 129.2, 127.9, 127.4, 127.1, 126.8, 124.1 (2C), 122.7, 121.6, 121.5, 118.3, 112.1, 88.1, 79.2, 56.6, 45.6, 33.4, 24.8, ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.21 (d, $J=7.5$, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.98 (d, $J=7.7$, 1H), 7.86 (d, $J=8.3$, 1H), 7.71 (d, $J=7.3$, 1H), 7.49 (dd, $J=7.9, 7.4$, 1H), 7.41 (dd, $J=7.5, 7.4$, 1H), 7.36 - 7.27 (m, 2H), 6.86 (d, $J=6.0$, 1H), 5.63 - 5.58 (m, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.53 (d, $J=3.3$, 1H), 2.23 - 2.14 (m, 1H), 1.96 - 1.92 (m, 1H), 0.96 - 0.88 (m, 1H), 0.60 - 0.57 (m, 1H), MS m/z (M+H) calcd 379, obsd 379

Also isolated by preparative HPLC of this reaction product mixture was compound II-2 (0.5 mg) which had the following characteristics ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.17 (d, $J=8.1$, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.98 (d, $J=7.0$, 1H), 7.85 (d, $J=6.8$, 1H), 7.57 (d, $J=6.8$, 1H), 7.49 (dd, $J=7.9, 7.4$, 1H), 7.44 - 7.26 (m, 3H), 6.81 (d, $J=6.0$, 1H), 5.43 - 5.33 (m, 1H), 4.43 (s, 2H), 2.23 - 2.14 (m, 1H), 1.96 - 1.92 (m, 1H), 1.45 - 1.55 (m, 2H), 0.96 - 0.88 (m, 1H), 0.60 - 0.57 (m, 1H), 0.29 (t, $J=7.0$, 3H), MS m/z (M+H) calcd 407, obsd 407

Example 3-B

In a similar manner, as described above for compound II-1, resin (XIII-A) (70.3 mg) was treated with 1,1-diethoxy-2-pentanone (0.75 mL) (which was prepared according to the literature procedure of Sworn, *et al*, *J Org Chem*, 1988, 53, 4894-6), to afford compound II-3 (3.5 mg) which was isolated by preparative TLC (silica gel, eluted with 50% EtOAc/toluene) and had the following properties ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.42 (d, $J=8.2$, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.95 (d, $J=7.4$, 1H), 7.79 (d, $J=8.3$, 1H), 7.71 (d, $J=7.1$), 7.50 - 7.20 (m, 4H), 6.81 (d, $J=5.9$, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.46 (s, 1H), 2.35 - 2.20 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.75 - 1.60 (m, 1H), 1.25 - 1.00 (m, 1H), 0.35 - 0.15 (m, 1H), MS m/z (M+H) calcd 393, obsd 393

Example 3-C

In a similar manner, (XIII-A) (74.3 mg) was treated with 1,1-diethoxy-2-hexanone (which was prepared according to the literature procedure of Brenner, *J Org Chem*, 1961, 26, 22-7) (0.75 mL) to afford compound II-4a (2.10 mg) and compound II-4b (1.06 mg) which were individually isolated by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid) Compound II-4a had the following properties ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.30 (d, $J=8.3$, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.97 (d, $J=7.2$, 1H), 7.65 (d, $J=8.5$, 1H),

-42-

7.59 (d, $J = 7.5$), 7.48 (dd, $J = 7.8, 7.2$, 1H), 7.39 - 7.15 (m, 3H), 6.31 (dd, $J = 5.9, 5.5$, 1H), 5.02 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 0.88 (s, 3H) other aliphatic signals lost under solvent peaks, MS m/z (M+H) calcd 407, obsd 407. Compound II-4b had the following properties: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.43 (d, $J = 8.1$, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 7.3$, 1H), 7.75 - 7.65 (m, 2H), 7.49 (dd, $J = 7.0, 6.4$, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.2, 8.1$, 1H), 7.36 - 7.25 (m, 2H), 6.75 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.50 (s, 1H), 1.95 (s, 3H) other aliphatic signals lost under solvent peaks, MS m/z (M+H) calcd 407, obsd 407.

Example 3-D

In a similar manner, (XIII-C) (1.00 g) was treated with diethoxybutyraldehyde (3.65 g) to afford compound II-6 (87.8 mg) which was isolated by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 2.5 x 25 cm, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid) and had the following properties: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.09 (d, $J = 8.6$, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 7.4$, 1H), 7.84 (d, $J = 8.3$, 1H), 7.47 (dd, $J = 7.2, 7.0$, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.29 (dd, $J = 7.0, 7.0$, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.6, 1.9$, 1H), 6.83 (d, $J = 6.0$, 1H), 5.65 - 5.55 (m, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.48 (d, $J = 3.9$, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.25 - 2.10 (m, 1H), 2.08 - 1.85 (m, 1H), 0.96 - 0.75 (m, 1H), 0.65 - 0.50 (m, 1H), MS m/z (M+Na) calcd 431, obsd 431.

Example 3-E

In a similar manner, resin (XIII-B) (153.2 mg) was treated with diethoxybutyraldehyde (1.5 mL) to afford compound II-8 (3.6 mg) which was isolated by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 2.5 x 25 cm, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid) and had the following properties: ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 9.09 (d, $J = 7.9$, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.81 - 7.73 (m, 3H), 7.48 - 7.35 (m, 3H), 7.24 (dd, $J = 7.6, 7.5$, 1H), 6.85 (d, $J = 6.2$, 1H), 5.63 - 5.59 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.61 (d, $J = 3.6$, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.21 - 2.13 (m, 1H), 1.96 - 1.90 (m, 1H), 0.87 - 0.79 (m, 1H), 0.61 - 0.56 (m, 1H), MS m/z (M+H) calcd 379, obsd 379.

25 Example 4 Preparation of Compound II-7a and Compound II-7b (Method A, Figure 6)

Example 4-A

Preparation of (1,1-diethoxyethoxy)acetone

-43-

To a cold (0 °C) suspension of NaH (2.68 g, 60%) in THF (150 mL) was added a solution of 1,1-diethoxyethanol (which was prepared according to the literature procedure of Zirkle, *et al*, *J Org Chem*, 1961, 26, 395-407) (9.00 g) in THF (20 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour before adding methallyl chloride (8.0 mL).

5 The reaction mixture was heated to reflux overnight, cooled and filtered through a plug of celite. Solvent was removed by rotary evaporation, and the residue purified by column chromatography (silica, 20% ether/hexane) to give 1,1-diethoxyethyl methallyl ether (11.5, 90%). Ozonolysis of a chilled (-30 °C) solution of this ether (6.00 g) in EtOAc (80 mL) was carried out until no starting material was detectable by TLC (1 hour). At this time, the
10 reaction was purged with oxygen, treated with Pd(OH)₂ (150 mg) and stirred under an atmosphere of hydrogen overnight. The catalyst was filtered away, and the filtrate was concentrated by rotary evaporation. The resulting residue was purified by column chromatography (silica, 20 % EtOAc/hexane) to afford the title compound (4.53 g, 82 %).

Example 4-B

15 According to Method A (Figure 6), resin (XIII-A) (230.2 mg) was treated with EtMgBr (1.25 mL) followed by (1,1-diethoxyethoxy)acetone (Example 3-A) (1.2 mL). After workup and cleavage from the resin, a portion of the crude reaction product mixture (10.5 mg) was taken up in methylene chloride (20 mL) and treated with BF₃ etherate (20 µL). After stirring for 2.5 hours, the solution was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine prior to
20 drying over MgSO₄. After filtration and solvent removal, the resulting residue was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid) to afford compound II-7a (2.34 mg) and compound II-7b (1.34 mg). Compound (II-7a) had the following properties: ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.35 - 9.20 (m, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.0, 1H), 7.60 - 7.45 (m, 1H), 7.49 (dd, *J* = 7.7, 7.5, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.1, 1H),
25 7.37 - 7.26 (m, 3H), 6.22 (s, 1H), 5.20 - 4.85 (m, 1H), 4.47 (s, 1H), 3.67 (d, *J* = 12.7, 1H), 3.52 (d, *J* = 11.8, 1H), 3.40 (d, *J* = 12.7, 1H), 3.38 (d, *J* = 11.8, 1H), 1.91 (s, 3H), MS *m/z* (M+H) calcd 409, obsd 409. Compound II-7b had the following properties: ¹H NMR (CDCl₃) δ 9.58 -
9.22 (m, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.4, 1H), 7.60 - 7.40 (m, 3H), 7.37 - 7.27 (m, 3H), 7.21 (d, *J* = 8.1, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 5.10 - 4.80 (m, 1H), 4.59 (d, *J* = 13.5, 1H), 4.38 (dd, *J* = 13.5,
30 5.3, 1H), 4.21 (d, *J* = 13.1, 1H), 3.82 (d, *J* = 13.2, 1H), 1.13 (s, 3H), MS *m/z* (M+H) calcd 409,

obsd 409

Example 5 Preparation of Compound II-5 (Figure 8)

To a solution of compound II-1 (8.1 mg) in THF (2 mL) was added NBS (4.6 mg), and the reaction was stirred overnight. Additional NBS (4.5 mg) was added, and the reaction stirred for 2.5 hours. Insoluble material was filtered away and the filtrate was concentrated by rotary evaporation. The resulting residue was purified by column chromatography (C-18, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid). The appropriate fractions were neutralized with NaHCO₃ and extracted into methylene chloride (3 x 20 mL) and dried over MgSO₄. After filtration and solvent evaporation, compound II-5 (5.1 mg) was obtained as white powder which had the following characteristics: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9.22 (d, J = 7.4, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.86 (d, J = 8.7, 1H), 7.72 (d, J = 7.0, 1H), 7.63 (d, J = 7.8, 1H), 7.42 (dd, J = 7.5, 7.3, 1H), 7.35 (dd, J = 7.3, 7.2, 1H), 6.86 (d, J = 6.0, 1H), 5.63 - 5.58 (m, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.54 (d, J = 3.1, 1H), 2.30 - 2.14 (m, 1H), 2.00 - 1.82 (m, 1H), 0.96 - 0.88 (m, 1H), 0.62 - 0.50 (m, 1H), MS m/z (M+H) calcd 457/9 (1.1), obsd 457/9 (1.1).

Example 6. Preparation of Intermediate XV (Figure 4)

To a solution of VIII-A [A¹, A²=H₂, B¹, B²=O, R³=R⁴=R⁵=R⁶=H] (1.05 g) in DMF (25 mL) was added triethylamine (0.75 mL) and t-butyldimethylsilyl chloride (TBS-Cl) (0.65 g). After stirring for 3 hours, the reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ and extracted into EtOAc. The organic layer was washed with water and brine and dried over MgSO₄. After filtration and solvent evaporation, the resulting residue was triturated with ether to give compound XV (848 mg). The washings were evaporated to leave a residue that was purified by column chromatography (silica, 1% EtOAc/CH₂Cl₂) and gave additional product (502 mg, combined yield of 94%) that had the following spectral properties: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11.94 (s, 1H), 9.32 (d, J = 7.6, 1H), 8.03 (d, J = 7.7, 1H), 7.64 (d, J = 7.2, 1H), 7.58 (d, J = 8.1, 1H), 7.44 (dd, J = 7.7, 7.6, 1H), 7.39 (dd, J = 7.7, 7.6, 1H), 7.32 (d, J = 7.3, 1H), 7.25 (dd, J = 7.6, 7.3, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 0.99 (s, 9H), 0.46 (s, 6H), MS m/z (M+H) calcd 425, obsd 425.

Example 7 Preparation of Compound II-1 via Method B (Figure 7)

-45-

A solution of Triton B in pyridine (0.45 M) was prepared by dissolving a 40% solution of Triton B in methanol (10 mL) in pyridine (10 mL). Solvent was removed under reduced pressure (20 mm Hg) to a final volume of ~ 8 mL. The residue was diluted with pyridine to 50 mL, filtered and stored under nitrogen. A solution of XV (20.3 mg) in pyridine (2.0 mL) was flushed with argon and treated with 300 μ L of Triton B (0.45 M in pyridine) and diethoxybutyraldehyde (50 μ L). After stirring for 2 hours, the reaction was extracted into EtOAc, washed with 1N aqueous HCl, brine and dried over $MgSO_4$. After filtration and solvent evaporation, the adduct was taken up in CH_2Cl_2 (10 mL) and treated with BF_3 etherate (10 μ L). After stirring for 2.0 h, the solution was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine prior to drying over $MgSO_4$. Removal of solvent by rotary evaporation gave a residue that was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 2.5 x 25 cm, 65% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid). The appropriate fractions were neutralized with $NaHCO_3$ and extracted into methylene chloride (3 x 20 mL) and dried over $MgSO_4$. After filtration and solvent evaporation, II-1 (11.8 mg, 65% yield) was obtained whose ^1H NMR and MS spectra and HPLC retention time were identical to material prepared and isolated by method A, described in Example 3-A.

Example 8 Preparation of Compound II-9 (Figure 8)

To a suspension of bromo compound II-5 (6.2 mg) in 1-propanol (4.0 mL) was added 3-aminophenylboric acid (3.8 mg). After stirring for 0.25 hour, $Pd(OAc)_2$ (2.0 mg), Ph_3P (4.8 mg), Na_2CO_3 (2.8 mg), and water (2.0 mL) were sequentially added. The mixture was heated at reflux for 0.75 hour, cooled, extracted into CH_2Cl_2 , and washed with water and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, and solvent was removed by rotary evaporation to give a residue that was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 2.5 x 25 cm, 50% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid). The appropriate fractions were neutralized with $NaHCO_3$ and extracted into methylene chloride (3 x 20 mL) and dried over $MgSO_4$. After filtration and solvent evaporation, compound II-9 (3.1 mg, 49% yield) was obtained and had the following spectral properties: ^1H NMR ($DMSO-d_6$) δ 9.22 (d, $J=7.5$, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.00 - 7.25 (m, 8H), 7.12 (dd, $J=7.1, 7.0$, 1H), 6.95 - 6.80 (m, 3H), 6.53 (d, $J=6.0$, 1H), 5.63 - 5.58 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.55 (s, 1H), 2.25 - 2.10 (m, 1H), 1.95 - 1.90 (m, 1H), 0.98 - 0.88 (m, 1H), 0.65 - 0.57 (m, 1H), MS m/z (M+H) calcd 470, obsd 470.

Example 9 Preparation of Compound II-10 (Figure 9)

To a solution of compound II-1 (50 mg) in DMSO (1 mL) was added NaCN (43 mg), and the mixture was warmed to 145 °C for 1 hour. The mixture was cooled, extracted into EtOAc, and washed with water (3 x 20 mL) and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated to give a residue that was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 2.5 x 25 cm, 55% MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid). The appropriate fractions were neutralized with NaHCO₃, extracted into methylene chloride (3 x 20 mL), and dried over MgSO₄. After filtration and solvent evaporation, compound II-10 (27 mg, 50% yield) was obtained and had the following spectral properties: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11.4 (s, 1H), 8.86 (d, J = 7.9, 1H), 8.79 (d, J = 7.6, 1H), 7.90 (d, J = 8.3, 1H), 7.62 - 7.55 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 7.6, 7.4, 3H), 7.40 (dd, J = 7.4, 7.3, 1H), 7.35 (dd, J = 7.5, 7.4, 1H), 6.86 (d, J = 6.0, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.40 - 5.30 (m, 1H), 2.25 - 2.14 (m, 1H), 2.03 - 1.90 (m, 1H), 1.10 - 0.98 (m, 1H), 0.82 - 0.77 (m, 1H).

