



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.02.22

(21) Номер заявки  
201890081

(22) Дата подачи заявки  
2015.10.22

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)  
*C07D 401/14* (2006.01)  
*C07K 14/525* (2006.01)  
*C07D 471/00* (2006.01)  
*C07K 14/705* (2006.01)

## (54) МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

(31) 1510758.4

(32) 2015.06.18

(33) GB

(43) 2018.06.29

(86) PCT/EP2015/074490

(87) WO 2016/202411 2016.12.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЮСБ БАЙОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:  
О'Коннелл Джеймс Филип, Портер  
Джон Роберт, Лоусон Аластер,  
Криплин Борис, Рапеки Стивен  
Эдуард, Норман Тимоти Джон,  
Макмиллан Дейвид Джеймс,  
Уорреллоу Грэм Джон, Брукингс  
Даниел Кристофер, Александер Рикки  
Питер (GB)

(74) Представитель:  
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)

(56) LAURA F. SILVIAN ET AL: "Small Molecule Inhibition of the TNF Family Cytokine CD40 Ligand through a Subunit Fracture Mechanism", ACS CHEMICAL BIOLOGY, vol. 6, no. 6, 17 June 2011 (2011-06-17), pages 636-647, XP055231751, US ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb2000346 cited in the application the whole document

MOLLY M HE ET AL: "Small-Molecule Inhibition of TNF-alpha", SCIENCE, vol. 310, no. 5750, 11 November 2005 (2005-11-11), pages 1022-1025, XP008147896, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US ISSN: 0036-8075 the whole document

GANESAN L ET AL: "Exploratory computational assessment of possible binding modes for small molecule inhibitors of the CD40-CD154 costimulatory interaction", PHARMAZIE, vol. 67, no. 5, May 2012 (2012-05), pages 374-379, XP002751609, ISSN: 0031-7144, DOI: 10.1691/PH.2012.1696 the whole document

ANDREAS HOFFMANN ET AL: "New Binding Mode to TNF-Alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein", PLOS ONE, vol. 7, no. 2, E31298, 20 February 2012 (2012-02-20), pages 1-10, XP055231011, DOI: 10.1371/journal.pone.0031298 the whole document

R. ALZANI ET AL: "Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor.alpha.", BIOCHEMISTRY, vol. 34, no. 19, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 6344-6350, XP055231745, US ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00019a012 the whole document  
WO-A1-2014009295

(57) Настоящее изобретение относится к области передачи сигнала TNF. Идентифицированы соединения, которые способны модулировать передачу сигнала тримеров TNF через рецепторы. В связи с этим предлагаются способы идентификации таких соединений. Соединения сами по себе пригодны для использования в терапевтических целях.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к способам идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала тримеров членов суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF) через рецепторы TNF. Прежде всего, настоящее изобретение относится к идентификации новых низкомолекулярных модуляторов. Настоящее изобретение также относится к соединениям, идентифицируемым указанными способами, и к комплексам соединений и тримеров. Соединения и комплексы можно использовать в терапевтических целях.

### **Предпосылки создания настоящего изобретения**

Суперсемейство фактора некроза опухоли (TNF) представляет собой семейство белков, которые проявляют общую регуляторную функцию выживания клеток и их гибели. Члены суперсемейства TNF характеризуются общим аминокислотным мотивом ядра молекулы, которое состоит из двух антипараллельных  $\beta$ -складчатых слоев с антипараллельными  $\beta$ -цепями, формирующих  $\beta$ -структуру типа "рулета". Другой общий признак членов суперсемейства TNF заключается в формировании гомо- или гетеротримерных комплексов. Именно эти тримерные формы членов суперсемейства TNF связываются со специфическими рецепторами суперсемейства TNF и активируют их.

TNF $\alpha$  является исходным членом суперсемейства TNF. Разрегуляция продуцирования TNF $\alpha$  принимает участие в развитии ряда патологических состояний, имеющих большое значение в медицине. Например, TNF $\alpha$  принимает участие в развитии ревматоидного артрита, воспалительного заболевания кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), боли, эпилепсии, остеопороза, астмы, системной красной волчанки (SLE) и рассеянного склероза (MS). Другие члены суперсемейства TNF также принимают участие в развитии патологических состояний, включая аутоиммунные заболевания.

Стандартные антагонисты членов суперсемейства TNF являются высокомолекулярными и действуют за счет ингибирования связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором. Примеры стандартных антагонистов включают антитела анти-TNF $\alpha$ , прежде всего моноклональные антитела, такие как инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®) и цертолизумаб пегол (Cimzia®), или растворимые гибридные белки на основе рецептора TNF $\alpha$ , такие как этанерцепт (Enbrel®).

### **Краткое описание сущности изобретения**

Если рецепторы присутствуют в эквивалентной концентрации или в избытке по сравнению с концентрацией мономеров TNF (т.е. молярное концентрационное соотношение рецепторы/мономеры составляет по крайней мере 1:1 (молярное концентрационное соотношение рецепторы/тримеры составляет по крайней мере 3:1)), тример TNF, как правило, связывается с тремя рецепторами. В настоящем изобретении идентифицированы низкомолекулярные соединения (SME), которые модулируют передачу сигнала TNF. Указанные соединения SME действуют за счет связывания с тримерной формой TNF и индукции и/или стабилизации конформационного изменения в структуре тримера. Тримеры, связанные с соединениями, характеризуются измененной аффинностью по отношению к необходимым рецепторам, прежде всего, сниженной аффинностью ко второму и третьему рецепторам, при этом число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, уменьшается. Соответственно, снижается передача сигнала в следующих сигнальных путях через рецепторы. В связи с этим, указанные соединения можно использовать при лечении состояний, опосредованных TNF. В настоящем изобретении также разработаны способы, которые позволяют идентифицировать соединения, которые способны таким образом модулировать передачу сигнала TNF.

В связи с этим, в настоящем изобретении предлагается способ идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала тримерного белка через необходимый рецептор суперсемейства TNF, при этом указанный способ включает определение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, и таким образом обеспечивает идентификацию способности соединения модулировать передачу сигнала через рецептор.

В настоящем изобретении также предлагается:

соединение, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала члена суперсемейства TNF через необходимый рецептор, при этом соединение обеспечивает связывание с комплексом тример-соединение эквивалентного среднего числа рецепторов, или изменение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, по сравнению с контрольным образцом,

соединение формулы (5) или его фармацевтически приемлемая соль или сольват,

комплекс, включающий тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и соединение, как определено выше,

соединение или комплекс, как определено выше, предназначенные для применения в способе лечения организма человека или животного, и

фармацевтическая композиция, включающая соединение или комплекс, как определено выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны взаимодействия, участвующие в передаче сигнала TNF $\alpha$ /TNF-R1 в отсутствие соединения. Величина  $K_D$  связывания тримеров TNF $\alpha$  с первыми двумя рецепторами составляет 93 пМ, а величина  $K_D$  связывания с третьим рецептором составляет приблизительно 1 мкМ. Затем указанные комплексы тримеров и рецепторов (с тремя связанными рецепторами) образуют сигнальные структуры за счет димеризации рецепторов, что в результате приводит к передаче сигнала в следующих сигнальных путях.

На фиг. 2 представлена кристаллическая структура, на которой только два димера рецепторов взаимодействуют с тримером TNF $\alpha$ , стабилизированным соединением.

На фиг. 3 показано действие двух типов соединений (А и Б) на передачу сигнала TNF $\alpha$ /TNF-R1. Оба соединения не оказывают влияния на образование димеров рецепторов, однако индуцируют и/или стабилизируют образование тримеров с искаженными конформациями. Тримеры с первым типом соединения (А) связываются с первым и вторым рецептором, но характеризуются сниженной аффинностью по отношению к третьему рецептору. Соответственно, тримеры формируют комплекс только с двумя связанными рецепторами. Тримеры со вторым соединением (Б) связываются с первым рецептором, но характеризуются сниженной аффинностью по отношению ко второму и третьему рецепторам. Следовательно, тримеры формируют комплекс только с одним связанным рецептором. Снижение числа рецепторов, связанных с тримером, препятствует образованию сигнальных структур.

На фиг. 4 показаны структуры соединений, которые способны модулировать передачу сигнала тримеров членов суперсемейства TNF через рецепторы TNF. На фиг. 4А показана структура соединения формулы (1), на фиг. 4Б показана структура соединения формулы (2), на фиг. 4В показана структура соединения формулы (3), на фиг. 4Г показана структура соединения формулы (4), а на фиг. 4Д показана структура соединения формулы (5).

На фиг. 5 представлены результаты экспериментов, полученных методом эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием соединения (2), TNF $\alpha$  и TNF-R1 (в 3,2-кратном избытке относительно количества комплекса тример-соединение). При низких концентрациях соединения (90 мкМ) преобладающий пик соответствует связыванию трех рецепторов с комплексом тример-соединение. Указанный пик характеризуется наличием слабо выраженного плеча, которое указывает на связывание некоторой части комплексов тример-соединение с двумя рецепторами. При увеличении концентрации соединения (690 мкМ), т.е. при его избыточном содержании относительно концентрации тримеров TNF, преобладающий пик соответствует связыванию двух рецепторов с комплексом тример-соединение. Слабое плечо пика свидетельствует о том, что некоторая часть тримеров все еще связана со всеми тремя рецепторами. На указанной фигуре представлены также результаты контрольных экспериментов, проведенных с использованием TNF $\alpha$  в отдельности, а также TNF $\alpha$  и TNF-R1 (отрицательный контроль в отсутствие соединения). При использовании отрицательных контролей, т.е. TNF $\alpha$  и TNF-R1, три рецептора связываются с комплексом тример-соединение. Указанный эффект достигается за счет предварительной инкубации TNF-R1 в 3,2-кратном избытке относительно количества тримера TNF $\alpha$ . Дополнительные данные представлены на фиг. 6.

На фиг. 6 приведены результаты контрольного испытания для экспериментов, полученные методом SEC, описанных на фиг. 5. TNF $\alpha$  инкубировали в присутствии различных концентраций TNF-R1 (изменяющихся от 1,2- до 5-кратного избытка количества рецепторов относительно количества тримеров (рецепторы/тримеры)). При увеличении концентрации добавляемого TNF-R1, молекулярная масса комплекса с TNF $\alpha$  увеличивается (пик смещается влево). Добавление 5-кратного избытка TNF-R1 относительно концентрации тримеров TNF $\alpha$  не приводит к увеличению молекулярной массы комплекса по сравнению с молекулярной массой комплекса, который образуется при использовании 3,2-кратного избытка рецепторов. Данный факт свидетельствует о насыщении TNF $\alpha$  при молярном соотношении 3 рецептора TNF-R1/3 мономера TNF $\alpha$  (3 рецептора TNF-R1 на один тример).

На фиг. 7 показаны результаты экспериментов, полученные методом SEC с использованием соединения (5). TNF $\alpha$  и TNF-R1 (при 3,5-кратном избытке рецепторов относительно концентрации комплекса тример-соединение). Представлены также результаты для контрольных образцов, первый из которых содержал TNF $\alpha$  и рецепторы в отсутствие соединения. Второй и третий контрольные образцы также содержали TNF $\alpha$  и рецепторы в отсутствие соединения, однако при этом использовали мутантную форму TNF $\alpha$ , чтобы нарушить взаимодействия в третьем, а также в третьем и во втором участках связывания рецепторов. Для контрольного образца, содержащего TNF $\alpha$  и рецепторы, наблюдается пик, указывающий на связывание трех рецепторов с тримером. Для контрольного образца, содержащего мутацию в одном участке связывания рецептора, наблюдается пик, соответствующий связыванию двух рецепторов с тримером, а для контрольных образцов, содержащих мутации в двух участках связывания, наблюдается пик, соответствующий связыванию одного рецептора с тримером. Пик, полученный в присутствии соединения (5), расположен посередине между пиками, полученными с использованием второго и третьего контрольных образцов, и, следовательно, указывает на присутствие смеси тримеров, связанных с двумя рецепторами и, соответственно, с одним рецептором.

На фиг. 8А-8Г представлены результаты экспериментов, полученные методом кристаллографии, свидетельствующие о связывании двух рецепторов с комплексом тример-соединение в присутствии соединения (1). На фиг. 8А-Г представлена одна и та же кристаллическая структура, но с различных сторон.

На фиг. 9 представлены результаты экспериментов, полученные методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) при увеличении концентрации соединения (3). Полное ингибирование, которое можно наблюдать в присутствии блокирующего антитела, приводит к отсутствию связывания рецепторов с  $TNF\alpha$ , т.е. к полному подавлению сигнала FRET. В этом случае сигнал FRET подавляется частично. При самых высоких концентрациях соединения максимальное подавление сигнала составляет 29%, свидетельствуя об ингибировании связывания одного из трех рецепторов с тримером TNF.

На фиг. 10 представлены результаты экспериментов, полученные методом FRET при увеличении концентрации соединения (4). Как и в предыдущем примере, наблюдается частичное подавление сигнала FRET. При самых высоких концентрациях соединения, максимальное подавление сигнала составляет 36%. Аналогично наблюдениям, описанным на фиг. 9, данный факт свидетельствует об ингибировании связывания одного из трех рецепторов с тримером TNF.

На фиг. 11 представлены результаты определения стехиометрического состава при связывании рецепторов, полученные методом масс-спектрометрии ионной подвижности. В контрольном образце (содержащем  $TNF\alpha$  и избыток рецепторов TNF-R1), наблюдается связывание в среднем трех рецепторов с комплексом тример-соединение. И наоборот, в присутствии соединения (3) стехиометрический состав при связывании рецептора снижается, и с комплексом тример-соединение связывается в основном два рецептора.

На фиг. 12 показано определение констант диссоциации в контрольном образце, содержащем  $TNF\alpha$  и TNF-R1. При увеличении концентрации рецепторов TNF-R1, добавляемых к  $TNF\alpha$ , наблюдаются ионы с различной массой, которые затем исчезают соответственно с появлением сначала одного рецептора TNF-R1, связанного с  $TNF\alpha$ , затем двух рецепторов TNF-R1, связанных с  $TNF\alpha$ , и, наконец, трех рецепторов TNF-R1, связанных с  $TNF\alpha$ .

На фиг. 13 показано определение констант диссоциации в образце, содержащем  $TNF\alpha$ , TNF-R1 и соединение (3). Представленные данные свидетельствуют о значительном ухудшении взаимодействия (снижении аффинности)  $TNF\alpha$  с третьим рецептором TNF-R1 (при концентрации от 0,2 до 9,612 нМ).

#### **Краткое описание перечня последовательностей**

SEQ ID NO: 1 и 2 представляют последовательности, использованные в разделе примеры.

SEQ ID NO: 3 представляет последовательность HCVR антитела C185\_01974.0.

SEQ ID NO: 4 представляет последовательность LCVR антитела C185\_01974.0.

SEQ ID NO: 5 представляет аминокислотную последовательность тяжелой цепи mIgG1 C185\_01974.0.

SEQ ID NO: 6 представляет аминокислотную последовательность к-легкой цепи антитела C185\_01974.0.

SEQ ID NO: 7 представляет последовательность HCVR антитела C185\_01979.0.

SEQ ID NO: 8 представляет последовательность LCVR антитела C185\_01979.0.

SEQ ID NO: 9 представляет аминокислотную последовательность тяжелой цепи mIgG1 C18501979.0.

SEQ ID NO: 10 представляет аминокислотную последовательность к-легкой цепи антитела C185\_01979.0.

#### **Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения**

Следует понимать, что различные варианты применения описанных способов и продуктов могут зависеть от конкретных потребностей в данной области. Следует также понимать, что терминология, использованная в данном контексте, предназначена только для описания отдельных вариантов осуществления настоящего изобретения и не ограничивает его объем.

Кроме того, использованные в описании настоящего изобретения и в прилагаемой формуле формы в единственном числе включают соответствующие формы во множественном числе, если в контексте явным образом не указано иное.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в данном контексте выше или ниже, таким образом, включены в полном объеме в настоящее описание в качестве ссылок.

Способы идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF.

Настоящее изобретение относится к способам (методам анализа) идентификации соединений, которые способны связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала тримерного белка через необходимый рецептор суперсемейства TNF. В связи с этим, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, также известны как модуляторы.

Как описано в данном контексте ниже, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, обычно предотвращают или снижают (подавляют) передачу сигнала TNF через необхо-

димые рецепторы. Такие соединения являются антагонистами передачи сигнала TNF. Однако способы по настоящему изобретению можно также использовать для идентификации соединений, проявляющих агонистическую активность, которые усиливают (повышают) передачу сигнала TNF через необходимые рецепторы. В обоих случаях соединения способны модулировать передачу сигнала TNF, не конкурируя с высоко аффинным взаимодействием члена суперсемейства TNF с его рецептором.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF. В связи с этим, соединения являются аллостерическими модуляторами, которые связываются с природными агонистами рецепторов суперсемейства TNF, т.е. с тримерными формами членов суперсемейства TNF. Способы скрининга соединений, которые способны связываться с тримерами TNF, описаны в данном контексте ниже.

В настоящее время известны 22 члена суперсемейства TNF: TNF $\alpha$  (TNFSF1A), TNF $\beta$  (TNFSF1B), CD40L (TNFSF5), BAFF (TNFSF13B/BlyS), APRIL (TNFSF13), OX40L (TNFSF4), RANKL (TNFSF11/TRANCE), TWEAK (TNFSF12), TRAIL (TNFSF10), TL1A (TNFSF15), LIGHT (TNFSF14), лимфотоксин, лимфотоксин- $\beta$  (TNFSF3), 4-1BBL (TNFSF9), CD27L (TNFSF7), CD30L (TNFSF8), EDA (эктодисплазин), EDA-A1 (эктодисплазин A1), EDA-A2 (эктодисплазин A2), FASL (TNFSF6), NGF и GITR (TNFSF18).

Способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала любого члена суперсемейства TNF, включая 22 известных члена суперсемейства TNF. Соединения, идентифицированные с использованием способов по настоящему изобретению, способны специфично связываться с тримерными формами одного или более членов суперсемейства TNF. Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, способны специфично связываться только с одним из членов суперсемейства TNF, и не связываться с любыми другими членами суперсемейства TNF. Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, способны также специфично связываться с двумя, тремя, четырьмя или вплоть до всех членов суперсемейства TNF.

Специально следует подчеркнуть, что соединения связываются с исследуемой молекулой или с молекулами, в данном случае с тримерной формой члена суперсемейства TNF, не проявляя перекрестную реактивность в отношении любой другой молекулы, которая может включать другие члены суперсемейства TNF. Перекрестную реактивность можно оценить любым пригодным способом, например, методом анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса. Перекрестную реактивность соединения в отношении тримерной формы члена суперсемейства TNF по сравнению с молекулой, отличающейся от тримерной формы конкретного члена суперсемейства TNF, можно рассматривать как значительную, если степень связывания соединения с другой молекулой выше по крайней мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или на 100% по сравнению со степенью связывания соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF. Степень связывания соединения, которое является специфичным в отношении тримерной формы члена суперсемейства TNF, с другой молекулой может снижаться на величину менее 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или 20% по сравнению со степенью связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF. Предпочтительно, степень связывания соединения с другой молекулой снижается на величину менее 20%, менее 15%, менее 10% или менее 5%, менее 2% или менее 1% по сравнению со степенью связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF.

Предпочтительно, членом суперсемейства TNF является TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  существует в растворимой (TNF $\alpha_s$ ) и мембраносвязанной (TNF $\alpha_m$ ) формах. При упоминании в данном контексте TNF $\alpha$ , ссылка включает обе формы - TNF $\alpha_s$  и TNF $\alpha_m$ . Прежде всего, предпочтительным TNF $\alpha$  является TNF $\alpha_s$ .

В настоящее время известно 34 рецептора TNF: 4-1BB (TNFRSF9/CD137), NGF R (TNFRSF16), BAFF R (TNFRSF13C), остеопротегерин (TNFRSF11B), BCMA (TNFRSF17), OX40 (TNFRSF4), CD27 (TNFRSF7), RANK (TNFRSF11A), CD30 (TNFRSF8), RELT (TNFRSF19L), CD40 (TNFRSF5), TACI (TNFRSF13B), DcR3 (TNFRSF6B), TNFRH3 (TNFRSF26), DcTRAIL R1 (TNFRSF23), DcTRAIL R2 (TNFRSF22), TNF-R1 (TNFRSF1A), TNF-R2 (TNFRSF1B), DR3 (TNFRSF25), TRAIL R1 (TNFRSF10A), DR6 (TNFRSF21), TRAIL R2 (TNFRSF10B), EDAR, TRAIL R3 (TNFRSF10C), Fas (TNFRSF6/CD95), TRAIL R4 (TNFRSF10D), GITR (TNFRSF18), TROY (TNFRSF19), HVEM (TNFRSF14), TWEAK R (TNFRSF12A), TRAMP (TNFRSF25), лимфотоксин- $\beta$  R (TNFRSF3) и XEDAR.

Необходимый рецептор представляет собой рецептор, который действует совместно с конкретным членом суперсемейства TNF. Прежде всего, необходимый рецептор представляет собой рецептор, который активируется членом суперсемейства TNF. Примеры членов суперсемейства TNF связываются с рецептором, и активация рецептора вызывает передачу сигнала в следующих сигнальных путях. Комбинации членов суперсемейства TNF и их необходимых рецепторов известны в данной области.

Предпочтительно, способы по настоящему изобретению используют для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала через рецепторы TNF-R1 (TNFR1) и TNF-R2 (TNFR2). При упоминании в данном контексте рецептора TNF-R, указанная ссылка включает оба рецептора TNF-R1 и TNF-R2, включая внеклеточный домен (ECD) рецепторов TNF-R1 и TNF-R2. Более предпочтительно,

членом суперсемейства TNF является TNF $\alpha$ , а рецептором TNF является TNF-R1 или TNF-R2. Еще более предпочтительно, членом суперсемейства TNF является TNF $\alpha$ , а рецептором TNF является TNF-R1. Наиболее предпочтительно, членом суперсемейства TNF является TNF $\alpha_s$ , а рецептором TNF является TNF-R1.

Способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации соединений, которые действуют за счет специфичной модуляции передачи сигнала членов суперсемейства TNF через рецептор TNF-R1. Прежде всего, соединения могут действовать за счет модуляции передачи сигнала членов суперсемейства TNF через рецептор TNF-R1, но при этом не оказывать влияния на передачу сигнала членов суперсемейства TNF через рецептор TNF-R2.

Члены суперсемейства TNF и их рецепторы можно очищать или получать в виде смесей, например, в культивируемых клетках, образцах тканей, в жидкостях тела или в культуральной среде.

В способах по настоящему изобретению были идентифицированы соединения, которые модулируют передачу сигнала тримерного белка через необходимые рецепторы. Модуляция передачи сигнала может означать усиление (повышение) передачи сигнала через необходимые рецепторы. Соединения, которые усиливают передачу сигнала, являются агонистами. Однако, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, обычно предотвращают или снижают (подавляют) передачу сигнала через необходимые рецепторы. Такие соединения известны как антагонисты.

Уровень передачи сигнала можно детектировать при проведении анализа, который позволяет оценить эффекты передачи сигнала, наблюдаемые в следующих сигнальных путях рецептора суперсемейства TNF. Например, для оценки стимуляции гибели клеток под действием TNF, можно использовать анализ гибели клеток мышинной фибросаркомы L929. Для оценки ингибирующего действия исследуемого соединения на передачу сигнала TNF через его рецептор, можно также использовать ингибирование TNF-индуцированного продуцирования IL-8 в моноцитах человека. Такие методы анализа широко известны в данной области техники.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут полностью или частично подавлять передачу сигнала через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF присутствует в форме комплекса тример-соединение, связанного с рецептором. Соединения могут снижать передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF по крайней мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Любое изменение уровня передачи сигнала можно измерить любым соответствующим методом, включая измерение активности репортерного гена с использованием щелочной фосфатазы или люциферазы, транслокации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B с использованием систем, таких как Cellomics AgraScan, фосфорилирования эффекторов, расположенных в следующих сигнальных путях, притока соединений, связанных с передачей сигнала, или гибели клеток.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут модулировать по крайней мере один из эффектов передачи сигнала, наблюдаемых в следующих путях передачи сигнала, через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF присутствует в форме комплекса тример-соединение, связанного с рецептором. Такие эффекты обсуждаются в данном контексте и включают индуцированное суперсемейством TNF продуцирование IL-8, IL17A/F, IL2 и VCAM, индуцированные суперсемейством TNF активацию NF- $\kappa$ B и приток нейтрофилов. Стандартные методы известны в данной области техники для измерения эффектов членов суперсемейства TNF, наблюдаемых в следующих сигнальных путях. Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут модулировать по крайней мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или вплоть до всех эффектов передачи сигнала через рецептор TNF, наблюдаемых в следующих сигнальных путях.

Активность соединений, идентифицированных способами по настоящему изобретению, можно определять количественно с использованием стандартной терминологии, такой как величины IC<sub>50</sub> или половины максимальной эффективной концентрации (EC<sub>50</sub>). Величины IC<sub>50</sub> означают концентрацию соединения, которая требуется для 50%-ного ингибирования специфической биологической или биохимической функции. Величины EC<sub>50</sub> означают концентрацию соединения, которая требуется для достижения 50% его максимального эффекта. Величины IC<sub>50</sub> или EC<sub>50</sub> соединений могут составлять 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 нМ, 100 пМ или менее. Величины IC<sub>50</sub> и EC<sub>50</sub> можно измерить с использованием любого соответствующего метода, например, можно количественно измерить продуцирование цитокинов методом иммуоферментного анализа (ИФА). Величины IC<sub>50</sub> и EC<sub>50</sub> можно затем оценивать с использованием стандартной 4 параметрической логистической модели, известной также как сигмоидная модель зависимости между дозой и эффектом.

В настоящем изобретении для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF можно проводить скрининг библиотек соединений (т.е. использовать способы, описанные в данном контексте). Такие библиотеки, как правило, включают по крайней мере 260 соединений. Предпочтительно, такие библиотеки включают по крайней мере 300, по крайней мере 500 или даже по крайней мере 1000 соединений.

В способах по настоящему изобретению для идентификации соединений, способных модулировать сигнальные пути TNF, определяют среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-

соединение. Если рецепторы присутствуют при эквивалентной или избыточной концентрации по сравнению с концентрацией мономеров TNF (при молярном соотношении рецепторы/мономеры выше 1:1, при молярном соотношении рецепторы/тримеры выше 3:1), то в отсутствие любого соединения с тримером TNF связываются, как правило, три рецептора. Затем указанные комплексы тримера и рецепторов образуют сигнальные структуры при образовании димеров рецепторов. Сигнальные структуры обеспечивают передачу сигнала в следующем сигнальном пути.

Указанное иллюстрируется на фиг. 1, где показаны взаимодействия тримера TNF и рецепторов, а также образование сигнальных структур, принимающих участие в передаче сигнала между TNF $\alpha$  и TNF-R1. Как показано на указанной фигуре, тримеры TNF $\alpha$  связываются с первым и вторым необходимыми рецепторами с аффинностью ( $K_D$ ) приблизительно 93 пМ. Затем тримеры связываются с третьим и последним рецептором с  $K_D$  приблизительно 1 мкМ.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, индуцируют и/или стабилизируют конформационные изменения тримеров TNF. Указанные тримеры характеризуются измененной аффинностью по отношению к рецепторам, прежде всего, характеризуются сниженной аффинностью по отношению ко второму и третьему рецепторам. Указанная сниженная аффинность приводит к снижению числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение. Например, как показано на фиг. 2, только два димера рецепторов могут связываться с комплексом тример-соединение (вместо трех рецепторов, которые связываются в нормальных условиях).

На фиг. 3 показано действие двух типов соединений на передачу сигнала TNF $\alpha$ /TNF-R1. Оба соединения не оказывают влияние на образование димеров рецепторов, но индуцируют и/или стабилизируют образование тримеров с искаженными конформациями. Тримеры с первым типом соединения связываются с первым и вторым рецепторами, но характеризуются сниженной аффинностью по отношению к третьему рецептору. Соответственно, тримеры связываются только с двумя рецепторами. Тримеры со вторым соединением связываются с первым рецептором, но характеризуются сниженной аффинностью по отношению ко второму и третьему рецепторам. В связи с этим, тримеры связываются только с одним рецептором. Таким образом, оба типа соединений препятствуют образованию сигнальных структур за счет снижения числа рецепторов, связанных с тримером.

В связи с этим, для идентификации соединений, которые модулируют сигнальные пути TNF, способы по настоящему изобретению включают определение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение. Термин "среднее" отражает тот факт, что в образце почти всегда присутствует смешанная популяция тримеров/рецепторов. Например, так как некоторые соединения снижают аффинность тримеров по отношению к третьему рецептору, в присутствии соединения часть тримеров все еще может связываться со всеми тремя рецепторами, однако большинство тримеров связывается только с двумя рецепторами.

Термин "среднее" может относиться к наиболее вероятному значению, т.е. к числу рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, которое встречается в образце наиболее часто. Наиболее вероятное значение можно определить визуально из экспериментальных данных. Указанное проиллюстрировано ниже в разделе Примеры.

Можно также анализировать экспериментальные данные для количественного определения доли (процентного содержания) тримеров в образце, связанных с тремя рецепторами, двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. Указанные методы являются стандартными в данной области техники. Например, методом эксклюзионной хроматографии можно получить пики, которые элюируются в различных элюирующих объемах, при этом каждый пик соответствует тримерам, связанным с различным числом рецепторов. Затем можно рассчитать площади под пиками и использовать эти площади для определения долей (процентного содержания) тримеров в образце, связанных с тремя рецепторами, двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. В данном случае наиболее вероятное среднее значение означает число рецепторов, связанных с тримером, которое соответствует максимальному процентному содержанию.

Термин "среднее" также может относиться к усредненному значению.

Для иллюстрации наиболее вероятного среднего значения и усредненного значения можно привести следующий пример. Если согласно способу (такому как описанные ниже способы) 5% тримеров, присутствующих в образце, идентифицируются как связанные с 1 рецептором, 75% - с двумя рецепторами, а 20% - с тремя рецепторами, то наиболее вероятное значение равно двум рецепторам, связанным с тримером. Усредненное значение составляет 2,15 рецепторов, связанных с тримером  $((5 \times 1 + 75 \times 2 + 20 \times 3) / 100)$ .

При определении усредненных значений таким способом полученный результат 0-0,4 указывает на то, что в среднем рецепторы совсем не связываются с тримером, полученный результат 0,5-1,4 указывает на то, что в среднем с тримером связывается один рецептор, полученный результат 1,5-2,4 указывает на то, что в среднем с тримером связываются два рецептора, а результат более 2,5 указывает на то, что в среднем с тримером связываются три рецептора.

В способах по настоящему изобретению среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, как правило, определяют при сравнении с контрольным образцом. Контрольный обра-

зец обрабатывают таким же образом, как и образец, содержащий исследуемое соединение. Прежде всего, контрольный образец обрабатывают в тех же экспериментальных условиях, как и образец, содержащий исследуемое соединение, включая те же концентрации реагентов, тримеров и рецепторов. Кроме того, среднее число рецепторов, связанных с тримером в контрольном образце, определяют с использованием того же экспериментального метода, как и для исследуемого соединения.

Среднее число рецепторов, связанных с тримером, обычно определяют одновременно в исследуемом образце и в контрольном образце. Другими словами, эксперименты проводят параллельно. Однако значения среднего числа рецепторов, связанных с тримером в контрольном образце, можно также определить до проведения экспериментов с исследуемым образцом. Указанные значения можно зарегистрировать, например, на компьютере.

Для эффективного сравнения результатов, среднее число рецепторов, связанных с тримером, для контрольного образца рассчитывают тем же способом, как и для исследуемого соединения (т.е. получают наиболее вероятные значения или усредненные значения, как описано выше).

Контрольный образец может содержать тримеры членов суперсемейства TNF и необходимые рецепторы в отсутствие соединения (отрицательный контроль). Другими словами, контрольный образец идентичен образцу с исследуемым соединением за исключением того, что контрольный образец не содержит исследуемое соединение. Тримеры членов суперсемейства TNF и необходимые рецепторы могут представлять собой любые из описанных выше соединений, но в контрольном образце и в образце с исследуемым соединением должны присутствовать одинаковые тримеры членов суперсемейства TNF и необходимые рецепторы (а также присутствовать при одинаковых концентрациях).

Предпочтительно, если контрольный образец содержит тримеры членов суперсемейства TNF и необходимые рецепторы в отсутствие соединения, снижение/уменьшение среднего числа рецепторов, связанных с одним комплексом тример-соединение, в исследуемом образце по сравнению с идентичным контрольным образцом указывает на то, что соединение способно модулировать передачу сигнала через рецептор. Другими словами, исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если в образце, содержащем исследуемое соединение, идентифицируют меньшее среднее число рецепторов, связанных с тримером, по сравнению с контрольным образцом.