Example 10 Preparation of Compound II-11 (Method A, Figure 6)

According to the method A, resin (XIIIa) (150.2 mg) was reacted with EtMgBr (1.0 mL) followed by ethyl 2,5-dioxopentanoate (Schmidt, *et al*, *Synthesis*, 1993, 809) (1.5 mL). After workup and cleavage from the resin, the crude reaction product mixture was taken up in methylene chloride (20 mL) and treated with BF₃ etherate (20 µL). After stirring for 2.5 hours, the solution was washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine prior to drying over MgSO₄. After filtration and solvent removal, the resulting residue was purified by preparative HPLC (Zorbax RX-8, 4 x 25 cm, 55%-75% gradient MeCN/water w/ 0.1% trifluoroacetic acid) to afford compound II-11 (64 mg) which had the following properties: ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9.36 (d, J = 7.7, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.7, 1H), 7.83 (d, J = 8.3, 1H), 7.58-7.15 (m, 5H), 6.97 (d, J = 5.9, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.82 (s, 1H), 4.48 (q, J = 7.1, 2H), 2.42 - 1.91 (m, 2H), 1.37 (t, 3H, J = 7.1), 1.25 - 0.63 (m, 2H).

Example 11 Preparation of Compound II-12

A solution of compound II-11 (34 mg) in THF (2 mL) was treated with a 2 M solution of LiBH₄ (1.0 mL in THF) and the reaction was stirred for 1.5 h. The reaction was quenched

210
209

-47-

by the addition of 1 N aqueous HCl (4 mL) After stirring for 20 minutes, 10% aqueous NaOH (15 mL) was added and the mixture was extracted into methylene chloride (3 x 10 mL) After drying over MgSO₄, the mixture was filtered and solvent evaporated to afford compound II-12 (0.32 mg) which had the following properties ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9.35 (d, J = 7.7, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.98 (d, J = 7.7, 1H), 7.83 (d, J = 8.2, 1H), 7.75 (d, J = 8.2, 1H), 7.50 - 7.25 (m, 4H), 6.84 (d, J = 7.7, 1H), 6.11 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.71 (s, 1H), 4.50 - 4.40 (m, 1H), 4.30 - 4.20 (m, 1H), 2.42 - 1.91 (m, 2H), 1.25 - 0.63 (m, 2H), MS m/z (M+H) calcd 409, obsd 409

Example 12 Enhancement of Spinal Cord ChAT Activity

ChAT is a specific biochemical marker for functional cholinergic neurons Cholinergic neurons represent a major cholinergic input into the hippocampal formation, olfactory nucleus, interpeduncular nucleus, cortex, amygdala, and parts of the thalamus In the spinal cord, the motoneurons are cholinergic neurons which contain ChAT (Pheips, *et al*, *J Comp Neurol*, 1988, 273, 459-472) ChAT activity has been used to study the effects of neurotrophins (e.g., NGF or NT-3) on the survival and/or function of cholinergic neurons The ChAT assay also serves as an indication of the regulation of ChAT levels within cholinergic neurons

Methods Fetal rat spinal cord cells were dissociated, and experiments were performed as described (Smith, *et al*, *J Cell Biology*, 1985, 101, 1608-1621, Glicksman, *et al*, *J Neurochem*, 1993, 61, 210-221) Dissociated cells were prepared from spinal cords dissected from rats (embryonic day 14-15) by standard trypsin dissociation techniques (Smith *et al*, *supra*.) Cells were plated at 6 x 10⁵ cells/cm² on poly-L-ornithine coated plastic tissue culture wells in serum-free N2 medium supplemented with 0.05% bovine serum albumin (BSA) (Bottenstein, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 514-517) Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air for 48 hours ChAT activity was measured after 2 days *in vitro* using a modification of the Fonnum procedure (Fonnum, *Neurochem.*, 1975, 24, 407-409) according to McManaman, *et al* and Glicksman, *et al* (McManaman, *et al*, *Develop Biol*, 1988, 125, 311-320, Glicksman, *et al*, *J Neurochem.*, *supra*.)

Compounds having formula II described in the examples are listed in Table 2 Values

for R¹, R⁴, R⁶, and R⁷ are H, Y is O, and n is 1

Table 2

| Compound | A ₁ A ₂ | B ₁ B ₂ | R ₂ | R ₃ | R ₅ | R ₆ | Z | m |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------|----------------|-------------------------|------|---|
| II-1 | O | H,H | H | H | H | H | bond | 1 |
| II-2 | O | H,H | Et | H | H | H | bond | 1 |
| II-3 | O | H,H | H | H | H | Me | bond | 1 |
| II-4a | O | H,H | H | H | H | Me | bond | 2 |
| II-4b | O | H,H | H | H | H | Me | bond | 2 |
| II-5 | O | H,H | H | Br | H | Me | bond | 1 |
| II-6 | O | H,H | H | H | 10-OMe | H | bond | 1 |
| II-7a | O | H,H | H | H | H | Me | O | 1 |
| II-7b | O | H,H | H | H | H | Me | O | 1 |
| II-8 | H,H | O | H | H | H | H | bond | 1 |
| II-9 | O | H,H | H | 3'-NH ₂ -Ph | H | H | bond | 1 |
| II-10 | O | O | OH | H | H | H | bond | 1 |
| II-11 | O | H,H | H | H | H | CO ₂ -
Et | bond | 1 |
| II-12 | O | H,H | H | H | H | CH ₂ -
OH | bond | 1 |

Example 13 pCDNA3-EE-MLK3, pCDNA3-EE-MLK3(K144R)

5 MLK3 was cloned as described (Lee, *et al* , *Oncogene*, 1993, 8, 3403-3410, Ezoe, *et al* , *Oncogene*, 1994, 9, 935-938) cDNA was prepared from 200 ng polyadenylated melanocyte mRNA and 5% of the reaction was used as template to amplify a repertoire of PTK cDNAs using mixtures of either two or four highly degenerate oligonucleotide primers derived from the consensus sequences of the conserved VIb and IX subdomains of known PTKs PTK1, 5'-CGGATCCACMGIGAYYT-3' (SEQ ID NO 1), PTK2, 5'-GGAATTCCAWAGGACCASACRTC-3' (SEQ ID NO 2), PTK3, 5'-CGGATCCRTICAYMGIGAYYTIGCIGCIMGLAA-3' (SEQ ID NO 3), PTK4, 5'-GGAATTIAYIGGAWAIGWCCALACRTCISW-3' (SEQ ID NO 4) Forty cycles of PCR were carried out using Taq DNA polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer/Cetus) and an

10

-49-

automated DNA thermal cycler, each cycle consisted of 40 s at 94°C, 2 min at 37°C and 3 min at 63°C. The products of eight PCRs were pooled, treated with DNA polymerase (Klenow), cleaved with BamHI plus EcoRI and electrophoresed in a 5% polyacrylamide gel. Ethidium bromide staining identified a predominant 200-230 bp band which was excised, eluted and cloned into M13mp18. In one experiment, part of the PCR amplified cDNA was not cleaved, but instead was cloned blunt into M13mp18 cleaved with SmaI. Nucleotide sequences were determined by chain-termination sequencing method.

One cDNA, identified as PTK1, was used as a probe to screen human melanoma and melanocyte cDNA libraries. A clone, designated PTK1-3.2, included the entire open reading frame of 2541 nt, coding for a protein of 847 amino acids. This cDNA was cut with NcoI, blunted with DNA polymerase (Klenow), cut again with EcoRI and ligated into the vector pCDNA3-EE cut with BamHI, blunted and then cut with EcoRI. The vector pCDNA3-EE was constructed by inserting into the HindIII/BamHI site an oligo that codes for a start codon followed by the EE epitope, MEEEEYMPME (SEQ ID NO 5) (Grussenmeyer, *et al*, *Proc Natl Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 7952-7954). The kinase-dead version of MLK3 was made by making the mutation K144R using PCR employing a previously published technique (Chen, *et al*, *Biotechniques*, 1994, 17, 657-659). The first, mutagenic oligo was 5'-GTGGCTGTGCGGGCAGCTCGCCAG-3' (SEQ ID NO 6) and the second oligo was 5'-GAGACCCTGGATCTCGCGCTT-3' (SEQ ID NO 7). Using MLK3 as a template, these oligos were used in PCR to generate a fragment of 806 bp and employed in a second PCR reaction using a T7 primer as the other primer and MLK3 as the template to generate a fragment of 1285 bp. The fragment was separated by agarose gel electrophoresis, isolated, cloned into pGEM-5 (Promega) and sequenced. The fragment was excised with HindIII and HpaI, and inserted into pCDNA3-EE-MLK3 cut with HindIII and HpaI. An additional point mutation was detected at nucleotide 1342. To correct this, a PflM1 fragment (nt 1093-1418) was excised from the wild-type MLK3 and used to replace the identical fragment in the K144R mutated MLK3.

Example 14 pFB-FLAG-MLK3

To obtain MLK3 protein, the cDNA was cloned into the baculoviral expression vector pFB-FLAG. MLK3 was excised from PTK1-3.2 by digestion with NcoI, blunted with DNA

-50-

polymerase (Klenow), cut again with NotI and ligated into pFB-FLAG digested with StuI and NotI. pFB-FLAG is derived from pFB (Life Technologies) and has the coding sequence for the FLAG epitope (Hopp, *et al.*, *Biotechnology*, 1988, 6, 1205-1210) with a start codon, MDYKDDDDK (SEQ ID NO 8), added to the polylinker in the BamHI site.

5 **Example 15 pFB-GST-MLK3(KD)**

Baculoviral expression of the kinase domain of MLK3 was achieved by excising the MLK3 fragment from the pGEXKG-MLK3(KD) using EcoRI and XhoI and ligating it into a pFB vector cut with EcoRI and XhoI in which the coding sequence for glutathione S-transferase (GST) had been cloned upstream. This was achieved by obtaining the GST coding
10 sequence and polylinker from the pGEXKG vector by PCR using the vector as a template (Guan, *et al.*, *Anal Biochem*, 1991, 192, 262-267). The 5' oligo for PCR created a BglII restriction site at the 5' end of the fragment. This isolated fragment was then digested with BglII and HindIII and ligated into pFB digested with BamHI and HindIII.

Example 16 pGEXKG-MLK3(KD)

15 A cDNA fragment that included both the MLK3 kinase domain and a portion of the leucine zipper (nt 736-1791) was obtained by PCR using the PTK1 cDNA. The isolated fragment was digested with the restriction enzymes EcoRI and XhoI, sites that were included in the PCR oligos, and cloned into pGEX-KG digested with EcoRI and XhoI. This fragment in pGEX-KG was then shortened by PCR to include only the kinase domain (nt 736-1638).

20 **Example 17 pKH3-MLK2, pKH3-MLK2(KA)**

MLK2 was cloned using degenerate PCR (Dorow, *et al.*, *Eur J Biochem.*, 1993, 213, 701-710, Dorow, *et al.*, *Eur J Biochem.*, 1995, 234, 492-500). Segments of cDNAs encoding catalytic subdomains of protein kinases expressed in the epithelial tumor cell line Colo 16 were amplified from RNA by reverse transcriptase PCR. Degenerate PCR primers were based
25 in sequences encoding conserved motifs in subdomains VIB and VIII of the epidermal-growth-factor receptor family kinase catalytic domains. Sequences of the primers were as follows: forward primer, 5'-CGGATCCGTG(A)CACC(A)GT(CG)G(A)ACC(T)T-3' (SEQ ID NO 9), reverse primer, 5'-GGAATTCACCA(G)TAA(G)CTCCAG(C)ACATC-3' (SEQ ID NO 10).

-51-

Several PCR products were cloned into M13 and sequenced using a T7 Super-Base sequencing kit (Bresatec). One 216-bp PCR product was used as a probe to screen a human colon λ gt11 cDNA library (Clontech, catalog #HL10346). The fragment was random-primed labeled, hybridization was performed at 65°C and the filters washed to a stringency of 0.2X NaCl/Citrate (150 mM sodium chloride, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) and 0.5% SDS at 65°C. Filters were autoradiographed for 16h at -70°C on Kodak XAR-5 film. Four clones were isolated and the longest, 1.2 kb, was used to reprobe the same library using the same conditions. Four more clones were selected and one of these clones represented a 1034 bp fragment of MLK2. This clone was used to probe a human brain λ gt10 library. Approximately 500,000 clones were screened and one 3454 bp clone was isolated, representing the entire coding region of MLK2.

MLK2 was cloned, from the ATG to the polyA tail, into the vector pKH3 between the BamHI and EcoRI sites in two steps as there is a BamHI site in the middle of the MLK2 sequence. The vector pKH3 was constructed by inserting three copies of the HA epitope tag followed by a BamHI site between the XbaI and EcoRI sites of the pRK7 polylinker. To make the mutagenized version, K125A, the MLK2 5' BamHI fragment was cloned into the Promega pAlter vector and mutated as recommended by the manufacturer. The fragment was then cloned back into the MLK2 pKH3 vector.

Example 18 pcDNA3-HA-JNK1

JNK1 cDNA was obtained as described (Coso, *et al*, *Cell*, 1995, 81, 1137-1146). The cDNA was obtained by PCR using as a template human skeletal muscle cDNA (Invitrogen) and was cloned into the BglII / SalI sites of pcDNA3-HA, a modified pcDNA3 expression plasmid encoding the HA epitope (Wilson, *et al*, *Cell*, 1984, 37, 767-778). This was then excised from pcDNA3, including the HA epitope, and ligated into pGEX-4T3 (Pharmacia). The JNK1 cDNA was excised from the pGEX-4T3 construct as a BglII / SalI fragment and ligated into pcDNA3-HA, a vector with the HA epitope added in the HindIII/BamHI site of pcDNA3.