Например, если при расчете с использованием наиболее вероятного значения в контрольном образце определяют, что с тримером связываются в среднем три рецептора, исследуемое соединение можно идентифицировать как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если определяют, что в образце с исследуемым соединением с комплексом тример-соединение связываются в среднем два или менее рецепторов. В отрицательном контрольном образце, содержащем тримеры членов суперсемейства TNF и необходимые рецепторы в отсутствие соединения, было установлено, что с тримером связываются в среднем три рецептора (если рецепторы присутствуют при концентрации, которая равна или выше концентрации мономеров TNF, при молярном соотношении рецепторы/мономеры по крайней мере 1:1 или при молярном соотношении рецепторы/тримеры 3:1). Тем не менее, если в контрольном образце определяют, что с тримером в среднем связываются два рецептора, то исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением определяют, что комплекс тример-соединение связывается в среднем с одним рецептором или совсем не связывается с рецептором. Наконец, если в контрольном образце определяют, что с тримером в среднем связывается один рецептор, исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением определяют, что комплекс тример-соединение в среднем совсем не связывается с рецептором.

Аналогичные рассуждения применимы при использовании усредненных значений в качестве средних, как рассчитано выше.

Снижение среднего числа рецепторов, связанных с тримером, относительно отрицательного контрольного образца можно также просто рассчитать, исходя из процентного содержания тримеров в образце, связанных с тремя рецепторами, двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. В этом случае в контрольном образце и в образце, содержащем исследуемое соединение, в первую очередь необходимо определить процентное содержание тримеров, связанных с тремя рецепторами, двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. Затем исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в присутствии соединения изменяется процентное содержание тримеров, связанных с определенным количеством рецепторов. Указанные расчеты, как правило, основаны на расчете процентного содержания тримеров в образце, связанных с тремя рецепторами, при этом сниженное процентное содержание тримеров, связанных с тремя рецепторами, указывает на антагонистическую активность соединения, которое модулирует передачу сигнала (одновременно должно увеличиваться процентное содержание тримеров, связанных с двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором).

Для иллюстрации, в отрицательном контрольном образце, содержащем только рецепторы и тримеры (в отсутствие соединения), можно определить, что 90% тримеров связываются с тремя рецепторами, а 10% тримеров связываются с двумя рецепторами. Затем исследуемое соединение можно идентифициро-

вать как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в присутствии соединения менее 90% тримеров связывается с тремя рецепторами. Если сниженный процент тримеров связывается с тремя рецепторами, процентное содержание тримеров, связанных с двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором, должно увеличиваться. Соответственно, среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, снижается по сравнению с контрольным образцом.

Предпочтительно, исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением процентное содержание тримеров, связанных с тремя рецепторами, снижается по крайней мере на 10% (т.е. по крайней мере на 10% ниже), по крайней мере на 20%, по крайней мере на 30%, по крайней мере на 40%, по крайней мере на 50%, по крайней мере на 60%, по крайней мере на 70%, по крайней мере на 80%, по крайней мере на 90%, или по крайней мере на 95% по сравнению с процентным содержанием тримеров, связанных с тремя рецепторами, в отрицательном контрольном образце (содержащем тримеры членов суперсемейства TNF и рецепторы в отсутствии соединения).

В другом варианте, контрольный образец может содержать тримеры членов суперсемейства TNF, необходимые рецепторы и известное соединение, которое модулирует передачу сигнала через рецепторы (так называемый "положительный контроль"). Известное соединение, которое модулирует передачу сигнала через рецептор, может представлять собой любое известное соединение, которое снижает среднее число рецепторов, связанных с тримером, до двух, одного или до нуля (в условиях, когда тримеры связываются с тремя рецепторами в отсутствие любого соединения). Такие соединения можно идентифицировать описанными в данном контексте способами. Примеры известных соединений, которые снижают среднее число связанных с тримером рецепторов до двух, включают соединения (1)-(4), а примером известного соединения, которое снижает среднее число связанных с тримером рецепторов, приблизительно до одного, является соединение (5). Положительный контроль может включать любое одно из соединений, указанных в качестве примеров.

Как описано выше, положительный контрольный образец обрабатывают таким же образом, как и образец с исследуемым соединением, при этом для контрольного образца и образца с исследуемым соединением используют одни и те же экспериментальные условия, способы и расчеты. Среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, обычно определяют для образца с исследуемым соединением и для контрольного образца в одно и то же время, однако для контрольного образца указанное число также можно определить до проведения экспериментов с образцом, содержащим исследуемое соединение.

Предпочтительно, если положительный контрольный образец содержит тримеры членов суперсемейства TNF, необходимые рецепторы и известное соединение, которое способно модулировать передачу сигнала через рецептор, то эквивалентное среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, в образце с исследуемым соединением по сравнению с контрольным образцом, или снижение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, в образце с исследуемым соединением по сравнению с контрольным образцом указывает на то, что соединение способно модулировать передачу сигнала через рецептор. Другими словами, исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если в образце с исследуемым соединением определяют, что с комплексом тример-соединение связывается идентичное или меньшее число рецепторов по сравнению с положительным контрольным образцом.

Например, если при расчете с использованием наиболее вероятного значения (описанного выше) в положительном контрольном образце определяют в среднем два рецептора, связанных с одним тримером, то исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением определяют в среднем два или менее рецепторов (два рецептора, один рецептор или ноль рецепторов), связанных с комплексом тример-соединение. Аналогичным образом, если в контрольном образце определяют в среднем один рецептор, связанный с тримером, исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением определяют в среднем один рецептор или ноль рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение. Если в контрольном образце определяют, что тример в среднем совсем не связан с рецептором, то исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением также определяют, что комплексом тример-соединение в среднем совсем не связан с рецептором.

Аналогичные рассуждения применимы при использовании усредненных значений в качестве средних.

Эквивалентное среднее число рецепторов, связанных с тримером, или снижение среднего числа рецепторов, связанных с тримером, в образце с исследуемым соединением по сравнению с положительным контрольным образцом можно снова рассчитать с использованием долей (процентного содержания) тримеров в образце, связанных с тремя рецепторами, с двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. Как описано выше, в первую очередь в контрольном образце и в образце с исследуемым соединением необходимо определить процентное содержание тримеров, связанных с тремя рецепторами, с двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связанных с рецептором. Затем

исследуемое соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в присутствии соединения определяют эквивалентное процентное содержание или повышенное/более высокое содержание тримеров, связанных с требуемым числом рецепторов (или связанных с меньшим числом рецепторов), по сравнению с контрольным образцом. Целью таких расчетов может служить процентное содержание тримеров в образце, связанных с двумя или менее рецепторами, с одним или менее рецепторами, или совсем не связанных с рецептором.

Для иллюстрации, в положительном контрольном образце в присутствии соединения 30% тримеров могут связываться с тремя рецепторами, а 70% тримеров могут связываться с двумя рецепторами. Затем исследуемое соединение можно идентифицировать как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в образце с исследуемым соединением по крайней мере 70% тримеров связываются с двумя или менее рецепторами (с двумя рецепторами, с одним рецептором или совсем не связываются с рецептором).

Использованный в данном контексте термин "эквивалентное процентное содержание", как правило, относится к значениям, которые отличаются друг от друга на 10% или менее, предпочтительно на 5% или менее. Например, исследуемое соединение, в присутствии которого 70% тримеров связываются с двумя рецепторами, можно рассматривать как обеспечивающее эквивалентное процентное содержание тримеров, связанных с двумя рецепторами, по сравнению с контрольным образцом, в котором 75% тримеров связываются с двумя рецепторами.

Соединение также можно идентифицировать как соединение, способное модулировать передачу сигнала, просто на основе определения числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, не проводя прямого сравнения с контрольным образцом.

Таким образом, соединение можно идентифицировать как соединение, способное модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если определено, что с комплексом тример-соединение связано в среднем менее трех рецепторов. Среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, может представлять собой усредненное значение или наиболее вероятное значение, как описано выше. Предпочтительно, соединения идентифицируют как соединения, способные модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если в присутствии соединения с тримером связываются в среднем два рецептора. Более предпочтительно, соединения идентифицируют как соединения, способные модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если в присутствии соединения с тримером связывается в среднем один рецептор. Соединение также можно идентифицировать как соединение, способное модулировать передачу сигнала тримерного белка через рецептор, если в присутствии соединения тример в среднем совсем не связывается с рецептором. Примеры таких соединений более подробно описаны ниже.

Среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, как правило, определяют при концентрации рецепторов, приблизительно равной концентрации TNF мономеров (молярное соотношение рецепторы/мономеры 1:1). Соотношение рецепторы/мономеры 1:1 соответствует соотношению рецепторы/тримеры 3:1.

Концентрация рецепторов может быть незначительно выше по сравнению с концентрацией мономеров. Предпочтительно, эксперименты проводят при молярном соотношении рецепторы/тримеры вплоть до приблизительно 10:1. Эксперименты можно проводить при любом молярном соотношении рецепторы/тримеры в пределах диапазона от приблизительно 3:1 до 10:1. Предпочтительно, анализы проводят при соотношениях рецепторы/тримеры приблизительно 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 или 10:1. В некоторых случаях анализы проводят при нескольких соотношениях рецепторы/тримеры, например, приблизительно 3:1, 6:1 и 10:1. Указанные титрования подробно проиллюстрированы в разделе примеры.

Как правило, эксперименты для определения среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, проводят при концентрации соединения, которая обеспечивает полную занятость тримеров соединением. Как описано выше, занятость тримеров соединением можно определить методом масс-спектрометрии. Концентрация соединения может равняться концентрации тримеров (соотношение соединение/тримеры 1:1, соотношение соединение/мономеры TNF 1:3). Однако соединение, как правило, присутствует в избыточном количестве по сравнению с концентрацией тримеров TNF. Например, избыток соединения может составлять от 1,5-кратного до 500-кратного относительно концентрации тримеров. Предпочтительно, соединение присутствует в избытке от 5-кратного до 100-кратного относительно концентрации тримеров, более предпочтительно в избытке от 10-кратного до 50-кратного относительно концентрации тримеров. Соединение может присутствовать по крайней мере в 1,5-кратном, по крайней мере в 2-кратном, по крайней мере в 3-кратном, по крайней мере в 4-кратном, по крайней мере в 5-кратном, по крайней мере в 6-кратном, по крайней мере в 7-кратном, по крайней мере в 8-кратном, по крайней мере в 9-кратном, по крайней мере в 10-кратном, по крайней мере в 20-кратном, по крайней мере в 50-кратном, по крайней мере в 100-кратном, по крайней мере в 250-кратном или по крайней мере в 500-кратном избытке относительно концентрации тримеров TNF.

Эксперименты можно проводить в диапазоне концентраций соединения, как показано ниже в разделе примеры.

Среднее число рецепторов, связанных с тримером, можно определить с использованием любого

пригодного метода анализа, например, метода масс-спектрометрии ионной подвижности, эксклюзионной хроматографии, агрегационного анализа, метода ферстеровского резонансного переноса энергии флуоресценции и/или метода кристаллографии. Для определения среднего числа рецепторов, связанных с тримером, указанные методы можно использовать в отдельности или, предпочтительно, в комбинации. Например, можно использовать вместе любые два, три, четыре или все пять методов анализа.

Для идентификации компонентов в исследуемом образце метод масс-спектрометрии ионной подвижности (IMS-MS) объединяет спектрометрию ионной подвижности и масс-спектрометрию. Способы проведения IMS-MS и обработки полученных данных широко известны в данной области техники и иллюстрируются ниже в разделе примеры.

В примере методики исследуемое соединение инкубируют в присутствии TNF при комнатной температуре в течение ночи. Сначала записывают исходный масс-спектр, чтобы убедиться в 100% занятости TNF соединением перед добавлением соединения. Другими словами, исходный масс-спектр позволяет убедиться в том, что соединение связывается с тримерами. Соединение, как правило, присутствует в избытке относительно концентрации тримеров, как описано выше. Затем добавляют необходимые рецепторы TNF и инкубируют перед снятием IMS-MS спектра образца.

Анализ методом масс-спектрометрии ионной подвижности проводят при любом пригодном соотношении рецепторы/тримеры, как правило, при соотношениях приблизительно от 3:1 до 10:1, например при соотношении рецепторы/тримеры равном 3:1, 6:1 и/или 10:1. В большинстве случаев анализ методом масс-спектрометрии ионной подвижности проводят для ряда соотношений концентраций в исследуемом образце.

Анализ масс-спектрометрии ионной подвижности также можно использовать для получения данных об аффинности связывания трех рецепторов с тримерами TNF. Указанное иллюстрируется ниже в разделе примеры.

Другим методом, который можно использовать для определения среднего числа рецепторов, связанных с тримером TNF, является эксклюзионная хроматография. Методы проведения эксклюзионной хроматографии широко известны в данной области и включают разделение компонентов в растворе, основанное на различии в их размере. Компоненты меньшего размера элюируются в растворе более медленно, и для них требуется больший элюирующий объем по сравнению с компонентами большего размера.

Размер тримера TNF, связанного с тремя рецепторами, больше по сравнению с размером тримера, который связан только с двумя рецепторами. В связи с этим, тримеры с тремя связанными рецепторами элюируются в меньшем объеме по сравнению с тримерами с двумя связанными рецепторами или с одним связанным рецептором. Таким образом, пики, элюированные в различных элюирующих объемах, можно использовать для идентификации среднего числа рецепторов, связанных с тримером. Указанное иллюстрируется более подробно ниже в разделе примеры.

В типичной методике анализа эксклюзионной хроматографией (SEC) тримеры TNF инкубируют в присутствии избытка соединения. Занятость тримеров TNF соединением можно определить методом IMS-MS, как описано выше. Затем образцы инкубируют в присутствии рецепторов и анализируют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Как правило, эксперименты методом эксклюзионной хроматографии проводят при соотношениях рецепторы/тримеры приблизительно от 3:1 до 10:1, например, при соотношении 3:1, 6:1 и/или 10:1. Предпочтительно, соединение исследуют в диапазоне концентрационных соотношений.

Контрольные образцы, которые используют для определения положения миграции (пиков) тримеров с двумя связанными рецепторами, или с одним связанным рецептором, описаны ниже в разделе Примеры. Указанные контрольные образцы включают мутантную форму TNF $\alpha$ , для которой характерно нарушение связывания или с третьим рецептором, или со вторым и третьим рецепторами.

Другим методом, который можно использовать для определения среднего числа рецепторов, связанных с тримером TNF, является агрегационный анализ.

Еще одним методом анализа, пригодным для определения среднего числа рецепторов, связанных с тримером, является метод ферстеровского резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Метод FRET можно использовать для определения непосредственной близости двух флуорофоров (донора и акцептора) друг к другу.

В методе анализа по настоящему изобретению в рецепторы можно включать метку, например, донор - флуорофор. Затем в тримеры включают метку, например, акцептор - флуорофор (например, через линкер). Эксперименты, как правило, проводят при соотношении рецепторы/мономеры 1:1, однако можно также титровать концентрацию рецепторов. Аналогичным образом, эксперименты можно проводить при различных концентрациях исследуемого соединения. Указанное иллюстрируется ниже в разделе примеры.

Наконец, для определения среднего числа рецепторов, связанных с тримером, можно использовать метод кристаллографии. Способы проведения анализа методом кристаллографии широко известны в данной области техники.

Все способы по настоящему изобретению включают получение результатов, которые позволяют

идентифицировать способность соединения модулировать передачу сигнала через рецептор. Результаты можно регистрировать, например, в лабораторном журнале. Результаты также можно ввести в компьютер.

Соединения и комплексы.

Настоящее изобретение также относится к соединениям, которые способны связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала члена суперсемейства TNF через необходимый рецептор. Соединения обеспечивают связывание с комплексом тример-соединение соответствующего среднего числа рецепторов или измененного числа рецепторов по сравнению с контрольным образцом. Указанные соединения можно идентифицировать способами, описанными выше.

Члены суперсемейства TNF и необходимые рецепторы включают любые из описанных выше соединений.

Можно проводить скрининг соединений в отношении связывания с тримером TNF с использованием методов, известных в данной области техники, таких как масс-спектрометрия. Метод масс-спектрометрии можно также использовать для идентификации присутствия в образце самих тримеров TNF.

Способы проведения масс-спектрометрии включают, например, масс-спектроскопию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI MS), масс-спектроскопию с поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (SELDI MS), времяпролетную масс-спектрометрию (TOF MS) и масс-спектрометрию с жидкостной хроматографией (LC MS).

Соединения не ограничены их химической формулой или структурой. Как правило, соединения представляют собой низкомолекулярные соединения (SME) с молекулярной массой 1000 Да или менее, предпочтительно 750 Да или менее, более предпочтительно 600 Да или менее. Соединения могут связываться во внутреннем центральном пространстве тримера члена суперсемейства TNF (т.е. в ядре тримера). Связывание соединения в ядре тримера можно детектировать с использованием стандартных методов, например, с использованием метода кристаллографии. Соединения могут включать остаток бензидазола или его изоостерный аналог.

Соединения связываются по крайней мере с одним членом суперсемейства TNF и модулируют передачу сигнала члена суперсемейства TNF через необходимый рецептор. Модуляция передачи сигнала описана выше в контексте описания способов по настоящему изобретению. При молярном соотношении рецепторы/мономеры 1:1, или в присутствии избытка рецепторов, тример TNF обычно связывается в среднем с тремя рецепторами. Модуляция передачи сигнала соединениями по настоящему изобретению обеспечивает связывание эквивалентного среднего числа рецепторов с комплексом тример-соединение, или изменение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, по сравнению с контрольным образцом.

Как описано выше, контрольный образец может содержать тримеры членов суперсемейства TNF и рецепторы в отсутствие соединения (отрицательный контроль). В образце с исследуемым соединением и в контрольном образце присутствуют одинаковые тримеры членов суперсемейства TNF и рецепторы, при этом образец с исследуемым соединением и контрольный образец обрабатывают в одинаковых экспериментальных условиях (например, при одинаковых концентрациях реагентов) и одинаковыми способами.

Контрольный образец можно анализировать параллельно с образцом, содержащим исследуемое соединение. В другом варианте, контрольный образец можно анализировать до проведения анализа образца, содержащего исследуемое соединение.

Если контрольный образец содержит тримеры членов суперсемейства TNF и рецепторы в отсутствие соединения, то следует ожидать, что при эквивалентном молярном соотношении мономеры TNF/рецепторы (1:1) или в присутствии избытка рецепторов относительно концентрации мономеров с тримером связываются в среднем три рецептора. В указанных условиях соединение, характеризующееся антагонистической активностью, снижает среднее число рецепторов, связанных с тримером. Способы определения снижения среднего числа рецепторов, связанных с тримером, описаны выше.

В другом варианте, контрольный образец может содержать тримеры членов суперсемейства TNF, необходимые рецепторы и известное соединение, модулирующее передачу сигнала тримеров через рецепторы (положительный контроль). Как и в предыдущем случае, в образце с исследуемым соединением и в контрольном образце присутствуют одинаковые тримеры членов суперсемейства TNF и рецепторы, при этом образец с исследуемым соединением и контрольный образец обрабатывают в одинаковых экспериментальных условиях (например, при одинаковых концентрациях реагентов) и одинаковыми способами. Как правило, контрольный образец анализируют параллельно с образцом, содержащим исследуемое соединение. Однако контрольный образец можно также анализировать до проведения анализа образца, содержащего исследуемое соединение.

Если контрольный образец содержит тримеры членов суперсемейства TNF, необходимые рецепторы и известное соединение, которое модулирует передачу сигнала через рецепторы, то соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала, если в присутствии такого со-

единения с комплексом тример-соединение связывается эквивалентное среднее число рецепторов по сравнению с контрольным образцом, или наблюдается снижение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, по сравнению с контрольным образцом. Способы идентификации соединений таким образом описаны выше.

Соединения, характеризующиеся антагонистической активностью, обеспечивают связывание с комплексом тример-соединение в среднем менее трех рецепторов (в условиях, когда в отсутствие соединения в среднем три рецептора связываются с одним комплексом тример-соединение). Предпочтительно, в указанных условиях исследуемое соединение обеспечивает связывание с комплексом тример-соединение в среднем двух рецепторов. Примеры таких соединений включают соединения (1)-(4). Указанные соединения можно использовать в качестве положительных контрольных соединений при оценке способности другого исследуемого соединения модулировать передачу сигнала.

Более предпочтительно, исследуемое соединение обеспечивает связывание в среднем одного рецептора с комплексом тример-соединение. Примеры таких соединений включают соединение (5), которое обеспечивает смещение в сторону связывания одного рецептора с одним тримером. Как и в предыдущем случае, указанные соединения можно использовать в качестве положительных контрольных соединений при оценке способности другого соединения модулировать передачу сигнала.

В присутствии исследуемого соединения комплекс тример-соединение также в среднем может совсем не связываться с рецептором.

Настоящее изобретение также относится к комплексам, содержащим тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и соединением. Тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и соединение могут представлять собой любое из соединений, описанных выше.

Антитела для идентификации комплексов тример-соединение.

В настоящем изобретении предлагаются антитела, которые селективно связываются с комплексами, включающими соединение по настоящему изобретению и тримерный член суперсемейства TNF. Указанные антитела можно использовать для идентификации других соединений, которые способны ингибировать TNF.

Прежде всего, в настоящем изобретении идентифицированы два антитела, названные CA185\_01974 и CA185\_01979, которые продуцируются против TNF $\alpha$  человека в комплексе с соединением по настоящему изобретению. Варибельная область тяжелой цепи (HCVR) антитела CA185\_01974 соответствует последовательности SEQ ID NO: 3, а варибельная область легкой цепи (LCVR) антитела CA185\_01974 соответствует последовательности SEQ ID NO: 4. Полноразмерная тяжелая цепь IgG1 соответствует последовательности SEQ ID NO: 5 (полноразмерная тяжелая цепь mIgG1 1974), а полноразмерная легкая цепь (полноразмерная к-легкая цепь антитела 1974) соответствует последовательности SEQ ID NO: 6.

Область HCVR антитела CA185\_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 7, а область LCVR антитела CA185\_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 8. Полноразмерная тяжелая цепь IgG1 CA185\_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 9 (полноразмерная тяжелая цепь mIgG1 1979), а полноразмерная легкая цепь соответствует последовательности SEQ ID NO: 10 (полноразмерная к-легкая цепь антитела 1979).

Специалист в данной области техники может синтезировать антитела, включая описанные выше HCVR/LCVR или пары полноразмерных последовательностей, по стандартным методикам.

В связи с этим, способы определения соединений, которые способны связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала через рецептор могут включать идентификацию связывания антитела, содержащего пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 3/4 или 7/8, с комплексом тример-соединение. Аналогичным образом, способы могут включать идентификацию связывания антитела, содержащего пару последовательностей SEQ ID No: 5/6 или 9/10, с комплексом тример-соединение. Кроме анализов, описанных в данном контексте, можно использовать анализ антител.

Антитела по настоящему изобретению можно исследовать в отношении связывания с комплексом тример-соединение, например, стандартным иммуноферментным анализом (ИФА) или методом вестерн-блоттинга. Селективность связывания антитела можно также определить, регистрируя связывание антитела с клетками, экспрессирующими целевой белок, например, методом проточной цитометрии. В связи с этим, метод скрининга по настоящему изобретению может включать стадию идентификации антитела, которое способно связываться с комплексом тример-соединение, с использованием ИФА или вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

Антитела, описанные в данном контексте, селективно (или специфично) распознают по крайней мере один комплекс тример-соединение, т.е. эпитопы в составе комплекса тример-соединение. Антитело, или другое соединение, "селективно связывается" или "селективно распознает" белок, если оно связывается с белком, с которым оно связывается селективно, с преобладающей или с высокой аффинностью, но в основном не связывается или связывается с низкой аффинностью с другими белками.

В данном случае комплекс тример-соединение, как правило, может связываться с антителом, содержащим пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 3/4 или 7/8 (или пары последовательностей SEQ ID NO: 5/6 или 9/10), с аффинностью менее 1 нМ. Другими словами, спо-

собы по настоящему изобретению могут включать определение способности соединения связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, и модулировать передачу сигнала через рецептор при выявлении антитела, содержащего пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 3/4 или 7/8 (или пару последовательностей SEQ ID NO: 5/6 или 9/10), которое связывается с комплексом тример-соединение с  $K_{D-ab}$  менее 1 нМ. В некоторых случаях значение  $K_{D-ab}$  может составлять менее 500 пМ или менее 200 пМ. Аффинность можно определить методом поверхностного плазмонного резонанса. TNF, как правило, представляет собой TNF $\alpha$  человека.

Аналогичным образом, комплекс по настоящему изобретению может представлять собой комплекс тримерного члена суперсемейства TNF и соединения, при этом комплекс соединения-тример связывается с антителом, содержащим пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 3/4 или 7/8 (или пару последовательностей SEQ ID No: 5/6 или 9/10). И снова TNF, как правило, представляет собой TNF $\alpha$  человека, а связывание, как правило, характеризуется аффинностью менее 1 нМ (или менее 500/200 пМ). Аффинность связывания, как правило, определяют методом поверхностного плазмонного резонанса.

Терапевтические показания.

TNF $\alpha$  является исходным членом суперсемейства TNF. TNF $\alpha$  является плеiotропным цитокином, который опосредует иммунную регуляцию и воспалительные реакции. Известно также, что TNF $\alpha$  *in vivo* принимает участие в развитии ответных реакций на бактериальные, паразитарные и вирусные инфекции. Прежде всего, известно, что TNF $\alpha$  принимает участие в развитии ревматоидного артрита (RA), воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера (AD), болезни Паркинсона (PD), боли, эпилепсии, остеопороза, астмы, сепсиса, лихорадки, системной красной волчанки (SLE) и рассеянного склероза (MS), а также рака. Известно также, что TNF $\alpha$  принимает участие в развитии амиотрофического бокового склероза (ALS), ишемического инсульта, иммунокомплексного гломерулонефрита, волчаночного нефрита (LN), гломерулонефрита, ассоциированного с антителами против компонентов цитоплазмы нейтрофилов (ANCA), липоидного нефроза, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (AKI), обструктивной уропатии, отторжения аллотрансплантата почек, цисплатин-индуцируемой AKI и обструктивной уропатии.

Известно, что другие члены суперсемейства TNF принимают участие в развитии аутоиммунного нарушения и иммунодефицитных состояний. Прежде всего, известно, что члены суперсемейства TNF принимают участие в развитии RA, SLE, рака, MS, астмы, ринита, остеопороза и множественной миеломы (MM). Известно, что TL1A принимает участие в развитии отторжения трансплантата органа.

Соединение, идентифицированное способами по настоящему изобретению, или комплекс тримера TNF и соединения, можно использовать в способе лечения организма человека или животного. Соединение или комплекс можно использовать для лечения, профилактики или снижения интенсивности симптомов любого состояния, которое можно лечить, в отношении которого можно проводить профилактику или интенсивность симптомов которого можно ослабить при использовании стандартного модулятора членов суперсемейства TNF. Соединение или комплекс можно использовать в отдельности или в комбинации со стандартным модулятором членов суперсемейства TNF.

Согласно настоящему изобретению можно лечить, проводить профилактику или снижать интенсивность симптомов любого состояния, которое частично или полностью развивается в результате патогенной передачи сигнала члена суперсемейства TNF через рецептор TNF или в результате недостаточной передачи сигнала члена суперсемейства TNF через рецептор TNF. Патогенная передача сигнала члена суперсемейства TNF через рецептор TNF включает повышенную передачу сигнала через рецептор TNF, т.е. превышающую нормальный физиологический уровень передачи сигнала, а также включает передачу сигнала через рецептор TNF, инициация которой прошла нормально, но которая не останавливается в ответ на нормальные физиологические сигналы, а также передачу сигнала через рецептор TNF, которая находится в пределах нормального физиологического диапазона величин, но которая была инициирована нефизиологическими факторами. В предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к лечению, профилактике или снижению интенсивности симптомов состояний, опосредованных TNF $\alpha$ , или на которые влияет TNF $\alpha$ .

Соответственно, соединения, которые взаимодействуют с TNF $\alpha$ , будут оказывать благоприятный эффект при лечении и/или профилактике различных заболеваний человека. Указанные заболевания включают аутоиммунные и воспалительные расстройства, неврологические и нейродегенеративные расстройства, боль и ноцицептивные расстройства, а также сердечно-сосудистые заболевания.

Воспалительные и аутоиммунные расстройства включают системные аутоиммунные нарушения, аутоиммунные эндокринные расстройства и органоспецифические аутоиммунные расстройства. Системные аутоиммунные расстройства включают системную красную волчанку (SLE), псориаз, васкулит, полимиозит, склеродермию, рассеянный склероз, анкилозирующий спондилоартрит, ревматоидный артрит и синдром Шегрена. Аутоиммунные эндокринные расстройства включают тиреоидит. Органоспецифические аутоиммунные расстройства включают болезнь Аддисона, гемолитическую или пернициозную анемию, гломерулонефрит (включая синдром Гудпасчера), болезнь Грейвса, идиопатическую тромбоцито-

пеническую пурпуру, инсулинозависимый сахарный диабет, юношеский диабет, увеит, воспалительные заболевания кишечника (включая болезнь Крона и язвенный колит), пемФигус, атопический дерматит, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, аутоиммунную пневмонию, аутоиммунный кардит, тяжелую псевдопаралитическую миастению, спонтанное бесплодие, остеопороз, астму, а также мышечную дистрофию (включая мышечную дистрофию Дюшенна).

Неврологические и нейродегенеративные расстройства включают болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, инсульт, боковой амиотрофический склероз, повреждение спинного мозга, травму головы, судороги и эпилепсию.

Нарушения сердечно-сосудистой системы включают тромбоз, гипертрофию сердца, гипертензию, нерегулярную сократительную способность сердца (например, при сердечной недостаточности), а также сексуальные расстройства (включая эректильную дисфункцию и женскую сексуальную дисфункцию).

Прежде всего, соединение или комплекс можно использовать для лечения или профилактики воспалительных заболеваний, расстройств центральной нервной системы (ЦНС), иммунных расстройств и аутоиммунных заболеваний, боли, остеопороза, лихорадки и отторжения трансплантата. В предпочтительном варианте соединения или комплекс можно использовать для лечения или профилактики ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона), псориаза, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, эпилепсии, астмы, сепсиса, системной красной волчанки, рассеянного склероза, астмы, ринита, рака и остеопороза. В другом предпочтительном варианте соединения или комплекс можно использовать для лечения или профилактики ревматоидного артрита (RA), неспецифического воспалительного артрита, эрозивного заболевания костей, хондрита, дегенерации и/или дегенерации хряща, юношеского воспалительного артрита, болезни Стилла (у детей и/или взрослых), юношеского идиопатического артрита (как олигоартикулярные, так и полиартикулярные формы), воспалительных заболеваний кишечника (включая болезнь Крона, язвенный колит, неопределенный колит, воспаление в области илеоанального резервуара), псориаза, псориатической артропатии, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Шегрена, болезни Альцгеймера (AD), болезни Бехчета, болезни Паркинсона (PD), амиотрофического бокового склероза (ALS), ишемического инсульта, боли, эпилепсии, остеопороза, остеопении, анемии при хроническом заболевании, кахексии, диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, астмы, хронического обструктивного заболевания дыхательных путей (или заболевания легких), сепсиса, лихорадки, респираторного дистресс-синдрома, системной красной волчанки (SLE), рассеянного склероза (MS), иммунокомплексного гломерулонефрита, волчаночного нефрита (LN), гломерулонефрита, ассоциированного с антителами против компонентов цитоплазмы нейтрофилов (ANCA), липоидного нефроза, диабетической нефропатии (DN), острой почечной недостаточности (AKI), обструктивной уропатии, отторжения аллотрансплантата почек, цисплатин-индуцируемой АКІ и обструктивной уропатии, заболеваний глаз (включая диабетическую ретинопатию, диабетический макулярный отек, ретинопатию недоношенных, возрастную дегенерацию макулы, макулярный отек, пролиферативную и/или непролиферативную ретинопатию, васкуляризацию роговицы, включая неоваскуляризацию, окклюзию вены сетчатки, различные формы увеита и кератита), тиреоидита, фиброзных нарушений, включая различные формы фиброза печени, различные формы фиброза легких, системного склероза, склеродермии, рака и осложнений, связанных с раком (включая скелетные осложнения, кахексию и анемию).

Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, и комплексы тример-соединение, как правило, получают в виде фармацевтических композиций в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

Использованный в данном контексте термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию и т.п. В качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для парентерального введения, например, такого как внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные способы введения, например, инъекция или вливание. В другом варианте, в качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для непарентерального введения, такого как местный, эпидермальный способ введения или способ введения через слизистые. В предпочтительном варианте в качестве носителя можно использовать носитель, пригодный для перорального введения. В зависимости от способа введения на модулятор можно наносить покрытие из материала для защиты соединения от действия кислот и других природных факторов, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать одну или более фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет биологическую активность исходного соединения и не оказывает любых нежелательных токсикологических эффектов. Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли.

Предпочтительные фармацевтически приемлемые носители включают водные носители или разбавители. Примеры пригодных водных носителей, которые можно использовать в фармацевтических ком-

позициях по настоящему изобретению, включают воду, водные буферные растворы и физиологический раствор. Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и пригодные смеси указанных соединений, растительные масла, такие как оливковое масло, а также органические сложные эфиры для инъекции, такие как этилолеат. Во многих случаях в состав композиции желателно включать изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно получать в виде раствора, микроэмульсии, липосом или в виде другой упорядоченной структуры, пригодной для включения лекарственного средства в высокой концентрации.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать дополнительные активные ингредиенты.