Example 19 pFLAG-DLK

DLK was cloned into the expression vector pcDNA3 with the FLAG epitope added as

-52-

described (Holzman, *et al*, *J Biol Chem.*, 1994, 269, 30808-30817) A fragment of the cDNA for DLK was isolated by degenerate oligonucleotide-based PCR cloning Total RNA was extracted from embryonic day 13.5 kidneys (32 organs) and embryonic day 17.5 kidneys (16 organs) using a commercially prepared phenol/guanidine isothiocyanate reagent method according to the directions of the manufacturer (TRIzol Reagent, Life Technologies, Inc) Following digestion with RNase-free DNase I, total RNA was reverse transcribed with RNase H-reverse transcriptase (Superscript, Life Technologies, Inc) from an oligo(dT) synthetic oligonucleotide primer to single-stranded cDNA. Degenerate oligonucleotide primers corresponding to the protein tyrosine kinase catalytic subdomains V_{ib} and IX originally designed by Wilks (Wilks, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86, 1603-1607) were modified to 5' *Eco*RI and *Hind*III sites, respectively (5'-ATAATTC(GT)GC(TAGC)GCCA(GA)GTC(TAGC)CGGTG-3' (SEQ ID NO 11), 5'-ATAAGCTTCC(TC)(AG)T(GC)AAGTGGA(TC)(GC)GC(AGC)CC(CT)GA-3') (SEQ ID NO 12) Forty PCR cycles were carried out for 1.5 min at 94°C, 2 min at 37°C, and 3 min at 63°C Fresh reagents were added and an additional 40 cycles were completed before a final 10-min extension at 72°C The resultant 200-210-bp DNA amplification product was gel isolated, subcloned into a prepared pGEM7zf(+) plasmid (Promega), and transformed into *Escherichia coli* Miniprep plasmid DNA was prepared from transformed bacteria and a portion digested with *Eco*RI and *Hind*III restriction endonucleases, clones containing inserts were sequenced

The 195-bp DLK cDNA fragment obtained from the degenerate PCR was radiolabeled and used to screen approximately 1×10^6 recombinants of a Uni-ZAP II (Stratagene, La Jolla, CA), oligo(dT)-primed adult mouse brain cDNA library (Holzman, *et al*, *Mol Cell Biol*, 1990, 10, 5830-5838) Filters were hybridized in a buffer consisting of 50% formamide, 5 x SSC, 3 x Denhardt's solution, 0.25% SDS, 1 mg/ml polyadenylic acid, and 200 mg/ml salmon sperm DNA at 42°C Filters were washed once at room temperature in 2 x SSC, 0.2% SDS and twice for 30 min at 65°C Twenty five unique clones were identified, 10 clones were purified to homogeneity, *in vivo* excised according to the protocol of the manufacturer and restriction mapped The two longest clones (3401 and 3397 bp, respectively, differing only at their 5' termini) were sequenced along both strands over their entire length

The full-length *Nsi*I-*Xho*I DLK cDNA fragment (3401 bp) was subcloned into the

-53-

cytomegalovirus promoter based eukaryotic expression vector pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) (construct designated pcDNA3-DLK) Next, a NH₂-Met FLAG epitope (DYKDDDDK) (SEQ ID NO 13) tagged construct (pFLAG-DLK) was made. The PCR was used to amplify cDNA fragments which encoded a 5' *Hind*III site, DLK's Kozak's consensus sequence including the initiation ATG, the FLAG epitope, and DLK cDNA open reading frame sequence extending from nucleotide 88 to an internal *Eco*RI site at nucleotide 758 (HPLC purified synthetic oligonucleotides used in equimolar quantities 5'-ATAAAGCTTCCAGAGGCCATGGACTACAAGGACGACGATGAC AAGGCCTGCCTCCATGAAACCCGAACA-3' (SEQ ID NO 14) for the FLAG construct sense primer and 5'-GACAGGGCGGCCGGCTCT-3' (SEQ ID NO 15) for the antisense primer) Gel purified *Hind*III and *Eco*RI-digested amplified fragments were subcloned into the *Hind*III-*Eco*RI to prepared pcDNA3-DLK plasmid Constructs were sequenced along both strands to assure Taq polymerase fidelity and maintenance of reading frame

Example 20 pcDNA3-MLK1

The 5' portion of MLK1 was obtained from the EST database (accession # AA160611) This clone was a fusion between MLK1 and another cDNA of unknown identity It contained previously unpublished 5' sequence of MLK1 along with part of the previously published kinase domain of MLK1 (Dorow, *et al*, *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710) The MLK1 cDNA sequence from the EST clone is as follows

GAATTCGGCACGAGAGGACTCGCAGGTGTCCGGCGACGAG
GGCTGGTGGACCGGGCAGCTGAACCAGCGGGTGGGCATCTTCCCCAGCAA
CTACGTGACCCCGCGCAGCGCCTTCTCCAGCCGCTGCCAGCCCGGCGGGCG
AGGACCCAGTTGCTACCCGCCCATTCAGTTGTTAGAAATTGATTTTGCG
GAGCTCACCTTGGAAGAGATTATTGGCATCGGGGGCTTTGGGAAGGTCTA
TCGTGCTTTCTGGATAGGGGATGAGGTTGCTGTGAAAGCAGCTCGCCACG
ACCCTGATGAGGACATCAGCCAGACCATAGAGAATGTTTCGCCAAGAGGCC
AAGCTCTTCGCCATGCTGAAGCACCCCAACATCATTGCCCTAAGAGGGGT
ATGTCTGAAGGAGCCCAACCTCTGCTTGGTCATGGAGTTTGCTCGTGGAG
GACCTTTGAATAGAGTGTTATCTGGGAAAAGGATTCCCCAGACATCCTG
GTGAATTGGGCTGTGCAGATTGCCAGAGGGATGAACTACTTACATGATGA

-54-

GGCAATTGTTCCCATCATCCACCGCGACCTTAAGTCCAGCAAC (SEQ ID NO 16)

This translates to NSAREDSQVS GDEGWWTGQL NQRVGIFPSN YVTPRSAFSS
RCQPGGEDPS CYPPIQLLEI DFAELTLEEI IGIGGFGKVY RAFWIGDEVA
VKAARHDPDE DISQTIENVR QEAKLFAMLK HPNIALRGV CLKEPNLCLV
MEFARGGPLN RVLSGKRIPP DILVNWAVQI ARGMNYLHDE AIVPIHRDL KSSN
(SEQ ID NO 17)

The 3' portion of MLK1 was initially cloned by degenerate PCR as previously published (Dorow, *et al*, *Eur J Biochem*, 1993, 213, 701-710) The protocol for cloning the 3' portion of MLK1 was as described above for MLK2 with the following exceptions Of the four clones obtained from rescreening the library with the 1.2 kb clone, three of the four clones represented MLK1 None of the clones included the entire kinase domain, which was obtained by PCR.

Phage from 1 µl aliquots of amplified libraries (normal human colonic epithelia and human T84 colonic carcinoma cell line cDNA in λ Uni-ZAPXR (Stratagene, cat #937204) were lysed by suspending in 20 µl water and snap freezing A 5 µl sample of the lysed phage was used as a PCR template in two reactions for each library Primers representing the vectors were taken from nucleotide sequences flanking the cloning sites In the case of the T84 colonic cell line library, the T3 and T7 sequencing primers (Promega) were used. In each reaction, one primer was from the 3' - 5' strand of the MLK1 gene, approximately 100bp from the 5' end of the known sequence The second primer was one of the two vector primers PCR reactions contained 1X PCR buffer, 2.5 mM magnesium chloride, 1U *Taq* polymerase (all from Bresatec), 0.2 mM dNTP and 0.4 mM each primer in a total of 50 µL Reaction conditions were 60s at 95°C, 90s at 52°C, 90s at 72°C for 30 cycles with a 15 min extension time in the final cycle PCR products were cloned and sequenced as described above The longest clone from the library screen and a PCR fragment that included additional MLK1 sequence were ligated together to create a 1.08 kb MLK1 cDNA in pUC18

The MLK1 clone from the EST database was provided in the vector pBluescript (Stratagene) The MLK1 cDNA from the colonic library was ligated into the EST clone by digestion of the former with *EcoRI*, blunted with Klenow, then cut with *AflIII* This isolated fragment was cloned into the MLK1 cDNA from the EST database cut with *XhoI*, blunted with Klenow, and cut with *AflIII* This new construct was then excised from pBluescript by

-55-

digestion with Not1 and Apa1 and ligated into pcDNA3-EE also cut with Not1 and Apa1 All cloning junctions were sequence verified.

Example 21 *E.coli* expression of GST-MLK3_{KD}

pGEXKG-MLK3(KD) was transformed into *E. coli* strain BL21 by electroporation. Bacteria containing the plasmid were inoculated into a 15 liter Applikon fermenter in 10 liter volume of the following rich medium 1.95 g/L K₂HPO₄, 0.9 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L ampicillin, 0.3 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.92 g/L MgSO₄·7H₂O, 42.7 mg/L Na citrate, 21.8 mg/L FeSO₄·7H₂O, 0.5 mL Pichia trace metals (Higgins, *et al.*, *Methods Molecular Biology*, 1998, 103, 149-177), 20 g/L casamino acids, 40 g/L glycerol, 25.5 mg/L CaCl₂. Bacteria were grown overnight at 800 rpm/68% dissolved oxygen/30°C until the culture reached an OD₆₀₀ = 4.4. Recombinant protein production was induced by the addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside, with continued fermentation at 25°C for up to 6 hr. Bacteria were then recovered by centrifugation and the cell paste stored frozen at -20°C until purification.

Example 22 Purification of bacterial GST-MLK3_{KD}

Partially-purified GST-MLK3_{KD} was prepared by sonicating 100 gm of bacterial cell paste in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol (DTT), pH 7.5 (buffer A). The solution was made 1% with Triton X-100, then stirred on ice for 1 hr. Supernatant solution after centrifugation for 45 min at 20,000 x g was mixed for 1 hr on ice with 10 mL glutathione Sepharose 4B resin (Pharmacia) equilibrated in buffer A. Pelleted resin was washed twice with 12.5x volume buffer A, then eluted with 20 mL 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM DTT (buffer B), containing 20 mM glutathione, pH 7.5. Protein was dialyzed overnight against buffer B and stored in aliquots at -80°C.

Example 23 Baculoviral expression of FLAG-MLK3 and GST-MLK3_{KD}

Recombinant baculoviruses expressing the FLAG-MLK3 and GST-MLK3_{KD} were produced from their respective transfer vectors, pFB-FLAG-MLK3 and pFB-GST-MLK3_{KD} using the BAC-TO-BAC system (Life Technologies) according to the instruction manual. Suspension cultures of Sf21 cells (Vaughn, *et al.*, *In Vitro*, 1977, 13, 213-217) were grown at 27°C/120 rpm in supplemented Grace's medium (Hink, *Nature*, 1970, 226, 466-467) with

-56-

10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) To produce recombinant FLAG-MLK3, Sf21 cells at a density of 1.5×10^6 cells/mL supplemented Grace's medium containing 5% FBS were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 3.1 and harvested at 39 hr after infection. To produce recombinant GST-MLK3_{KD}, Sf21 cells at a density of 1.5×10^6 cells/mL supplemented Grace's medium containing 5% FBS were infected with an MOI of 2 and harvested at 41 hr after infection. In both cases, pelleted cells were resuspended in buffer comprised of 10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.5 mM Pefabloc SC, 5 μ M pepstatin, 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin, pH 7.4. Supernatant solution after centrifugation for 1 hr at 147,000 xg was readjusted to pH 7.4 with 3 M Tris base and then stored at -70°C prior to purification.

Example 24 Purification of baculoviral GST-MLK3_{KD}

Partially-purified baculoviral GST-MLK3_{KD} was prepared by glutathione affinity chromatography. For 10 mL of cell extract (26.6 mg total protein), 1 mL of glutathione Sepharose 4B resin (Pharmacia) equilibrated in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4 (buffer C) was added and protein was allowed to bind for 45 min at 4°C. Resin was then washed in column format with 30 column volumes of buffer C, then eluted with 5 column volumes of buffer C containing 20 mM glutathione. Pooled final product was dialyzed overnight against buffer C and stored in aliquots at -70°C.

Example 25 Purification of baculoviral FLAG-MLK3

Partially-purified baculoviral FLAG-MLK3 was prepared by antibody affinity chromatography. Protein from 15 mL of extract (19.5 mg total protein) with an additional 0.1M NaCl was bound onto a 0.25 mL column of M2 monoclonal FLAG peptide antibody coupled to agarose resin (Sigma) by repeated loading (three times total). Resin had been equilibrated with a 5 column volume wash of 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4 (TBS), a 3 column volume wash of 0.1M glycine, pH 3.5, followed by another 5 column volume wash with TBS, prior to chromatography. Recombinant protein was primarily eluted by 5 column volumes of 0.2 mM FLAG peptide (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) (SEQ ID NO 18) in TBS. Protein was stored in aliquots at -80°C prior to assay.

214

-57-

Example 26: Dominant Negative Mutant A dominant negative mutant of the MLK family blocks death in differentiated PC12 cells following removal of Nerve Growth Factor

The PC-12 cell line derived from a rat pheochromocytoma tumor has been used extensively as a neuronal cell model for examining the molecular events leading to neuronal death (for review, see Troy, *et al*, *Adv Neurology*, 1997, 103-111) Nerve Growth Factor (NGF) induces PC-12 cells to differentiate into a sympathetic neuronal phenotype (Greene, *Cell Biol*, 1978, 78, 747-755) NGF differentiated PC-12 cells are dependent on NGF for survival and undergo a morphologically described apoptotic death upon removal of NGF from the culture medium. A cell system was developed to determine the effect of members of the mixed lineage kinase family on PC-12 cell death following NGF withdrawal PC-12 cells were transfected with cDNA coding for a dominant negative (DN) mutant of MLK-3 using Pfx lipid transfer system as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA) A stable pool of transfectant expressing DN-MLK-3 was selected using G418 sulfate (Mediatech Inc, Herndon, VA) Approximately 30% of cells in these pools express DN MLK3 as determined by immunohistochemistry Pools of cells stably expressing the mutant kinase were plated on polyornithine/laminin (10 ug/ml each in phosphate buffered saline) coated tissue culture 96-well format plates at a density of 2×10^4 cells/well and treated with 100 ng/ml of NGF for 7 days Medium containing the NGF was removed, the cell monolayer washed with phosphate buffered saline and medium containing neutralizing NGF antibody (cat. #N6655, Sigma, St. Louis, MO) at a final dilution of 1:1000 was replaced for 1-5 days Cell viability was quantified by a cell viability assay using the conversion of the tetrazolium salt, MTS, to a colored formazan which was read at an absorbance of 570 nm on a CytoFluor 2350 (Millipore, Bedford, MA) as recommended by manufacturer (Promega, Madison, WI) Stable pools expressing DN-MLK-3 were partially rescued from cell death caused by NGF withdrawal (Figure 10)

Example 27 Assay for enzymatic activity of recombinant MLK protein

In order to demonstrate that the MLK protein expressed in either the baculovirus or bacterial expression system is enzymatically active, several assay formats may be utilized. The MLK protein may be a full-length construct or a kinase domain expressed in either a

-58-

baculovirus or bacterial expression system. The assay may be antibody-based such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), time-resolved fluorescence (TRF), or fluorescence polarization (FP). The antibody may be monoclonal or polyclonal with reactivity towards phosphoserine, phosphothreonine, or phospho-specific substrate. Alternatively, a non-antibody-based method may be used such as radioactive gel-based assay (see Figure 11), multiscreen trichloroacetic acid (TCA) precipitation assay (Figure 13), scintillation proximity assay (SPA), flashplate method, or phosphocellulose filter assay format (Figure 13). The assay may be designed to monitor direct phosphorylation of a substrate or a coupled assay system utilizing the downstream kinases in the signaling pathway. The substrate may be a specific substrate such as SEK-1 or a relatively non-specific substrate such as myelin basic protein (MBP).

Example 28 Kinase Assays

(1) Radioactive Gel-Based Kinase Assay

The kinase activity of MLK-3 was assayed by monitoring the incorporation of ^{32}P from $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ into a substrate of MLK (e.g. kinase-dead SEK-1, myelin basic protein). The 50- μl assay mixture contained Buffer A (20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -glycerol phosphate, 5 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM dithiothreitol), 15 mM MgCl_2 , 100 μM ATP, 10 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, and 0.1 μg kinase-dead SEK-1 substrate (Stressgen, Inc., bound glutathione S-transferase-SEK-1 (GST-SEK-1) was released from glutathione-agarose beads with 10 mM glutathione, pH 8.0) or 25 μg MBP (Sigma Chemical Co.). Reaction was initiated by adding MLK protein (kinase domain or preparation containing both full-length and kinase domain) or control protein. The mixture was incubated for 30 min at 30°C . At the end of the reaction 2x reducing sample buffer was added. The mixture was boiled for 5 min, loaded onto either a 12% SDS-PAGE gel (using MBP as substrate) or 8% gel (SEK-1 as substrate). After electrophoresis, the gel was dried. Quantitation of phosphate incorporation into substrate, SEK-1, was performed on a Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, CA). Results of experiments designed to show the enzymatic activities of baculovirus-expressed MLK-3 (FLAG-tagged full-length or GST-tagged kinase domain) using kinase-dead GST-SEK-1 or MBP as substrate are shown in Figures 11A and 11B.

(2) Western Blot Analysis

The kinase activity of baculovirus-expressed MLK-3 was examined by immunoblot analysis. The 20- μ l assay mixture contained Buffer A, 15 mM $MgCl_2$, 100 μ M ATP, and 0.1 μ g kinase-dead SEK-1 substrate. The reaction was allowed to proceed for 30 min at 30°C, then quenched with 10 μ l 4x reducing sample buffer. Proteins were separated on a 8% Tris-glycine gel and electrophoretically transferred to Immobilon PVDF membrane. The membrane was incubated with phospho-specific SEK-1 (Thr223) antibody (New England Biolabs, Inc.) followed by horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad). Detection of the immunoreactive bands was performed *via* enhanced chemiluminescence (Amersham). The phosphorylation of kinase-dead GST-SEK-1 by FLAG-MLK-3 protein (baculovirus preparation containing both full-length and kinase domain) is illustrated in Figure 12.

(3) Multiscreen Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation Assay

The kinase activity of bacterially-expressed GST-MLK-3 kinase domain was assessed using the Millipore Multiscreen trichloroacetic (TCA) "in-plate" assay as described by Pitt, *et al*, *J Biomol Screening*, 1996, 1, 47-51. Assays were performed in 96-well Multiscreen Durapore plates (Millipore). Each 50- μ l assay mixture contained 20 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $MnCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 μ Ci [γ - P^{32}] ATP and 30 μ g MBP substrate. The reaction was initiated by adding MLK protein and allowed to proceed for 15 min at 37°C. The reaction was stopped with 25 μ l of 50% TCA. The plates were allowed to equilibrate for 30 min. at 4°C, then washed with ice cold 25% TCA. Scintillation cocktail was added to the plates, and the radioactivity was determined using Wallac MicroBeta 1450 PLUS scintillation counter. The protein dose response versus formation of ^{32}P -labeled MBP is shown in Figure 13.

(4) Phosphocellulose Filter Assay

The kinase assay was performed in a 50- μ l reaction mixture containing 20 mM Hepes, pH 7.4, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $MnCl_2$, 2 mM DTT, 0.1 mM Na_3VO_4 , 1 μ Ci [γ - P^{32}] ATP and 30 μ g MBP. The reaction was initiated by adding MLK protein and allowed to proceed for 15 min at 37°C. The reaction was stopped with 75 μ l of 75 mM phosphoric acid. An aliquot of the quenched solution was loaded directly on the phosphocellulose membrane (Pierce). Alternatively, the 96-well phosphocellulose multiscreen plate (Millipore) may be used. The membranes were washed with 75 mM H_3PO_4 . The bound ^{32}P -labeled phosphorylated MBP

-60-

was eluted in collection tubes by adding 1 M sodium hydroxide. The radioactivity was determined by Cerenkov counting in a Beckman scintillation counter (Somerset, NJ). The formation of phosphorylated MBP with increasing concentration of bacterially-expressed GST-MLK-3 kinase domain is shown in Figure 13.

5 **Example 29 Assay to determine binding of compounds to recombinant MLK Family**

K-252a (Compound III-3, see, Table 4), an indolocarbazole metabolite of *Nocardia* species, binds to a variety of serine/threonine and tyrosine kinases (Angeles, et al, *Anal Biochem*, 1996, 236, 49-55, Knight, et al, *Anal Biochem.*, 1997, 247, 376-381). A tritiated K-252a ligand was used to assess binding to human recombinant full length MLK-3 from a crude preparation of baculovirus infected cells. [³H]K-252a was specifically labelled with tritium in the 3 and 9 positions through a contract with NEN Research products (Billerica, MA) and had a specific activity of 40 Ci/mmol. Binding reactions were performed in 1 ml in a 96-well plate. The reaction mixture contained 50 mM MOPS buffer, pH 7, 150mM NaCl, 5 mM MnCl₂, 1 mg/ml BSA, 1 % DMSO and 0.25 nM [³H]K252a. The samples were carried out in triplicate with a concentration of 5 ug/ml of crude baculovirus derived MLK-3. Non-specific binding was defined as binding in presence of unlabeled 1.2 uM K252a and was subtracted from total binding to give specific binding. At this dilution 12-15 % of the total counts were non-specifically bound to protein and 75-85 % of these counts were specifically bound to MLK-3 (Figure 14). All experiments were performed for 2 hrs at 4°C. [³H]K252a/MLK-3 complexes were collected on GF/C Whatman filters using a Brandel harvester, washed with cold MOPS/NaCl buffer and counted on a Wallac Micro Beta counter. A saturation binding experiment was performed to obtain a K_d for K252a. An example of the results from one of these experiments is shown (Figure 14). A K_d of 0.89 nM (Confidence Limits 0.2 to 1.5 nM) was obtained.

25 **Example 30 Intact Cell Assays**

(A) Cos 7 Overexpression System

Materials

K-252a and derivatives of this compound were provided by Kyowa-Hakko Kogyo Co Ltd (Tokyo, Japan) (Kaneko et al, 1997). Compounds were dissolved in cell culture grade

-61-

dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored in the dark at 4°C. All dilutions of compounds were made in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1 % bovine serum albumin. Hemagglutinin (HA) antibody was purchased from BAbCO (Richmond, CA). AP-1 (c-jun) substrate was purchased from Promega (Madison, WI). [γ - ^{32} P]ATP (6000 Ci/mmol) was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL).

Cos7 Cell Culture

Green Monkey Kidney Cos7 cells were obtained from ATCC, Rockville, Maryland (CRL 1651) and maintained in DMEM containing 10 % bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, 50 U/ml penicillin/streptomycin at 37°C in 10% CO₂, 90 % air atmosphere. Cos7 cells were detached for passaging by adding 0.25 % trypsin.

(1) Overexpression of MLK family members and JNK1 in Cos7 cells

Cos7 cells were plated at 80% confluency and transfected with 2 μ g each of cDNA constructs using lipofectamine as recommended by the provider (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). A full length cDNA of human MLK-3, MLK-2, or mouse DLK or a partial human MLK-1 as described above, and a full length Hemagglutinin A-tagged human JNK1, kindly provided by J. Silvio Gutkind (NIH, Bethesda, MD), were subcloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen, San Diego, CA). After a 48 hr transfection, the cells were treated with 0.025% DMSO or 500 nM of the indicated compounds for 2 hr followed by lysis in 0.4 ml Triton buffer (1% Triton X-100, 50 mM sodium chloride, 10 mM Tris (pH 7.6), 0.1 % bovine serum albumin, 30 μ M sodium pyrophosphate, 50 mM sodium fluoride, 20 μ g/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mM sodium vanadate). JNK activity from the lysate was assayed by an immunoprecipitation/kinase assay as described below.

(2) Immunoprecipitation and Kinase Assay from Whole Cells

Lysate from Cos 7 cells was measured for protein concentration using the Micro BCA kit from Pierce (Rockford, IL) and equal amounts of protein were immunoprecipitated with the HA antibody for 1 hr at 4°C. Immunoprecipitates were pelleted by centrifugation in a microfuge centrifuge for 20 sec, resuspended in Triton buffer, washed by centrifugation 2 more times, followed by a final wash in Kinase buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 0.1 mM sodium vanadate). The immunoprecipitate was resuspended in kinase buffer containing 1 μ M ATP and 5 μ Ci [γ - ^{32} P]ATP and substrate (1 μ g/sample of AP-1) and incubated for 15 min at 30°C. The kinase reaction was stopped by addition of reducing

sample buffer (Laemmli, Nature 1970 227,680-685) Samples were heated to 80°C for 5 min and loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were separated by electrophoresis. The gel was dried and quantitation of radioactivity in the AP-1 substrate was performed on a Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, Ca.) Results from experiments in which MLK-3, MLK-2 and DLK are co-expressed with HA-JNK1 and incubated in the absence or presence of K-252a are shown in Figures 15A and 15B. In contrast, a derivative of the parental K-252a compound named Compound III-3 (see Table 4), which is a more selective kinase inhibitor, did not interfere with the JNK pathway activated by another MAPKKK upstream of JNK, MEKK1 (Figure 15C)

(B) Whole-Cell Reporter Assay For MLK activated JNK

Attempts at deriving clones constitutively expressing the MLK family have been unsuccessful, suggesting that overexpression of the MLK's may affect cell survival (Bergeron *et al*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 1997, 231, 153-155, Nagata, *et al*, *EMBO J*, 1998, 17, 149-158). Therefore, in developing a whole cell assay for tracking MLK induced biochemical events, a cell line containing a genetically engineered inducible expression system of the kinase of interest may be required. For example, a PC-12 cell line transfected with a tetracycline-controlled transactivator. When cells are further transfected with a gene of interest driven by the inducible promoter *tetO*, expression of that gene is tightly controlled by tetracycline in the medium (Shockett, *et al*, *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1995, 92, 6522)

To quantitate the activation of MLK, one can measure the phosphorylation of downstream substrates such as MEK4, JNK or c-jun in multiple assay formats as described above. Another approach to quantitate the MLK activation in whole cells is to use a reporter enzyme activity such as the c-jun luciferase reporter system commercially available through the PathDetect™ system (Stratagene, LaJolla, CA). In this system, the tetracycline-inducible cell line is transfected with two plasmids. One plasmid constitutively expresses a fusion of the cJun NH₂-terminal transactivating domain with the yeast GAL4 DNA binding domain (cJun-DBD fusion protein). The other plasmid carries the coding sequences for firefly luciferase driven by five tandem repeats of the GAL4 binding site. Upon activation of MLK, the downstream substrate of JNK, cJun-DBD fusion protein, is phosphorylated, binds to the GAL4 binding sites, and induces luciferase gene transcription. Luciferase is easily assayed in cell lysates by addition of its substrate (Promega, Madison, WI) and measurement of

228
2/7

-63-

chemiluminescence.

Example 31 Association of Inhibition of MLK family members with Motoneuron Survival

Survival of Rat Spinal Cord Cultures Enriched for Motoneurons

5 Spinal cords were dissected from Sprague-Dawley rat fetuses (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) of embryonic age (E) 14 5-15 Cells from only the ventral portion of the spinal cord were dissociated, and further enriched for motoneurons by centrifugation on a 6 5% step metrizamide gradient, as described previously (Henderson, *et al* , 1993), and were analyzed for purity by staining with low affinity neurotrophin receptor antibody (IgG-192, Boehringer-Mannheim) (data not shown) Cells were seeded onto 96-well plates previously coated with poly-l-ornithine and laminin (5 ug/ml each) at a density of 6×10^4 cells/cm² in chemically defined serum-free N2 medium (Bottenstein, *et al* , 1979, *supra*) In order to separate attachment from survival effects, addition of compounds to cultures was made after an initial attachment period of 1-3 h Neuronal survival was assessed after 4 d by using calcein AM (Molecular Probes, Eugene, OR) in a fluorometric viability assay (Bozyczko-Coyne, *et al* , 1993, *supra*) Microscopic counts of neurons correlated directly with relative fluorescence values In brief, culture medium was serially diluted in DPBS (Dulbeccos phosphate buffered saline) and a final concentration of 6 uM calcein AM stock was then added to each 96-well The plates were incubated for 30 min at 37°C, followed by serial dilution washes in DPBS The fluorescent signal was read using a plate-reading fluorimeter from Millipore (Cytofluor 2350) at excitation=485 nm and emission = 538 nm For each plate, mean background derived from wells receiving calcein AM, but containing no cells, was subtracted from all values Linearity of the fluorescence signal was verified for the concentration and incubation time for the range of cell densities in these experiments An example of the percent survival above control of motoneurons in the presence of test compounds at 250 nM is shown in Table 3

Survival Of Cortical Neurons

Cerebral cortices were dissected from embryonic day 18 rat fetuses and enzymatically digested to obtain a single cell suspension. Cells were seeded at a density of 1.56×10^5 /cm²

onto poly-ornithine/laminin coated 96 well tissue culture plates in serum-free Neural Basal Medium containing B27 supplements. Plates were coated with a solution of poly-ornithine/laminin (8 µg/ml each) made in PBS for at least two hours at 37C. On *in vitro* days 5-7, cortical neurons were exposed to Ab25-35 (20µM) either in the presence or absence of test compounds. Ab25-35 (Sigma, St. Louis, MO) stock solutions (1 mM) were prepared in deionized-distilled sterile H₂O. Relative neuronal survival was determined at 48 hrs post-peptide addition using lactate dehydrogenase (LDH) release as an indicator of plasma membrane integrity/cell viability. LDH was measured using the Cytotoxicity Detection Kit (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) in accordance with the manufacturer's instructions. Data is expressed as percent inhibition of LDH released relative to cultures treated with AB25-35 alone.

Table 3

| | Cortical
Neurons | Motoneurons | | Cos-7
cells | Cos-7
cells | Cos-7
cells | Cos-7
cells |
|------------------|---------------------|-------------|---------|------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Survival | Survival | % JNK | DLK | MLK3 | MLK2 | MLK1 |
| Formula | % Control | % Control | Inhib @ | % JNK | % JNK | % JNK | % JNK |
| | @ 250 nM | @ 250 nM | 500 nM | Inhib. @ | Inhib @ | Inhib @ | Inhib @ |
| | | | | 500 nM | 500 nM | 500 nM | 500 nM |
| III ¹ | 46, 56 | 300 | 65 | 63, 73 | 98, 99 | 89, 67 | 97, 96 |
| III ² | 47, 80 | 315 | 88 | 36, 22, 42 | 94, 94 | 69, 44 | 92, 64 |
| I ³ | 22, 54 | 177 | 88 | 20, 25 | 94, 93 | 0 | 79, 29 |
| I ⁴ | 29, 39 | 165 | 97 | 58, 13,
52, 8 | 84, 92,
90 | 0 | 63, 38 |

¹Compound has formula III where Z₁, Z₂, R₁, and R₂ are H, X is CO₂CH₃, and R is OH

²Compound has formula III where Z₁ and Z₂ are H, X is CO₂CH₃, R₁ and R₂ are CH₂SCH₂CH₃, and R is OH.