В объем настоящего изобретения включены также наборы, включающие соединения или комплексы, а также инструкции по применению. Набор может, кроме того, включать один или более дополнительных реагентов, таких как дополнительное лекарственное или профилактическое средство, как описано выше.

Соединения и комплексы соединения-тример или их составы или композиции можно вводить для профилактики и/или лечения.

При лечении соединения и комплексы соединения-тример вводят субъекту, уже страдающему от расстройства или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для лечения, облегчения или частичной приостановки развития состояния или снижения интенсивности одного или нескольких его симптомов. Указанное лечение может привести к снижению тяжести симптомов заболевания или к увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов. Количество, достаточное для достижения указанных целей, в данном контексте определяется как "терапевтически эффективное количество".

При профилактическом лечении составы вводят субъекту из группы риска развития расстройства или состояния, как описано выше, в количестве, достаточном для предотвращения или уменьшения последующего осложнения состояния или одного или нескольких его симптомов. Количество, достаточное для достижения указанных целей, в данном контексте определяется как "профилактически эффективное количество". Эффективные количества для достижения каждой цели будут зависеть от тяжести заболевания или повреждения, а также от массы тела и общего состояния субъекта.

Субъектом, которому вводят лекарственное средство, является человек или животное, не относящееся к человеку. Термин "животное, не относящееся к человеку" включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не относящиеся к человеку (низшие приматы), овцы, собаки, кошки, лошади, крупный рогатый скот, куры, амфибии, рептилии и т.д. Обычно субъектом, которому осуществляют введение, является человек.

Соединение или комплекс соединения-тример можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или более способов из множества способов, известных в данной области техники. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что путь и/или способ введения можно изменять в зависимости от требуемых результатов. Примеры путей введения соединений или комплексов соединения-тример по настоящему изобретению включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутриглазной, внутрибрюшинный, подкожный, спинномозговой или другие парентеральные способы введения, например, инъекция или вливание. Термин "парентеральное введение", использованный в данном контексте, означает способы введения, которые отличаются от энтерального и местного введения, и обычно осуществляется с использованием инъекции. В другом варианте, соединение, идентифицированное способами по настоящему изобретению, или комплекс соединения-тример по настоящему изобретению можно вводить непарентеральным способом, таким как местный, эпидермальный способ введения или способ введения через слизистые. В предпочтительном варианте соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, или комплекс соединения-тример по настоящему изобретению предназначено для перорального введения.

Практикующий врач может определить пригодную дозу соединения или комплекса соединения-тример. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, при этом композиция и способ введения не должны оказывать токсичный эффект на пациента. Выбираемый уровень дозировки зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, масса тела, состояние, общее состояние здоровья и медицинский анамнез пациента, нуждающегося в таком лечении, и другие подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Пригодную дозу можно выбрать, например, из диапазона от приблизительно 0,01 мкг/кг до прибли-

зительно 1000 мг/кг массы тела, обычно от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 1000 мг/кг массы тела пациента, нуждающегося в таком лечении. Например, пригодная доза может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сут или от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела в сут.

Режимы дозировки можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократную дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение определенного промежутка времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от терапевтической ситуации. Термин "стандартная лекарственная форма", использованный в данном контексте, обозначает физически дискретные формы, пригодные для использования в качестве единых доз, вводимых субъектам, нуждающимся в таком лечении, при этом каждая форма содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в смеси с необходимым фармацевтическим носителем.

Лекарственное средство можно вводить в виде однократной дозы или многократных доз. Многократные дозы можно вводить одним и тем же или различными способами, а также в один или разные участки тела. В другом варианте, дозы можно получать в виде препарата с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировку и частоту введения можно корректировать в зависимости от полупериода выведения антагониста у пациента и требуемой продолжительности лечения.

Как описано выше, соединения или комплексы соединения-тример можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими агентами. Например, другой агент может представлять собой обезболивающее средство, анестетик, иммунодепрессант или противовоспалительное средство.

Комбинированное введение двух или более агентов можно осуществлять рядом различных способов. Оба агента можно вводить совместно в составе одной композиции, или их можно вводить в отдельных композициях в ходе комбинированной терапии. Например, один агент можно вводить до, после введения другого агента или одновременно с ним.

Следующие примеры представлены только для иллюстрации настоящего изобретения.

#### Примеры

Пример 1(А).

Получение соединений формул (1), (2), (3) и (4).

Синтез соединения (1) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 490).

Синтез соединения (2) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 2).

Синтез соединения (3) описан в заявке WO 2014/009295 (пример 4).

Синтез соединения (4) описан в заявке WO 2013/186229 (пример 89).

Пример 1(Б).

Получение соединения формулы (5).

Номенклатура.

Соединениям присваивали названия с использованием номенклатурного программного обеспечения ACD/Name Batch (Network) версии 12.0 или программного обеспечения Accelrys Draw 4.0.

Сокращения.

ДХМ:	Дихлорметан	EtOAc:	Этилацетат
ДМФА:	Диметилформамид	MeOH:	Метанол
ДМСО:	Диметилсульфоксид	SiO <sub>2</sub> :	Диоксид кремния
Et <sub>2</sub> O:	Диэтиловый эфир	ч:	Час
ТГФ:	Тетрагидрофуран	ВУ:	Время удерживания
КТ:	Комнатная температура	MeCN	Ацетонитрил
ушир.:	Уширенная полоса	М:	Масса
Солевой раствор:	Насыщенный водный раствор хлорида натрия		
ВЭЖХ:	Высокоэффективная жидкостная хроматография		
LCMS:	Масс-спектрометрия с жидкостной хроматографией		
ES <sup>+</sup> :	Положительная ионизация электрораспылением		
ТЭА:	Триэтиламин		
ТСХ:	Тонкослойная хроматография		

Условия проведения анализа.

Все спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) снимали при частоте 300 или 400 МГц.

Все реакции с использованием реагентов, чувствительных к присутствию воздуха или влаги, проводили в атмосфере азота с использованием осушенных растворителей и стеклянных изделий.

Все данные анализа методом LCMS для соединений получали с использованием описанного ниже

способа.

Способ 1.

Система Waters Acquity-SQD, колонка Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм.

Подвижная фаза А: 10 мМ формиат аммония+0,1% аммиак.

Подвижная фаза В: 95% MeCN+5% H<sub>2</sub>O+0,1% аммиак.

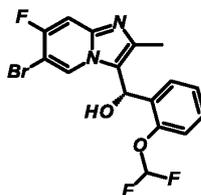
Программа градиента (скорость потока 1,0 мл/мин, температура колонки 40°C):

Время	А%	Б%
0,00	95	5
0,50	95	5
1,75	5	95
2,00	5	95
2,25	95	5

Специалисту в данной области представляется очевидным, что при сборе данных LCMS при использовании различных аналитических условий можно получить различные времена удерживания (ВУ).

Оптическое вращение определяли с использованием поляриметра Optical Activity PolAAR 2001.

Промежуточное соединение 1.

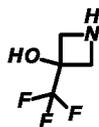


(6-Бром-7-фтор-2-метилимидазо[1,2-а]пиридин-3-ил)[2-(дифторметокси)фенил]метанол - энантиомер А.

Указанное в заголовке рацемическое соединение получали по следующей методике, описанной в патентной заявке WO 2014/009295. Полученную таким образом рацемическую смесь разделяли на составляющие энантиомеры с использованием метода хиральной хроматографии, как подробно описано ниже.

Указанное в заголовке соединение выделяли очисткой рацемического (6-бром-7-фтор-2-метилимидазо[1,2-а]пиридин-3-ил)[2-(дифторметокси)фенил]метанола в условиях жидкостной хроматографии (ЖХ) на колонке Chiralpak AD (100×500 мм, скорость потока 300 мл/мин, 30°C, 2-пропанол/гептан 1:9, нанесение 230 мл раствора при концентрации 7,5 г/л). Первый элюированный энантиомер (ВУ 27 мин) собирали и фракции упаривали, при этом получали энантиомер А. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -12,8°. Второй элюированный энантиомер (ВУ 50 мин) собирали и фракции упаривали, при этом получали энантиомер В. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +12,7°.

Промежуточное соединение 2.

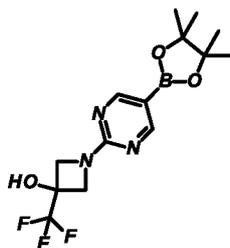


3-(Трифторметил)азетидин-3-ол.

В раствор 1-вос-3-азетидинона (11,3 г, 58,4 ммоль) и (трифторметил)триметилсилана (9,22 г, 64,3 ммоль) в ТГФ (100 мл), охлажденный до ~-5°C на бане со льдом и насыщенным водным раствором хлорида натрия, порциями добавляли фторид цезия (9,77 г, 64,3 ммоль). Полученную смесь перемешивали при КТ, через 4 ч результаты анализа методом ТСХ указывали на полное потребление исходного материала и менее полярного компонента. Реакцию останавливали при добавлении насыщенного водного раствора хлорида аммония (100 мл) и водную фазу экстрагировали EtOAc (3×100 мл). Органическую фазу отделяли, сушили над сульфатом натрия, отфильтровывали и удаляли летучие компоненты в вакууме, при этом получали неочищенное масло. Полученное таким образом масло растворяли в ДХМ (100 мл) и добавляли трифторуксусную кислоту (40 мл). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 4 ч. Летучие компоненты удаляли в вакууме и остаток отгоняли в виде азеотропной смеси с толуолом (3×150 мл), при этом получали триацетат указанного в заголовке соединения в виде твердого вещества коричневого цвета (15 г). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ/част./млн 9,48 (s, 2H), 7,95 (d, J 0,3 Гц, 1H), 4,28 (d, J 13,1 Гц, 2H), 4,06 (m, 2H).

Полученное таким образом соединение использовали в следующей реакции без дополнительной очистки.

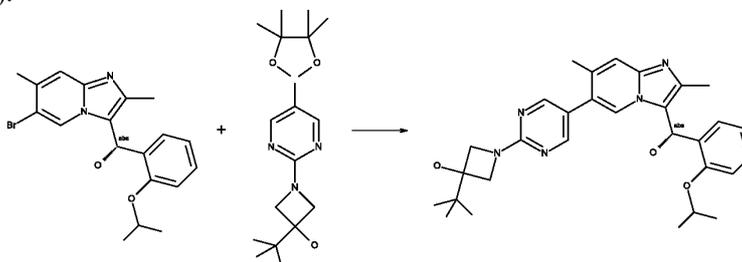
Промежуточное соединение 3.



1-[5-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиримидин-2-ил]-3-(трифторметил)азетидин-3-ол.

В раствор промежуточного соединения 2 (12 г) в ацетонитриле (150 мл) добавляли ТЭА (30 мл) и 2-хлор-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиримидин (16 г) и реакционную смесь перемешивали при 65°C в течение 18 ч. Растворители удаляли в высоком вакууме, а твердый остаток растирали и промывали дистиллированной водой, при этом получали твердое вещество бежевого цвета, которое сушили в вакууме, при этом получали указанное в заголовке соединение в виде твердого вещества бежевого цвета (18,5 г). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): δ/част./млн 8,53 (2H, s), 7,46 (1H, s), 4,33-4,31 (2H, m), 4,10-4,08 (2H, m), 1,29 (12H, s). МС-ЖХ (ES<sup>+</sup>) ВУ 1,14 мин, 346,0 (M+H)<sup>+</sup>.

Соединение (5).



1-[5-[3-[(S)-[2-(Дифторметокси)фенил]гидроксиметил]-7-фтор-2-метилимидазо[1,2-а]пиридин-6-ил]пиримидин-2-ил]-3-(трифторметил)азетидин-3-ол (энантиомер А).

Смесь промежуточного соединения 1 (0,7 г, 2 ммоль), промежуточного соединения 3 (0,7 г, 2 ммоль), комплекса 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроценпалладий(II) дихлорида и дихлорметана (36 мг, 0,044 ммоль) и 2М карбоната натрия (2 мл) в диоксане (12 мл) дегазировали и кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч. Охлажденную реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали дважды насыщенным водным раствором хлорида натрия и органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (SiO<sub>2</sub>, 0-90% EtOAc/гептан), при этом получали указанное в заголовке соединение в виде кремообразного твердого вещества (500 мг, 50%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ДМСО-d<sub>6</sub>): 5 8,51 (m, 3H), 7,95 (dd, J<sub>1</sub> 2,3 Гц, J<sub>2</sub> 6,7 Гц, 1H), 7,46 (m, 2H), 7,36 (m, 2H), 7,12 (m, 2H), 6,42 (d, J 4,4 Гц, 1H), 6,18 (d, J 4,4 Гц, 1H), 4,35 (m, 2H), 4,13 (d, J 10,2 Гц, 2H), 2,12 (s, 3H). МС-ЖХ (ES<sup>+</sup>) ВУ 1,34 мин, 540,0 (M+H)<sup>+</sup>. [α]<sub>D</sub>+39,7°.

Пример 2.

Анализ комплексов TNFα/TNF-R1/соединение методом аналитической эксклюзионной хроматографии.

Для определения числа рецепторов TNF-R1, связанных с TNFα, в отсутствие и в присутствии различных соединений, использовали метод эксклюзионной хроматографии. Соединение (2) анализировали в условиях, описанных ниже в методике 1. Соединение (5) анализировали, как описано в методике 2.

Методика 1.

Соединение (2) добавляли в 300 мкМ гибридного тримера TNFα до конечной концентрации в диапазоне от 90 до 690 мкМ, поддерживая постоянную концентрацию ДМСО (1,0%). Образец, содержащий TNFα и соединение, инкубировали при 4°C в течение ночи.

К комплексу соединение-тример (75 мкМ), полученному, как описано выше, добавляли рецептор до конечной концентрации 240 мкМ (3,2-кратный избыток относительно количества тримеров). Конечная концентрация ДМСО составляла 0,25%. Смесь инкубировали при 22°C в течение 1 ч.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию проводили в режиме ВЭЖХ в следующих условиях: объем наносимой пробы 50 мкл, колонка TSK G3000SW L×I.D. 30 см×7,5 мм, размер частиц 10 мкм, буферный раствор 10 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl. Для белков единая полипептидная цепь тримерного TNFα человека содержала остатки V77-L233 TNFα человека, за которыми следовали два дополнительных повтора остатков D86-L233 TNFα человека, связанные между собой через аминокислотный линкер Ser-Gly-Ser (последовательность на основе UniProt P10375). Использовали TNF-R1 (V43-N184)(N54D, C182S) человека на основе последовательности P19438 (UniProt).

Результаты показаны на фиг. 5. На указанной фигуре видно, что числа 1-3 обозначают число рецеп-

торов, связанных с тримерами TNF $\alpha$ . Как видно на указанной фигуре, добавление увеличивающихся концентраций соединения (2) приводит к снижению числа связанных рецепторов в среднем от трех рецепторов на тример до в среднем двух рецепторов на тример. Прежде всего, при низких концентрациях соединения (90 мкМ), наблюдается пик, соответствующий связыванию трех рецепторов с одним тримером (наряду с небольшим плечом, соответствующим связыванию двух рецепторов с одним тримером). При избытке концентрации соединения (690 мМ) преобладающий пик соответствует связыванию двух рецепторов с тримером, при этом небольшое плечо соответствует связыванию трех рецепторов с тримером. Следовательно, при указанной концентрации соединения большая часть комплексов тример-соединение связывается с двумя рецепторами.

В отдельном эксперименте для наблюдения ожидаемой миграции одного, двух и трех рецепторов, связанных с TNF $\alpha$ , к TNF $\alpha$  добавляли TNF-R1 в диапазон концентраций (1,2-, 2,2-, 3,2- и 5-кратный избыток относительно концентрации тримера TNF $\alpha$ ). Результаты представлены на фиг. 6. Как видно на указанной фигуре, при увеличении концентрации рецепторов наблюдается увеличение молекулярной массы комплекса (сдвиг влево), что указывает на сдвиг числа рецепторов, связанных с одним тримером, от одного до трех. С тримером TNF $\alpha$  связывается максимально три рецептора, т.к. при дальнейшем увеличении концентрации TNF-R1 никакого изменения не наблюдается.