³Compound has formula I where A₁, A₂, R₁, R₃, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂ together represent O, R₂ is CH₂CH₂OAc, R₄ is CH₂CH₂(2-Pyridyl), and X is CH₂

⁴Compound has formula I where A₁, A₂, R₁, R₃, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂ together represent O, R₂ is H, R₄ is CH₂CH₂(2-Pyrimidinyl), and X is CH₂

-65-

Example 32 Immunoprecipitation of Endogenous JNK Activity from motoneuron cultures in the Absence or Presence of Indolocarbazoles or Fused Pyrrolocarbazoles

Purified motoneurons were plated at a density of 6×10^4 cells/cm² in 16 mm diameter wells. Cells were allowed to attach for 2 hours prior to treatment. Cells were treated with either 0.0125 % DMSO or 500 nM compound for 2 hrs in N2 defined medium. Cells were then rinsed with ice cold phosphate buffered saline followed by lysis in 0.4 ml Triton buffer as described above in example 30. Lysate from motoneuron cultures was normalized to cell number and immunoprecipitated with a JNK1 antibody (cat. # sc-474) purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). JNK activity from the immunoprecipitates was assayed in the presence of ³²P-ATP and c-jun substrate as described above. The profile of inhibitory activity of the 4 test compounds was compared in motoneurons and in Cos7 cells overexpressing either DLK, MLK-1, MLK-2 or MLK-3 (Table 3).

Example 33 Correlation between inhibition of MLK3-induced JNK activity in Cos7 cells and cholineacetyl transferase activity in primary embryonic cultures

To determine whether inhibition of the JNK pathway regulated by these kinases correlated with neurotrophic compounds, we evaluated the effect of compounds on JNK activity in Cos7 cells overexpressing HA-JNK and MLK3. After a 48 hr transfection period, the cells were incubated with compounds at 500 nM for 2hr followed by cellular lysis. Lysate was immunoprecipitated and kinase activity measured as previously described. The results are reported as percent inhibition of control sample where control is JNK activity in the presence of DMSO. As can be seen in Table 4, most compounds which were active in spinal cord and/or basal forebrain ChAT activity were potent inhibitors of MLK-3 activation of JNK.

Table 4
Effect of Indolo- and Indeno- carbazoles on JNK activity in Cos7 cells
overexpressing MLK3

| | Compound | Cholineacetyltransferase Activity | | % Inhibition of JNK Activity (average)
MLK3 in Cos7 cells |
|----|----------------------|-----------------------------------|-----------------|--|
| | | Spinal Cord | Basal Forebrain | |
| 5 | III-1 ¹ | + | + | 84 |
| | III-2 ² | + | + | 96 |
| | III-3 ³ | + | + | 94 |
| | I-1 ⁴ | + | + | 93 |
| | I-2 ⁵ | + | + | 85 |
| 10 | I-3 ⁶ | + | + | 93.5 |
| | I-4 ⁷ | - | + | 95 |
| | I-5 ⁸ | - | + | 97 |
| | I-6 ⁹ | - | + | 58 |
| | I-7 ¹⁰ | - | + | 85.5 |
| 15 | III-4 ¹¹ | - | + | 66 |
| | III-5 ¹² | - | + | 96 |
| | III-7 ¹³ | - | + | 54 |
| | I-8 ¹⁴ | + | - | 89 |
| | III-8 ¹⁵ | + | - | 94 |
| 20 | III-9 ¹⁶ | + | + | 98.5 |
| | III-10 ¹⁷ | + | - | 78 |
| | I-9 ¹⁸ | + | - | 88 |
| | I-10 ¹⁹ | + | - | 94 |
| | III-11 ²⁰ | - | - | 92.5 |
| 25 | I-11 ²¹ | - | + | 33 |
| | I-12 ²² | - | - | 11 |
| | I-13 ²³ | - | - | 1 |

¹ Compound having formula III where Z₁ and Z₂ are H, X is CO₂CH₃, R₁ is NHCONHC₂H₅, R₂ is CH₂CH₂(2-Pyridyl), and R is OH

30 ² Compound having formula III where Z₁ and Z₂ are H, X is CO₂CH₃, R₁ and R₂ are CH₂OCH₂OCH₂CH₃, and R is OH

³ Compound having formula III where Z₁ and Z₂ are H, X is CO₂CH₃, R₁ and R₂ are

-67-

$\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, and R is OH

- ⁴ Compound having formula I where A_1, A_2, R_1, R_3 , and R_4 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, R_5 and R_6 are OCH_3 , and X is CH_2
- 5 ⁵ Compound having formula I where A_1, A_2, R_1, R_3, R_5 , and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$, R_4 is Br, and X is CH_2
- ⁶ Compound having formula I where A_1, A_2, R_1, R_3, R_5 , and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OAc}$, R_4 is $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, and X is CH_2
- ⁷ Compound having formula I where $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$, and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, and X is CH_2
- 10 ⁸ Compound having formula I where $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$, and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, and X is CH_2
- ⁹ Compound having formula I where $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5$, and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, and X is S
- 15 ¹⁰ Compound having formula I where $A_1, A_2, R_1, R_3, R_4, R_5$, and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}(4\text{-(OH)Ph})$, and X is CH_2
- ¹¹ Compound having formula III where Z_1, Z_2, R_1 , and R_2 are H, X is $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, and R is OH
- ¹² Compound having formula III where Z_1, Z_2 , and R_1 are H, R_2 is CH_2OH , X is CO_2CH_3 , and R is OH
- 20 ¹³ Compound having formula III where Z_1 and Z_2 together form $=\text{O}$, R_1 and R_2 are Br, X is CO_2CH_3 , and R is OH
- ¹⁴ Compound having formula I where A_1, A_2, R_1, R_3, R_5 , and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_2 is H, R_4 is $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyrimidinyl})$, and X is CH_2
- ¹⁵ Compound having formula III where Z_1 , and Z_2 are H, R_1 is Br, R_2 is I, X is CO_2CH_3 , and R is OH.
- 25 ¹⁶ Compound having formula III where Z_1, Z_2, R_1 , and R_2 are H, X is CO_2CH_3 , and R is OH
- ¹⁷ Compound having formula III where Z_1 , and Z_2 are H, R_1 and R_2 are $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, X is CO_2CH_3 , and R is OH
- ¹⁸ Compound having formula I where $A_1, A_2, R_1, R_2, R_3, R_5$, and R_6 are H, B_1 and B_2 together represent O, R_4 is $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridazinyl})$, and X is CH_2
- 30 ¹⁹ Compound having formula I where A_1, A_2, R_1, R_3, R_5 , and R_6 are H, B_1 and B_2 together

-68-

represent O, R₂ is H, R₄ is CH₂CH₂(2-Pyridyl), and X is CH₂

²⁰ Compound having formula III where Z₁, Z₂, R₁, and R₂ are H, X is CO₂CH₃, and R is OCH₃

²¹ Compound having formula I where A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂ together represent O, R₂ is (CH₂)₃-NH-C(=O)-3,5-dihydroxyphenyl, and X is CH₂

5 ²² Compound having formula I where A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂ together represent O, R₂ is benzoyl, and X is CH₂

²³ Compound having formula I where A₁, A₂, R₁, R₂, R₃, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂ together represent O, R₄ is CH=CH-C=N, and X is CH₂

Example 34 Gel shift assay for MLK activation.

10 Activation of MLKs can lead in induction of *c-jun* transcription, resulting in increased c-Jun protein. The increased amount of c-Jun protein can be measured by a standard assay, identified as a gel shift assay Garner, *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 1981, 9, 3047-3060, which is incorporated herein by reference in its entirety Radiolabeled double-stranded DNA oligomers, that code for a c-Jun DNA-binding site, are incubated with a nuclear cell extract
15 followed by acrylamide gel electrophoresis and quantitation of the radiolabeled DNA shifted to a slower mobility This represents the portion of DNA that is bound to the c-Jun protein and is directly proportional to the amount of c-Jun protein in the extract

 Activation of MLKs can also induce c-Jun phosphorylation This can be detected using antibodies which specifically recognize the phosphorylated form of the protein in
20 detection systems such as, for example, Western blots or ELISAs

Example 35 Survival of Chick Embryonic Neurons

Materials

 Leibovitz's L15 media, glucose, sodium bicarbonate, trypsin and antibiotics were from Gibco Muscle extract was prepared as described (Henderson, *et al.*, *Nature*, 1983, 302, 609-
25 611, which is incorporated herein by reference in its entirety) All other reagents were from Sigma, unless otherwise indicated

Cell culture

 Motoneurons (embryonic day 5.5) were isolated with an immunological method according to the procedure set forth in Bloch-Gallego, *et al.*, *Development*, 1991, 111, 221-

232, which is incorporated herein by reference in its entirety, with modifications as described in Weng, *et al*, *NeuroReport*, 1996, 7, 1077-1081, which is incorporated herein by reference in its entirety. Purified motoneurons were seeded onto 35 mm tissue culture dishes (Nunc) pre-coated with poly-DL-ornithine and laminin (1 µg/ml, Upstate Biotech). The culture medium was L15 with sodium bicarbonate (22.5 mM), glucose (20 mM), progesterone (2×10^{-8} M), sodium selenite (3×10^{-8} M), conalbumin (0.1 mg/ml), insulin (5 µg/ml), penicillin-streptomycin, and 10% heat-inactivated horse serum. Muscle extract was supplemented at 30 µg/ml. Compound III-3 was prepared as a 4 mM stock solution in DMSO and stored protected from light at 4°C. The final concentration of DMSO in treated and control cultures was 0.125%.

Paravertebral sympathetic ganglia (SG, embryonal day 12 (E12)), dorsal root ganglia (DRG; E9), and ciliary ganglia (CG; E8) were dissected from chick embryos at the indicated embryonic day as described in Lindsay, *et al*, *Dev Biol*, 1985, 112, 319-328, which is incorporated herein by reference in its entirety. After trypsinization and dissociation, the nerve cell suspensions were plated onto polyornithine-laminin-coated culture dishes in Ham's F14 culture medium, supplemented with 10% horse serum. Immediately after plating, survival factors were added at the following concentrations: Nerve growth factor (NGF), 20 ng/ml, ciliary neurotrophic factor (CNTF), 10 ng/ml. The cultures were maintained at 37° and 5% CO₂ in a humidified environment.

Cell counting

Neurons were plated in 35 mm culture dishes with grids (Nunc). Selected areas of each dish comprising together about 10% of the surface scanned for the presence of phase bright cells immediately after plating and again after 48 h to assess survival percentages. Cell survival was confirmed by vital staining with trypan blue (not shown).

Intact DRG

Ganglia were placed in 96 well plates previously coated with poly-L-ornithine and laminin (5 µg each/ml phosphate buffered saline) in serum-free N2 medium (Bottenstein, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76, 514-517, which is incorporated herein by reference in its entirety) containing 0.05% bovine serum albumin (BSA) and maintained for 48 h at 37° and 5% CO₂ in a humidified environment. Treated ganglia received either 250 nM Compound III-3 or 20 ng/ml NGF 2 h after plating.

Compound III-3 supports the survival of chick embryonic peripheral neurons in a concentration-dependent fashion

Withdrawal of NGF from dissociated cultures of E9 dorsal root ganglion sensory neurons (DRG) and E12 sympathetic ganglion neurons (SG) cause them to undergo PCD within 48 h. This was prevented by addition of Compound III-3 to the culture medium at the time of NGF withdrawal. At 1 μ M, Compound III-3 kept 94% of SG neurons and 890% of DRG neurons alive after 48 h (NGF-treated control SG 65%, DRG 66%). Similarly, Compound III-3 promoted the survival of 76% of CNTF-dependent ciliary ganglion (CG) neurons after 24 h (CNTF-treated control 67%). In the presence of 10% serum, the survival effects of Compound III-3 were concentration-dependent, with a plateau reached around 1 μ M for all three neuronal populations (Fig 16A-C). The surviving neurons showed extensive neurite outgrowth with thicker and more curved neurites as compared to control cultures (Fig. 17 E-H). After four days, the survival promoting activity was still intact. DRG Compound III-3 52%, growth factor-treated control 41%, SG Compound III-3 83%, NGF-treated control 55%, CG Compound III-3 58%, CNTF-treated control 50%). Under optimal conditions, the cultures could be maintained with Compound III-3 for one week and longer (not shown).

Compound III-3 supports the survival of chick embryonic motoneurons in a concentration-dependent fashion

Cultured chick motoneurons can survive and extend processes in the presence of muscle extract, whereas they die rapidly in its absence. In our experiments, after 48 h, 65% of the motoneurons survived in the presence of muscle extract, in contrast to 14% of untreated controls. In serum-free conditions, the survival effect of Compound III-3 was maximal at 300 nM, and was somewhat higher (79%) than that induced by muscle extract. The concentration-dependency of the survival effect of Compound III-3 in this system is different than in peripheral neurons, since Compound III-3 concentrations above 300 nM showed a progressively reduced effect (Fig 16A). This might indicate a particular sensitivity of motoneurons to some aspect of Compound III-3 activity. Morphologically, motoneurons rescued with Compound III-3 exhibited phase bright cell bodies and were able to extend long neurites, which appeared slightly thicker than those induced by muscle extract (Fig 17). After four days in culture, 56% of the motoneurons were alive with Compound III-, compared with 42% with muscle extract. At 300 nM, Compound III-treated neurons survived in vitro for at

-71-

least a week (not shown)

Compound III-3 promotes neurite outgrowth from intact dorsal root ganglia

Results from the above experiments demonstrate that Compound III-3 not only promotes survival of embryonic neurons from the peripheral and central nervous systems, but also resulted in robust neurite outgrowth. Many of these extensions appeared to be thicker than those elicited in the presence of growth factors (compare Fig 17 A-D to Fig 17 E-H). This effect was also observed in the neuritic outgrowth elicited from intact embryonic dorsal root ganglia cultured in the presence of 250 nM Compound III-3 (Fig 18C). Neurites grew in response to both NGF (Fig 18B) and Compound III-3, those elicited by NGF were much finer and more branched than those grown in the presence of Compound III-3 which appeared thick and possibly fasciculated.

Example 36 In Vivo Treatment

Developmentally Regulated Motor Neuronal Death in the Chick Embryo

The present example is described in detail in Glicksman, *et al*, *J Neurobiol*, 1998, 35, 361-370, which is incorporated herein by reference in its entirety. On E6, a window in the shell of chick eggs (Spafas, Preston, CT) was made and either vehicle (5% Solutol™ HS 15, polyethylene glycol 660 hydroxystearate, BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany (in phosphate-buffered saline, pH 7.2)) or the specified dose of Compound III-3 in the vehicle was applied directly onto the vascularized chorioallantoic membrane once daily from E6 to E9 as described in Oppenheim, *et al*, *Science*, 1991, 251, 1616-1617, which is incorporated herein by reference in its entirety. Embryos were sacrificed at E10 and their spinal cords were removed, fixed in Carnoy's solution (10% glacial acetic acid, 60% absolute ethanol, 30% chloroform), processed for serial paraffin sections, and stained with thionin. Every 20th section of lumbar segments 1-8 was counted according to previously described criteria (Clarke, *et al*, *Methods In Cell Biology Cell Death*, 1995, Schwart & Osborne, Eds, Academic Press, New York, pp 277-321, which is incorporated herein by reference in its entirety).

Developmentally Regulated Motor Neuronal Death in the Neonatal Rat

Untimed pregnant Sprague-Dawley rats were obtained from Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Female rat pups were injected daily, subcutaneously (SC), over the target

-72-

perineal muscles, with Compound III-3 in 5% Solutol™ HS 15 or vehicle along starting on the day of birth (P1) and continuing for 5 days (P5). On P10 or P60, pups were decapitated, blood was collected in heparinized capillary tubes, and the region of the spinal cord containing the sexually dimorphic spinal nucleus of the bulbocavernosus (SNB) and the perineal area containing the bulbocavernosus (BC) and levator ani (LA) muscles were dissected after perfusion of the animals with saline/formalin. The region of the spinal cord containing the SNB was postfixed, embedded in Paraplast, sectioned at 10µm, and stained with Cresylecht violet (Nordeen, *et al*, *Science*, 1985, 229, 671-673, which is incorporated herein by reference in its entirety). Motor neurons were counted at X500 in serial sections from the lumbar 5 to the sacral 1 region of the spinal cord as described previously (Nordeen, *et al*, *supra*). The microscopic enumeration was made on coded sections by an observer blinded to the treatment groups. Motor neuron counts were corrected for cell size and section thickness (Königsmark, *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*, Nauta & Ebbesson, Eds, 1970, Springer-Verlag, New York, pp 315-340, which is incorporated herein by reference in its entirety) and statistical analysis was by one-way analysis of variance (ANOVA). Perineal musculature was postfixed, decalcified, embedded in Paraplast, sectioned at 10µm and stained with Milligan's Trichrome. Using bright-field microscopy (X250), BC and LA muscles in normal females and Compound III-3-treated females (405 animals/group) were positively identified by both their location and the presence of striated fibers. The outline of muscle tissue was traced from alternate sections using a projection microscope (62.5), and the cross-sectional area was measured using a digitizing pad and a computer-based morphometry system (Sigmascan, Jandel Scientific). Muscle volume was calculated by taking the total cross-sectional area and multiplying it by the section thickness, and corrected for the percentage of the structure sampled.

Collected blood was centrifuged for 5 min at room temperature, then, plasma was removed and frozen at -20°C. Serum testosterone levels (6-7 animals/group) were measured by radioimmunoassay following the procedures set forth in Wingfield, *et al*, *Steroids*, 1975, 26, 311-327, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Axotomy-Induced Motor Neuronal Dedifferentiation in the Adult Rat

The left hypoglossal nerve was transected in the neck of adult female Sprague-Dawley rats (120-180 g) under Neumbutol anesthesia, and 50 µl of Compound III-3 or its vehicle (5%

-73-

Solutol™ HS 15) were applied to a piece of Gelfoam™ (AJ Buck, Owings Mills, MD), then wrapped around the proximal end of the transected nerve. After 7 days, the animals were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in Sorenson's buffer, 0.07 M phosphate, pH 7.2. The brain stem was removed and 40-µm-thick serial coronal sections were cut on a cryostat (Chiu, *et al*, *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, which is incorporated herein by reference in its entirety). Every fifth section was processed for ChAT immunohistochemistry as previously described (Chiu, *et al*, *J Comp Neurol*, 1993, 328, 351-363, which is incorporated herein by reference in its entirety) using a 1:350 dilution of an anti-ChAT monoclonal antibody obtained from Chemicon. Cells that stained clearly above background were counted in stained sections, the number of enumerated cells was expressed as the ratio of the number of ChAT-immunoreactive cells on the axotomized side of the hypoglossal nucleus versus the number of immunoreactive cells on the control (uninjured) side.

Compound III-3 rescued rat embryo motor neurons from apoptotic death *in vitro* and inhibited a signaling pathway resulting in JNK1 activation in these cells (Maroney, *et al*, *J Neurosci*, 1998, 18, 104-111, which is incorporated herein by reference in its entirety). To determine potential activity *in vivo*, Compound III-3 was assessed in two models of developmentally regulated programmed motor neuronal death and in a model of axotomy-induced dedifferentiation in adult motor neurons. In chicks, approximately 50% of the spinal cord motor neurons undergo PCD during E5-10 (Hamburger, *et al*, *J Neurosci*, 1982, 1, 38-55, Purves, *et al*, *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections*, 1988, Harvard University Press, Cambridge, MA, both of which are incorporated herein by reference in its entirety). Application of Compound III-3 to the chorioallantoic membrane during this period prevented motor neuronal death in a dose-dependent manner (Fig. 19). Forty percent of the motor neurons that would normally die were rescued at the two highest doses tested (2.3 and 7 µg/day), while 25% of the motor neurons were rescued at lower doses (1.2 and 1.8 µg/day) (Fig. 19).

During early perinatal life of female rats (late embryonic stage until postnatal day (PN) 4), more than 50% of the motor neurons in the SNB are eliminated via PCD (Breedlove, *J Neurobiol*, 1986, 17, 157-176, which is incorporated herein by reference in its entirety). In males, motor neurons in this nucleus innervate striated penile muscles involved in copulatory reflexes. Testicular secretion of androgenic steroids reduces SNB motor neuronal death in

males and prevents much of the atrophy of the BC and LA muscles innervated by the neurons. Administration of testosterone to female pups resulted in a fully masculine number of SNB motor neurons (Nordeen, *et al*, *supra*) and prevented BC and LA muscle atrophy (Wairman, *et al*, *Endocrinology*, 1941, 29, 955-978, which is incorporated herein by reference in its entirety). Daily sc administration of Compound III-3 (PN 1-5) to female rats significantly attenuated motor neuronal death (Fig 20A). Rescue of the SNB motor neuronal death by Compound III-3 occurred at two doses (0.5 and 1 mg/kg per day). At the maximally effective doses of 0.5 and 1 mg/kg per day, administration of Compound III-3 resulted in a 70% enhancement in motor neuronal survival which equaled the effect of testosterone (Fig 20A). Compound III-3 did not alter plasma testosterone levels of treated females. Radio immune measurement of plasma testosterone levels in the 1-mg/kg per day group resulted in no significant difference when compared to the vehicle control group (0.016 ± 0.008 ng/mL and 0.029 ± 0.015 ng/mL standard error of the mean (S.E.M.), respectively).

To determine whether the Compound III-3 treatment was effective in long-term maintenance of motor neuron survival, females were treated with Compound III-3 (0.5 and 1 mg/kg per day) for the same time period PN (1-5). One half of the animals in the vehicle and both treatment groups were sacrificed on PN10. The remaining animals were then maintained without additional Compound III-3 treatment until sacrifice at PN60. As previously observed (Fig 20A), Compound III-3 treatment resulted in a 70% enhancement in motor neuronal survival (Fig 20B). Furthermore, 100% of these rescued motor neurons were identifiable morphologically 55 days after the last treatment with Compound III-3 (Fig 20B). Compound III-3 inhibition of motor neuronal death during the neonatal period permitted motor neuronal survival into adulthood.

Despite the clear demonstration and devastating effects of motor neuronal loss in adult human diseases such as amyotrophic lateral sclerosis, adult motor neurons in most animal models of motor neuronal injury are resistant to death. However, axonal injury does result in morphological (Oppenheim, *et al*, *supra*) as well as biochemical changes (Oppenheim, *et al*, *supra*; Rende, *et al*, *J Comp Neurol*, 1992, 319, 285-298, which is incorporated herein by reference in its entirety; Chiu, *et al*, *J Comp Neurol*, 1993, 328, 351-363, which is incorporated herein by reference in its entirety) in adult motor neurons that may mimic degenerative change preceding death in diseased or degenerating motor neurons. One

-75-

example of this type of change results from axotomy of the hypoglossal nerve that innervates the tongue. Unilateral transection of this nerve in the adult rat resulted in the loss of 95% of the ChAT-immunoreactive hypoglossal motor neurons in the ipsilateral nucleus after 7 days (Chiu, *et al*, *NeuroReport*, 1994, 5, 693-696, which is incorporated herein by reference in its entirety). The loss in ChAT immunoreactivity was not permanent. Four weeks following axotomy, 100% of the motor neurons had recovered control levels of ChAT immunoreactivity (Borke, *et al*, *J Neurocytol*, 1993, 22, 141-153, which is incorporated herein by reference in its entirety). ChAT immunoreactivity in the contralateral hypoglossal motor neurons was not affected (Chiu, *et al*, *supra*) (Fig. 21 and Table 5)

When applied in Gelfoam™ to the proximal end of the hypoglossal nerve, Compound III-3 dose-dependently attenuated the decrease in ChAT immunoreactivity in ipsilateral hypoglossal motor neurons assessed 7 days postaxotomy. The maximally effective dose (50 µg) resulted in 40% more ChAT-immunoreactive motor neurons compared to the axotomized, untreated control (Fig. 21B and Table 5). There was a bell-shaped dose dependence with both lower and higher doses resulting in survival greater than the untreated control, but less than that achieved at 50 µg. As was true with the SNB model, there was no associated weight loss, mortality, or gross tissue damage in these animals at any doses tested.

In three separate models of motor neuron degeneration *in vivo*, Compound III-3 demonstrated neuroprotective activity: developmentally-regulated PCD of lumbar spinal cord motor neurons in embryos (Fig. 19), androgen-sensitive death of postnatal SNB motor neurons (Fig. 20), and axotomy-induced loss of a functional marker, ChAT, in adult hypoglossal motor neurons (Fig. 21 and Table 5). Compound III-3 was efficacious when administered peripherally by sc injection, applied locally to the cut end of a nerve, or directly overlaid on the chick embryo chorioallantoic membrane. In contrast to the parent molecule K-252a, Compound III-3 was approximately fivefold more potent in mediating survival in motor neuron-enriched cultures (data not shown) and did not exhibit inhibitory activity against trkA tyrosine kinase and several serine/threonine kinases (Maroney *et al*, *supra*; Kaneko, *et al*, *J Med. Chem.*, 1997, 40, 1863-1869, which is incorporated herein by reference in its entirety).

Table 5
Effect of Compound III-3 On Choline Acetyltransferase Immunoreactivity
In Axotomized Hypoglossal Motor Neurons

| Treatment | n | ChAT-Positive Motor Neurons | | |
|---------------|---|-----------------------------|--------|---------------|
| | | Experimental/Control | % | Average/Group |
| vehicle | 2 | 20/544 | 3.68 | 4.01 |
| | | 19/437 | 4.35 | |
| 3.6 µg III-3 | 2 | 55/420 | 13.10 | 12.84* |
| | | 72/572 | 12.59 | |
| 25 µg III-3 | 2 | 95/597 | 15.91 | 19.01* |
| | | 142/642 | 22.12 | |
| 50 µg III-3 | 2 | 188/484 | 38.84 | 41.34* |
| | | 278/637 | 43.85 | |
| 100 µg III-3 | 4 | 465/920 | 50.54 | 32.61* |
| | | 235/784 | 29.98 | |
| | | 178/770 | 23.12 | |
| | | 182/679 | 26.80 | |
| 200 µg III-3 | 2 | 99/461 | 21.48 | 24.96* |
| | | 159/559 | 28.44 | |
| sham operated | 2 | 350/335 | 104.48 | 101.24 |
| | | 292/298 | 98.00 | |

Compound III-3 or vehicle were added in gel foam to the proximal end of the hypoglossal nerve immediately following its transection. After 7 days, animals were sacrificed and serially sectioned through the hypoglossal nucleus, and every fifth section was immunostained with anti-ChAT antibodies. Counts of ChAT-positive neurons were made in the ipsilateral (experimental) and contralateral (control) sides of the nucleus.

*p<0.05, statistically significant compared to control vehicle-treated animals

An Inhibitor of the MLK-3 pathway demonstrates in vivo efficacy and blocks phosphorylation events downstream of MLK-3 in the MPTP model

224

-77-

MPTP was administered at a dose (40 mg/kg) that produces loss of striatal dopaminergic terminals and cell bodies in the substantia nigra. Tyrosine hydroxylase was used as a marker for dopaminergic nerve terminals in the substantia nigra. Systemically administered Compound III-3 attenuated the loss of substantia nigra tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons after MPTP lesion (Fig 22A, Saporito *et al*, 1999) Since Compound III-3 is a known inhibitor of MLK-3, activation of a downstream substrate of MLK-3 was measured in MPTP-treated mice. Levels of phosphorylated MKK4 were measured using a phospho-MKK4 specific antibody (New England Biolabs, Beverly, MA) that recognizes the monophosphorylated form of MKK4 by either immunoblot (Fig 22B) or ELISA (Fig 22C). MPTP administration elevated levels of phosphorylated MKK4 in the substantia nigra by up to 5 fold over control levels (Fig 22B). Peak elevations occurred 4 hrs after administration of MPTP and coincided with peak CNS levels of MPP⁺. MPTP-mediated MKK4 phosphorylation was attenuated by pretreatment with 1-deprenyl, indicating that these phosphorylation events were mediated by MPP⁺ (Fig 22C). Moreover, MKK4 phosphorylation was partially inhibited with Compound III-3 pretreatment at a dose (1 mg/kg) that produces protection against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic loss (Fig 22C). These data demonstrate that MPTP (MPP⁺) activates MKK4, a downstream substrate of MLK-3. Moreover, these data demonstrate that a known inhibitor of MLK-3 inhibits activation of this kinase pathway *in vivo*.

Example 37 Inflammation

The induction of IL-1 and TNF- α by LPS in THP-1 cells and the effect of indolocarbazoles and pyrrolocarbazoles on their induction

Cells of the immune system were chosen since many kinases are involved in the regulation of numerous immunological functions, e.g., the induction of the synthesis of cytokines and the induction of a cytokine's biological response. A recent report (Hambleton, *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 2774-2778, which is incorporated herein by reference in its entirety) showed that the treatment of monocyte-derived cell lines with LPS caused a rapid activation of JNK activity. When monocytes come in contact with bacterial endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS) they produce the inflammatory cytokines, IL-1 and TNF- α . Inhibition of production of these two cytokines may be a useful treatment of

-78-

certain inflammatory disorders of the immune system. These cytokines can be easily measured by commercial ELISA kits. We designed experiments to determine (1) if indolo- and fused pyrrolocarbazoles can inhibit the synthesis of IL-1 and TNF- α in our monocyte cell line THP-1, (2) if JNK is activated by LPS in THP-1 cells, and (3) if the activation of JNK by LPS can be inhibited by indolo- and fused pyrrolocarbazoles.

Experimental Procedures

THP-1 cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. LPS (E coli serotype 0111:B4, TCA extracted) was purchased from Sigma and dissolved in PBS. ELISA kits for assaying IL-1 and TNF- α were purchased from Boehringer-Mannheim and assays on THP-1 culture medium were performed as directed by the manufacturer. Standard curves according to directions were obtained with each assay.