#### Методика 2.

Соединение (5) добавляли в 20 мкМ тример TNF $\alpha$  до конечной концентрации 200 мкМ (соотношение тримеры/соединение 1:10), поддерживая постоянную концентрацию ДМСО (2,0%). Образец, содержащий TNF $\alpha$  и соединение, инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. В 10 мкМ комплекс тример-соединение добавляли рецепторы до конечной концентрации 35 мкМ (3,5-кратный избыток рецепторов относительно количества комплекса тример-соединение). Конечная концентрация ДМСО составляла 10%. Смесь инкубировали при 22°C в течение 1 ч.

Аналитическую эксклюзионную хроматографию проводили в режиме ВЭЖХ в следующих условиях: объем нанесенной пробы 50 мкл, колонка Superdex 200HR 10/300, L×I.D. 30 см×10 мм, размер частиц 13-15 мкм и буферный раствор 10 мМ HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl.

В качестве TNF $\alpha$  использовали единую полипептидную цепь тримерного TNF $\alpha$  человека, состоящую из остатков V77-L233 TNF $\alpha$  человека, за которыми следовали два дополнительных повтора остатков D86-L233 TNF $\alpha$  человека, связанные между собой через аминокислотный линкер Ser-Gly-Ser (последовательности на основе UniProt P10375). В качестве TNF-R1 человека использовали (V43-N184)(N54D, C182S) на основе последовательности UniProt P19438.

Для выявления маркеров, указывающих на ожидаемую миграцию одного, двух и трех рецепторов, связанных с TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$  с точечными мутациями, которые нарушали взаимодействия в одном, двух и трех участках связывания рецепторов, добавляли к 3,5-кратному избытку рецепторов (3,5-кратный избыток рецепторов относительно количества тримеров) в буферном растворе, содержащем ту же конечную концентрацию ДМСО (1,0%).

На фиг. 7 показано перекрытие кривой соединения (5) с контрольной кривой, демонстрирующее связывание мутантных форм TNF $\alpha$  с 1, 2 и 3 рецепторами. По сравнению с кривой соединения (2), пик соединения (5) расположен ближе к пику связывания с 1 рецептором.

#### Пример 3.

Анализ тройного комплекса мышинный TNF $\alpha$ -TNFR1-соединение (1) методом кристаллографии.

Растворимую форму TNF $\alpha$  (VC 6535, UniProt P06804) мыши экспрессировали в виде гибридного белка в *E. coli*, которая характеризовалась конечной аминокислотной последовательностью:

```
DKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVPADGLYLVYS
QVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWY
EPIYLGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL (SEQ ID NO: 1).
```

Клетки предварительно культивировали при 37°C в обогащенной среде, экспрессию индуцировали при добавлении 0,1% арабинозы и клетки инкубировали для экспрессии в векторе pEMB54 при 25°C в течение ночи. Указанный вектор позволяет ввести отщепляемую N-концевую метку His<sub>6</sub>Smt. Клетки лизировали и очищали Ni-хелатной хроматографией на сорбенте Ni-NTA. Гибридный белок элюировали буферным раствором, содержащим имидазол, и расщепляли при добавлении протеазы. Полученный в итоге расщепленный белок TNF $\alpha$  очищали на стадии субтрактивной Ni-хелатной хроматографии, при этом удаляли гибридную метку и затем белок очищали методом эксклюзионной хроматографии, при этом удаляли оставшиеся примеси. Конечный продукт TNF $\alpha$  концентрировали до концентрации 20,5 мг/мл и быстро замораживали в жидком азоте.

Внеклеточный домен TNF-R1 человека (VC 5602, UniProt P19438), экспрессированный в виде секретируемого белка в бакуловирусе, после инфицирования клеток насекомых характеризуется конечной аминокислотной последовательностью:

```
GSVCPQGGKYIHPQDNSICCTKCHKGTLYNDCP GPGQDTDCRECESGSFT
ASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRD TVCGCRKNQYRHYWSEN
```

FQCFNCSLCLNGTVHLSQCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSSSN (SEQ ID NO: 2).

Плазмиду гибридного белка клонировали в экспрессионный вектор pEMB50, который кодирует отщепляемый N-концевой секреторный сигнальный белок и His-меченый гибридный белок. Вирус получали с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Инфицированные клетки насекомых секретируют гибридный белок в среду. Гибридный белок очищали Ni-хелатной хроматографией на сорбенте Ni-NTA и элюировали с Ni-хелатной колонки в градиенте имидазола. Элюированный белок расщепляли протеазой, при этом отделяли N-концевую His-гибридную метку. Затем расщепленный TNF-R1 очищали на стадии субтрактивной Ni-хелатной хроматографии и затем очищали методом эксклюзионной хроматографии. Конечный продукт TNF-R концентрировали до концентрации 8,8 мг/мл и быстро замораживали в жидком азоте.

Очищенный TNF $\alpha$  мыши (20,5 мг/мл, VC 6535) инкубировали в присутствии соединения (1) (100 мМ в ДМСО) при 6-кратном молярном избытке при 37°C в течение 3 ч, затем инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день добавляли TNF-R1 человека (8,8 мг/мл, VC 5602) при конечном молярном соотношении 3 мономера TNF $\alpha$  (эквивалент 1 тримера)/3 рецептора TNF-R1. Тройной комплекс (цитокин, лиганд, рецептор) инкубировали в течение 1 ч, затем наносили на колонку Superdex 200 (23 мл) для проведения эксклюзионной хроматографии, которую предварительно уравнивали 10 мМ раствором HEPES, pH 7,5, 150 мМ NaCl. Конечный очищенный тройной комплекс концентрировали до концентрации 18,5 мг/мл и непосредственно использовали в кристаллографических исследованиях.

Тройной комплекс кристаллизовали методом диффузии паров в сидячей капле при смешивании 0,5 мкл комплекса с 0,5 мкл виннокислого натрия-калия (800 мМ), 0,5% PEG5000 MME, 100 мМ Tris (pH 8,5) над 100 мкл того же раствора для кристаллизации. Для сбора данных кристаллы выращивали в течение приблизительно 2 месяцев после первоначальной установки. Кристаллы кратковременно пропитывали парафиновым маслом и замораживали напрямую в жидком азоте для сбора данных на приборе 8/17/2012 с аргоновым источником фотонов, пучок синхротронного излучения 21-IDF.

Структуру комплекса TNF $\alpha$  (VC 6535) мыши и TNF-R (VC 5602) человека с соединением (1) определяли методом молекулярного замещения с использованием модели Phaser с моделями входных данных на основе структуры TNF $\alpha$  человека, включенного в состав комплекса. Данные интегрировали в XDS и масштабировали с использованием программы SCALA. Для определения исходной структуры и уточнения использовали данные, полученные от единого кристалла с разрешением до 3,15 Å. Итеративное ручное построение моделей с использованием программного обеспечения Coot (Emsley P. и Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., D, Biol. Crystallogr.*, декабрь, 60, часть 12, часть 1, сс. 2126-2132 (2004). PMID: 15572765) и программного обеспечения Refmac (Murshudov G.N., Vagin A. A. и Dodson E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, 1 мая, 53 (часть 3), сс. 240-255 (1997). PMID: 15299926) продолжали до получения значений R=0,222 и R<sub>free</sub>=0,272. Качество модели оценивали с использованием программного обеспечения Coot и сервера MolProbity (Lovell S.C., Davis I.W., Arendall W.B., de Bakker P.I., Word J.M., Prisant M.G., Richardson J.S. и Richardson D.C. Structure validation by Dalphi geometry: phi, psi and Cbeta deviation. *Proteins*, 15 февраля, 50, 3, сс. 437-450 (2003). PMID: 12557186). Условия конечной обработки данных и статистика уточнения приведены ниже в табл. 1.

Таблица 1. Сбор данных и статистика уточнения

Сбор данных	Набор данных 1
Идентификационный номер (ID) кристалла	234879c07
Пучок синхротронного излучения	APS 21-IDF
Дата сбора данных	8/17/2012
Ширина колебаний (°)	1,0
Кадры	60
Время экспозиции (с)	3
Расстояние (мм)	300
Длина волны (Å)	0,97872
Обработка данных	(внешняя оболочка)
Пространственная группа	P 4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Элементарная ячейка (Å, °)	a = b = 133,577, c = 141,445, α = β = γ = 90
Разрешение (Å)	3,15
I/σ	8,3 (1,8)
Полнота исследования (%)	99,9 (100)
R <sub>rim</sub>	0,095 (0,45)
R <sub>merge</sub> (%)	0,19 (0,90)
Сигналы (однозначно определяемые)	18,167 (1,314)
Мультиплетность	4,8 (5,0)
Статистка обработки	
Общее соотношение R <sub>рабочее</sub> /R <sub>свободное</sub>	22,2/27,2
Полосы RMSD (Å)	0,011
Углы RMSD (°)	1,222
Полные маргинальные остатки по карте Рамачандрана (%)	0,9
Число и процент остатков в предпочитаемой области по карте Рамачандрана (%)	95,9
Оценка MolProbity	1,91, 100 <sup>ый</sup> перцентиль* (N = 2048, 3,15 Å ± 0,25Å)
Рецензирование:	David Fox

\*100<sup>ый</sup> перцентиль представляет собой наиболее оптимальную структуру из структур, полученных при сопоставимом разрешении, 0<sup>ый</sup> перцентиль представляет собой наиболее неудовлетворительную структуру.

На кристаллических структурах, представленных на Фиг. 8А-Г, показано связывание двух рецепторов с комплексом тример-соединение.

Пример 4.

Исследование связывания TNFα с TNF-R1 методом резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением

Анализ резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET) разработан для оценки опосредованного соединением снижения степени связывания рецептора 1 TNF (внеклеточный домен TNF-R1 (ECD)) с гибридным тримером TNFα.

Получали комплекс меченого тербием стрептавидина с биотинилированным гибридным тримером TNFα и использовали его в качестве части донора пары для анализа FRET. В качестве акцептора FRET использовали TNF-R1 (ECD), конъюгированный с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 (AF488).

Таблица 2. Конструкты белков и меток для анализа FRET

Конструкт белка	Метка
TNF-R1 (ECD) – 6 × лизин – одноцепочечный фрагмент Fc человека	Взаимодействующий с аминами краситель Alexa Fluor 488 5-TFP (фирмы Life technologies, A30005)
TNFα (гибридный тример) – метка AVI	Молекула биотина на метке AVI (фирмы Avidity, биотин-протеин лигаза, EC 6.3.4.15)
Стрептавидин	Взаимодействующий с аминами хелат тербия Lanthascreen (фирмы Life Technologies, PV3581)

Каждый из меченых белков разбавляли до конечной концентрации 7,5 нМ (соотношение концентраций мономеры TNF/рецепторы 1:1) в буферном растворе (20 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,2). Соединения исследовали при проведении титрования по 10 точкам при трехкратном разбавлении. Максимальная концентрация соединения при проведении конечного анализа составляла 25 мкМ. Конечная концентрация ДМСО при проведении анализа составляла 5 об. %.

Планшет инкубировали в течение 20 ч, затем считывали с использованием планшет-ридера LJI Analyst. Образцы облучали при длине волны 330 нм для возбуждения флуоресценции и регистрировали флуоресцентные сигналы при 495 и 520 нм (длины волн испускания тербиевого донора и акцептора AF488, соответственно). Соотношение FRET рассчитывали, деля число сигналов акцептора на число сигналов донора и умножая полученный результат на 10000.

В отсутствие препятствующей молекулы, TNF-R1 образует комплекс с гибридным тримером TNFα,

генерируя сигнал FRET. Препятствующая молекула предотвращает связывание TNF-R1 и в результате подавляет сигнал FRET.

Подавление сигнала FRET может быть полным или частичным, при этом наблюдается снижение связывания TNF-R1 (ECD), указывающее на снижение стехиометрического состава комплекса TNF $\alpha$ -TNF-R1 (ECD). Полное подавление, как в случае антитела, составляет 100%.

На фиг. 9 и 10 показано частичное подавление связывания, наблюдаемое при использовании соединения (3) и соединения (4). При максимальной концентрации соединения максимальное подавление связывания составляет 29 и 36%, соответственно. Это соответствует среднему подавлению связывания одного из трех возможных рецепторов (теоретическое значение 33%).

Пример 5.

Анализ стехиометрического состава связывания рецептора TNF методом масс-спектрометрии ионной подвижности.

TNF $\alpha$  человека обессоливали и перед использованием заменяли буферный раствор на 20 мМ раствор ацетата аммония, pH 7,4. Комбинация спин-колонок zeba (фирмы Thermo-Fisher, номинальное отсечение по молекулярной массе (MWCO) 7 кДа) с последующим микродиализом (установки для микродиализа Thermo slide-a-lyzer, MWCO 10 кДа) обеспечивала полное обессоливание белка и получение сигналов с высоким разрешением методом масс-спектрометрии природных соединений. Добавляли TNF $\alpha$  (20 мкМ) и низкомолекулярный ингибитор TNF $\alpha$  (соединение (3)), 200 мкМ, при соотношении 1:1 (об./об.), 2% ДМСО. Соединение разбавляли, начиная от исходного 10 мМ раствора ДМСО, с использованием 20 мМ ацетата аммония (pH 7,4). Получали также контрольный образец, содержащий только ДМСО, при этом к TNF $\alpha$  (20 мкМ) добавляли буферный раствор (20 мМ раствор ацетата аммония, pH 7,4, 2% ДМСО) при соотношении 1:1 (об./об.). Оба раствора инкубировали при комнатной температуре в течение ночи, затем образец, содержащий низкомолекулярное соединение, анализировали методом времяпролетной масс-спектрометрии для изучения нековалентных взаимодействий (масс-спектрометр Waters LCT Premier, снабженный источником Advion TriVersa NanoMate), при этом подтверждали полное связывание TNF $\alpha$ .

TNF-R1 человека (дегликозилированные остатки 41-184, C182S) готовили для анализа методом масс-спектрометрии природных соединений, заменяя буферный раствор на 20 мМ раствор ацетата аммония, pH 7,4, используя спин-колонку zeba (Thermo-Fisher, MWCO 7 кДа). В аликвоты образцов TNF $\alpha$ , полученные, как описано выше, добавляли рецептор при соотношении 1:1 (об./об.), при этом получали три образца для каждого эксперимента, содержащие 5, 10 и 23 мкМ TNF-R (конечная концентрация TNF $\alpha$  в каждом образце составляла 5 мкМ). Образцы инкубировали в течение 2 ч и анализировали методом масс-спектрометрии ионной подвижности (масс-спектрометр Waters Synapt G2 Q-TOF, снабженный источником Advion TriVersa NanoMate).

Стехиометрический состав рецепторов можно однозначно определять методом масс-спектрометрии за счет значительной разницы в массе, получаемой при связывании 1, 2 или 3 рецепторов с TNF $\alpha$ . Однако возникают проблемы из-за перекрывания заряженных состояний на используемой шкале масса/заряд ( $m/z$ ), например, одно и то же значение  $m/z$  равно 2000 можно получить для анализируемого соединения (ММ 20000 Да) с 20 зарядами, а также для анализируемого соединения (ММ 32000 Да) с 16 зарядами. Следовательно, для проведения указанных экспериментов требуется метод масс-спектрометрии ионной подвижности, так как указанный метод обеспечивает чрезвычайно высокую степень разделения, полученную при измерении "времени пролета" и соотношения масса/заряд. Время пролета анализируемого соединения зависит от его массы, заряда и конформации, и его измеряют по периоду времени, который требуется каждому анализируемому соединению для пересечения в поперечном направлении наполненной газом ячейки подвижной фазы в спектрометре. Получаемый в результате двумерный график зависимости соотношения  $m/z$  от времени обеспечивает однозначную оценку стехиометрического состава рецептора.

В контрольном эксперименте, в присутствии более 3-кратного молярного избытка добавленного TNF-R по сравнению с концентрацией TNF $\alpha$ , наблюдали связывание трех рецепторов с одним тримером TNF $\alpha$ . В присутствии низкомолекулярного ингибитора TNF $\alpha$ , такого как соединение (3), стехиометрический состав связывания рецептора снижался, и с одним тримером TNF $\alpha$  преимущественно связывалось два рецептора (см. фиг. 11).

Пример 6.

Анализ влияния соединения (3) на аффинность TNF-R1 по отношению к TNF $\alpha$  методом масс-спектрометрии.

Исходный раствор соединения.

Исходный раствор ДМСО (2 мкл, 10 мМ) и 2 мкл ДМСО добавляли в 96 мкл буферного раствора ацетата аммония (20 мМ), при этом получали 100 мкл раствора соединения (3) (200 мкМ), 4% ДМСО.

Исходные растворы белка.

TNF обессоливали с использованием 2 $\times$  колонок Zeba, затем проводили диализ в 20 мМ ацетате аммония, pH 7,4. TNF-R обессоливали с использованием 2 $\times$  колонок Zeba, затем проводили диализ в 20

мМ ацетате аммония, pH 7,4. Конечную концентрацию белка в образцах подтверждали, регистрируя оптическую плотность растворов при 280 нм.