Experiments were performed in 12 well culture plates with either 1 or 2 ml of THP-1 cells at 4×10^5 cells/ml. IL-1 and TNF- α were induced by the addition of LPS to the culture medium and the medium collected at various times thereafter for cytokine assay. Cells were removed by centrifugation and the supernatants frozen at -70°C until assay. To minimize costs experiments were performed in duplicate cultures and the duplicate supernatants were pooled after centrifugation. Each pooled supernatant was assayed in duplicate. Stock solutions of indolo- and fused pyrrolocarbazoles in 100% DMSO were diluted to the desired concentrations in either medium containing 10% fetal bovine serum or in medium containing 0.5 mg/ml BSA. Unless otherwise stated, compounds were added to the THP-1 cells 1 hr prior to the addition of LPS.

Assays for JNK activity were performed after immunoprecipitating the JNK protein from an extract of lysed THP-1 cells. Pelleted THP-1 cells were lysed on ice for 15 min in 500 μl of Frac buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 30 μM sodium pyrophosphate, 1 mg/ml BSA, 1% Triton-X-100). The extract was centrifuged for 10 min at 14K and 5 μl of JNK antibody (Santa Cruz) was added to the supernatant. The extract was rotated for 60 min at 4°C , 75 μl of washed protein A Sepharose (20% w/v in Frac) added and the extract rotated another 30 min to bind the antibody complex to the protein A Sepharose. The protein A Sepharose was washed twice with Frac buffer, once with 20 mM Hepes, pH 7.6, 20 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, then incubated for 15 min at 30°C in 30 μl of kinase buffer (20 mM hepes, 20 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 1 μg recombinant c-jun, and 2 μM ATP- γ - ^{32}P , 2 μCi). The

225

-79-

reaction was terminated by the addition of 10 μ l of 4X SDS gel loading buffer, heated for 3 min at 80° C, and the proteins were analyzed on a 10% SDS gel. The gel was dried, exposed to a Phosphorimager plate, and the radioactive bands were analyzed on a Phosphorimager.

Results from initial experiments indicated that LPS at 2 μ g/ml gave the maximum yield of IL-1 and this concentration of LPS was used in all experiments thereafter. The minimum time after addition of LPS for maximum yield of the cytokines was determined by taking aliquots of medium for assay at various times after the addition of LPS. The first experiment indicated that both IL-1 and TNF- α attained maximum yield at less than 5 hr after the addition of LPS. Since the earliest collection time was 2.4 hr in the first experiment, a second experiment was performed with medium collections starting at 15 min after the addition of LPS. The results of this experiment where only TNF- α was assayed showed that it attained maximum yield at 3 hr after the addition of LPS. No significant TNF- α was found in the medium until 90 min after LPS addition.

The rapid attainment of maximum yield indicated a very tight regulation of the synthesis of the 2 cytokines - rapid synthesis and rapid down regulation. Cultures of cells were treated for 30 min prior to the addition of LPS with either Actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, or cycloheximide, a protein synthesis inhibitor. Medium was collected 3 hr after the addition of LPS and TNF- α was assayed. Both new RNA and new protein synthesis are required for TNF- α induction since no TNF- α was found in the medium of cells treated with either inhibitor. The next experiments were performed to determine if Compound III-3 would inhibit the induction of IL-1 and TNF- α . Compound III-3 inhibited the induction of both IL-1 and TNF- α with IC50 values of 267 nM and 139 nM respectively. The results of these experiments were obtained with cells in medium containing 10% fetal bovine serum. Since the assays with spinal cord tissue and basal forebrain tissue for the neurotrophic activity of compounds are performed in serum-free medium (500 μ g/ml BSA) it was of interest to determine the IC50 values for the inhibition of IL-1 and TNF- α in serum-free medium. When THP-1 cells were treated with Compound III-3 in serum-free medium (500 μ g/ml BSA) the IC50 was reduced 10 fold from 269 nM to 23 nM. Unless otherwise stated all experiments performed hereafter were performed in serum-free medium. The inhibition by Compound III-3 of the induction of IL-1 and TNF- α in THP-1 cells suggests that Compound III-3 might be useful as a therapeutic in treating pathological conditions caused by the production of above

-80-

normal quantities of these cytokines. Septic shock is such a condition. Septic shock is caused by the growth of gram negative bacteria in the circulation which in turn release large amounts of the endotoxin, LPS. The LPS then stimulates primarily the monocytes and macrophages to produce large quantities of IL-1 and TNF- α which then cause massive tissue damage and in many cases death.

Several compounds were tested for their ability to inhibit TNF- α and compared with the ability to inhibit JNK. Results are shown in Table 6

Table 6

| Compound | THP-1 Cells | | Overexpressed
MLK3 in Cos 7
Cells |
|----------|-----------------------|-------------------|---|
| | TNF- α IC50 nM | JNK % inh. 500 nM | JNK % inh. 500 nM |
| III-1 | 49.5 | 93.5 | 83.8 |
| III-3 | 29 | 93 | 94 |
| I-2 | >5000 | 78.5 | 85 |
| I-3 | 366 | 80.5 | 93.7 |
| I-4 | 75.5 | 79.5 | 95 |
| I-5 | 514 | 89 | 97.2 |
| I-6 | 817.5 | 77.5 | 57.8 |
| I-7 | 1009 | 74 | 85.5 |
| III-4 | 462.5 | 81 | 66 |
| III-5 | 4 | 84.5 | 96 |
| III-7 | 590.5 | 11.5 | 54 |
| III-8 | 11.5 | 51 | 94 |
| III-10 | 4298 | 48 | 59 |
| I-10 | 4500 | 62 | 94 |
| I-11 | 686 | 51 | 92.5 |

Effect of Compound III-3 on the induction of IL-2 in Jurkat cells

Experiments were performed to determine if Compound III-3 inhibited the induction

-81-

of IL-2 in Jurkat cells

Experimental Procedures

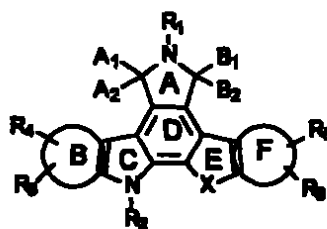
Jurkat cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. TNF- α was from Promega and anti CD3 and anti CD28 antibodies were from Pharmigen. Jurkat experiments were done in 200 μ l in a 96 well plate IL-2 was measured with an ELISA kit purchased from Boehringer Mannheim. The antibodies to CD3 and CD28 were allowed to bind to the plastic of the 96 well plate (18 hr in PBS) prior to addition of the Jurkat Cells. Cells were treated with compounds 1 hr prior to adding to the antibody coated plate. Antibodies to CD3 and CD28 were used to activate the T cell receptor and induce IL-2. IL-2 was released from the Jurkat cells between 6 hr and 24 hr after initiation of induction (Fig 23A). No IL-2 was made constitutively (Fig 23A CNT). The effect of Compound III-3 (1 hr treatment with Compound III-3 prior to induction) on IL-2 induction was next assessed (Fig 23B). A Compound III-3 concentration of 500 nM inhibited IL-2 induction by greater than 80% (Fig 23B). A more extensive dose response experiment was performed with Compound III-3 and with Compound I-4 which yielded IC₅₀ values of 139 nM for Compound III-3 and 207 nM for Compound I-4 (Fig 23C).

It is intended that each of the patents, applications, and printed publications mentioned in this patent document be hereby incorporated by reference in their entirety.

As those skilled in the art will appreciate, numerous changes and modifications may be made to the preferred embodiments of the invention without departing from the spirit of the invention. It is intended that all such variations fall within the scope of the invention.

WHAT IS CLAIMED IS

- 1 A method for identifying a compound useful in treatment of AIDS peripheral neuropathy comprising contacting a cell or cell extract containing a multiple lineage kinase protein with a compound and determining whether said compound decreases activity of said multiple lineage kinase protein.
- 2 The method of claim 1 wherein said multiple lineage kinase protein is selected from the group consisting of multiple lineage kinase 1, multiple lineage kinase 2, multiple lineage kinase 3, leucine zipper bearing kinase, dual leucine zipper bearing kinase, and multiple lineage kinase 6
- 3 The method of claim 2 wherein said protein activity is determined by measuring the activity or phosphorylation state of a substrate of said protein, wherein said substrate is selected from the group consisting of JNK1, JNK2, JNK3, ERK1, ERK2, p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ , MEK1, MEK2, MKK3, MKK4 (SEK1), MEK5, MKK6, MKK7, jun, ATF2, ELK1, and the mammalian homolog of AEX-3
- 4 The method of claim 2 wherein said protein activity is determined by measuring the activity of a substrate of said protein, amount of a substrate of said protein, or mRNA encoding said substrate of said protein
- 5 A method of treating a human having AIDS peripheral neuropathy comprising administering to said human a compound that inhibits a multiple lineage kinase protein in a pharmaceutically acceptable salt or diluent.
- 6 The method of claim 5 wherein said compound has the formula



wherein

B and F, independently, each together with the carbon atoms to which they are attached, form either

an unsaturated 6-membered carbocyclic aromatic ring in which from one to three carbon atom(s) may be replaced by nitrogen atom(s), or

an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring in which either

one carbon atom is replaced with an oxygen, nitrogen, or sulfur atom, or

two carbon atoms are replaced with a sulfur and nitrogen atom, or an oxygen

and nitrogen atom,

A¹ and A² together represent O, and B¹ and B² together represent O,

R¹ is H, alkyl of 1-4 carbons (inclusive), aryl, arylalkyl, heteroaryl, and heteroarylalkyl, COR⁹, where R⁹ is alkyl of 1-4 carbons (inclusive), or aryl, preferably phenyl or naphthyl, -OR¹⁰, where R¹⁰ is H or alkyl of 1-4 carbons (inclusive), -CONH₂, -NR⁷R⁸, -(CH₂)_nNR⁷R⁸, where n is an integer of 1-4 (inclusive), or -O(CH₂)_nNR⁷R⁸, and either

R⁷ and R⁸ independently are H or alkyl of 1-4 carbons (inclusive), or

R⁷ and R⁸ are combined together to form a linking group of the general

formula -(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂-, where X¹ is O, S or CH₂,

R² is H, -SO₂R⁹, -CO₂R⁹, -COR⁹, alkyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably an alkyl of 1-4 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably an alkenyl of 1-4 carbons (inclusive), or alkynyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably an alkynyl of 1-4 carbons (inclusive), or a monosaccharide of 5-7 carbons (inclusive) where each hydroxyl group of the monosaccharide independently is either unsubstituted or is replaced by H, alkyl of 1-4 carbons (inclusive), alkylcarbonyloxy of 2-5 carbons (inclusive) or alkoxy of 1-4 carbons (inclusive), and either

each alkyl of 1-8 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive), or alkynyl of 1-8 carbons (inclusive) is unsubstituted, or

each alkyl of 1-8 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive), or alkynyl of 1-8 carbons (inclusive) independently is substituted with 1-3 aryl of 6-10 carbons (inclusive), preferably phenyl or naphthyl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂, OH, -OR⁹, -O(CH₂)_nNR⁷R⁸, -OCOR⁹, -OCONHR⁹, O-tetrahydropyranyl, NH₂, -NR⁷R⁸, -NR¹⁰COR⁹, -NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰CONR⁷R⁸, -NHC(=NH)NH₂, -NR¹⁰SO₂R⁹,

-S(O)_yR¹¹, where R¹¹ is H or alkyl of 1-4 carbons, aryl of 6-10 carbons, preferably phenyl or naphthyl, or heteroaryl and y is 1 or 2, -SR¹¹, -CO₂R⁹, -CONR⁷R⁸, -CHO, COR⁹, -CH₂OR⁷, -CH=NNR¹¹R¹², -CH=NOR¹¹, -CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -SO₂NR¹²R¹³, -PO(OR¹¹)₂, or OR¹⁴ where R¹⁴ is the residue of an amino acid after the hydroxyl group of the carboxyl group is removed, and either

R¹² and R¹³ independently are H, alkyl of 1-4 carbons (inclusive), aryl of 6-10 carbons, preferably phenyl or naphthyl, or heteroaryl, or

R¹² and R¹³ are combined together to form a linking group, preferably -(CH₂)₂-X¹-(CH₂)₂,

each R³, R⁴, R⁵ and R⁶, independently is H, aryl, preferably an aryl of 6-10 carbons (inclusive), more preferably phenyl or naphthyl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, -CN, CF₃, -NO₂, OH, -OR⁹, -O(CH₂)_nNR⁷R⁸, -OCOR⁹, -OCONHR⁹, NH₂, -CH₂OH, -CH₂OR¹⁴, -NR⁷R⁸, -NR¹⁰COR⁹, -NR¹⁰CONR⁷R⁸, -SR¹¹, -S(O)_yR¹¹ where y is 1 or 2, -CO₂R⁹, -COR⁹, -CONR⁷R⁸, -CHO, -CH=NOR¹¹, -CH=NR⁹, -CH=NNR¹¹R¹², -(CH₂)_nSR⁹, where n is an integer of 1-4 (inclusive), -(CH₂)_nS(O)_yR⁹, -CH₂SR¹⁵ where R¹⁵ is alkyl of 1-4 carbons (inclusive),

-CH₂S(O)_yR¹⁴, -(CH₂)_nNR⁷R⁸, -(CH₂)_nNHR¹⁴, alkyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably alkyl of 1-4 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably alkenyl of 1-4 carbons (inclusive), alkynyl of 1-8 carbons (inclusive), preferably alkynyl of 1-4 carbons (inclusive), and either

each alkyl of 1-8 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive) or alkynyl of 1-8 carbons (inclusive) is unsubstituted, or

each alkyl of 1-8 carbons (inclusive), alkenyl of 1-8 carbons (inclusive) or alkynyl of 1-8 carbons (inclusive) is substituted as described in d)2), above,

X is either

an unsubstituted alkylene of 1-3 carbons (inclusive), or

X is an alkylene of 1-3 carbons (inclusive) substituted with one R² group, preferably OR¹⁰, -SR¹⁰, R¹⁵, where R¹⁵ is an alkyl of 1-4 carbons (inclusive), phenyl, naphthyl, arylalkyl of 7-14 carbons (inclusive), preferably benzyl, or

X is -CH=CH-, -CH(OH)-CH(OH)-, -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -CR¹⁰)₂-, -C(=O)-, -C(=NOR¹¹)-, -C(OR¹¹)(R¹¹)-, -C(=O)CHR¹⁵-, -CHR¹⁵)C(=O)-,

-85-

$-C(=NOR^{11})CHR^{15}-$, $-CHR^{15}C(=NOR^{11})-$, $-CH_2Z-$, $-Z-CH_2-$, $-CH_2ZCH_2-$,
 where Z is, C(OR¹¹)(R¹¹), O, S, C(=O), C(=NOR¹¹), or NR¹¹,

or

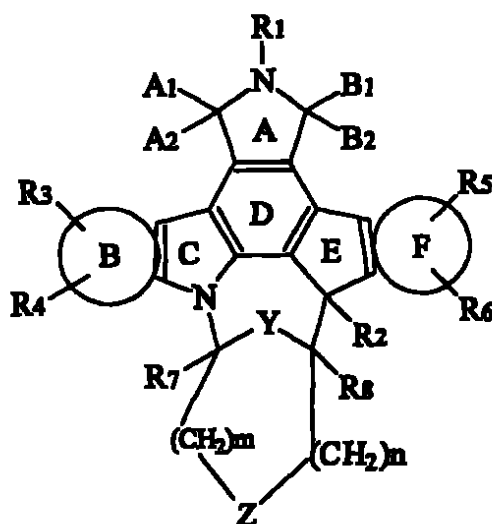
A¹ and A² together are each independently H, H, H, -OR¹¹, H, -SR¹¹, H, -NR¹¹)₂, or
 5 together represent =S or =NR¹¹, B¹ and B² together represent O, and each R¹, R², R³, R⁴,
 R⁵, R⁶ and X are as defined above,

or

A¹ and A² together represent O, and B¹ and B² together are each independently H, H, H,
 10 -OR¹¹, H, -SR¹¹, H, -NR¹¹)₂, or together represent =S or =NR¹¹, and each R¹, R², R³, R⁴,
 R⁵, R⁶ and X are as above