В раствор TNF (40 мкМ) добавляли соединения при соотношении 1:1 (об./об.) и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. (Конечная концентрация ДМСО=2%)

Получали также контрольный образец, содержащий только ДМСО.

Для каждого образца, 5 мкл TNF в смеси с соединением или TNF только в смеси с ДМСО, добавляли в 5 мкл TNF-R при каждой указанной концентрации. Конечная концентрация TNF ([TNF]) составляла 5 мкМ.

До проведения анализа образцы инкубировали в присутствии TNF-R в течение 2 ч.

Растворы, содержащие 5000 нМ TNF $\alpha$  человека и 5000 нМ TNF $\alpha$  человека в присутствии соединения (3), титровали TNF-R1 человека (внеклеточный домен, содержащий остатки 41-184) в диапазоне концентраций 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000 и 23000 нМ.

Анализ методом масс-спектрометрии ионной подвижности проводили на масс-спектрометре Waters Synapt G2, снабженном источником Advion NanoMate. Использовали следующие рабочие параметры.

Конусный скиммер=50 В.

Температура источника=20°C.

Энергия захвата/столкновения с передачей заряда=выключено.

Скорость потока захваченного газа=0,4 мл/мин.

Гелиевая ячейка=180 мл/мин.

Масс-спектрометрия ионной подвижности (IMS) (N<sub>2</sub>)=90 мл/мин.

Смещение постоянным током в ловушке=40 В.

Ручной пуск захвата подвижной фазы - не активировано.

Задержка волны IMS=450 мкс

Скорость волны IMS=750 м/с.

Амплитуда волны IMS=40 В.

Форвакуумное давление=6,21 мбар.

Ловушка  $2,05 \times 10^{-2}$  мбар.

IMS 3,47 мбар.

TOF  $1,2 \times 10^{-6}$  мбар.

Квадрупольный профайл:

4000, 5000, 6000 (dwell 30, ramp 30).

Диапазон 500-8000.

Данные анализировали, выделяя масс-спектр для каждого образца в программном обеспечении driftscore. Полученные спектры сглаживали (50/5) и высоту пиков суммировали по всем заряженным состояниям.

Измеряли число ионных пиков, соответствующих образцам TNF (без связанных рецепторов), TNF+1R (один связанный рецептор), TNF+2R (два связанных рецептора) и TNF+3R (три связанных рецептора). Нормализованное число ионов рассчитывали в виде фракции ионов каждого образца, деленной на общее число подсчитанных ионов. Указанные значения использовали в качестве эквивалента молярной фракции каждого образца в равновесном состоянии. Данные, полученные при проведении двух экспериментов, суммированы в таблицах ниже.

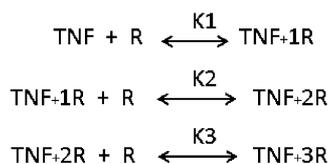
Таблица 3

Исходная концентрация		Нормализованное число ионов			
TNF $\alpha$ человека Тример [нМ]	TNF-R1 человека [нМ]	TNF	TNF+1R	TNF+2R	TNF+3R
5000	1000	0,973	0,027	0,000	0,000
5000	2000	0,767	0,233	0,000	0,000
5000	4000	0,421	0,525	0,054	0,000
5000	6000	0,121	0,547	0,332	0,000
5000	8000	0,000	0,331	0,669	0,000
5000	10000	0,000	0,000	0,720	0,280
5000	23000	0,000	0,000	0,000	1,000

Таблица 4

Исходная концентрация		Нормализованное число ионов			
TNF $\alpha$ человека Тример [нМ] + соединение (3)	TNF-R1 человека [нМ]	TNF	TNF+1R	TNF+2R	TNF+3R
5000	1000	0,869	0,131	0,000	0,000
5000	2000	0,789	0,211	0,000	0,000
5000	4000	0,396	0,558	0,046	0,000
5000	6000	0,113	0,665	0,222	0,000
5000	8000	0,034	0,490	0,476	0,000
5000	10000	0,000	0,050	0,950	0,000
5000	23000	0,000	0,000	0,713	0,287

Для получения констант равновесия из указанных данных равновесное состояние системы представляли следующими реакциями:



Для расчета ряда констант диссоциации K1, K2 и K3 в максимальном соответствии данным анализа природных соединений методом масс-спектрометрии, значения K1, K2, K3, которые соответствуют образованию фракций образцов TNF, TNF+1R, TNF+2R и TNF+3R, наиболее близких к измеряемым молярным фракциям указанных образцов, получали при сведении к минимуму функции

$$\begin{aligned} \text{Error}(K1, K2, K3) &= \sum_{T0, Rmin}^{T0, Rmax} [(f_{\text{TNF}_{calc}} - f_{\text{TNF}_{obs}})^2 + (f_{\text{TNF}+1\text{R}_{calc}} - f_{\text{TNF}+1\text{R}_{obs}})^2 \\ &+ (f_{\text{TNF}+2\text{R}_{calc}} - f_{\text{TNF}+2\text{R}_{obs}})^2 + (f_{\text{TNF}+3\text{R}_{calc}} - f_{\text{TNF}+3\text{R}_{obs}})^2]^{1/2} \cdot R \end{aligned}$$

где T0 обозначает исходное количество TNF, а Rmin, R, Rmax представляют исходную концентрацию анализируемого рецептора R, начиная от концентрации Rmin и заканчивая при концентрации Rmax. Фракции  $f_{\text{obs}}$  представляют собой молярные фракции образцов TNF, TNF+1R, TNF+2R и TNF+3R (например,  $f_{\text{TNF}_{obs}}$ ), полученные по данным анализа природных соединений методом масс-спектрометрии в равновесном состоянии.  $f_{\text{calc}}$  представляют собой молярные фракции образцов (например,  $f_{\text{TNF}_{calc}}$ ), рассчитанные при решении уравнений статистического равновесия с использованием инструмента для моделирования BioNetGen BNGL (Blinov M. L., Faeder J. R., Goldstein B. и Hlavacek W. S. "BioNetGen: software for rule-based modeling of signal transduction based on the interactions of molecular domains". Bioinformatics, 20, сс. 3289-3291 (2004)) и принимая в качестве исходных данных значения T0, R0 и K1, K2 и K3. Функцию "Error" сводили к минимуму с использованием утилиты для минимизационного перебора, внедренной в программу SciPy/NumPy (<http://docs.scipy.org/doc/numpy/index.html>). Полный анализ по обработке данных осуществляли на языке программирования Python (<https://www.python.org/>), при необходимости обращаясь к программному обеспечению BioNetGen.

После анализа данных рассчитывали три константы равновесия (K1, K2 и K3), соответствующие трем событиям связывания рецептора, для смесей TNF и рецептора в присутствии и в отсутствии соединения (3). Данные визуализировали при построении графика зависимости молярных фракций всех образцов в равновесном состоянии (ось "Y") от концентрации рецептора, добавленного к фиксированной исходной концентрации TNF (ось "X"). Символы обозначают наблюдаемые молярные фракции образцов, определенные в результате проведения анализа природных соединений методом масс-спектрометрии, а кривые соответствуют теоретическим значениям концентраций, рассчитанным из констант равновесия K1, K2 и K3. Указанные графики приведены на фиг. 12 и 13.

Таблица 5

Образец	K1 [нМ]	K2 [нМ]	K3 [нМ]
TNF + рецептор	0,01	0,02	0,22
TNF + рецептор + соединение (3)	0,04	0,19	9612

#### Пример 7.

Соединения и комплексы, описанные в статье Ma и др. (2014) и в статье Silvan и др. (2011), имеют другие характеристики по сравнению с соединениями по настоящему изобретению.

Согласно данным, представленным на с. 12458 в статье Ma и др. (JBC, 289, сс. 12457-12466 (2014)), соединение C87 было выявлено в ходе виртуального скрининга, целью которого был поиск молекул, размер которых соответствует пространству, занимаемому 7-членным аминокислотным пептидом из петли 2/домена 2 TNF-R1, при его взаимодействии с внешней поверхностью TNF $\beta$ . Соединение C87, описанное в статье Ma и др., и соединение BI08898, описанное в статье Silvan и др. (ACS Chemical Biology, 6, сс. 636-647 (2011)), были исследованы авторами настоящего изобретения.

Краткое описание результатов.

Результаты анализа ViaSage в отношении соединения C87, описанные в статье Ma и др., повторить не удалось.

Никаких данных специфического ингибирования TNF в клетках получить не удалось.

Кроме того, согласно данным масс-спектрометрии, чувствительность которой в отношении аффинности связывания находится на миллимолярном уровне, связывания соединения C87 не наблюдалось.

Расширенные кристаллографические исследования проводили только в отношении апо-TNF (TNF в отсутствие соединения).

По данным поляризационного флуоресцентного (FP) анализа соединение C87 не проявляло значительного ингибирования, превосходящего уровень интерференции соединения при считывании флуоресцентного сигнала.

По данным термического флуоресцентного анализа ThermoFluor, который позволяет оценить стабилизацию температуры плавления TNF $\alpha$ , наблюдается небольшая стабилизация для соединения С87.

Таким образом, не было найдено никаких доказательств того, что соединение С87 связывается в центре тримера. Подавляющее большинство данных не указывало на прямое взаимодействие с TNF $\alpha$ . Было также установлено, что соединение BI08898 не связывается с TNF $\alpha$ .

Анализ клеток HEK NF $\kappa$ B, индуцированных TNF, с использованием репортерного гена.

Перед добавлением к клеткам HEK-293, стабильно трансфектированным SEAP под контролем NF $\kappa$ B, соединение С87 предварительно инкубировали с TNF $\alpha$  в течение 1 ч. Проводили также соответствующий обратный скрининг для детектирования активности, которая не связана с TNF (без мишени). Перед оценкой уровня ингибирования по сравнению с 100%-ной блокировкой контрольным соединением, исследуемый образец инкубировали в течение ночи. Максимальная концентрация соединения С87 составляла 10000 нМ, анализ проводили с использованием 3-кратных серийных разведений.

Ингибирующий эффект, который не относится к связыванию с мишенью, не наблюдался.

Анализ Biacore.

TNF иммобилизовали с использованием линкера avi-tag и соединение С87 пропускали через чип. В одном эксперименте дозозависимый ответ оценивали с использованием соединения С87 в максимальной концентрации, которая составляла 10 мкМ. Никакого связывания обнаружить не удалось.

Во втором эксперименте скорость потока раствора соединения С87, пропускаемого через чип, снижали. Наблюдался небольшой сдвиг сигнала, но общее связывание оставалось на пренебрежимо низком уровне.

Связывание С87 с TNF, описанное в статье Ma и др., вероятно, является супер-стехиометрическим, согласно уровню резонансного сигнала (RU) по оси Y. При стандартной плотности TNF на чипе величина указанного сигнала находилась в области значений, которые в тридцать раз превышали значения, ожидаемые при простом связывании 1:1.

В другом эксперименте исследовали взаимодействие BI08898 с иммобилизованной растворимой формой CD40L и растворимой формой TNF $\alpha$  методом SPR (поверхностный плазмонный резонанс) на установке Biacore 4000. При связывании с CD40L среднее геометрическое IC<sub>50</sub> составило 17 мкМ, при этом по данным указанного анализа связывание с TNF $\alpha$  в концентрации вплоть до 100 мкМ не наблюдалось.

Масс-спектрометрия.

Данных связывания С87 (400 мкМ) с TNF $\alpha$  человека (20 мкМ) получить не удалось. Оказалось, что связывание соединений с низкой молекулярной массой (~ 473 Да) составляет менее 5% от занятости рецептора. Молекулярная масса С87 составляет 503 Да. На основании занятости при концентрации 400 мкМ можно ожидать проявление аффинности для низкомолекулярных соединений в избытке, т.е. более 1 мМ.

Кристаллография.

В целом были проведены расширенные исследования по кристаллизации соединения С87 с TNF $\alpha$ , включая условия, которые обычно используют при работе с соединениями, описанными в настоящей заявке. Указанные исследования заключались в проведении большого количества экспериментов по кристаллизации с использованием лигандов в различных концентрациях, белка в различных концентрациях, а также при разных временах инкубации. Были исследованы несколько кристаллов, которые по данным анализа представляли собой соль или TNF без соединения.

Поляризационная флуоресценция (FP).

Перед проведением анализа с использованием флуоресцентного соединения (зонда) С87 предварительно инкубировали с TNF $\alpha$  в течение 1 ч. Конкуренцию с флуоресцентным соединением при прямом (связывание с тем же сайтом) или косвенном (нарушение конформации TNF) связывании оценивали по снижению уровня FP.

При экстраполяции кривой ингибирования было установлено, что IC<sub>50</sub> составляет приблизительно 100 мкМ. Однако тушение (снижение) флуоресценции наблюдалось при самых высоких концентрациях ингибитора, таким образом по данным этого анализа в результате вычитания было установлено, что С87 оказывает пренебрежимо малое ингибирующее воздействие.

Термический флуоресцентный анализ ThermoFluor.

Термический флуоресцентный анализ ThermoFluor позволяет оценить изменение температуры плавления (T<sub>m</sub>) TNF $\alpha$  в результате взаимодействия с соединением, стабилизирующим или изменяющим конформацию белка. Стабилизирующий эффект при использовании соединения С87 в концентрации 500 мкМ составил 3,8°C, что указывает на возможность слабого связывания, которое может быть неспецифическим.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным TNF $\alpha$ , и модулировать передачу сигнала тримерного TNF $\alpha$  через рецептор TNF, включающий определение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, и тем самым идентификацию способности соединения модулировать передачу сигнала через рецептор, где снижение среднего числа рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, по сравнению с контрольным образцом указывает на способность соединения модулировать передачу сигнала через рецептор.

2. Способ по п.1, где контрольный образец содержит тримеры TNF $\alpha$  и рецепторы в отсутствие соединения.

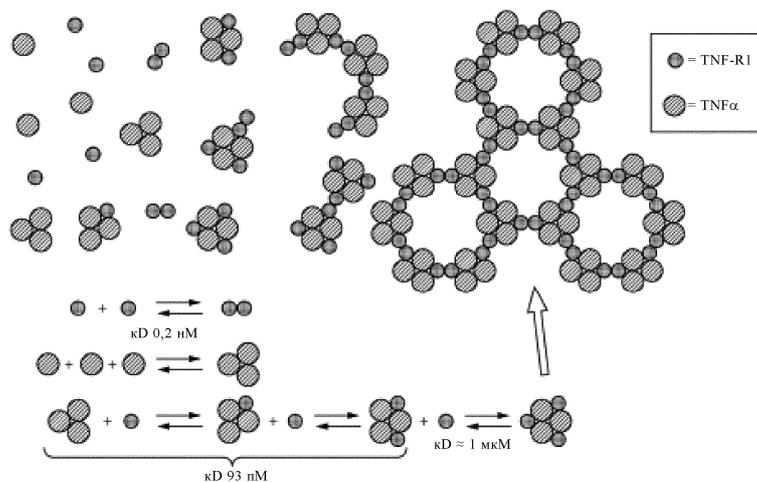
3. Способ по п.1, где контрольный образец содержит тримеры TNF $\alpha$ , рецепторы и известное соединение, которое модулирует передачу сигнала тримеров через рецепторы.

4. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где среднее число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, определяют при молярном соотношении рецепторы/тримеры в интервале от 3:1 до 10:1.

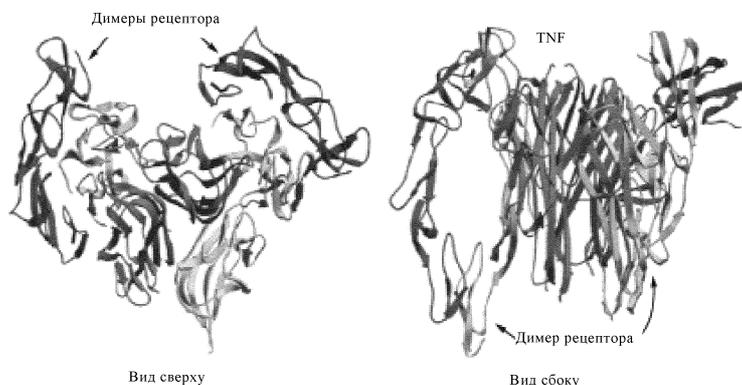
5. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где соединение идентифицируют как соединение, способное модулировать передачу сигнала тримерного TNF $\alpha$  через рецептор, если определено, что с комплексом тример-соединение связано в среднем менее трех рецепторов, в среднем два рецептора или в среднем один рецептор.

6. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где число рецепторов, связанных с комплексом тример-соединение, определяют методом:

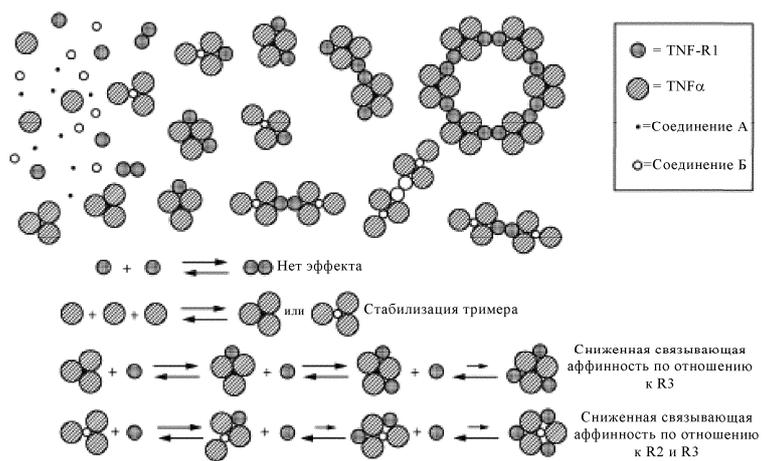
- i) масс-спектрометрии ионной подвижности, и/или
- ii) эксклюзионной хроматографии, и/или
- iii) агрегационного анализа, и/или
- iv) ферстеровского резонансного переноса энергии флуоресценции, и/или
- v) кристаллографии.



Фиг. 1

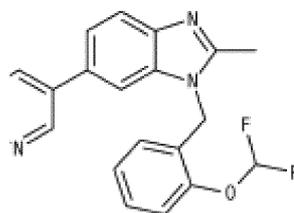


Фиг. 2



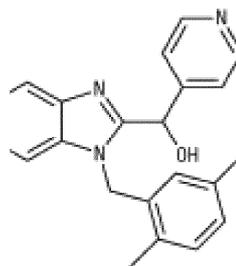
Фиг. 3

Соединение (1)



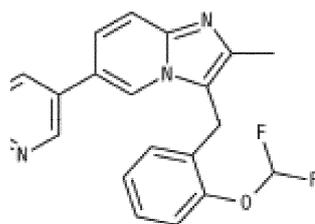
Фиг. 4А

Соединение (2)



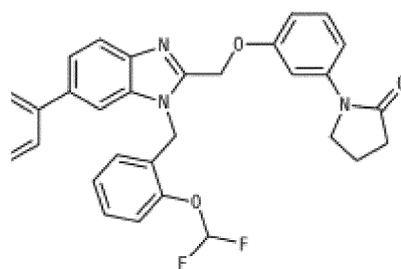
Фиг. 4Б

Соединение (3)



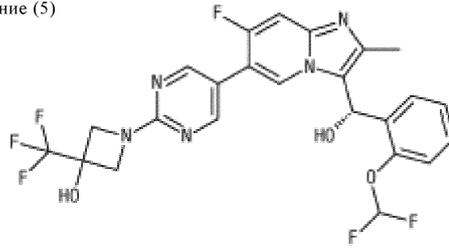
Фиг. 4В

Соединение (4)

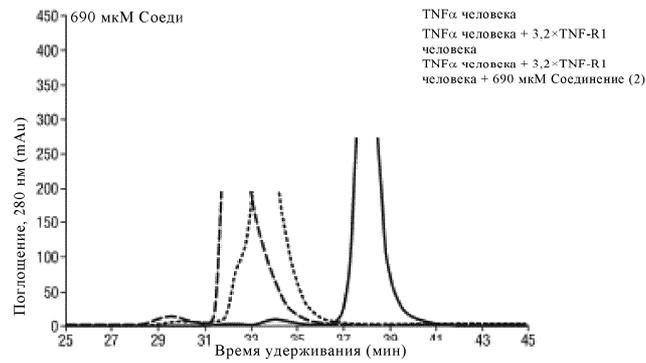
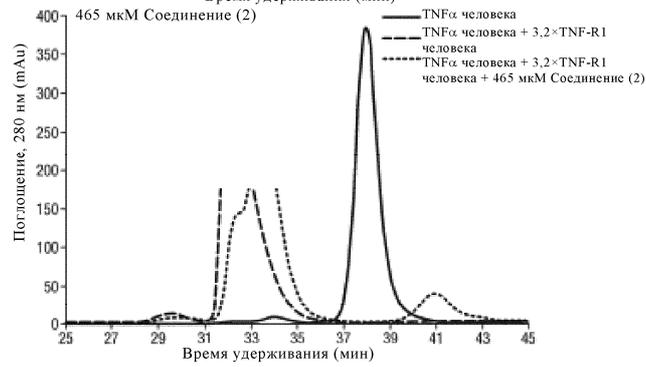
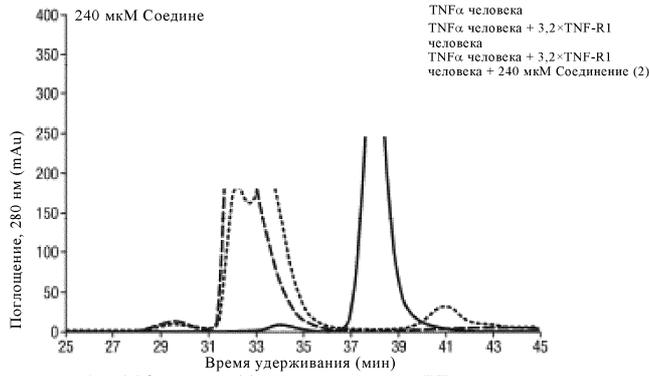
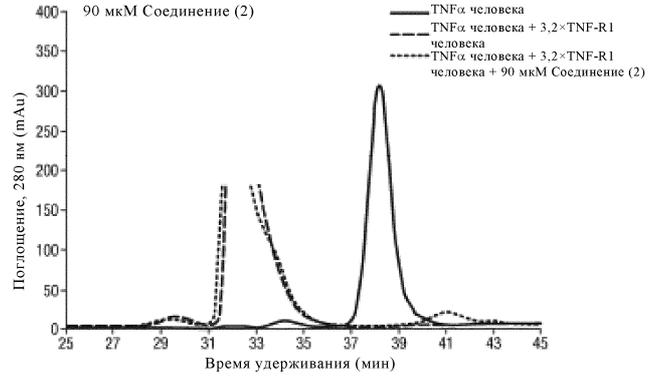


Фиг. 4Г

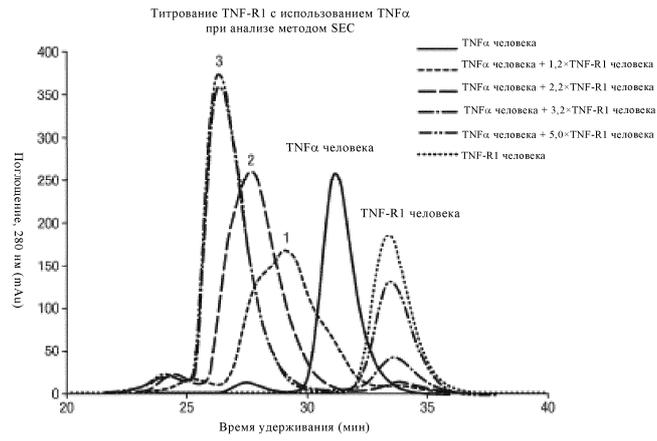
Соединение (5)



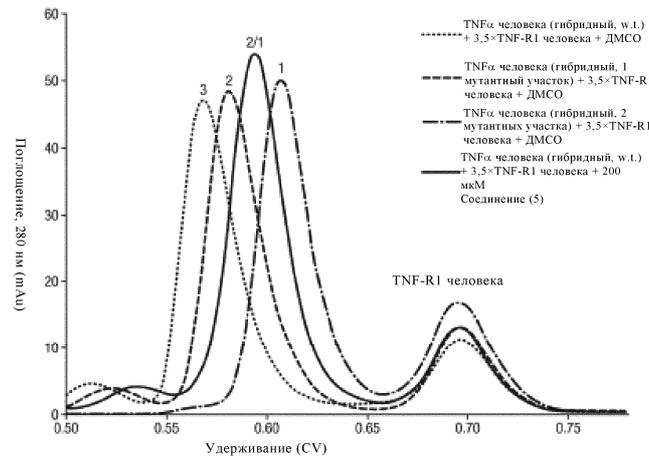
Фиг. 4Д



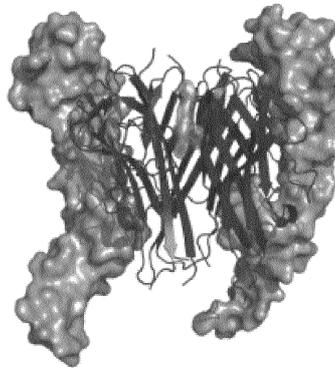
Фиг. 5



Фиг. 6



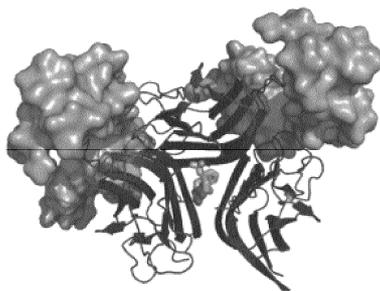
Фиг. 7



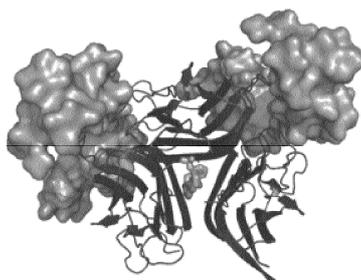
Фиг. 8А



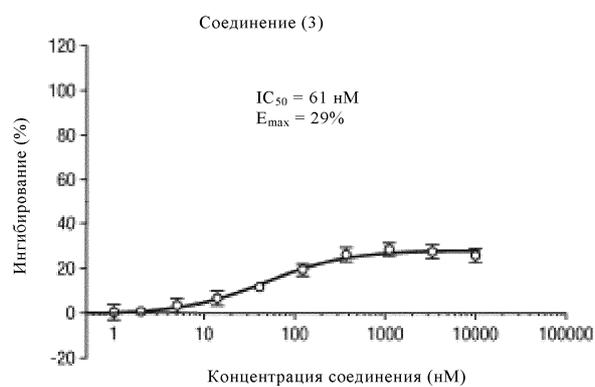
Фиг. 8Б



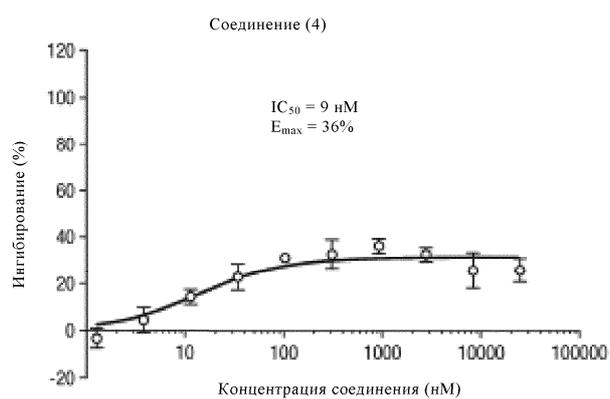
Фиг. 8В



Фиг. 8Г



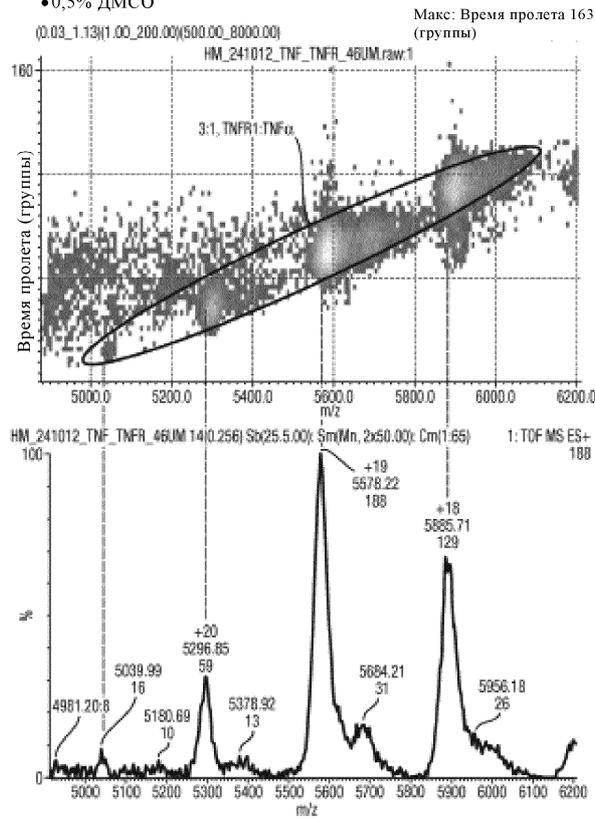
Фиг. 9



Фиг. 10

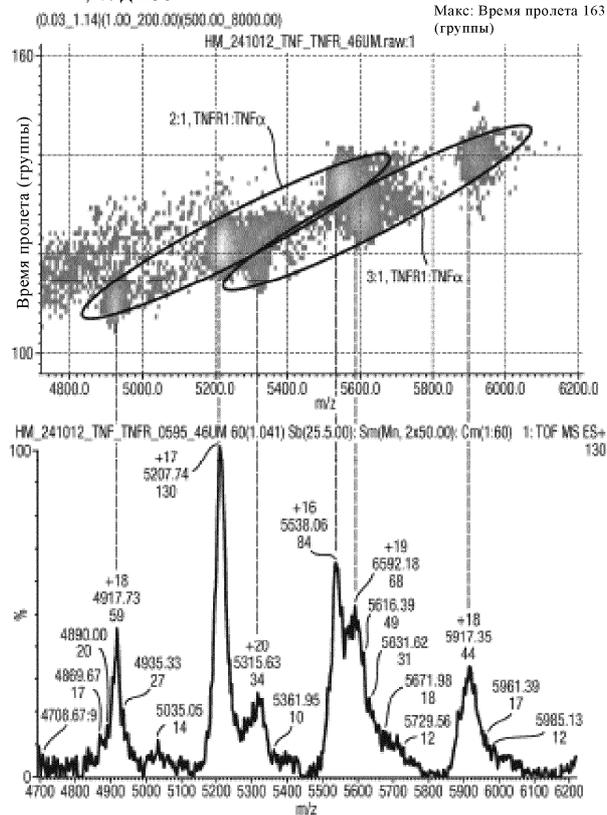
Контроль только ДМСО

- TNF $\alpha$  (5 мкМ)
- TNF-R1 (41-184, C182S, дегликозилированный) – (23 мкМ)
- 0,5% ДМСО

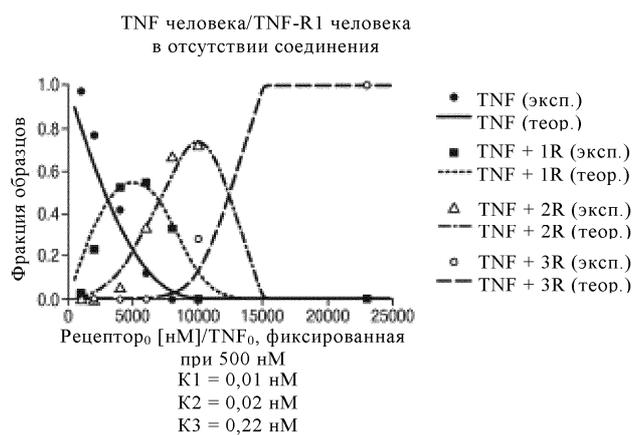


TNF + соединение (3)

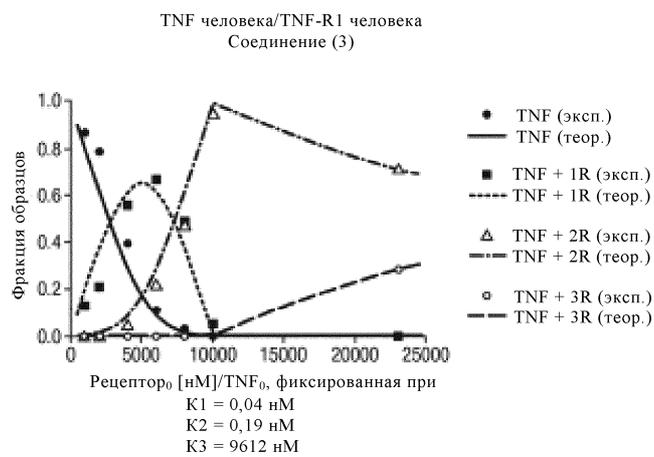
- TNF $\alpha$  (5 мкМ), соединение (3) (50 мкМ)
- TNF-R1 (41-184, C182S, дегликозилированный) – (23 мкМ)
- 0,5% ДМСО



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