7 The method of claim 6 wherein A₁, A₂, R₁, R₃, R₄, R₅, and R₆ are H, B₁ and B₂
 together represent O, R₂ is CH₂CH₂OH, and X is CH₂

8 The method of claim 5 wherein said compound has the formula



15 wherein

ring B and ring F, independently, and each together with the carbon atoms to which they are
 attached, are selected from the group consisting of

- a) an unsaturated 6-membered carbocyclic aromatic ring in which from 1 to 3 carbon atoms
 may be replaced by nitrogen atoms,
- 20 b) an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring, and
- c) an unsaturated 5-membered carbocyclic aromatic ring in which either

- 1) one carbon atom is replaced with an oxygen, nitrogen, or sulfur atom,
- 2) two carbon atoms are replaced with a sulfur and a nitrogen atom, an oxygen and a nitrogen atom, or two nitrogen atoms, or
- 3) three carbon atoms are replaced with three nitrogen atoms,

5 R^1 is selected from the group consisting of

- a) H, substituted or unsubstituted alkyl having from 1 to 4 carbons, substituted or unsubstituted aryl, substituted or unsubstituted arylalkyl, substituted or unsubstituted heteroaryl, or substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,
- b) $-C(=O)R^9$, where R^9 is selected from the group consisting of alkyl, aryl and heteroaryl,
- c) $-OR^{10}$, where R^{10} is selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons,
- d) $-C(=O)NH_2$, $-NR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pOR^{10}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$ and $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, wherein p is from 1 to 4, and wherein either

- 1) R^{11} and R^{12} are each independently selected from the group consisting of H and alkyl having from 1 to 4 carbons, or
- 2) R^{11} and R^{12} together form a linking group of the formula $-(CH_2)_2-X^1-(CH_2)_2-$, wherein X^1 is selected from the group consisting of $-O-$, $-S-$, and $-CH_2-$,

20 R^2 is selected from the group consisting of H, alkyl having from 1 to 4 carbons, $-OH$, alkoxy having from 1 to 4 carbons, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, substituted or unsubstituted arylalkyl having from 6 to 10 carbons, and substituted or unsubstituted heteroarylalkyl,

R^3 , R^4 , R^5 and R^6 are each independently selected from the group consisting of

- 25 a) H, aryl, heteroaryl, F, Cl, Br, I, $-CN$, CF_3 , $-NO_2$, $-OH$, $-OR^9$, $-O(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-OC(=O)R^9$, $-OC(=O)NR^2R^7$, $-OC(=O)NR^{11}R^{12}$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, $-CH_2OR^{10}$, $-NR^{11}R^{12}$, $-NR^{10}S(=O)_2R^9$, $-NR^{10}C(=O)R^9$,
- b) $-CH_2OR^{14}$, wherein R^{14} is the residue of an amino acid after the hydroxyl group of the carboxyl group is removed,
- 30 c) $-NR^{10}C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CO_2R^2$, $-C(=O)R^2$, $-C(=O)NR^{11}R^{12}$, $-CH=NOR^2$, $-CH=NR^9$, $-(CH_2)_pNR^{11}R^{12}$, $-(CH_2)_pNHR^{14}$, or $-CH=NNR^2R^{2A}$ wherein R^{2A} is the same as R^2 ,

-87-

d) $-S(O)_yR^2-(CH_2)_pS(O)_yR^9$, $-CH_2S(O)_yR^{14}$ wherein y is 0, 1 or 2,

e) alkyl having from 1 to 8 carbons, alkenyl having from 2 to 8 carbons, and alkynyl having 2 to 8 carbons, wherein

1) each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is unsubstituted, or

2) each alkyl, alkenyl, or alkynyl group is substituted with 1 to 3 groups selected from the group consisting of aryl having from 6 to 10 carbons, heteroaryl, arylalkoxy, heterocycloalkoxy, hydroxyalkoxy, alkoxy-alkoxy, hydroxyalkylthio, alkoxy-alkylthio, F, Cl, Br, I, -CN, -NO₂, -OH, -OR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹², -X²(CH₂)_pCO₂R⁹, -X²(CH₂)_pS(O)_yR⁹, -X²(CH₂)_pNR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -OC(=O)R⁹, -OCONHR², -O-tetrahydropyranyl, -NR¹¹R¹², -NR¹⁰C(=O)R⁹, -NR¹⁰CO₂R⁹, -NR¹⁰C(=O)NR¹¹R¹², -NHC(=NH)NH₂, NR¹⁰S(O)₂R⁹, -S(O)_yR⁹, -CO₂R², -C(=O)NR¹¹R¹², -C(=O)R², -CH₂OR¹⁰, -CH=NNR²R^{2A}, -CH=NOR², -CH=NR⁹, -CH=NNHCH(N=NH)NH₂, -S(=O)₂NR²R^{2A}, -P(=O)(OR¹⁰)₂, -OR¹⁴, and a monosaccharide having from 5 to 7 carbons wherein each hydroxyl group of the monosaccharide is independently either unsubstituted or is replaced by H, alkyl having from 1 to 4 carbons, alkylcarbonyloxy having from 2 to 5 carbons, or alkoxy having from 1 to 4 carbons,

X² is O, S, or NR¹⁰,

R⁷ and R⁸ are each independently selected from the group consisting of H, alkyl having from 1 to 4 carbons, alkoxy having from 1 to 4 carbons, substituted or unsubstituted arylalkyl having from 6 to 10 carbons, substituted or unsubstituted heteroarylalkyl, -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR¹¹R¹², and -(CH₂)_pNR¹¹R¹², or R⁷ and R⁸ together form a linking group of the formula -CH₂-X³-CH₂-, wherein X³ is X² or a bond,

m and n are each independently 0, 1, or 2,

Y is selected from the group consisting of -O-, -S-, -N(R¹⁰)-, -N⁺(O)(R¹⁰)-, -N(OR¹⁰)-, and -CH₂-,

Z is selected from the group consisting of a bond, -O-, -CH=CH-, -S-, -C(=O)-, -CH(OR¹⁰)-, -N(R¹⁰)-, -N(OR¹⁰)-, CH(NR¹¹R¹²)-, -C(=O)N(R¹⁷)-, -N(R¹⁷)C(=O)-, -N(S(O)_yR⁹)-, -N(S(O)_yNR¹¹R¹²)-, -N(C(=O)R¹⁷)-, -C(R¹⁵R¹⁶)-, -N⁺(O)(R¹⁰)-, -CH(OH)-CH(OH)-, and -CH(O(C(=O)R⁹))CH(OC(=O)R^{9A})-, wherein R^{9A} is the same as R⁹,

-88-

R^{15} and R^{16} are independently selected from the group consisting of H, -OH, $-C(=O)R^{10}$, $-O(C=O)R^9$, hydroxyalkyl, and $-CO_2R^{10}$.

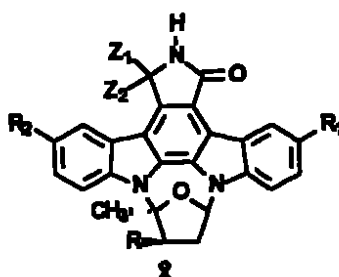
R¹⁷ is selected from the group consisting of H, alkyl, aryl, and heteroaryl.

A¹ and A² are selected from the group consisting of H, H, H, OR², H, -SR², H, -N(R²)₂, and
 5 a group wherein A¹ and A² together form a moiety selected from the group consisting of =O,
 =S, and =NR².

B¹ and B² are selected from the group consisting of H, H, H, -OR², H, -SR², H, -N(R²)₂, and a group wherein B¹ and B² together form a moiety selected from the group consisting of =O, =S, and =NR².

10 with the proviso that at least one of the pairs A^1 and A^2 , or B^1 and B^2 , form $=0$

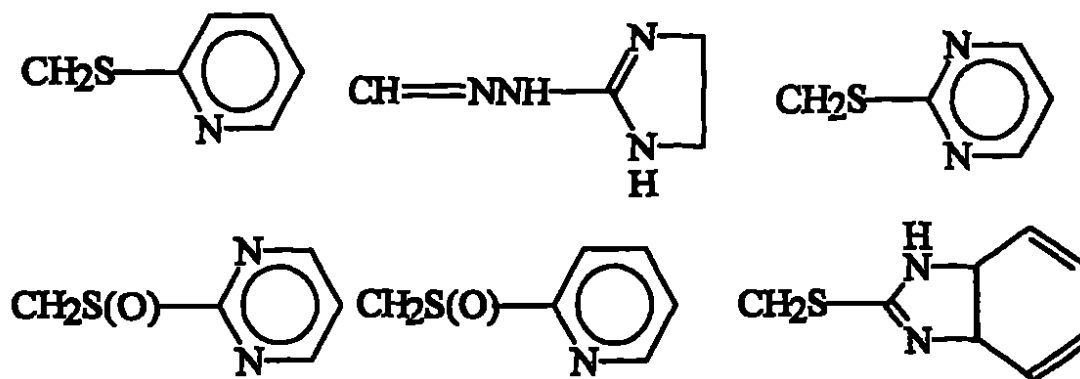
9 The method of claim 5 wherein said compound has the formula



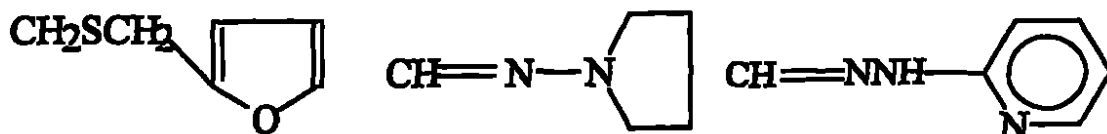
where

Z_1 is H and Z_2 is H or Z_1 and Z_2 together form =O,

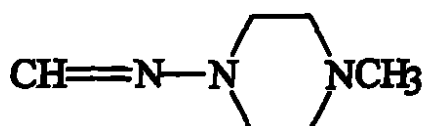
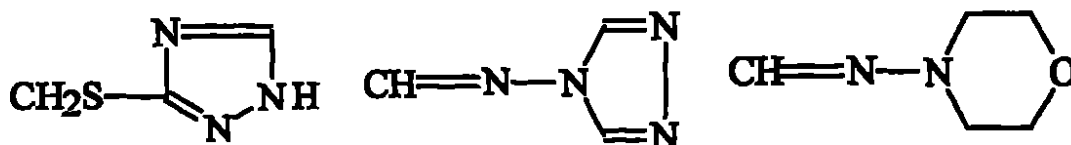
15 R_1 is selected from the group consisting of H, Cl, $CH_2SO_2C_2H_5$, Br, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $CH_2S(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH_2$, $n-C_4H_9$, $NHCONHC_6H_5$, $NHCONHC_2H_5$, $CH_2SC_2H_5$, $CH_2SC_4H_9$, $N(CH_3)_2$, CH_3 , $CH_2OCONHC_2H_5$, $NHCO_2CH_3$, $CH_2OC_2H_5$, $CH_2N(CH_3)_2$, OH, O n -propyl, $CH=NNH-C(=NH)NH_2$, $CH=N-N(CH_3)_2$, $CH_2S(CH_2)_2NH-n-C_4H_9$, $CH_2OCH_2OCH_2CH_3$, $CH_2S[3-(1,2,4\text{-triazine})]$, $CH_2CH_2SCH_3$,



-89-



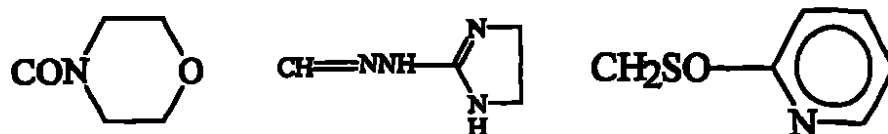
20



and

25 R_2 is selected from the group consisting of H, Br, Cl, I, $\text{CH}_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCONHC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{S}[3\text{-(1,2,4-triazine)}]$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, and CH_2OH ,

30 X is selected from the group consisting of H, CH_2OH , $\text{CH}_2\text{NH-SerineH}$, CO_2CH_3 , CONHC_6H_5 , $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{NHCO}_2\text{CH}_3$, CH_2N_3 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Glycine}$, $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{NHCO}_2-$, CONH_2 , CONHC_2H_5 , $\text{CH}_2\text{NH-Serine}$, CH_2SOCH_3 , $\text{CH}=\text{NOH}$, $\text{CH}_2\text{NH-Proline}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2(2\text{-Pyridyl})$, $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $\text{CH}=\text{NNHCONH}_2$, $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{SC}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{SOC}_6\text{H}_5$, $\text{CO}_2n\text{-hexyl}$, CONHCH_3 , $\text{CO}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$,



35

and

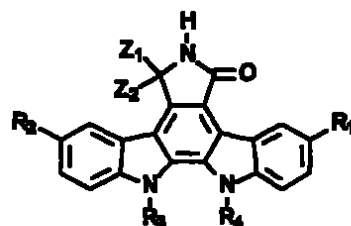
R is selected from the group consisting of OH , and OCH_3

10 The method of claim 9 wherein Z_1 and Z_2 are H, X is CO_2CH_3 , and R is OH

-90-

11 The method of claim 9 wherein Z_1 and Z_2 are H, X is CO_2CH_3 , R_1 and R_2 are $\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_3$, and R is OH.

12 The method of claim 5 wherein said compound has the formula



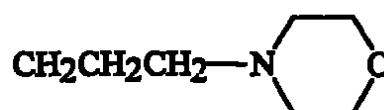
5 wherein

Z_1 is H and Z_2 is H or Z_1 and Z_2 together form $=\text{O}$,

R_1 is H or Br,

R_2 is H,

R_3 is H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, or



10 and

R_4 is H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ or $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

| | USUARIO | RADICADOR |
|---|-----------------------|-----------|
| PATENTE DE INVENCION | () | () |
| MODELO DE UTILIDAD | () | () |
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | () | () |
| - Descripción de la invención. | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes. | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas. | () | () |
| COMPLETA () | INCOMPLETA () | () |
| DISEÑO INDUSTRIAL () | | |
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |
| COMPLETA () | INCOMPLETA () | () |
| ESQUEMA DE TRAZADO () | | |
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |
| COMPLETA () | INCOMPLETA () | () |
| Firma Responsable: | | |

Fecha Radicación 03011303 00000000 Folios 233
Fecha (ACB): 2003-02-11 16:22:40
Trámite 011 FCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: E320 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES