

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042619**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.06

(21) Номер заявки
201890080

(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) АНАЛИЗ МОДУЛЯТОРОВ(31) **1510758.4**(32) **2015.06.18**(33) **GB**(43) **2018.07.31**(86) **PCT/EP2015/074524**(87) **WO 2016/202413 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,
Уорреллоу Грэм Джон (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) MOLLY M. HE ET AL.: "Small-Molecule Inhibition of TNF-alpha", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 310, № 5750, 11 November 2005 (2005-11-11), p. 1022-1025, XP008147896, ISSN: 0036-8075, the whole document

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, № 6, 17 June 2011 (2011-06-17), p. 636-647, XP055231751, US, ISSN: 1554-8929, DOI: 10.1021/cb2000346, cited in the application, the whole document

ANDREAS HOFFMANN ET AL.: "New Binding Mode to TNF-Alpha Revealed by Ubiquitin-Based Artificial Binding Protein", PLOS ONE, vol. 7, № 2, 20 February 2012 (2012-02-20), p. e31298, 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, № 19, 1 May 1995 (1995-05-01), p. 6344-6350, XP055231745, US, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi00019a012, the whole document

L. MA ET AL.: "A Novel Small-molecule Tumor Necrosis Factor Inhibitor Attenuates Inflammation in a Hepatitis Mouse Model", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 289, № 18, 2 May 2014 (2014-05-02), p. 12457-12466, XP055231855, US, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M113.521708, cited in the application, the whole document

WO-A2-2013024040
WO-A1-2013186229

(57) Описано, что определенные соединения связываются с TNF и стабилизируют конформацию тримерного TNF, который связывается с рецептором TNF. Соответственно указанные соединения можно использовать в качестве модуляторов TNF. Также описан новый метод анализа для идентификации соединений с указанным механизмом действия.

B1**042619****042619 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к модуляторам суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF). Прежде всего, настоящее изобретение относится к новым низкомолекулярным модуляторам суперсемейства TNF. Настоящее изобретение также относится к методам анализа для идентификации новых модуляторов суперсемейства TNF.

Предпосылки создания 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 β -складчатых слоев с антипараллельными β -цепями, формирующих β -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 α является исходным членом суперсемейства TNF. Разрегуляция продуцирования TNF α принимает участие в развитии ряда патологических состояний, имеющих большое значение в медицине. Например, TNF α принимает участие в развитии ревматоидного артрита, воспалительных заболеваний 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 α , прежде всего моноклональные антитела, такие как инфликсимаб (Remicade®), адалимумаб (Humira®) и цертолизумаб пегол (Cimzia®), или растворимые гибридные белки на основе рецептора TNF α , такие как этанерцепт (Enbrel®).

Краткое описание сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали классы низкомолекулярных соединений (SME), которые модулируют TNF α . Эти соединения действуют за счет связывания с гомотримерной формой TNF α и индукции и стабилизации конформационного изменения гомотримера TNF α . Например, гомотримеры TNF α со связанным соединением могут связываться с рецепторами TNF α , но способны в меньшей степени или вообще не способны инициировать передачу сигнала в следующих сигнальных путях рецептора TNF α . Эти соединения можно использовать при лечении состояний, опосредованных TNF α . Авторы настоящего изобретения также разработали методы анализа, которые позволяют идентифицировать соединения, которые способны ингибировать TNF α указанным способом.

Соответственно в настоящем изобретении предлагается способ идентификации соединения, способного связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала рецептора, при этом указанный способ включает

а) идентификацию связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF в образце; и/или

б) определение стабильности тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем соединение; и/или

в) определение уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, в образце, содержащем соединение; и/или

г) определение конкуренции исследуемого соединения с соединением-зондом при связывании с тримерной формой члена суперсемейства TNF,

а также сравнение связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF по п.(а), и/или стабильности тримерной формы члена суперсемейства TNF по п.(б), и/или уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, по п.(в), и/или уровня конкуренции, наблюдаемой по п.(г), с соответствующими значениями, полученными для контрольных образцов, и выбор соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором члена суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала рецептора.

Таким образом, способы по настоящему изобретению можно использовать для идентификации соединения, способного связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором члена суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала, индуцированную тримером через рецептор. Другими словами, согласно настоящему изобретению комплекс соединение-тример модулирует передачу сигнала рецептора.

В настоящем изобретении также предлагается комплекс, включающий тримерный белок, который является членом суперсемейства TNF, и связанное с ним соединение, или состоящий из указанных компонентов; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемей-

ства TNF и модулирует передачу сигнала рецептора.

В настоящем изобретении также предлагается комплекс, включающий член суперсемейства TNF и соединение, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала рецептора, предназначенного для применения в способе лечения организма человека или животного.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая комплекс соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала рецептора тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; а также фармацевтически приемлемый носитель.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показана структура соединения формулы (1) и структура соединения формулы (2).

На фиг. 2 показана структура соединения формулы (3) и структура соединения формулы (4).

На фиг. 3А показаны результаты анализа (анализ Mesoscale Discovery, MSD) исследуемых соединений, которые оказывают влияние на связывание TNF α с рецептором TNF. Исследовали множество исследуемых соединений и рассчитывали уровень ингибирования (в %) связывания TNF α с рецептором TNF.

На фиг. 3Б показана дозозависимая кривая для соединения формулы (1), полученная с использованием указанного анализа.

На фиг. 3В показана дозозависимая кривая для соединения формулы (2).

На фиг. 4А показан анализ связывания рецептора с лигандом, демонстрирующий повышенную степень связывания TNF с внеклеточным доменом (ECD) TNF-R1 в присутствии соединения формулы (1).

На фиг. 4Б показана повышенная степень связывания, индуцированная соединением формулы (2), при проведении того же анализа.

На фиг. 5 (нижняя кривая) показан развернутый масс-спектр TNF α в 100% водном растворе. На фиг. 5 (верхняя кривая) показан развернутый масс-спектр TNF α в растворе, содержащем 10% (об./об.) диметилсульфоксида (ДМСО). На фиг. 5 (средняя кривая) показан развернутый масс-спектр TNF α в растворе, содержащем 10% (об./об.) ДМСО, и соединение формулы (1).

На фиг. 6 показан масс-спектр TNF α в растворе, содержащем соединение формулы (1).

На фиг. 7А и 7Б показано перекрытие профиля элюции после эксклюзионной хроматографии и результаты последующего анализа методом масс-спектрометрии (А) образца TNF α , предварительно инкубированного в присутствии соединения формулы (1) и затем смешанного с TNF-R, и (Б) образца TNF α , предварительно инкубированного в присутствии TNF-R и затем смешанного с соединением формулы (1).

На фиг. 8А и 8Б показаны (А) результаты изотермического калориметрического анализа связывания TNF α с рецептором TNF-R и (Б) результаты изотермического калориметрического анализа связывания TNF α с рецептором TNF-R, при этом TNF α предварительно инкубировали в присутствии соединения формулы (2).

На фиг. 9 показана кристаллическая структура комплекса соединения формулы (1) с тримерным TNF α .

На фиг. 10 показан график нейтрализации TNF α человека соединением формулы (1) и соединением формулы (2), представленный в виде зависимости концентрации соединения формулы (1) (Δ) и концентрации соединения формулы (2) (\diamond) от остаточной концентрации TNF α человека (пг/мл), измеренной методом анализа гибели клеток мышинной фибросаркомы L929.

На фиг. 11 показан график зависимости концентрации соединения формулы (1) (нМ) от относительного продуцирования IL-8 (в %) в моноцитах человека, обработанных TNF α .

На фиг. 12А-12В показан график зависимости концентрации соединения формулы (2) (нМ) от ингибирования (в %) активации NF- κ B в клетках HEK293 в присутствии (А) TNF α (0,5 нг/мл), (Б) IL-1 β (0,5 нг/мл) и (В) активирующего TNF-R1 антитела (300 нг/мл).

На фиг. 13А показана кинетика связывания соединения формулы (1) с TNF α в течение времени, измеренная методом поверхностного плазмонного резонанса.

На фиг. 13Б показана кинетика связывания соединения формулы (2) с TNF α .

На фиг. 13В показана кинетика связывания соединения формулы (3) с TNF α .

На фиг. 14А и 14Б показан уровень притока нейтрофилов в ответ на TNF α в отдельности или на TNF α , который предварительно инкубировали в присутствии увеличивающихся концентраций (А) соединения формулы (1) или (Б) соединения формулы (2) и вводили внутрибрюшинной инъекцией (в/б).

На фиг. 15 показан уровень притока нейтрофилов в ответ на TNF α в отдельности или в присутствии увеличивающихся концентраций соединения формулы (1), введенного перорально.

На фиг. 16 показан график результатов анализа методом анализа поляризованной флуоресценции

(FP) с использованием исследуемых соединений формул (1), (2) и (3). Концентрации исследуемого соединения представлены в виде графика зависимости от ингибирования связывания (в %) соединения формулы (4) с TNF α .

На фиг. 17 (нижняя кривая) показан масс-спектр CD40L в 100%-ном водном растворе. На фиг. 17 (средняя кривая) показан масс-спектр CD40L в растворе, содержащем 10% (об./об.) ДМСО. На фиг. 17 (верхняя кривая) показан масс-спектр CD40L в растворе, содержащем 10% (об./об.) ДМСО и соединение формулы (1).

Краткое описание перечня последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет последовательность HCVR антитела C185_01974.0.

SEQ ID NO: 2 представляет последовательность LCVR антитела C185_01974.0.

SEQ ID NO: 3 представляет аминокислотную последовательность тяжелой цепи mIgG1 C185_01974.0.

SEQ ID NO: 4 представляет аминокислотную последовательность каппа-легкой цепи антитела C185_01974.0.

SEQ ID NO: 5 представляет последовательность HCVR антитела C185_01979.0.

SEQ ID NO: 6 представляет последовательность LCVR антитела C185_01979.0.

SEQ ID NO: 7 представляет аминокислотную последовательность тяжелой цепи mIgG1 C185_01979.0.

SEQ ID NO: 8 представляет аминокислотную последовательность каппа-легкой цепи антитела C185_01979.0.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения

Методы анализа для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF.

Авторы настоящего изобретения разработали методы анализа для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF. Модуляторы членов суперсемейства TNF включают агонистов и антагонистов членов суперсемейства TNF. Модулятор членов суперсемейства TNF может представлять собой антагонист одного или более членов суперсемейства TNF. В другом варианте модулятор членов суперсемейства TNF может представлять собой агонист одного или более членов суперсемейства TNF. Более подробно, авторы настоящего изобретения разработали методы анализа, которые можно использовать для идентификации соединений, которые связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF и которые стабилизируют эти тримеры в конформации, которая способна связываться с необходимым рецептором TNF, и таким образом модулируют передачу сигнала через указанный рецептор. Соответственно в настоящем изобретении предлагаются методы анализа, которые пригодны для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF.

Прежде всего, описанные в данном контексте методы анализа можно использовать для идентификации соединений, которые связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF и которые образуют комплекс соединение-тример, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF.

В предпочтительном варианте методами анализа по настоящему изобретению идентифицируют соединения, которые связываются с тримерной формой членов суперсемейства TNF, но не связываются с их мономерной формой. В прежде всего предпочтительном варианте соединения связываются и стабилизируют тримерную форму членов суперсемейства TNF, но не связываются с мономерной формой и не стабилизируют димерную форму члена суперсемейства TNF. Стабилизация тримеров суперсемейства TNF исследуемыми соединениями может происходить за счет ингибирования исследуемым соединением обмена мономерными субъединицами в тримерах.

Методы анализа по настоящему изобретению могут включать определение способности исследуемого соединения повышать степень связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором и в связи с этим идентификацию модуляторов суперсемейства TNF. В предпочтительном варианте методы анализа по настоящему изобретению могут включать определение способности исследуемого соединения повышать степень связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором и таким образом идентификацию антагонистов суперсемейства TNF, которые действуют за счет повышения степени связывания форм членов суперсемейства TNF, характеризующихся сниженным уровнем передачи сигнала или отсутствием передачи сигнала, с их рецепторами.

Согласно настоящему изобретению методы анализа для идентификации модуляторов суперсемейства TNF могут включать инкубацию образца, включающего исследуемый член суперсемейства TNF, в условиях, которые дестабилизируют образование тримеров члена суперсемейства TNF, например, в присутствии ДМСО и определение степени стабилизации образования тримеров членов суперсемейства TNF исследуемым соединением. В другом варианте методы анализа для идентификации модуляторов суперсемейства TNF согласно настоящему изобретению могут включать связывание тримеров суперсемейства TNF с исследуемым соединением и определение степени связывания комплекса соединение-тример с необходимым рецептором TNF.

Члены суперсемейства TNF и их рецепторы можно очищать, или они могут присутствовать в смесях, таких как культивируемые клетки, образцы тканей, биологические жидкости или культуральная сре-

да. Можно разработать анализы, которые являются качественными или количественными, при этом количественные анализы можно использовать для определения параметров связывания (связывающей аффинности и кинетических параметров) исследуемого соединения с тримерными формами членов суперсемейства TNF, а также параметров связывания комплекса соединение-тример с необходимым рецептором TNF.

Количество мономерной, димерной и тримерной форм членов суперсемейства TNF можно определить при измерении массы мономерной, димерной и тримерной форм, количества молей мономерной, димерной и тримерной форм, концентрации мономерной, димерной и тримерной форм, а также молярной концентрации мономерной, димерной и тримерной форм. Указанное количество можно представить в любых соответствующих единицах. Например, концентрацию мономерной, димерной и тримерной форм можно приводить в пг/мл, нг/мл или мкг/мл. Массу мономерной, димерной и тримерной форм можно приводить в пг, нг или мкг.

Количество мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF в исследуемом образце можно сравнивать с уровнем мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF в другом образце, например в контрольном образце, как описано в данном контексте. В указанном способе можно оценивать действительное количество мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF, например массу, количество молей, концентрацию или молярную концентрацию мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF в образце. Количество мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF можно сравнивать с соответствующим количеством в другом образце без количественного определения массы, количества молей, концентрации или молярной концентрации мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF. Таким образом, согласно настоящему изобретению количество мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF в образце можно оценивать по относительному количеству, например по относительной массе, относительному количеству молей, относительной концентрации или относительной молярной концентрации мономерной, димерной или тримерной форм члена суперсемейства TNF на основании сравнения двух или более образцов.

Согласно настоящему изобретению для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF можно проводить скрининг библиотек соединений (т.е. использовать методы анализа, 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.

Анализы методом масс-спектрометрии.

Авторами настоящего изобретения было установлено, что для идентификации соединений, которые связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF и которые стабилизируют указанные тримеры в конформации, которая способна связываться с необходимым рецептором TNF, можно использовать анализ методом масс-спектрометрии.

Прежде всего, метод масс-спектрометрии можно использовать для оценки способности соединения стабилизировать тримерную форму членов суперсемейства TNF.

Соответственно в настоящем изобретении предлагается метод анализа для идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, причем указанный метод включает стадии идентификации связывания исследуемого соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF в образце и сравнения связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF с соответствующими значениями, полученными для контрольных образцов, и указанный метод включает проведение анализа образца, содержащего член суперсемейства TNF и соединение, методом масс-спектрометрии для определения количества тримера члена суперсемейства TNF, а также сравнение количества тримера члена суперсемейства TNF в образце с количеством тримера члена суперсемейства TNF в контрольном образце и выбор соединения, которое способно связываться с тримерной формой члена суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор. Контрольный образец может быть идентичен анализируемому образцу за исключением отсутствия исследуемого соединения. Образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, может дополнительно включать дестабилизирующий агент.

Согласно настоящему изобретению исследуемое соединение можно добавлять в раствор, содержащий член суперсемейства TNF в присутствии дестабилизирующего агента. Дестабилизирующие агенты (другое название хаотропные агенты) включают агенты, такие как мочевины, гуанидин или ацетонитрил, используемые в низких молярных концентрациях (например, 1 М), при этом использование указанных агентов в высоких концентрациях (например, 6 М или более) приводит к полной диссоциации тримера TNF α и разворачиванию входящих в его состав мономерных субъединиц TNF α . В качестве дестабилизирующего агента можно использовать ДМСО, обычно в концентрации 5, 10% или более. Полученный в результате раствор можно анализировать с использованием метода масс-спектрометрии.

Можно детектировать нековалентные комплексы, образованные членами суперсемейства TNF и ис-

следуемыми соединениями, характеризующиеся низкой связывающей аффинностью, такой как 1 мМ. Стехиометрию связывания можно определить напрямую по присутствию или отсутствию комплексов, в состав которых входит множество связанных молекул исследуемого соединения. Значения связывающей аффинности (значения K_D) можно определить при измерении концентрационного соотношения член суперсемейства TNF - комплекс исследуемое соединение (комплекс соединение-тример)/член суперсемейства TNF при известных концентрациях исследуемого соединения.

Исследуемое соединение стабилизирует тримерную форму члена суперсемейства TNF, если в его присутствии увеличивается доля тримера по сравнению с количеством тримера, наблюдаемым в образце, содержащем член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения. Исследуемое соединение может увеличивать количество тримера на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством тримера, присутствующим в образце, содержащим член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения.

Исследуемое соединение может также увеличивать количество тримера по сравнению с количеством тримера, наблюдаемым в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие обоих компонентов: дестабилизирующего агента и исследуемого соединения. Исследуемое соединение может увеличивать количество тримера на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством тримера, присутствующим в образце, содержащим член суперсемейства TNF в отсутствие обоих компонентов: дестабилизирующего агента и исследуемого соединения.

При исследовании методом масс-спектрометрии стабилизацию тримера доказывали двумя способами.

Первый способ включает физическую диссоциацию комплекса тримера TNF α , которую можно измерять по соотношению мономера и тримера, наблюдаемому в масс-спектре. Димерные комплексы в ходе исследований по настоящему изобретению не наблюдали. Указанная диссоциация может происходить при образовании продукта в результате высокоэнергетического процесса, используемого для введения молекул в масс-спектрометр. Тем не менее ее можно использовать для оценки способности исследуемых соединений стабилизировать тримерный комплекс в ходе распыления и ионизации и в связи с этим снижать количество мономера, наблюдаемое в масс-спектре, при этом соотношение мономер/тример использовали для определения степени стабилизации.

Второй способ заключается в снижении энергии тримерного комплекса в условиях мягкой ионизации, что обеспечивает перенос интактного комплекса в спектрометр и за счет этого более точно отражает истинный состав раствора. Процесс ионизации электрораспылением приводит к появлению множественных зарядов на белках, так как в режиме положительной ионизации основные функциональные группы в составе определенных аминокислот приобретают положительный заряд. В масс-спектрометре определяется соотношение масса/заряд (m/z). Следовательно, например, тример TNF α с молекулярной массой 52000 Да номинально регистрируется при соотношении m/z 5200, если он содержит 10 зарядов. Именно данный эффект множественных зарядов позволяет использовать спектрометры с ограниченным массовым диапазоном при исследовании мультимерных белковых комплексов. Программное обеспечение, поставляемое вместе со спектрометром, позволяет пользователю расшифровывать данные и определять массу белка при его детектировании, если он несет даже единичный заряд (т.е. истинную молекулярную массу белка на основании его атомного состава).

В белках, характеризующихся свернутой структурой, где множество аминокислотных остатков закрыто в ядре и на поверхность экспонирована лишь незначительная часть, как правило, образуется от 6 до 8 положительных зарядов. Ни один из образцов с единичным зарядом не преобладает; в большинстве случаев в малом диапазоне наблюдаются несколько типов молекул (ионов), включая молекулы, известные как спектр многозарядных ионов. И наоборот, если белок полностью денатурирован (т.е. характеризуется развернутой структурой), то экспонировано значительно большее число аминокислотных остатков и типичное число приобретенных зарядов может составлять 20, при этом спектр многозарядных ионов также включает большее число заряженных молекул, так как статистически в данном случае увеличивается число участков, доступных для приобретения заряда. Таким образом, число зарядов и число заряженных молекул, включающая спектр многозарядных ионов, являются чувствительными индикаторами степени свернутости белка. Кроме того, если белок, характеризующийся свернутой структурой, может существовать во множестве конформаций, которые отличаются относительным числом аминокислотных остатков, экспонированных на поверхность, то указанные различия отразятся сдвигом спектра многозарядных ионов.

В условиях мягкой ионизации нано-электроспреем при исследованиях методом масс-спектрометрии интактный белок TNF α , характеризующийся свернутой структурой, детектируется в виде почти 100% тримера TNF α и наблюдается крайне незначительное количество мономера TNF α , в то время как димерные образцы полностью отсутствуют.

В условиях более жесткой ионизации или при добавлении дестабилизирующего агента в образец

TNF α наблюдаются повышенные уровни мономерного TNF α при одновременном снижении уровней тримера. Наблюдается только чрезвычайно незначительное количество димера.

Метод масс-спектрометрии можно также использовать для определения связывания исследуемого соединения с мономерной, димерной и тримерными формами члена суперсемейства TNF.

Метод масс-спектрометрии можно также использовать для определения стехиометрического состава связывания исследуемых соединений с членами суперсемейства TNF, т.е. для определения числа молекул исследуемого соединения, связанных с членом суперсемейства TNF.

Метод масс-спектрометрии можно также использовать для определения связывания комплекса соединения - тример члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором TNF.

Метод масс-спектрометрии можно также использовать для определения скорости, с которой исследуемое соединение связывается с членом суперсемейства TNF (on-rate или k_{on-c}), и скорости, с которой исследуемое соединение диссоциирует, т.е. отделяется от члена суперсемейства TNF (off-rate или k_{off-c}). Используемый в данном контексте символ " K_{D-c} " означает связывающую аффинность (константа диссоциации) исследуемого соединения в отношении члена суперсемейства TNF. Величину K_{D-c} определяют как k_{off-c}/k_{on-c} . Исследуемые соединения могут снижать скорость on-rate, которую можно измерить в минутах методом масс-спектрометрического анализа по интенсивностям пиков члена суперсемейства TNF и комплекса соединение-тример. Величины K_{D-c} для исследуемого соединения можно оценивать при повторении этого измерения в присутствии различных соотношений член суперсемейства TNF/комплекс соединения-тример. В предпочтительном варианте связывание соединений по настоящему изобретению с тримерами суперсемейства TNF характеризуется высокими скоростями on rate, в идеальном случае на уровне $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, и низкими скоростями off-rate, например, обычно на уровне 10^{-3} , 10^{-4} c^{-1} , или величина off gate не измерима.

Метод масс-спектрометрии можно использовать для определения связывания исследуемого соединения с членом суперсемейства TNF в присутствии необходимого рецептора. Такое исследование может включать инкубацию исследуемого соединения в смеси с членом суперсемейства TNF, который предварительно инкубируют в присутствии его рецептора. Затем образец, содержащий исследуемое соединение, а также предварительно инкубированные член суперсемейства TNF и рецептор, можно фракционировать для разделения по их молекулярным массам, например, методом аналитической гель-фильтрации. Полученные фракции можно анализировать методом масс-спектрометрии, при этом определяют связывание исследуемого соединения с членом суперсемейства TNF в присутствии необходимого рецептора. Если соединение связано с членом суперсемейства TNF, то оно элюируется в той же фракции, что и член суперсемейства TNF. Если соединение не связано с членом суперсемейства TNF, то оно элюируется в составе другой фракции, отличающейся от фракции, в которой элюируется член суперсемейства TNF. В этом случае соединение обычно элюируется в составе более поздней гель-фильтрационной фракции по сравнению с фракцией члена суперсемейства TNF.

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

Методы анализа связывания рецептора с лигандом.

Действие стандартных антагонистов суперсемейства TNF основано на ингибировании связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором. Авторами настоящего изобретения были использованы методы анализа связывания рецептора с лигандом для определения способности исследуемого соединения повышать степень связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором. В связи с этим такие методы анализа связывания рецептора с лигандом можно использовать для идентификации антагонистов суперсемейства TNF, которые действуют за счет повышения степени связывания форм членов суперсемейства TNF, характеризующихся сниженным уровнем передачи сигнала или отсутствием передачи сигнала, через их рецепторы. Таким образом, методы анализа связывания рецептора с лигандом можно также использовать для идентификации агонистов, которые действуют за счет повышения степени связывания членов суперсемейства TNF с их рецепторами и усиления передачи сигнала через рецепторы суперсемейства TNF.

Соответственно в настоящем изобретении предлагается метод анализа для идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, причем указанный метод включает стадию определения уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, в образце, содержащем исследуемое соединение, и сравнения уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, с соответствующими значениями для контрольных образцов, а также указанный метод включает проведение анализа связывания лиганда с рецептором, в ходе которого образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, наносят на необходимый рецептор TNF, который связан с поверхностью, и сравнение количества тримера члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором TNF, с контрольным образцом, а также выбор соединения, которое способно

связываться с тримерной формой члена суперсемейства TNF, в результате чего комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор. Контрольный образец может быть идентичен анализируемому образцу за исключением того, что он не содержит исследуемое соединение и/или он содержит известное соединение. Образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, может дополнительно включать дестабилизирующий агент.

Исследуемое соединение можно добавлять в раствор, содержащий член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент. Уровень связывания рецептора суперсемейства TNF в присутствии дестабилизирующего агента в отдельности (в контрольном образце) можно сравнивать с уровнем связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором в присутствии дестабилизирующего агента и исследуемого соединения. Исследуемое соединение повышает степень связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором, если в присутствии соединения увеличивается доля члена суперсемейства TNF, связанного с его рецептором, по сравнению с уровнем связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором, наблюдаемым для образца, содержащего член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения.

Исследуемое соединение может увеличивать количество члена суперсемейства TNF, связанного с его рецептором, на 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 300, 400% или более по сравнению с количеством члена суперсемейства TNF, связанного с его рецептором, в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения.

Для анализа связывания рецептора с лигандом по настоящему изобретению, как правило, требуется рецептор суперсемейства TNF, связанный с подложкой. Рецептор суперсемейства TNF можно присоединять к подложке напрямую или косвенным образом, используя линкер, такой как авидин или стрептавидин. Затем уровень связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором можно анализировать при добавлении раствора, содержащего член суперсемейства TNF наряду с дестабилизирующим агентом. Дестабилизирующие агенты (другое название хаотропные агенты) включают агенты, такие как мочевины, гуанидин или ацетонитрил, используемые в низких молярных концентрациях (например, 1 М), при этом использование указанных агентов в высоких концентрациях (например, 6 М или более) приводит к полной диссоциации тримера TNF α и разворачиванию входящих в его состав мономерных субъединиц TNF α . В качестве дестабилизирующего агента можно использовать ДМСО обычно в концентрации 5, 10% или более.

Связывание члена суперсемейства TNF с его рецептором, как правило, определяют с использованием антитела, которое является специфичным для члена суперсемейства TNF и которое связывается с маркером. Маркером может являться любая молекула, которую можно детектировать. Например, маркером может являться радиоактивный изотоп (например, ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S и ^3H), флуоресцентный краситель (например, флуоресцеин, родамин), конъюгат фермента и т.п. Для фермента используют субстрат, чтобы определить количество члена суперсемейства TNF, связанного с рецептором, присоединенным к поверхности. Другие маркеры включают молекулярные метки, которые под воздействием определенных стимулов, таких как электричество, можно активировать для излучения света. Выбор маркера зависит от используемой системы детектирования.

Анализ связывания рецептора с лигандом можно проводить в нескольких форматах, включая клеточные методы анализа связывания, методы анализа в жидкой фазе, а также методы иммуноанализа. Твердые подложки для проведения реакций связывания рецептора с лигандом предпочтительно содержат лунки. Обычно комплексы исследуемое соединение-тример инкубируют в присутствии необходимого рецептора суперсемейства TNF в течение определенного периода времени, затем определяют количество комплекса соединение-тример, который связан с рецептором. Уровень связанного комплекса соединение-тример можно рассчитать при измерении маркера с использованием микроскопии, флуориметрии, сцинтилляционного счетчика или любого пригодного метода иммуноанализа.

Использованный в данном контексте символ " $k_{\text{on-r}}$ " обозначает скорость (скорость on-rate), с которой комплекс соединение-тример связывается с рецептором суперсемейства TNF. Использованный в данном контексте символ " $k_{\text{off-r}}$ " обозначает скорость (скорость off-rate), с которой комплекс соединение-тример диссоциирует, т.е. отделяется от рецептора суперсемейства TNF. Использованный в данном контексте символ " $K_{\text{D-r}}$ " обозначает связывающую аффинность (константу диссоциации) комплекса соединение-тример в отношении рецептора суперсемейства. Величину $K_{\text{D-r}}$ определяют как $k_{\text{off-r}}/k_{\text{on-r}}$.

Методы анализа связывания рецептора с лигандом можно использовать для определения связывающей аффинности комплексов соединение-тример по настоящему изобретению по отношению к необходимому рецептору суперсемейства TNF. Прежде всего, можно использовать методы конкурентного анализа для сравнения значений $k_{\text{on-r}}$ и $k_{\text{off-r}}$ для связывания комплексов соединение-тример по настоящему изобретению с необходимым рецептором суперсемейства TNF, а также значений $k_{\text{on-r}}$ и $k_{\text{off-r}}$ для связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором в отсутствие исследуемого соединения и для определения значений $K_{\text{D-r}}$ для связывания комплексов соединение-тример по настоящему изобретению с необходимым рецептором суперсемейства TNF.

Анализ стабильности.

Авторами настоящего изобретения были разработаны способы определения действия исследуемых соединений на стабильность членов суперсемейства TNF. Соответственно в настоящем изобретении предлагается метод анализа для идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства и модулирует передачу сигнала рецептора, и указанный метод включает стадию определения стабильности тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем соединение, и сравнения стабильности тримерной формы члена суперсемейства TNF с соответствующими значениями, полученными для контрольных образцов, а также указанный метод включает проведение анализа для определения средней температуры термического перехода (T_m) тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем член суперсемейства TNF и соединение, сравнение T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF с контрольным образцом и выбор соединения, которое способно связываться с тримерной формой члена суперсемейства TNF, в результате чего комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор. Контрольный образец может быть идентичен анализируемому образцу за исключением того, что он не содержит исследуемое соединение и/или он содержит известное соединение. Образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, может дополнительно включать дестабилизирующий агент.

Исследуемое соединение можно добавлять в раствор, содержащий член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент. Стабильность тримерной формы члена суперсемейства TNF в присутствии дестабилизирующего агента в отдельности (в контрольном образце) можно сравнивать со стабильностью тримерной формы члена суперсемейства TNF в присутствии дестабилизирующего агента и исследуемого соединения. Исследуемое соединение повышает стабильность тримерной формы члена суперсемейства TNF, если исследуемое соединение повышает среднюю температуру термического перехода (T_m) тримерной формы члена суперсемейства TNF по сравнению с T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF, наблюдаемой для образца, содержащего член суперсемейства TNF и дестабилизирующий агент в отсутствие исследуемого соединения. T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF означает температуру, при которой 50% биомолекул находятся в развернутом состоянии. T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в присутствии и/или отсутствии исследуемого соединения можно измерять с использованием любого соответствующего метода анализа, известного в данной области техники, например с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или термической денатурации с флуоресцентным зондом.

Исследуемое соединение может повысить величину T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF по крайней мере на 1°C, по крайней мере на 2°C, по крайней мере на 5°C, по крайней мере на 10°C, по крайней мере на 15°C, по крайней мере на 20°C или более по сравнению с T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем член суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения. Предпочтительно исследуемое соединение повышает T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF по крайней мере на 1°C, более предпочтительно по крайней мере на 10°C и еще более предпочтительно на величину в интервале от 10 до 20°C.

Дестабилизирующие агенты (другое название хаотропные агенты) включают агенты, такие как мочевины, гуанидин или ацетонитрил, используемые в низких молярных концентрациях (например, 1 М), при этом использование указанных агентов в высоких концентрациях (например, 6 М или более) приводит к полной диссоциации тримера TNF α и разворачиванию входящих в его состав мономерных субъединиц TNF α . В качестве дестабилизирующего агента можно использовать ДМСО, обычно в концентрации 5, 10% или более.

Изотермический калориметрический метод анализа.

Авторами настоящего изобретения были разработаны изотермические калориметрические методы для определения действия исследуемых соединений на связывающую аффинность членов суперсемейства TNF в отношении их рецепторов.

Соответственно в настоящем изобретении предлагается метод анализа для идентификации соединения, способного связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, и указанный метод включает стадию определения уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, в образце, содержащем соединение, и сравнения уровня тримерного члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, с соответствующими значениями для контрольных образцов, а также указанный метод включает проведение изотермического калориметрического анализа для определения связывающей аффинности члена суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора в присутствии соединения и сравнение связывающей аффинности члена суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора с контрольным образцом, а также выбор соединения, способного связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, в результате чего комплекс соединение-тример связывается с

необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор. Контрольный образец может быть идентичен анализируемому образцу за исключением того, что он не содержит исследуемое соединение и/или он содержит известное соединение.

Аликвотные части члена суперсемейства TNF можно последовательно добавлять в емкость, содержащую необходимый рецептор TNF. Объем аликвотных частей может находиться в любом допустимом диапазоне. Аликвотные части могут характеризоваться любым пригодным объемом, например, от 0,1 до 10 мкл. В предпочтительном варианте объем аликвотных частей может составлять 0,5, 1,0 или 3,0 мкл. Можно использовать аликвотные части большего объема в зависимости от объема шприца.

Каждое добавление члена суперсемейства TNF приводит к выделению или поглощению незначительного количества тепла в результате связывания тримеров суперсемейства TNF с рецептором. Как правило, каждое добавление члена суперсемейства TNF приводит к выделению незначительного количества тепла в результате связывания тримеров суперсемейства TNF с рецептором. Количество выделившегося тепла можно измерять с использованием изотермического калориметрического анализа и использовать указанную информацию для определения связывающей аффинности члена суперсемейства TNF с его рецептором.

Указанный процесс можно повторять, последовательно добавляя раствор, содержащий член суперсемейства TNF и исследуемое соединение, в емкость, содержащую рецептор суперсемейства TNF. Предпочтительно член суперсемейства TNF и исследуемое соединение присутствуют в форме комплекса соединение-тример. Как и в предыдущем случае, количество выделившегося тепла можно измерять с использованием изотермического калориметрического анализа и использовать указанную информацию для определения связывающей аффинности члена суперсемейства TNF с его рецептором.

Связывающую аффинность члена суперсемейства TNF и связывающую аффинность комплекса соединение-тример можно сравнивать, чтобы определить повышение связывающей аффинности члена суперсемейства TNF с его рецептором в присутствии соединения.

Исследуемое соединение может повышать связывающую аффинность члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 раз или более по сравнению со связывающей аффинностью члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора в отсутствие исследуемого соединения.

Связывающую аффинность можно представить в виде константы связывающей аффинности (K_{D-r}), а также в любых других соответствующих единицах, таких как мкМ, нМ или пМ. Чем меньше величина K_{D-r} , тем больше связывающая аффинность члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора.

Величину K_{D-r} члена суперсемейства TNF при связывании с его рецептором в присутствии исследуемого соединения можно снизить по крайней мере 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 раз или более по сравнению с величиной K_{D-r} для связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором в отсутствие исследуемого соединения.

Величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения может составлять 1 мкМ, 100, 10, 5, 1 нМ, 100, 10 пМ или менее. В предпочтительном варианте величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения составляет 1 нМ или менее.

Способы конкурентного анализа.

Авторами настоящего изобретения были разработаны способы идентификации соединений, которые способны связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, и указанные способы включают изучение способности исследуемого соединения конкурировать с соединением-зондом в отношении связывания с тримерным членом суперсемейства TNF. Соответственно в настоящем изобретении предлагается метод анализа, который включает измерение конкуренции исследуемого соединения с соединением-зондом в отношении связывания с тримерной формой члена суперсемейства TNF и сравнение уровня наблюдаемой таким образом конкуренции с соответствующими значениями для контрольных образцов, а также выбор соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF, в результате чего комплекс соединение-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор.

Согласно настоящему изобретению соединение-зонд может включать любое соединение, которое содержит радиоактивную метку. Радиоактивные изотопы, которые можно использовать в составе анализируемых соединений по настоящему изобретению, включают тритий (^3H), ^{14}C , ^{18}F , ^{22}Na , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I , ^{131}I и $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Прежде всего, конкурентный анализ может представлять собой анализ поляризационной флуоресценции (FP), при проведении которого степень поляризации флуоресценции связана со временем вращательной релаксации флуоресцентной молекулы и, таким образом, с размером молекулы. Молекулы большого размера характеризуются более высокой степенью поляризации по сравнению с молекулами малого размера. В связи с этим анализ FP можно использовать для определения взаимодействия флуоресцентного лиганда малого размера или зонда с более крупным белком, таким как член суперсемейства

TNF. Степень поляризации обеспечивает прямое определение соотношения связанных/свободный флуоресцентный лиганд.

В связи с этим в настоящем изобретении предлагается способ идентификации соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, и указанный способ включает стадии определения конкуренции соединения с соединением-зондом в отношении связывания с тримерной формой члена суперсемейства TNF, сравнения уровня наблюдаемой конкуренции с соответствующими значениями для контрольного образца и выбор соединения, которое способно связываться с тримерным белком, который является членом суперсемейства TNF; тем самым комплекс соединения-тример связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор, при этом указанный способ включает проведение анализа поляризационной флуоресценции с использованием соединения и соединения-зонда, сравнение степени поляризации соединения-зонда в присутствии соединения со степенью поляризации в контрольном образце.

Способность исследуемого соединения конкурировать с соединением-зондом или лигандом можно количественно оценить с использованием стандартной терминологии, такой как полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}). В данном контексте величины IC_{50} означают концентрацию соединения, которая требуется для 50%-ного ингибирования связывания соединения-зонда с тримерным членом суперсемейства TNF. Величины IC_{50} исследуемых соединений могут составлять 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 нМ, 100 пМ или менее. Предпочтительно величина IC_{50} исследуемых соединений составляет 200 нМ или менее. Более предпочтительно величина IC_{50} исследуемых соединений составляет 150 нМ или менее или величина IC_{50} составляет 100 нМ или менее.

Как упомянуто выше, в настоящем изобретении для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF анализируют библиотеку соединений, как правило, одним или более способами, описанными в данном контексте. Скрининг таких библиотек, которые могут включать по крайней мере 260 соединений, по крайней мере 300, по крайней мере 500 или даже по крайней мере 1000 соединений, можно проводить с использованием поляризационной флуоресценции.

При скрининге библиотеки соединений с использованием метода анализа поляризационной флуоресценции способ может включать выбор соединения в качестве модулятора члена суперсемейства TNF, если в присутствии соединения наблюдается конкретная величина IC_{50} . Например, соединение можно идентифицировать как модулятор члена суперсемейства TNF, если соединение обеспечивает величину IC_{50} менее 50 мкМ. В некоторых объектах идентифицированы соединения, которые приводят к получению величины IC_{50} менее 500 нМ, менее 200 нМ или даже менее 100 нМ.

Соединение из библиотеки также можно идентифицировать как модулятор члена суперсемейства TNF, если в его присутствии наблюдается наиболее низкая величина IC_{50} по сравнению со всеми другими исследуемыми соединениями из библиотеки. Аналогичным образом соединение можно идентифицировать как модулятор члена суперсемейства TNF, если в его присутствии наблюдается низкая величина IC_{50} (т.е. улучшенная величина IC_{50}) по сравнению с другими соединениями библиотеки. Например, 50% соединений библиотеки, в присутствии которых наблюдаются наиболее низкие величины IC_{50} , можно идентифицировать как модуляторы. В некоторых объектах 25% или даже 10% соединений библиотеки, в присутствии которых наблюдаются наиболее низкие величины IC_{50} , можно идентифицировать как модуляторы.

В одном варианте соединения-зонд включает соединение согласно настоящему изобретению, конъюгированное с флуоресцентным лигандом. Соответственно флуоресцентный лиганд представляет собой флуоресцентный краситель, характеризующийся временем жизни флуоресценции 10 нс или менее. Типичные примеры пригодных флуоресцентных красителей включают флуоресцеин, родамин, краситель Cy (например, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 или Cy7), краситель Alexa Fluor® (например, Alexa Fluor® 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 или 790) или краситель BODIPY® (например, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR или BODIPY TR). Конкретным примером соединения-зонда по настоящему изобретению является соединение формулы (4), представленное на фиг. 2.

Контрольный образец может быть идентичен анализируемому образцу за исключением того, что он не содержит исследуемое соединение и/или содержит известное соединение.

Образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, может дополнительно содержать дестабилизирующий агент. Дестабилизирующие агенты (другое название хаотропные агенты) включают агенты, такие как мочевины, гуанидин или ацетонитрил, используемые в низких молярных концентрациях (например, 1 М), при этом использование указанных агентов в высоких концентрациях (например, 6 М или более) приводит к полной диссоциации тримера TNF α и разворачиванию входящих в его состав мономерных субъединиц TNF α . В качестве дестабилизирующего агента предпочтительно можно использовать ДМСО, обычно в концентрации 5, 10% или более.

Хотя для идентификации модуляторов членов суперсемейства TNF можно использовать метод по-

ляризации флуоресценции, в некоторых объектах настоящего изобретения такие модуляторы можно идентифицировать любым методом анализа, описанным в данном контексте, за исключением метода поляризационной флуоресценции (т.е. метод анализа, который не является анализом поляризационной флуоресценции). Прежде всего, связывание соединения с тримерным членом суперсемейства TNF и конкуренцию соединения с соединением-зондом за связывание с тримерной формой члена суперсемейства TNF можно определить любым методом, который отличается от метода анализа поляризационной флуоресценции.

Передача сигнала через рецепторы суперсемейства TNF.

Настоящее изобретение включает способ идентификации соединения, которое способно модулировать (т.е. предотвращать, снижать или повышать) передачу сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, связанные с членом суперсемейства TNF.

В одном варианте настоящее изобретение включает способ идентификации соединения, которое способно предотвращать, снижать или повышать передачу сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, связанные с членом суперсемейства TNF. Указанный способ может включать контактирование рецепторов суперсемейства TNF как с членом суперсемейства TNF, так и с комплексом соединение-тример и детектирование предотвращения или снижения передачи сигнала тримера суперсемейства TNF через рецептор суперсемейства TNF под действием исследуемого соединения. Уровень передачи сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, обработанные комплексом соединение-тример, можно сравнивать с уровнем передачи сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, обработанные только членом суперсемейства TNF.

В другом варианте настоящее изобретение включает способ идентификации соединения, которое способно повышать передачу сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, связанные с членом суперсемейства TNF. Указанный способ может включать контактирование рецепторов суперсемейства TNF как с членом суперсемейства TNF, так и с комплексом соединение-тример и детектирование повышения передачи сигнала тримера суперсемейства TNF через рецептор суперсемейства TNF под действием исследуемого соединения. Уровень передачи сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, обработанные комплексом соединение-тример, можно сравнивать с уровнем передачи сигнала через рецепторы суперсемейства TNF, обработанные только членом суперсемейства TNF.

Для детектирования уровня передачи сигнала можно проводить анализы, в ходе которых определяют эффекты передачи сигнала через рецептор суперсемейства TNF, наблюдаемые в следующих сигнальных путях. 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.

Антитела для идентификации комплексов тример-соединение.

Авторами настоящего изобретения были сконструированы антитела, которые селективно связываются с комплексами, включающими соединения по настоящему изобретению и тримерный член суперсемейства TNF. Указанные антитела можно использовать для идентификации других соединений, которые способны ингибировать TNF.

Прежде всего, авторы настоящего изобретения идентифицировали два антитела, названные CA185_01974 и CA185_01979, которые продуцируются против TNF α человека в комплексе с соединением по настоящему изобретению.

Варибельная область тяжелой цепи (HCVR) антитела CA185_01974 соответствует последовательности SEQ ID NO: 1, а варибельная область легкой цепи (LCVR) антитела CA185_01974 соответствует последовательности SEQ ID NO: 2. Полноразмерная тяжелая цепь IgG1 соответствует последовательности SEQ ID NO: 3 (полноразмерная тяжелая цепь mIgG1 1974), а полноразмерная легкая цепь (полноразмерная κ -легкая цепь антитела 1974) соответствует последовательности SEQ ID NO: 4.

Область HCVR антитела CA185_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 5, а область LCVR антитела CA185_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 6. Полноразмерная тяжелая цепь IgG1 CA185_01979 соответствует последовательности SEQ ID NO: 7 (полноразмерная тяжелая цепь mIgG1 1979), а полноразмерная легкая цепь соответствует последовательности SEQ ID NO: 8 (полноразмерная κ -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 по настоящему изобретению для 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: 1/2 или 5/6, с комплексом тример-соединение. Аналогичным образом способы могут включать идентификацию связывания антитела, содержащего пару последовательностей SEQ ID NO: 3/4 или 7/8, 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 соединение-тример, например, стандартным иммуноферментным анализом (ИФА) или методом вестерн-блоттинга. Селективность связывания антитела можно также определить, регистрируя связывание антитела с клетками, экспрессирующими белок-мишень, например, методом проточной цитометрии. В связи с этим метод скрининга по настоящему изобретению может включать стадию идентификации антитела, которое способно связываться с комплексом соединение-тример, с использованием ИФА или вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

Антитела, описанные в данном контексте, селективно (или специфично) распознают по крайней мере один комплекс соединение-тример, т.е. эпитопы в составе комплекса соединение-тример. 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 соединение-тример, как правило, может связываться с антителом, содержащим пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 1/2 или 5/6 (или пары последовательностей SEQ ID NO: 3/4 или 7/8), с аффинностью менее 1 нМ. Другими словами, способы 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: 1/2 или 5/6 (или пару последовательностей SEQ ID NO: 3/4 или 7/8), 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 α человека.

Аналогичным образом комплекс по настоящему изобретению может представлять собой комплекс тримерного члена суперсемейства TNF и соединения, при этом комплекс соединение-тример связывается с антителом, содержащим пару HCVR/LCVR, соответствующую последовательностям SEQ ID NO: 1/2 или 5/6 (или пару последовательностей SEQ ID No: 3/4 или 7/8). И снова TNF, как правило, представляет собой TNF α человека, а связывающая аффинность, как правило, составляет менее 1 нМ (или менее 500/200 пМ). Связывающую аффинность связывания, как правило, определяют методом поверхностного плазмонного резонанса.

Модуляторы членов суперсемейства TNF.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали исследуемые соединения, которые связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF с использованием описанных в данном контексте методов анализа. Эти соединения представляют собой низкомолекулярные соединения (SME) с молекулярной массой 1000 Да или менее, предпочтительно 750 Да или менее, более предпочтительно 600 Да или менее. Эти соединения стабилизируют конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор.

Стабилизирующий эффект соединений по настоящему изобретению на тримерные формы членов суперсемейства TNF можно оценивать количественно при измерении средней точки температурного перехода (T_m) тримеров в присутствии и отсутствии соединения. T_m означает температуру, при которой 50% биомолекул характеризуются развернутой структурой. Соединения, которые стабилизируют тримеры членов суперсемейства TNF, повышают T_m тримеров. T_m можно определять с использованием соответствующего метода анализа, известного в данной области техники, например с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) или метода термической денатурации с флуоресцентным зондом.

Соединения могут связываться во внутреннем центральном пространстве тримера члена суперсемейства TNF (т.е. в ядре тримера).

Эти соединения могут превращать член суперсемейства TNF в антагониста рецептора суперсемейства TNF. Следовательно, эти соединения способны блокировать передачу сигнала члена суперсемейства TNF и при этом не конкурировать с высокоаффинным взаимодействием между членом суперсемейства TNF и его рецептором.

В другом варианте соединения могут стабилизировать конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и усиливает передачу сигнала через рецептор. Следовательно, эти соединения способны усиливать передачу сигнала члена суперсемейства TNF и при этом не конкурировать с высокоаффинным взаимодействием между членом суперсемейства TNF и его рецептором.

В тех случаях, когда в данном контексте соединения описаны как антагонисты, следует понимать, что соединения могут в равной степени представлять собой агонисты и усиливать передачу сигнала с участием рецептора суперсемейства TNF, который связывается с комплексом тримера члена суперсемейства TNF, и, таким образом, могут являться соединением-агонистом. Аналогичным образом если в другом контексте указаны антагонистические соединения, то в данном описании методы идентификации

таких соединений и применение таких соединений могут в равной степени относиться к соединениям-агонистам.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, являются аллостерическими модуляторами, которые связываются с природными агонистами рецепторов суперсемейства TNF, т.е. с тримерными формами членов суперсемейства TNF, и которые приводят к тому, что эти тримеры принимают конформацию, которая все еще сохраняет способность связываться с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала рецептором. Следует понимать, что термин "модуляция" означает, что соединение может обладать антагонистическим действием, т.е. снижать передачу сигнала рецептором суперсемейства TNF, или оказывать стимулирующий эффект, т.е. увеличивать или повышать передачу сигнала рецептором суперсемейства TNF.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут превращать природные агонисты членов суперсемейства TNF в антагонисты. И наоборот, стандартные антагонисты членов суперсемейства TNF связываются с членом суперсемейства TNF или рецептором суперсемейства TNF и предотвращают связывание члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором. В другом варианте соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут усиливать передачу сигнала рецептором суперсемейства TNF, когда член суперсемейства TNF находится в связанном состоянии, по сравнению с уровнем передачи сигнала рецептором суперсемейства TNF, когда член суперсемейства TNF находится в связанном состоянии в отсутствие соединения. Следовательно, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут превращать природные агонисты членов суперсемейства TNF в так называемые "суперагонисты". Следовательно, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут быть также известны как аллостерические модуляторы лигандной активности (AMLA).

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, не ограничены их химической формулой или структурой при условии, что они связываются по крайней мере с одним членом суперсемейства TNF и стабилизируют конформацию тримерного члена суперсемейства TNF, который связывается с необходимым рецептором суперсемейства TNF и модулирует передачу сигнала через рецептор суперсемейства TNF. Следовательно, соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, можно идентифицировать с использованием методов анализа и способов, описанных в данном контексте. Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут включать остаток бензимидазола или его изостерный аналог, например соединения формул (1), (2) и (3).

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут повышать связывающую аффинность членов суперсемейства TNF (в форме комплекса соединение-тример) с необходимым рецептором по сравнению со связывающей аффинностью членов суперсемейства TNF с необходимым рецептором в отсутствие соединений.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, связываются с тримерными формами членов суперсемейства TNF. Такие соединения могут специфически связываться с тримерными формами одного или более членов суперсемейства TNF. Соединение, идентифицированное способами по настоящему изобретению, может связываться специфически только с одним из членов суперсемейства TNF, но не с любым другим членом суперсемейства TNF. Соединение, идентифицированное способами по настоящему изобретению, может также связываться специфически с двумя, тремя, четырьмя или вплоть до всех членов суперсемейства TNF. Следует понимать, что термин "специфически" означает, что соединения связываются с исследуемыми молекулой или молекулами, в данном случае с тримерной формой члена суперсемейства TNF, не проявляя значительную перекрестную реактивность в отношении любой другой молекулы, которая может включать другие члены суперсемейства TNF. Перекрестную реактивность можно оценивать любым пригодным методом, например методом поверхностного плазмонного резонанса. Перекрестную реактивность соединения в отношении тримерной формы члена суперсемейства TNF с молекулой, которая отличается от тримерной формы этого конкретного члена суперсемейства TNF, можно рассматривать как значительную, если степень связывания соединения с другой молекулой повышается по крайней мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 100% по сравнению со степенью связывания соединения с тримерной формой исследуемого члена суперсемейства TNF. Соединение, которое является специфичным в отношении тримерной формы члена суперсемейства TNF, может связываться с другой молекулой, при этом степень связывания составляет менее 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25 или менее 20% по сравнению со степенью связывания соединения с тримерной формой члена суперсемейства TNF. Предпочтительно степень связывания соединения с другой молекулой составляет 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.

Значение K_{D-T} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения (т.е. в форме комплекса соединение-тример) по крайней мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 раз ниже по сравнению с значением K_{D-T} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в отсутствие исследуемого соединения. В предпочтительном варианте значение K_{D-T} комплекса соединение-тример для связывания с членом суперсемейства TNF снижается по крайней

мере в 1,5 раза, предпочтительно по крайней мере в 3 раза, более предпочтительно по крайней мере в 4 раза по сравнению со значением K_{D-r} тримера суперсемейства TNF, связывающегося с рецептором суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения, т.е. связывающая аффинность комплекса соединение-тример в отношении рецептора суперсемейства TNF предпочтительно увеличивается по крайней мере в 1,5 раза, предпочтительно по крайней мере в 3 раза, более предпочтительно по крайней мере в 4 раза по сравнению со связывающей аффинностью тримера суперсемейства TNF в отношении рецептора суперсемейства TNF в отсутствие исследуемого соединения.

Уменьшение значения K_{D-r} комплекса соединение-тример для связывания с рецептором суперсемейства TNF по сравнению со значением K_{D-r} тримера суперсемейства TNF, связывающегося с рецептором суперсемейства TNF в отдельности, может происходить в результате увеличения скорости ассоциации (k_{on-r}) при связывании комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF по сравнению с тримером суперсемейства TNF в отдельности и/или снижения скорости диссоциации (k_{off-r}) по сравнению с тримером суперсемейства TNF в отдельности. В предпочтительном варианте скорость on -rate (k_{on-r}) при связывании комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF повышается по сравнению с тримером суперсемейства TNF в отдельности. В другом варианте скорость off -rate (k_{off-r}) при связывании комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF снижается по сравнению с тримером суперсемейства TNF в отдельности. В еще одном варианте скорость on -rate (k_{on-r}) при связывании комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF повышается, а скорость off -rate (k_{off-r}) при связывании комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF снижается по сравнению с тримером суперсемейства TNF в отдельности. Значение k_{on-r} комплекса соединение-тример в отношении необходимого рецептора суперсемейства TNF может повышаться по крайней мере в 1,5 раза или по крайней мере в 2 раза, а предпочтительно по крайней мере в 3 раза по сравнению со значением k_{on-r} тримера суперсемейства TNF, связывающегося с его рецептором в отсутствие соединения, и/или значение k_{off-r} комплекса соединение-тример в отношении необходимого рецептора суперсемейства TNF можно снизить по крайней мере в 1,2 раза, по крайней мере в 1,6 раза, по крайней мере в 2 раза, более предпочтительно по крайней мере в 2,4 раза по сравнению со значением k_{off-r} тримера суперсемейства TNF, связывающегося с его рецептором в отсутствие соединения.

В одном варианте скорость on -rate связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{on-c}) повышается по сравнению со скоростью on -rate связывания комплекса соединения-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{on-r}). В другом варианте скорость off -rate для связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{off-r}) повышается по сравнению со скоростью off -rate для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{off-c}). В еще одном варианте скорость on -rate связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{on-c}) повышается по сравнению со скоростью on -rate связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{on-r}), а скорость off -rate для связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF (k_{off-r}) повышается по сравнению со скоростью off -rate для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF (k_{off-c}). В предпочтительном варианте величина K_{D-c} для связывания соединения с тримером суперсемейства TNF снижается по сравнению с величиной K_{D-r} для связывания комплекса соединение-тример с рецептором суперсемейства TNF, т.е. соединение характеризуется более высокой аффинностью в отношении тримера, чем комплекс соединение-тример в отношении рецептора.

Величины k_{on-r} , k_{off-r} и K_{D-r} как для комплекса соединение-тример, так и для тримера суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора суперсемейства TNF можно определить с использованием соответствующего метода, например поверхностного плазмонного резонанса, масс-спектрометрии и изотермической калориметрии, как описано в данном контексте в разделе "Примеры". Величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения может составлять 1 мкМ, 100, 10, 5, 1 нМ, 100, 10 пМ или менее. В предпочтительном варианте величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с его рецептором в присутствии исследуемого соединения (т.е. в составе комплекса соединение-тример) может составлять 1 нМ или менее. В более предпочтительном варианте величина K_{D-r} комплекса соединение-тример для связывания с необходимым рецептором суперсемейства TNF составляет менее 600 пМ, более предпочтительно менее 500 пМ, менее 400 пМ, менее 300 пМ, менее 200 пМ, менее 100 пМ или менее 50 пМ. В наиболее предпочтительном варианте величина K_{D-r} комплекса соединение-тример для связывания с необходимым рецептором суперсемейства TNF составляет менее 200 пМ.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, можно идентифицировать методом анализа, который включает определение величины K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем член суперсемейства TNF и соединение, сравнение величины K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце с контрольным образцом, и выбор соединения по настоящему изобретению.

Соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут полностью или частично ингибировать передачу сигнала через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF в форме комплекса соединение-тример связывается с рецептором. Соединение может оказывать действие при снижении передачи сигнала через рецептор суперсемейства TNF по крайней мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60,

70, 80, 90 или на 100%. В другом варианте соединения, идентифицированные способами по настоящему изобретению, могут повысить передачу сигнала через рецептор TNF, если член суперсемейства TNF в форме комплекса соединения-тример связывается с рецептором. Соединение может оказывать действие при увеличении передачи сигнала через рецептор суперсемейства TNF по крайней мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 200%. Любое изменение уровня передачи сигнала можно измерить любым соответствующим методом, включая измерение активности репортерного гена с использованием щелочной фосфатазы или люциферазы, транслокации NF-κB с использованием систем, таких как Cellomics Arrayscan, 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 в форме комплекса соединения-тример связывается 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-κB 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_{50} или половины максимальной эффективной концентрации (EC_{50}). Величины IC_{50} означают концентрацию соединения, которая требуется для 50%-ного ингибирования специфической биологической или биохимической функции. Величины EC_{50} означают концентрацию соединения, которая требуется для достижения 50% его максимального эффекта. Величины IC_{50} или EC_{50} соединений, идентифицированных способами по настоящему изобретению, 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_{50} и EC_{50} можно измерить с использованием любого соответствующего метода, например продуцирование цитокинов можно количественно измерить методом ИФА. Затем величины IC_{50} и EC_{50} можно рассчитать с использованием стандартной 4-х параметрической логистической модели, известной как сигмоидная модель зависимости между дозой и эффектом.

Суперсемейство TNF и его рецепторы.

В настоящее время известно 22 члена суперсемейства TNF: TNFα (TNFSF1A), TNFβ (TNFSF1B), CD40L (TNFSF5), BAFF (TNFSF 13B/BlyS), APRIL (TNFSF 13), OX40L (TNFSF4), RANKL (TNFSF 11/TRANCE), TWEAK (TNFSF 12), TRAIL (TNFSF 10), TL1A (TNFSF15), LIGHT (TNFSF 14), лимфотоксин, лимфотоксин β (TNFSF3), 4-1BBL (TNFSF9), CD27L (TNFSF7), CD30L (TNFSF8), EDA (эктодисплазин), EDA-A1 (эктодисплазин A1), EDA-A2 (эктодисплазин A2), FASL (TNFSF6), NGF и GITRL (TNFSF 18).

В предпочтительном варианте членом суперсемейства TNF является TNFα. TNFα существует как в растворимой форме (TNFα_s), так и мембраносвязанной форме (TNFα_m). Термин TNFα, использованный в данном контексте, включает обе TNFα_s и TNFα_m формы. В наиболее предпочтительном варианте TNFα является TNFα_s форма.

Анализ по изобретению можно использовать для идентификации модуляторов по крайней мере одного из любых членов суперсемейства TNF, включая 22 известных члена суперсемейства TNF. Более подробно, анализ по изобретению можно использовать для идентификации соединений, которые связываются с любым членом суперсемейства TNF, прежде всего с тримерными формами членов суперсемейства TNF, а также соединений, которые стабилизируют указанные тримеры в конформации, при которой они способны связываться с необходимым рецептором TNF, и которые модулируют передачу сигнала через указанный рецептор. В предпочтительном варианте анализ по изобретению используют для идентификации модуляторов TNFα или CD40L, более предпочтительно TNFα, еще более предпочтительно TNFα_s.

Соединение, идентифицированное методами по настоящему изобретению, может являться модулятором по крайней мере одного из любых членов суперсемейства TNF, включая 22 известных члена суперсемейства TNF. В предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNFα или CD40L, более предпочтительно TNFα, еще более предпочтительно TNFα_s.

Комплекс соединения-тример по изобретению может включать тримерную форму любого члена суперсемейства TNF, включая 22 известных членов суперсемейства TNF. В предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNFα или CD40L. Более предпочтительно член суперсемейства TNF представляет собой TNFα, еще более предпочтительно TNFα_s.

Члены суперсемейства TNF связываются с рецепторами TNF и инициируют передачу сигнала через них. В настоящее время известно 34 рецептора TNF: 4-1BB (TNFRSF9/CD137), NGF R (TNFRSF16), BAFF R (TNFRSF13C), остеопротегерин (TNFRSF1 IB), BCMA (TNFRSF 17), OX40 (TNFRSF4), CD27

(TNFRSF7), RANK (TNFRSF1 1A), CD30 (TNFRSF8), RELT (TNFRSF 19L), CD40 (TNFRSF5), TAC1 (TNFRSF 13B), DcR3 (TNFRSF6B), TNFRH3 (TNFRSF26), DcTRAIL R1 (TNFRSF23), DcTRAIL R2 (TNFRSF22), TNF-R1 (TNFRSF 1 A), TNF-R2 (TNFRSF IB), DR3 (TNFRSF25), TRAIL R1 (TNFRSF 1 OA), DR6 (TNFRSF21), TRAIL R2 (TNFRSF 1 OB), EDAR, TRAIL R3 (TNFRSF IOC), Fas (TNFRSF6/CD95), TRAIL R4 (TNFRSF 10D), GITR (TNFRSF 18), TROY (TNFRSF 19), HVEM (TNFRSF 14), TWEAK R (TNFRSF 12A), TRAMP (TNFRSF25), лимфотоксин β R (TNFRSF3), а также XEDAR.

В предпочтительном варианте рецептором TNF является TNF-R1 или TNF-R2. Термин TNF-R, использованный в данном контексте, включает TNF-R1 и TNF-R2, включая внеклеточный домен (ECD) TNF-R1 и TNF-R2. Анализы по изобретению можно использовать для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала членами суперсемейства TNF через любой требуемый рецептор суперсемейства TNF. В предпочтительном варианте анализы по изобретению можно использовать для идентификации соединений, которые модулируют передачу сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1, TNF-R2 или CD40. В более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1 или TNF-R2. В еще более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1. В еще более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α_s , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1. Анализы по изобретению можно использовать для идентификации соединений, действие которых осуществляется за счет специфической модуляции передачи сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1. Прежде всего, соединения могут оказывать воздействие в результате модуляции передачи сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R1, но не оказывать влияния на передачу сигнала членами суперсемейства TNF через TNF-R2. В еще более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α_s , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1.

Комплекс соединения-тример по изобретению может модулировать передачу сигнала членами суперсемейства TNF через по крайней мере один рецептор TNF, включая 34 известных рецепторов TNF. В предпочтительном варианте рецептором TNF является TNF-R1, TNF-R2 или CD40L.

В более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1 или TNF-R2. В еще более предпочтительном варианте член суперсемейства TNF представляет собой TNF α , а рецептор TNF представляет собой TNF-R1. В еще более предпочтительном варианте членом суперсемейства TNF является TNF α_s , а рецептором TNF является TNF-R1.

Терапевтические показания.

TNF α является исходным членом суперсемейства TNF. TNF α является плеiotропным цитокином, который опосредует иммунную регуляцию и воспалительные ответные реакции. Известно также, что TNF α *in vivo* принимает участие в развитии ответных реакций на бактериальные, паразитарные и вирусные инфекции. Прежде всего, известно, что TNF α 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 α 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 заболевания 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 изобретению или комплексами по изобретению, можно использовать для лечения, профилактики или снижения интенсивности симптомов любых состояний, которые можно вылечить, предотвратить или снизить интенсивность их симптомов стандартным модулятором члена суперсемейства TNF. Соединение, идентифицированное способами по изобретению или комплексами по изобретению, можно использовать в отдельности или в комбинации со стандартным модулятором члена суперсемейства TNF. Любое состояние, которое развивается в результате частичной или полностью патогенной передачи сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF или из-за недостаточной передачи сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF, в принципе можно вылечить, предотвратить или снизить интенсивность его симптомов согласно настоящему изобретению. Патогенная передача сигнала членом суперсемейства TNF через рецептор TNF включает повышенную передачу сигнала через рецептор TNF, т.е. превышающую нормальный физиологический уровень передачи сигнала, включает передачу сигнала через рецептор TNF, которая была инициирована нормально, но которая не останавливается в ответ на нормальные физиологические сигналы, а также пе-

редачу 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, опосредование которых происходит в результате действия TNF α или CD40L или на их развитие влияют TNF α или CD40L.

Соединения, идентифицированные способами по изобретению, которые взаимодействуют с TNF α , соответственно будут оказывать благоприятное действие при лечении и/или профилактике различных заболеваний человека. К ним относятся аутоиммунные и воспалительные заболевания, неврологические и нейродегенеративные расстройства, боль и ноцицептивные расстройства, а также нарушения сердечно-сосудистой системы.

Воспалительные и аутоиммунные нарушения включают системные аутоиммунные расстройства, 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 тромбоцитопеническую пурпуру, инсулинозависимый сахарный диабет, юношеский диабет, увеит, воспалительное заболевание 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.

Расстройства 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, идентифицированное способами по изобретению, или комплексы по изобретению можно использовать для лечения или профилактики воспалительных расстройств, расстройств ЦНС, иммунных расстройств и аутоиммунных заболеваний, боли, остеопороза, лихорадки и отторжения трансплантата. В предпочтительном варианте соединение, идентифицированное способами по изобретению или комплексом по изобретению, 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 соединение, идентифицированное способами по изобретению или комплексом по изобретению, можно использовать для лечения или профилактики ревматоидного артрита (RA), неспецифического воспалительного артрита, эрозивного заболевания костей, хондрита, дегенерации и/или деградация хряща, юношеского воспалительного артрита, болезни Стилла (у детей и/или взрослых), юношеского идиопатического артрита, юношеского идиопатического артрита (как олигоартикулярные, так и полиартикулярные формы), воспалительные заболевания 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, дозировки и режимы дозировки.

Соединения, идентифицированные способами по изобретению, и комплексы соединения-тример по

изобретению обычно перерабатывают в фармацевтические композиции в смеси с фармацевтически приемлемым носителем.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", используемый в данном контексте, 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 носителем является носитель, пригодный для перорального введения. В зависимости от способа введения на модулятор можно наносить покрытие из материала для защиты соединения от воздействия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Термин "фармацевтически приемлемая соль" обозначает соль, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не вызывает никаких нежелательных токсикологических эффектов. Примеры указанных солей включают кислотнo-аддитивные соли и основнo-аддитивные соли.

Предпочтительные фармацевтически приемлемые носители включают носители или разбавители на водной основе. Примеры пригодных носителей на водной основе, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, водные буферные растворы и солевой раствор. Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их пригодные смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Во многих случаях в состав композиции предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях получения 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 изобретению могут содержать дополнительные активные ингредиенты.

В объем настоящего изобретения также включены наборы, содержащие соединения, идентифицированные способами по изобретению, и комплексы по изобретению, а также инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать один или более дополнительных реагентов, таких как дополнительное лекарственное или профилактическое средство, как описано выше.

Соединения, идентифицированные способами по изобретению, и комплексы соединения-тример по настоящему изобретению или их составы или композиции можно вводить для профилактики и/или лечения.

При лечении соединения и комплексы соединение-тример вводят субъекту, уже страдающему от нарушения 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 увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов. Количество, достаточное для достижения указанных целей, определяется как "терапевтически эффективное количество".

При профилактическом лечении составы вводят субъекту из группы риска развития нарушения 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, 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 лекарственные средства, 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. Предпочтительно субъектом, которому осуществляют введение, является человек.

Соединение, идентифицированное способами по изобретению, или комплексы соединения-тример по настоящему изобретению 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 соедине-

ние-тример по 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, обозначает способы введения, которые отличаются от энтерального и местного введения, и обычно используют инъекцию. В другом варианте соединение, идентифицированное способами по изобретению, или комплексы 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 изобретению, или комплексы соединения-тример по настоящему изобретению предназначено для перорального введения.

Практикующий врач может определить пригодную дозу соединения, идентифицированного способами по изобретению, или комплекса соединения-тример по изобретению. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно изменять, чтобы получить композиции, содержащие активный ингредиент в количестве, эффективном 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 комбинациями, возраст, пол, масса тела, состояние, общее состояние 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 приблизительно 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 сутки или от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела в сутки.

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 единичных 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, идентифицированные способами по изобретению, или комплексы соединения-тример по изобретению 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. Синтез соединений формулы (1), (2) и (3).

Промежуточное соединение 1: 1-(2,5-диметилбензил)-1H-бензимидазол.

Карбонат цезия (22,0 г, 100,0 ммоль) и иодид n-бутиламония (12,5 г, 34,0 ммоль) добавляли в раствор бензимидазола (4,0 г, 34,0 ммоль) в ДМФА (60 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин при 0°C, а затем добавляли 2,5-диметилбензилбромид (6,7 г, 34,0 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч. Реакцию останавливали добавлением ледяной воды (50 мл) и смесь экстрагировали этилацетатом (3×40 мл). Органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляли в вакууме, при этом получали указанное в заголовке соединение (8,0 г, 75%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета.

ЯМР (ДМСО-d₆): δ_H 8,23 (s, 1H), 7,68-7,66 (m, 1H), 7,43-7,41 (m, 1H), 7,21-7,19 (m, 2H), 7,10 (d,

$J=7,6$ Гц, 1H), 7,01 (d, $J=7,6$ Гц, 1H), 6,67 (s, 1H), 5,45 (s, 2H), 2,25 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

ЖХ-МС: (ES⁺) 237 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 2: 5-бром-2-нитроанилин.

2-Фтор-4-бром-1-нитробензол (0,5 г, 2,2 ммоль) добавляли в метанольный аммиак (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток растирали с изогексаном, при этом получали указанное в заголовке соединение (0,48 г, 97%) в виде твердого вещества желтого цвета.

ЯМР (ДМСО- d_6): δ_H 7,88 (d, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,53 (ушир. s, 2H), 7,25 (d, $J=3,0$ Гц, 1H), 6,75 (dd, $J=9,2, 2,0$ Гц, 1H).

Промежуточное соединение 3: 5-бром-N-(2,5-диметилбензил)-2-нитроанилин.

Гидрид натрия (60% дисперсия в масле, 0,82 г, 20,7 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору промежуточного соединения 2 (5,0 г, 23,0 ммоль) в ДМФА (50 мл) при 0°C. Затем добавляли 2,5-диметилбензилбромид (4,56 г, 23,0 ммоль), реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 ч. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора хлорида аммония, смесь экстрагировали этилацетатом (3×50 мл), промывали водой (2×30 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке (SiO₂, 5% EtOAc/изогексан), при этом получали указанное в заголовке соединение (4,89 г, 63%) в виде твердого вещества желтого цвета.

ЯМР (ДМСО- d_6): δ_H 8,42 (ушир. s, 1H), 8,01 (d, $J=8,8$ Гц, 1H), 7,12-6,86 (m, 4H), 6,85 (d, $J=7,2, 1,6$ Гц, 1H), 4,54 (d, $J=5,6$ Гц, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,21 (s, 3H).

Промежуточное соединение 4: 5-бром-N¹-(2,5-диметилбензил)бензол-1,2-диамин.

SnCl₂ (20,2 г, 89,4 ммоль) добавляли в перемешиваемый раствор промежуточного соединения 3 (10,0 г, 29,8 ммоль) в EtOH (200 мл) и реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 5 ч. Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме, остаток нейтрализовали добавлением насыщенного водного раствора бикарбоната натрия и экстрагировали ДХМ (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали водой (2×50 мл), экстрагировали, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке (SiO₂, 5% MeOH/ДХМ), при этом получали указанное в заголовке соединение (5,4 г, 69%) в виде масла темно-коричневого цвета.

ЯМР (ДМСО- d_6): δ_H 7,08 (s, 1H), 7,06 (d, $J=7,6$ Гц, 2H), 6,97 (d, $J=7,6$ Гц, 1H), 6,53 (dd, $J=8,4, 2,0$ Гц, 1H), 6,47 (d, $J=8,0$ Гц, 1H), 6,45 (d, $J=2,0$ Гц, 1H), 5,06 (t, $J=5,4$ Гц, 1H), 4,77 (ушир. s, 2H), 4,15 (d, $J=5,2$ Гц, 1H), 2,27 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).

ЖХ-МС: (ES⁺) 305 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 5: 6-бром-1-(2,5-диметилбензил)-1H-бензимидазол.

Смесь промежуточного соединения 4 (0,40 г, 1,31 ммоль) и муравьиной кислоты (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток распределяли между этилацетатом и насыщенным водным раствором бикарбоната натрия. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Неочищенный остаток очищали хроматографией на колонке (SiO₂, 20-75% EtOAc/изогексан), при этом получали указанное в заголовке соединение (0,20 г, 48%) в виде твердого вещества белого цвета.

ЯМР (ДМСО- d_6): δ_H 8,24 (s, 1H), 7,74 (d, $J=1,7$ Гц, 1H), 7,64 (d, $J=8,6$ Гц, 1H), 7,34 (dd, $J=8,6, 1,9$ Гц, 1H), 7,12 (d, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,02 (d, $J=7,8$ Гц, 1H), 6,61 (s, 1H), 5,47 (s, 2H), 2,24 (s, 3H), 2,15 (s, 3H).

ЖХ-МС: (ES⁺) 316 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 6: [6-бром-1-(2,5-диметилбензил)-1H-бензимидазол-2-ил](пиридин-4-ил)метанол.

К диизопропиламину (2,8 мл) в ТГФ (10 мл), охлажденному до 0°C, добавляли n-BuLi (12,5 мл, 1,6 M в гексане) и полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 10 мин. Аликвотную часть свежеприготовленного диизопропиламида лития (LDA) (1,8 мл, 1,62 ммоль) добавляли в раствор промежуточного соединения 5 (0,25 г, 0,81 ммоль) в ТГФ (5 мл) при -78°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при -78°C, затем добавляли пиридин-4-карбоксальдегид (0,15 мл, 1,62 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением насыщенного водного раствора хлорида натрия и смесь нагревали до комнатной температуры. Смесь экстрагировали этилацетатом (3×40 мл). Органические слои сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке (SiO₂, 0-10% MeOH/ДХМ), при этом получали указанное в заголовке соединение (0,18 г, 51%) в виде твердого вещества белого цвета.

ЖХ-МС: (ES⁺) 423 (M+H)⁺.

Промежуточное соединение 7: 5-(3-фтор-4-нитрофенил)-2-метоксипиридин.

6-Метоксипиридин-3-илборную кислоту (40,0 г, 262 ммоль), 4-бром-2-фтор-1-нитробензол (52,3 г, 238 ммоль) и Na₂CO₃ (76 г, 713 ммоль) смешивали в 1,2-диметоксиэтаноле (1200 мл) и воде (300 мл). Реакционную смесь продували аргоном. Затем добавляли Pd(PPh₃)₂Cl₂ (8,34 г, 11,89 ммоль) и смесь нагревали при 90°C в течение 1,5 ч. Затем добавляли EtOAc и воду. Органическую фазу отделяли и водную фазу дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои сушили над Na₂SO₄, затем раствори-

тель удаляли в вакууме.

Остаток перекристаллизовывали из толуола, при этом получали указанное в заголовке соединение (42,00 г, 169,2 ммоль, 71%).

МС [ESI⁺] m/z: 249 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение 8: N-[2-(дифторметокси)бензил]-5-(6-метоксипиридин-3-ил)-2-нитроанилин.

2-(Дифторметокси)бензиламин (2,093 г, 12,09 ммоль) растворяли в N-метилпирролидоне (NMP, 20 мл). Затем добавляли промежуточное соединение 7 (2 г, 8,06 ммоль) и K₂CO₃ (1,336 г, 9,67 ммоль). Указанную смесь нагревали в микроволновой установке при 150°C в течение 30 мин. Затем добавляли EtOAc и воду. Органическую фазу отделяли и водную фазу дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои трижды промывали водой и дважды соевым раствором. После высушивания над Na₂SO₄ растворитель удаляли в вакууме. Остаток перекристаллизовывали из смеси гептан/EtOAc (100/25 мл), при этом получали указанное в заголовке соединение (2,513 г, 6,26 ммоль, 78%).

МС [ESI⁺] m/z: 402 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение 9: N¹-[2-(дифторметокси)бензил]-5-(6-метоксипиридин-3-ил)бензол-1,2-диамин.

Палладий на угле (1,10 г, 10 мас.%) добавляли в раствор промежуточного соединения 8 (2,512 г, 6,26 ммоль) в EtOAc (150 мл), через который предварительно продували аргон. Газовую среду заменяли на водород и реакционную смесь перемешивали в атмосфере H₂ (1 бар) в течение 1 ч. Смесь фильтровали через слой кизельгура. Фильтрат концентрировали в вакууме. Продукт очищали на колонке экспресс-хроматографией (элюент: градиент 7-60% EtOAc в гептане), при этом получали указанное в заголовке соединение (2,07 г, 5,57 ммоль, 89%).

МС [ESI⁺] m/z: 372 [M+H]⁺.

Промежуточное соединение 10: 5-{4-амино-3-[2-(дифторметокси)бензиламино]фенил}пиридин-2(1H)-он.

Гидрохлорид пиридина (10,64 г, 92 ммоль) добавляли к промежуточному соединению 9 (6,84 г, 18,42 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 165°C в открытом сосуде в течение 3 мин. Затем добавляли воду и смесь обрабатывали ультразвуком. Осадок отделяли фильтрованием и затем растирали в кипящем ацетонитриле. Осадок отделяли фильтрованием, при этом получали указанное в заголовке соединение (3,822 г, 9,95 ммоль, 54%).

МС [ESI⁺] m/z: 358 [M+H]⁺.

Соединение (1): [1-(2,5-диметилбензил)-1H-бензимидазол-2-ил](пиридин-4-ил)метанол.

В раствор промежуточного соединения 1 (0,25 г, 1,06 ммоль) в ТГФ (10 мл) при -78°C медленно по каплям добавляли 1,6 М н-бутиллитий (0,79 мл, 1,27 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин. Затем медленно по каплям добавляли изоникотинальдегид (0,17 г, 1,59 ммоль) в ТГФ (1 мл). Через 10 мин реакцию останавливали добавлением воды (1 мл) и реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Реакционную смесь выливали в смесь этилацетат/вода. Органический слой отделяли, сушили (MgSO₄) и концентрировали в вакууме. Остаток очищали хроматографией на колонке (SiO₂, 0-30% MeOH/ДХМ), при этом получали указанное в заголовке соединение (0,2 г, 55%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета.

ЯМР (CDCl₃): δ_H 8,31 (d, J=5,9 Гц, 2H), 7,69 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,28-7,16 (m, 4H), 7,00-6,95 (m, 2H), 6,87-6,85 (m, 1H), 6,16 (s, 2H), 5,84 (s, 1H), 5,35-5,09 (dd, J_{AB}=17,0 Гц, 2H), 2,25 (s, 3H), 1,89 (s, 3H).

ЖХ-МС: (ES⁺) 344 (M+H)⁺.

Соединение (2): [1-(2,5-диметилбензил)-6-(1-метил-1H-пиразол-4-ил)-1H-бензимидазол-2-ил](пиридин-4-ил)метанол.

1-Метил-4-(4,4,5,5-тетраметил[1,3,2]диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (0,15 г, 0,71 ммоль) и 2 М раствор карбоната натрия (2 мл) добавляли в раствор промежуточного соединения 6 (0,15 г, 0,36 ммоль) в смеси 1,4-диоксан/вода (4:1, 5 мл) и реакционную смесь дегазировали в течение 10 мин. Затем добавляли PdCl₂(dppf) (0,01 г, 0,05 ммоль) и реакционную смесь дегазировали в течение 10 мин, затем нагревали до 100°C в течение 60 мин в микроволновом реакторе Biotage. Затем добавляли этилацетат и реакционную смесь фильтровали через слой целита. Органический слой отделяли, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом препаративной ВЭЖХ, при этом получали указанное в заголовке соединение в виде твердого вещества белого цвета.

ЯМР (DMCO-d₆): δ_H 8,39 (dd, J=4,5, 1,6 Гц, 2H), 8,03 (s, 1H), 7,76 (s, 1H), 7,64 (d, J=8,8 Гц, 1H), 7,44-7,41 (m, 2H), 7,28 (d, J=5,6 Гц, 2H), 7,06 (d, J=7,7 Гц, 1H), 6,87 (d, J=6,8 Гц, 1H), 6,70 (d, J=5,5 Гц, 1H), 6,01 (d, J=5,5 Гц, 1H), 5,83 (s, 1H), 5,63-5,43 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 2,33 (s, 3H), 1,92 (s, 3H).

ЖХ-МС: (ES⁺) 424 (M+H)⁺.

Соединение (3): 5-(1-[2-(дифторметокси)бензил]-2-{3-(2-оксопирролидин-1-ил)феноксид}метил)-1H-бензимидазол-6-ил)пиридин-2(1H)-он.

2-[3-(2-Оксопирролидин-1-ил)феноксид]уксусную кислоту (2 экв.) добавляли в раствор HATU (2 экв.) в ДМФА (2 мл). Смесь перемешивали в течение 30 мин. Затем добавляли раствор промежуточно-

го соединения 9 (1 экв.) в ДМФА (2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем температуру повышали до 50°C и смесь продолжали перемешивать в течение еще 24 ч. Растворитель упаривали и остаток растворяли в уксусной кислоте (4 мл) и нагревали до 80°C в течение 5 ч. Уксусную кислоту удаляли упариванием. Остаток распределяли между водой и хлороформом (1:1, 6 мл) при 50°C. Слои разделяли, используя фазовый сепаратор. Водный слой промывали хлороформом (4 мл) и органический слой упаривали досуха. Остаток переносили в ДМСО (1 мл) и очищали методом препаративной ЖХ-МС, при этом получали указанное в заголовке соединение.

Пример 2. Синтез конъюгата формулы (4).

Промежуточное соединение 10: 1-(2,5-диметилбензил)-6-[4-(пиперазин-1-илметил)фенил]-2-(пиридин-4-илметил)-1Н-бензимидазол.

Синтез проводили с использованием стадий, которые описаны для синтеза промежуточных соединений 7, 8 и 9, затем получали соединения (3) с использованием соответствующей бороновой кислоты, пригодного амина и соответствующей карбоновой кислоты.

Конъюгат (4).

Промежуточное соединение 10 (27,02 мг, 0,0538 ммоль) растворяли в ДМСО (2 мл). Сукцинимидоловый сложный эфир 5- и 6-карбоксихлорофлуоресцеина (24,16 мг, 0,0510 ммоль, фирмы Invitrogen, номер по каталогу C1311) растворяли в ДМСО (1 мл), при этом получали раствор ярко-желтого цвета. Два раствора смешивали при комнатной температуре, при этом образуется смесь красного цвета. Смесь перемешивали при комнатной температуре. Через короткий промежуток времени отбирали аликвотную часть (20 мкл) и разбавляли смесью АсОН/Н₂О (80:20) для ЖХ-МС анализа на установке 1200RR-6140 LC-MS. На хроматограмме наблюдались два близко расположенных пика, которые характеризовались временами удерживания 1,42 и 1,50 мин, оба с массой (М+Н)⁺=860,8 а.е.м., что соответствует двум продуктам, содержащим 5- и 6-замещенную карбоксихлорофлуоресцеиновую группу. Еще один пик со временем удерживания 2,21 мин характеризовался массой (М+Н)⁺=502,8 а.е.м., что соответствует промежуточному соединению 10. Пик, соответствующий непрореагировавшему сукцинимидиловому эфиру 5- и (6)-карбоксихлорофлуоресцеина, не наблюдался. Площади пиков составляли 22,0, 39,6 и 31,4% для трех указанных сигналов, что указывало на то, что в этот момент времени образуются два изомера требуемого продукта, при этом степень конверсии составляет 61,6%. Через несколько часов отбирали аликвотную часть (20 мкл), затем еще одну после перемешивания в течение ночи, при этом аликвотные части разбавляли, как описано выше, и анализировали методом ЖХ-МС. В указанные моменты времени степень конверсии составляла 79,8 и 88,6% соответственно. Смесь очищали на установке для препаративной ВЭЖХ с УФ-детектором. Объединенные очищенные фракции лиофильно высушивали для удаления избытка растворителя. После лиофильного высушивания получали твердое вещество оранжевого цвета (23,3 мг), что эквивалентно 0,027 ммоль продукта и соответствует общему выходу 53% после остановки реакции и очистки продукта методом препаративной ВЭЖХ.

Пример 3. Поиск соединений, которые связываются с TNF α .

Анализ соединений формулы (1) и (2) проводили методом следующего анализа.

384-луночный планшет без покрытия (стандартное связывание, планшеты фирмы Meso Scale Discovery (MSD)) покрывали в течение ночи внеклеточным доменом TNFR (TNFR-ECD, 10 мкл, 1 мкг/мл в буферном растворе ФСБ). Для обеспечения равномерности распределения домена планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин. Затем планшеты закрывали и хранили в течение ночи при +4°C.

Затем лунки планшета трижды промывали 50 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (рН 6,5, ФСБ), содержащего 0,05% Твин 20 (промывочный буферный раствор), и затем блокировали 50 мкл 2% БСА. Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре на качалке (600 об/мин) в течение 2 ч. После указанного инкубирования планшеты промывали (3×50 мкл промывочного буферного раствора на лунку).

После блокирующей инкубации перед добавлением в предварительно заблокированные и промытые планшеты MSD соединения формулы (1) и (2) предварительно инкубировали с TNF (фирмы R&D Systems). Для одноточечного анализа, как представлено на фиг. 3А, соединения анализировали при конечной концентрации 100 мкМ (конечная концентрация ДМСО составляла 5% (об./об.)).

Для определения значений ЕС₅₀ (см. фиг. 3Б и 3В) соединения формулы (1) и (2) разбавляли ДМСО в два или три раза; таким образом, при проведении анализа наибольшая концентрация исследуемого соединения составляла 50 или 100 мкМ (конечная концентрация ДМСО составляла 5% (об./об.)). Предварительно разбавленные соединения формулы (1) и (2) добавляли в соотношении 1:1 к раствору TNF с концентрацией 4 нг/мл (конечная концентрация 2 нг/мл) и затем инкубировали при комнатной температуре на качалке (600 об/мин) в течение 1 ч. Предварительно инкубированные смеси соединения формулы (1) или (2) с TNF α (10 мкл) добавляли в подготовленный планшет MSD и инкубировали при комнатной температуре на качалке в течение 1 ч.

Затем планшеты промывали промывочным буферным раствором (3×50 мкл на лунку). Затем в каждую лунку добавляли анти-TNF-поликлональные антитела с сульфо-меткой (сульфо-tag) и планшеты

инкубировали в течение еще 1,5 ч при комнатной температуре на качалке.

Затем планшеты промывали (3×50 мкл промывочного буферного раствора на лунку), затем добавляли 50 мкл буферного раствора MSD Read T плюс ПАВ (разбавляли H₂O в два раза) и считывали сигнал на установке SECTOR Imager 6000.

Для однокочечных анализов уровень ингибирования (в процентах) рассчитывали с использованием контрольного образца, который не содержал соединение.

Значения EC₅₀ рассчитывали стандартными способами, используя 4-параметрическую логистическую модель (сигмоидальная дозозависимая модель).

Согласно данным, представленным на фиг. 3А, соединение, обозначенное как "SPD-304", которое является представителем антагонистов TNF α , известных в данной области техники, характеризуется уровнем ингибирования в % +80%, что указывает на то, что указанное соединение ингибирует связывание TNF α с его рецептором. Наоборот, некоторые из исследуемых соединений характеризуются отрицательными значениями ингибирования (в %), что указывает на то, что указанные соединения усиливают связывание TNF α с рецептором TNF.

Аналогичные результаты наблюдались при исследовании эффектов в зависимости от дозы соединений формулы (1) (см. фиг. 3Б) и формулы (2) (см. фиг. 3В), которые описываются кривыми отрицательного ингибирования. Другими словами, оказалось, что связывание TNF α с иммобилизованным ECD-TNFR усиливается по мере увеличения концентраций соединений. В связи с этим целесообразнее рассчитывать EC₅₀ (концентрация соединения, при которой наблюдается 50% общего эффекта), а не IC₅₀. В этом случае EC₅₀ для соединения формулы (1) составляет 4,6 мкМ, а EC₅₀ для соединения формулы (2) составляет 3,7 мкМ.

Анализ биомолекулярного взаимодействия (BIA) с использованием поверхностного плазмонного резонанса также можно использовать для оценки индуцированного соединением усиления связывания TNF α с рецептором TNF. Для этого использовали установку Biacore A100/4000. В так называемом анализе "конкуренция/усиление в растворе" внеклеточный домен рецептора TNF (ECD-TNFR) иммобилизовали на сенсор CM5 (в буферном растворе HBS-P (10 мМ HEPES (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,005% ПАВ (P20), фирмы Biacore, GE Healthcare)) при pH 5 до уровня 1 KRU.

Получали двукратные серийные разведения соединений, при этом самая высокая концентрация, используемая в анализе, составляла 20 мкМ. Например, в типичном анализе можно использовать 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 мкМ раствор соединения. Соединения смешивали с 0,5-1 нМ TNF α и уравнивали в течение по крайней мере в течение 5 ч. Контрольные соединения тестировали через каждые 10-15 циклов. Смесь TNF α /соединение пропускали через иммобилизованный TNFR в течение 3 мин с последующей регенерацией поверхности после каждого цикла за счет однократного пропускания 30 мл 10 мМ HCl, при этом скорость потока составляла 30 мл/мин. Кривые связывания с вычетом фонового сигнала анализировали с использованием программного обеспечения BIAevaluation по стандартным алгоритмам. Значения EC₅₀ определяли с использованием четырехпараметрического логистического подбора.

На фиг. 4А и 4Б представлены кривые процесса для соединений формулы (1) и формулы (2) соответственно. Значение сигнала (в RU, резонансные единицы) для TNF α в отсутствие соединения вычитали из кривых; таким образом, они отражают только увеличение связывания, индуцированное соединениями. При увеличении концентрации соединения плато на кривых процесса характеризовалось более высокими значениями сигнала (RU). На основе указанных данных можно рассчитать значение EC₅₀ при определении концентрации соединения, при которой наблюдается эффект, уровень которого составляет 50% от уровня максимального эффекта, с использованием 4-параметрической логистической модели подбора. В указанных экспериментах для соединения формулы (1) рассчитанное значение EC₅₀ составляло 298 нМ, а для соединения формулы (2) - 280 нМ.

Следует отметить, что значения EC₅₀ характеризовались вариабельностью от анализа к анализу и условия анализов Biacore и анализов MSD сильно различались. Таким образом, следует ожидать, что измеренные значения EC₅₀ не будут идентичны для двух форматов анализа.

Пример 4. Анализ связывания соединения 1 с TNF α методом масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрию обычно проводили с использованием времяпролетного масс-спектрометра (Time-of-Flight) Waters LCT-premier или масс-спектрометра Q-TOF Waters SynaptG2. Образцы вводили с использованием инфузионного устройства Advion Triversa Nanomate nanoflow, которое использовали вместо стандартного источника спектрометра, впрыск образца осуществляли с помощью чипа серии А с размером сопла 5 мкм при номинальной скорости потока 100 нл/мин. Другие модификации времяпролетного масс-спектрометра (Time-of-Flight) Waters LCT включали нестандартное (изготовленное по индивидуальному заказу) устройство для охлаждения источника, позволяющее точно контролировать температуру источника, и коммерчески доступное устройство регулировки давления, обеспечивающее точный контроль вакуума в области источника. Все эти модификации обеспечивали сохранение тримера TNF α в нативной складчатой конформации, а также облегчали обнаружение комплексов, образованных с исследуемыми соединениями с низкой аффинностью. Обычно анализ проводили при следующих рабо-

чих параметрах: температура источника 10°C, давление в источнике 3,74E-3 мбар, давление в анализаторе 1,54E-6 мбар.

Ионы генерировали с использованием стандартных условий электрораспыления положительных ионов, приводящих к формированию множества заряженных состояний TNF α .

Масс-спектрометрия очень чувствительна к солям в составе буферного раствора, которые присутствуют в образце белка. Стандартные соли, входящие в состав буферных растворов, такие как фосфат калия или фосфат натрия, оказывают сильное негативное воздействие на ионизацию. Соответственно образцы белка предварительно обрабатывали для удаления указанных солей с использованием спин-колонки Zeba для обессоливания, при этом белок переводили в буферную систему, совместимую с масс-спектрометрией, обычно в 50 мМ раствор ацетата аммония (рН 6,8).

В условиях мягкой ионизации, когда наблюдается 100% перенос тримерных форм, в нативных условиях в 100%-ном водном окружении тримерная форма характеризуется спектром многозарядных ионов, который включает ионы +12, +13 и +14; при добавлении 5% ДМСО (об./об.) спектр многозарядных ионов смещался в область более низких значений m/z (повышается z), что указывает, как и ожидалось, на то, что органический соразворитель вызывает частичное разворачивание тримерных форм в растворе, при этом также наблюдается повышение уровня мономера. При добавлении 10%-ного ДМСО (об./об.) наблюдался спектр многозарядных ионов, соответствующий только мономерной форме, что указывает на то, что указанное количество ДМСО препятствует образованию тримера в растворе. Обычно готовили 10 мМ исходный раствор исследуемых соединений в ДМСО, при инкубировании которого с TNF α конечная концентрация ДМСО в растворе составляла 5%. В условиях мягкой ионизации наблюдался сдвиг спектра многозарядных ионов в область более высоких значений m/z (понижение z) по сравнению не только с контрольным спектром в присутствии 5%-ного ДМСО, но и со спектром, полученным при 100%-ном содержании воды, что указывает на то, что исследуемые соединения способны подавить дестабилизирующий эффект 5%-ного ДМСО и обеспечивают более высокий уровень стабилизации по сравнению с уровнем, наблюдаемым в нативных условиях. Об этом свидетельствуют изменения количества зарядов, приобретаемых белком в различных описанных условиях.

Измеренная скорость "on" представляет собой результат арифметического расчета на основе зависимости константы скорости k_{on} от концентрации исследуемого соединения, и при высоких концентрациях исследуемого соединения наблюдаемая скорость больше, чем при низких концентрациях. Экспериментальное измерение наблюдаемой скорости методом масс-спектрометрии при различных концентрациях исследуемого соединения позволяет определить значение константы скорости (k_{on}). В стандартном эксперименте смесь, содержащую исследуемое соединение и тример TNF α в требуемых концентрациях, получали с использованием робота Advion Triversa Nanomate из исходных растворов TNF α и исследуемого соединения. Затем образец вводили в масс-спектрометр в течение нескольких минут, в течение которых регистрировали соотношение сигналов масс-спектра, соответствующих свободному TNF α и комплексу TNF α /исследуемое соединение. Указанный эксперимент повторяли при нескольких различных соотношениях исследуемое соединение/TNF α .

Затем данные, полученные для различных соотношений исследуемое соединение/TNF α , обрабатывали и методом подбора получали теоретическую однофазную логарифмическую ассоциативную кривую с использованием программного обеспечения Graphpad PRISM v.5 для расчета значения k_{on} . Полученные результаты подтвердили низкое значение k_{on} , наблюдаемое при использовании установки Biacore.

Исследуемые соединения получали в виде 10 мМ растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО). В связи с этим необходимо было оценить влияние ДМСО на нативный тример TNF α в отсутствие исследуемого соединения. ДМСО добавляли в водный раствор тримера TNF α , при этом получали раствор с конечной концентрацией ДМСО равной 5% (об./об.), затем снимали масс-спектр.

В 100%-ном водном окружении, т.е. в отсутствие ДМСО, большая доля TNF α существует в тримерной форме со значительной долей мономера TNF α . В 100%-ном водном окружении тримерная форма TNF α характеризуется спектром многозарядных ионов, включающим ионы +12, +13 и +14 (см. фиг. 5, нижняя кривая).

Меньшее количество тримерного TNF α наблюдалось при добавлении ДМСО до концентрации 5% (об./об.). Спектр многозарядных ионов сдвигался в область более низких значений отношения масса/заряд (m/z), что указывало на то, что ДМСО вызывает частичное разворачивание тримерных форм. В присутствии 5% ДМСО (об./об.) также наблюдалось повышение уровня мономерного TNF α .

При добавлении ДМСО до концентрации 10% (об./об.) спектр многозарядных ионов соответствовал спектру только мономерной формы, что указывало на то, что указанное количество ДМСО препятствует образованию тримера TNF α (фиг. 5, верхняя кривая).

Соединение формулы (1) добавляли в раствор, содержащий TNF α и 5% ДМСО (об./об.), и снимали масс-спектр. Было установлено, что в 5% (об./об.) растворе ДМСО в присутствии соединения формулы (1) TNF α существует в тримерной форме (см. фиг. 5, средняя кривая). Спектр многозарядных ионов, полученный для соединения 1, связанного с TNF α , смещается в область более высоких значений m/z (исклю-

чительно +12 и +11), что свидетельствует о том, что соединение формулы (1) не только устраняет слабое разворачивающее влияние ДМСО на TNF α , но также обеспечивает более высокий уровень стабилизации, по сравнению с уровнем, наблюдаемым в отсутствие ДМСО.

Для устранения сомнений в необходимости присутствия ДМСО в количестве, достаточном для ослабления тримерного TNF α перед образованием комплекса при связывании с исследуемыми соединениями, эксперимент повторяли с использованием водорастворимого соединения в 100%-ном водном окружении. В отсутствие ДМСО связывание соединения с тримерным комплексом вызывает тот же сдвиг спектра в область более высоких значений отношения m/z , который наблюдался в присутствии ДМСО (данные не показаны). Полученные данные подтвердили, что для связывания исследуемых соединений с тримером TNF α не требуется присутствие ДМСО и они могут оказывать стабилизирующее действие независимое от присутствия дестабилизирующего агента.

Другие доказательства стабилизации тримерной формы TNF α исследуемыми соединениями были получены при анализе образцов в условиях более жесткой ионизации, которые могут приводить к распаду нативной тримерной формы на мономеры. При связывании TNF α с соединением формулы (1) количество мономера TNF α , который обнаруживается в указанных условиях, существенно снижается (данные не показаны). Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые соединения защищают тример TNF α от разрушения в условиях проведения масс-спектрометрического анализа.

Пример 5. Стехиометрический состав комплекса TNF α -соединение формулы (1).

Инкубацию исследуемых соединений из библиотеки, включая соединение формулы (1), с TNF α контролировали с помощью масс-спектрометрии в условиях мягкой ионизации. Согласно полученным данным молекулы соединения формулы (1) и тримера TNF α связываются в стехиометрическом соотношении 1:1 (фиг. 6). Было установлено, что соединение формулы (1) не связывается с мономерной формой TNF α . Не было получено доказательств о стабилизации димерной формы TNF α . Полученные данные подтверждают, что исследуемые соединения, включая соединение формулы (1), действуют по другому механизму в отличие от известных соединений, которые стабилизируют димерную форму TNF α .

Пример 6. Обмен мономеров в тримерах TNF α .

Гомотримеры TNF α человека и мыши (H_3 и M_3 соответственно) инкубировали в смеси и аликвотные части растворов анализировали масс-спектрометрией по появлению в спектрах сигналов перекрестных типов гетеротримеров. Масс-спектрометрический анализ подтвердил возможность обмена мономеров в нативных тримерах TNF α в растворе. Обмен происходил с низкой скоростью, и его регистрировали в течение 4 ч до полного равновесия (данные не показаны). Механизм обмена неизвестен, хотя маловероятно, что он включает образование димерных форм, поскольку сигналы таких форм не наблюдались. Обмен мономерами, вероятно, происходит между чистыми тримерами человека и мыши, а смешивание тримеров мыши и человека позволяет визуализировать такой обмен методом масс-спектрометрии.

Во второй серии экспериментов TNF α человека инкубировали с избытком соединением формулы (1), затем избыток соединения формулы (1) удаляли. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что между соединением формулы (1) и TNF α человека образуется комплекс 1:1. В указанный образец добавляли TNF α мыши, затем образец анализировали методом масс-спектрометрии в течение нескольких часов. Через 18 ч не наблюдалось изменений в составе образца. Следует отметить, что обмен мономерами не происходил и образование смешанных гетеротримеров, свободных, таких как MH_2 и M_2H , или со связанным лигандом, таких как MH_2L и M_2HL , не наблюдалось. Кроме того, не было получено доказательств образования тримеров M_3L и образования несодержащих связанный лиганд тримеров H_3 . Полученные данные четко свидетельствовали о том, что после связывания соединения формулы (1) с TNF α человека для формирующегося комплекса скорость off-rate неизмерима. Таким образом, в ходе предварительной инкубации с TNF α человека соединение формулы (1) закрывает тример человека, следовательно, не наблюдается перекрестный обмен мономерными субъединицами между тримерами.

Затем эксперимент повторяли в обратном порядке. TNF α мыши инкубировали с избытком соединения формулы (1), затем избыток соединения формулы (1) удаляли. Масс-спектрометрический анализ подтвердил, что между соединением формулы (1) и TNF α мыши образовался комплекс 1:1. В указанный образец добавляли TNF α человека, затем образец анализировали методом масс-спектрометрии в течение нескольких часов. Полученные данные четко свидетельствовали о том, что обмен мономерных субъединиц может происходить, наблюдалось образование смешанных гетеротримеров, свободных (MH_2 и M_2H) и со связанным лигандом (MH_2L и M_2HL). Кроме того, было обнаружено образование гомотримера человека со связанным лигандом (H_3L), не содержащего лиганд гомотримера мыши (M_3), а также несвязанного соединения формулы (1) (L). Полученные данные свидетельствуют о том, что несмотря на образование комплекса между соединением формулы (1) и гомотримером TNF α мыши (1:1) скорость off-rate можно измерить. После диссоциации указанного комплекса (M_3L) происходит обмен мономерными субъединицами между тримерами H_3 и M_3 , а затем высвободившийся лиганд способен образовывать комплексы со всеми 4 видами тримера, присутствующими в растворе. Таким образом, в ходе предварительной инкубации с TNF α мыши соединение формулы (1) не препятствовало обмену мономерных субъ-

единиц и наблюдалось образование смешанных гетеротримеров.

Затем указанные два эксперимента повторяли с использованием соединения формулы (2) вместо соединения формулы (1). Соединение формулы (2) предварительно инкубировали с TNF α человека, при этом образовывался комплекс 1:1, затем полученный комплекс смешивали с не содержащим лиганд TNF α мыши, при этом были получены результаты, аналогичные полученным для соединения формулы (1). В течение 18 ч обмен мономерными субъединицами в растворе не наблюдался, при этом были выявлены только тримеры H₃L и M₃. Полученные результаты подтвердили, что для образующегося комплекса соединения формулы (2) и TNF α человека скорость off-rate также неизмерима. Таким образом, в ходе предварительной инкубации с TNF α человека соединение формулы (2) закрывает тример человека, следовательно, не наблюдается перекрестный обмен мономерными субъединицами между тримерами.

Однако в отличие от соединения формулы (1), если соединение формулы (2) предварительно инкубировали с TNF α мыши с образованием комплекса 1:1, а затем смешивали с не содержащим лиганд TNF α человека, обмен мономерными субъединицами не наблюдался в течение 18 ч, при этом в растворе были выявлены только тримеры M₃L и H₃. Полученные результаты свидетельствовали о том, что для комплекса TNF α мыши и соединения формулы (2) скорость off-rate также неизмерима. Таким образом, в ходе предварительной инкубации с TNF α мыши соединение формулы (2) закрывает тример мыши, следовательно, не наблюдается перекрестный обмен мономерными субъединицами между тримерами.

Все полученные данные свидетельствуют о том, что, хотя соединение формулы (1) и соединение формулы (2) характеризуются сходной аффинностью в отношении TNF α человека, соединения характеризуются различной аффинностью в отношении тримера TNF α мыши, с которым соединение формулы (2) образует более прочную связь по сравнению с соединением формулы (1).

Пример 7. Масс-спектрометрический анализ фракций эксклюзионной хроматографии с использованием TNF α , TNF-R и соединения формулы (1).

Фракции, полученные в ходе разделения смесей TNF α , TNF-R и соединения формулы (1) методом эксклюзионной хроматографии, анализировали методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Готовили два образца для эксклюзионной хроматографии. При получении первого образца соединение формулы (1) предварительно инкубировали с TNF α , затем полученный комплекс соединение-тример добавляли к TNF-R. При получении второго образца соединение формулы (1) добавляли к предварительно сформированному комплексу TNF α и TNF-R. Данные ЖХ-МС анализа свидетельствовали о том, что соединение формулы (1) связывается с теми фракциями, которые содержат два белка (фиг. 7), что указывает на то, что независимо от порядка добавления соединение формулы (1) может связываться с TNF α , т.е. соединение формулы (1) связывается с TNF α даже в присутствии TNF-R.

Пример 8. Анализ связывания TNF α и комплексов соединения формулы (2) - тримера TNF α с TNF-R - методом изотермической калориметрии.

TNF α (128 мкМ) в буферном растворе ITC (50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4) инкубировали в течение 60 мин после добавления исходного раствора соединения 2 в ДМСО, при этом конечная концентрация соединения составляла 300 мМ в 5% ДМСО (исследуемый образец). Контрольный образец, который содержал ДМСО, но не соединение добавляли к образцу TNF α и также инкубировали в течение 60 мин (контроль).

После инкубации образцы фильтровали методом гель-фильтрации на колонке для эксклюзионной хроматографии Nap 5 (фирмы GE Healthcare). Колонку уравнивали 15 мл буферного раствора ITC, затем на колонку наносили образец (500 мкл), затем элюировали с использованием 1 мл буферного раствора ITC. Этот процесс позволяет отделить TNF и соединение, связанное с TNF, от свободного соединения и ДМСО.

Для определения концентрации TNF α в исследуемом образце или контроле после элюирования из колонки NAP 5 и разбавления образцов до концентрации TNF α 64 мкМ использовали показания оптической прочности при 280 нм.

200 мкл внеклеточного домена (ECD) рецептора TNFR1 (10 мМ) добавляли в кювету установки AutoITC200 (фирмы GE Healthcare) в автоматическом режиме (используя протокол Plates Standard B). В двух экспериментах 40 мкл исследуемого образца или контрольного образца добавляли в шприц для ввода пробы в автоматическом режиме с использованием того же протокола.

Эксперименты ITC (изотермической титрационной калориметрии) проводили с использованием протокола ввода проб ITC, как описано на изотермических графиках (см. фиг. 8А и 8Б), при 25°C и перемешивании при 1000 об/мин.

Данные собирали и анализировали с использованием приложений GE Healthcare ITC программного обеспечения Origin 4.0 и результаты рассчитывали с использованием алгоритма односайтового связывания (по одному сайту).

Было установлено, что значение K_D связывания TNF α с TNF-R в отсутствие любого исследуемого соединения составляет 77 нМ (фиг. 8А). Значение K_D связывания TNF α с TNF-R в присутствии соединения формулы (2) ниже диапазона чувствительности калориметра и поэтому не могло быть точно рассчи-

тано. Однако нижняя граница чувствительности калориметра составляет приблизительно 1 нМ. Следовательно, значение K_D связывания TNF α с TNF-R в присутствии соединения формулы (2) должно составлять 1 нМ или менее (см. фиг. 8Б).

Пример 9. Кристаллическая структура тримера TNF α , связанного с соединением формулы (1).

TNF α предварительно инкубировали с соединением формулы (1) и полученный комплекс соединение-тример кристаллизовали. Кристаллическую структуру комплекса соединение-тример TNF α определяли с использованием рентгеноструктурной кристаллографии. Кристаллическая структура комплекса с разрешением 2,2 Å представлена на фиг. 9. Согласно представленным данным соединение располагается в средней части тримера, который уже не является симметричным.

Пример 10. Нейтрализация TNF α соединениями по изобретению.

Анализы нейтрализации L929 проводили по протоколу, описанному в статье Vaarsch M.J. и др. (J. Immunol. Methods, 140, 15-22 (1991)) и статье Galloway C.J. и др. (J. Immunol. Methods, 140, 37-43 (1991)).

Краткое описание метода: клетки L929 (ECACC, 85011425) культивировали в культуральной среде RPMI 1640 (фирмы Gibco), содержащей 10% ФЭС (фирмы PAA), 2 мМ глутамин (фирмы Gibco), 50 ед./мл пенициллина (фирмы Gibco) и 50 мкг/мл стрептомицина (фирмы Gibco). При пересевании клетки трижды промывали 10 мл фосфатно-солевого буферного раствора Дульбекко без кальция и магния (фирмы Gibco), затем добавляли 3 мл смеси трипсин-ЭДТА (фирмы Gibco) и инкубировали в течение 2 мин для удаления клеток из флакона для культивирования. Затем добавляли культуральную среду для нейтрализации действия трипсина и клетки ресуспендировали пипетированием для разрушения всех агрегатов.

За день до использования клетки L929 разбавляли средой 1/2 или 1/3 и культивировали еще в течение 24 ч. Затем флаконы обрабатывали трипсином, как описано выше, в лунки 96-луночного планшета с плоским дном (фирмы Veston Dickinson) добавляли по 100 мкл среды, содержащей 2×10^4 клеток. Перед проведением анализа планшеты инкубировали в течение 24 ч.

Серийные разведения готовили из исходных растворов соединений в ДМСО. Обычно для получения кривой титровальная по 9-ти точкам из концентрированного раствора соединения готовили 2-кратные серийные разведения, при этом в лунках конечная концентрация составляла 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39, 0,2, 0,1 мкМ.

Среда для анализа представляла собой указанную культуральную среду, но которая также содержала 1 мкг/мл актиномицина D (фирмы Sigma). Среду удаляли из планшета постукиванием, и образцы для анализа плюс TNF α , стандарты и контрольные образцы (объем 100 мкл) добавляли в двух повторах. Затем планшеты инкубировали в течение 16 ч, в лунки добавляли по 10 мкл раствора метилтиазолтетразолина (5 мг/мл, МТТ, фирмы Sigma) в культуральной среде и инкубировали в течение еще 4 ч. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл буферного раствора для солюбилизации, содержащего 20% додецилсульфата натрия (ДСН, фирмы BDH), растворенного в смеси, содержащей 50% диметилформамида (ДМФА, фирмы BDH) и 50% деионизированной воды.

После инкубации в течение ночи при 37°C для растворения красителя планшеты анализировали на ридере для планшетов Multiskan EX (фирмы Labsystem) при 570 нм с вычитанием сигнала при 630 нм. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Genesis.

Соединение формулы (1), а также соединение формулы (2) ингибировали цитотоксическую активность TNF α человека (фиг. 10), что указывало на то, что соединение формулы (1), а также соединение формулы (2) способны ингибировать TNF α человека-индуцированную передачу сигнала через рецептор TNF-R. В этом случае (эксперименте) для соединения формулы (1) значение IC_{50} составляет 306 нМ, а для соединения формулы (2) значение IC_{50} составляет 125 нМ. Протокол повторяли с использованием соединения формулы (3); было установлено, что оно также ингибирует TNF α человека-индуцированную передачу сигнала через рецептор TNF-R, при этом для соединения формулы (3) значение IC_{50} составляет 21 нМ.

Пример 11. Ингибирование TNF α -индуцируемой продуцирования IL-8 соединением формулы (1).

Венозную кровь от здоровых доноров забирали венопункцией в пробирки, содержащие натрий/гепарин (фирмы BD Biosciences). Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл-пак (Ficoll Paque, фирмы Amersham Biosciences). Краткое описание метода: 10 мл крови разбавляли RPMI 1640 (фирмы Gibco) 1:1 (об./об.) и осторожно наносили на 20 мл Ficoll Paque. Клетки центрифугировали в течение 30 мин при 470 g, PBMC собирали, один раз промывали RPMI 1640 и все оставшиеся примеси эритроцитов лизировали в буферном растворе для лизиса эритроцитов (1 г/л $KHCO_3$, 8,3 г/л NH_4Cl , 0,0372 г/л ЭДТА). Выделение моноцитов из PBMC проводили с использованием магнитных частиц CD14+ Magnetic MicroBeads (фирмы Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Краткое описание метода: PBMC ресуспендировали в среде Игла в модификации Дульбекко, содержащей 5% БСА (фирмы Sigma) и 2 мМ ЭДТА (фирмы Sigma), при этом получали суспензию, содержащую 1×10^7 клеток/мл.

Частицы CD14 MicroBeads (25 мкл) инкубировали в присутствии клеток (общее количество -

10 клеток) в течение 15 мин при комнатной температуре. Магнитное разделение проводили с использованием колонки LS (фирмы Miltenyi Biotec). Перед нанесением на колонку смеси клетки/частицы указанную колонку помещали в магнитное поле и дважды промывали 5 мл буферного раствора. Затем клеточную суспензию наносили на колонку в магнитном поле. Моноциты, связывающиеся с частицами CD14+ MicroBeads, удерживались в колонке LS, а оставшиеся PBMC проходили через колонку. Затем для выделения моноцитов колонку (содержащую удерживаемые клетки) удаляли из магнитного поля и помещали в пробирку для сбора образцов. Буферный раствор (5 мкл) наносили на колонку и клетки CD14+ собирали, продвигая поршень шприца в верхнюю часть колонки. Собранные клетки промывали один раз средой RPMI 1640.

11-Точечные 3-кратные серийные разведения (включая контроль) соединений (исходная концентрация - 10 нМ) осуществляли в ДМСО в 96-луночном планшете с круглым дном.

Очищенные моноциты промывали центрифугированием (300 г в течение 5 мин) и ресуспендировали в полной среде, при этом получали суспензию с концентрацией 1×10^6 клеток/мл. В трех повторах указанную популяцию клеток (160 мкл) в присутствии соединений (40 мкл) и TNF α (конечная концентрация ~1 нг/мл) в среде RPMI 1640 или соответствующие контрольные образцы инкубировали при 37°C в 96-луночном планшете с круглым дном.

Через 18 ч планшеты центрифугировали (300 г, 5 мин), супернатанты собирали для определения количества цитокинов.

Количество ИЛ-8 человека в супернатантах клеточной культуры определяли с использованием наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) (фирмы R & D Systems Ltd.) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве субстрата для ИФА использовали TM Blue (фирмы Serologicals Corporation). Планшеты считывали при длине волны 630 нм с учетом поправки при 470 нм. Соединение формулы (1) ингибировало TNF α -индуцируемую продукцию ИЛ-8 в зависимости от концентрации (фиг. 11), при этом значение IC₅₀ составляло 454,1 нМ.

Пример 12. Ингибирование TNF α -индуцируемой активации NF- κ B соединением формулы (2).

Стимуляция клеток HEK-293 под действием TNF α приводит к активации пути NF- κ B. Репортерную клеточную линию, используемую для определения активности TNF α , получали на фирме Invivogen. HEK-BlueTM CD40L представляет собой устойчивый трансфектант, экспрессирующий SEAP (секретируемая щелочная фосфатаза) под контролем минимального промотора IFN- β , слитого с 5 сайтами связывания NF- κ B. Секретия SEAP указанными клетками стимулируется TNF α (0,5 нг/мл), ИЛ-1- β (0,5 нг/мл) и активирующим антителом против TNFR1 человека (300 нг/мл) в зависимости от концентрации.

Соединения (10 мМ исходный раствор в ДМСО) разбавляли (конечная концентрация для анализа образца 0,3%), при этом получали 10-точечные 3-кратные серийные разведения (конечная концентрация от 30000 до 2 нМ). Полученные таким образом образцы смешивали в 384-луночном планшете для микротитрования со стимулирующим лигандом и инкубировали в течение 1 ч. Свежезамороженные и промытые клетки добавляли в смесь соединения/стимуляторы и дополнительно инкубировали в течение 18 ч. Активность SEAP в супернатанте определяли с использованием субстрата Quanti-blue TM для колориметрического анализа (фирмы Invivogen).

Уровень ингибирования (в процентах) для разведений соединения рассчитывали с учетом контроля на основе ДМСО и максимального уровня ингибирования (контрольное соединение в избытке), значение IC₅₀, рассчитывали с использованием xlfit (4-параметрическая логистическая модель) в Activity Base.

Специфическую активность каждого соединения в отношении ответа TNF α сравнивали с активностью, наблюдаемой при обратном скрининге (ИЛ-1 β и антитело против TNFR1 человека).

Соединение формулы (2) ингибировало активацию NF- κ B под действием TNF α , при этом значение IC₅₀ составляет 113 нМ (фиг. 12А). Наоборот, соединение формулы (2) не ингибирует активацию NF- κ B под действием ИЛ-1 β (фиг. 12Б) или антителом, активирующим рецептор TNF-R1 (фиг. 12В). В каждом случае значения IC₅₀ составляли более 30000 нМ. Следовательно, соединение формулы (2) специфически ингибирует TNF α -индуцируемую передачу сигнала через рецептор TNF-R1, но не оказывает влияния на активацию NF- κ B, вызванную другими сигнальными путями (например, ИЛ-1 β), или когда инициация передачи сигналов от рецептора TNF-R1 в результате действия TNF α происходит по обходному пути (например, при использовании антитела, активирующего TNF-R1).

Пример 13. Определение кинетики связывания TNF α .

Метод поверхностного плазмонного резонанса использовали для оценки скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинности соединений формул (1) и (2) в отношении TNF α (фиг. 13А и 13Б). Указанные исследования проводили с использованием установки Biacore T100/T200.

TNF α иммобилизовали при pH 5 на сенсорный чип CM5 в буферном растворе HBS-P (10 мМ HEPES (pH 7,4), 0,15 М NaCl, 0,005% детергента P20, фирмы Biacore, GE Healthcare), при этом уровень иммобилизации составил 5-8 KRU (резонансные единицы). Затем TNF α уравнивали в буферном растворе HBS-P, содержащем 5% ДМСО, в течение по крайней мере 5 ч. Образцы получали разбавлением исходного 10 мМ раствора в ДМСО соответствующим буферным раствором и инкубировали для

солюбилизации по крайней мере в течение 5 ч. Скорость потока составляла 30 мкл/мин.

Указанный анализ проводили при добавлении соединения в 4-х или 5-ти концентрациях, начиная с максимальной концентрации, которая для соединения формулы (1) составляла 25 мкМ, а для соединения формулы (2) составляла 1 мкМ, а затем готовили серийные разведения указанного образца. Кривые связывания с вычитанием фона анализировали с использованием программного обеспечения VIAevaluation. Параметры связывания, аффинности, а также кинетические параметры определяли с использованием программного обеспечения ViaSore. Кинетические параметры определяли с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта.

Согласно полученным экспериментальным данным указанные соединения очень медленно связываются с иммобилизованным TNF α , о чем свидетельствует тот факт, что для соединения формулы (1) значение k_{on} составляет $2,668e^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (фиг. 13A), а для соединения формулы (2) составляет $1,119e^3 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (фиг. 13B). Диссоциация комплексов указанных соединений также характеризуется чрезвычайно медленной скоростью, что является характерным признаком соединений с указанным способом действия. Значение константы скорости диссоциации (k_{off}) для соединения формулы (1) составляет $9,46e^5 \text{ c}^{-1}$, а для соединения формулы (2) составляет $2,24e^5 \text{ c}^{-1}$. Это указывает на то, что при диссоциации период полураспада ($t_{1/2}$) составляет более 2 и 8 ч соответственно. Константу диссоциации (K_D) можно рассчитать по соотношению двух констант k_{off}/k_{on} . В указанном эксперименте значения K_D для соединения формулы (1) и соединения формулы (2) составили 35 и 2 нМ соответственно. Полученные значения значительно ниже, чем значения EC_{50} , определенные на установке ViaSore, как описано в примере 4, что, вероятно, связано с различиями в формате указанных анализов. Кроме того, в анализе кинетических параметров, описанном в примере 13, TNF α используют в другой форме, т.е. в иммобилизованной форме.

Эксперимент повторяли для измерения скорости ассоциации, скорости диссоциации и аффинности связывания TNF α с использованием соединения формулы (3) (фиг. 13B). Было установлено, что для соединения формулы (3) значение константы k_{on} равно $5470 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, константы скорости диссоциации равно $4,067e^5 \text{ c}^{-1}$ и K_D равно 7 нМ.

Пример 14. Соединение формулы (1) и соединение формулы (2) проявляют антагонистическую активность в отношении TNF α *in vivo*.

В отдельных исследованиях соединения формулы (1) и формулы (2) смешивали с 20 мкМ растворами TNF α , растворенным в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ) до концентрации 2, 20 и 200 мкМ. Таким образом, соотношение каждого соединения и TNF α составляло 0,1:1 (образец 1), 1:1 (образец 2) и 10:1 (образец 3). Растворы инкубировали при комнатной температуре в течение 3 ч для связывания соединений с TNF α , затем осуществляли гель-фильтрацию (ГФ) с использованием колонки Zeba Spin для обессоливания (фирмы Thermo Scientific). Указанный процесс обеспечивал разделение соединения, связанного с белком, и свободного соединения. Контрольный образец, содержащий только ФСБ, обрабатывали таким же образом для оценки влияния носителя на данные указанного исследования.

Концентрацию элюируемого белка определяли с использованием набора Nanodrop (ND-1000). Перед нанесением комплексы TNF α /соединение разбавляли ФСБ до концентрации 0,03 мкг/кг.

Обычно испытания проводили с использованием групп, каждая из которых включала 10 самцов мышей Balb/c (фирмы Charles River), за исключением группы, в которой исследовали антитела против TNF α человека (положительный контроль), которая включала 5 мышей. Мышам из контрольной группы с антителами вводили антитела против hTNF α (10 мг/кг, 100 мкл) внутривенной (в/в) инъекцией за 5 мин ($t=-5$) до в/в инъекции ФСБ или hTNF α (0,1 мкг/кг ($t=0$)).

Мышам из исследуемых групп вводили в/в инъекцией ($t=0$) 100 мкл полученных после гель-фильтрации носителя (ФСБ), hTNF α (0,03 мкг/кг) или образцов 1, 2 и 3 (соединение, связанное с TNF α в соотношении 0,1:1, 1:1 и 10:1 соответственно).

В испытания также были включены мыши, которым вводили только соединение, для оценки влияния соединения на приток нейтрофилов.

Всех мышей умерщвляли с использованием цервикальной дислокации через 2 ч после инъекции hTNF α ($t=2$ ч), брюшную полость промывали 3 мкл буферного раствора FACS (500 мл ФСБ, содержащего 2 г бычьего сывороточного альбумина, 6 мл буферного раствора HEPES и 500 мл ЭДТА). Жидкость для промывки отсасывали и оценивали число нейтрофилов, окрашивая клетки реагентами анти-Gr1 PE и анти-CD45 FITC, с использованием метода анализа FACS, как подробно описано ниже.

В пробирку для анализа FACS добавляли аликвотные части (100 мкл) каждого образца промывочной жидкости. Смесь для анализа FACS получали с использованием реагентов анти-GR-1 PE (фирмы BD, номер по каталогу cat# 553128 Lot# 75542) и анти-CD45 FITC (фирмы BD, номер по каталогу cat# 553080 Lot# 80807), которые разбавляли буферным раствором для анализа FACS в соотношении 1/39 и 1/19 соответственно. Препарат, блокирующий Fc (фирмы BD, номер по каталогу Cat# 553142 Lot# 87810), разбавляли буферным раствором для анализа FACS в соотношении 1/10, затем 10 мкл полученного препарата добавляли к каждому образцу за 5 мин до добавления смеси антител. Смесь антител (10 мкл) добавляли в каждую пробирку, содержащую 100 мкл образца. Затем образцы инкубировали в течение 20 мин на ледяной бане. В каждую пробирку добавляли 1 мл лизирующего раствора для анализа

FACS (фирмы BD, номер по каталогу Cat# 349202 Lot# 29076, разбавленный dH₂O в соотношении 1/10), перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем в каждую пробирку добавляли 1 мл буферного раствора для анализа FACS и центрифугировали при 400 g в течение 5 мин, буферный раствор для анализа FACS осторожно выливали, верхнюю часть пробирки промокали фильтровальной бумагой, при этом получали полностью сухие пробирки. Затем в каждую пробирку добавляли 300 мкл раствора стандартных частиц (фирмы Sigma, номер по каталогу cat# P2477 Lot# 116K1612), разбавленных буферным раствором для анализа FACS в соотношении 1/10.

Образцы анализировали с использованием программного обеспечения FACScalibur II и FloJo.

На фиг. 14 представлены результаты для соединения формулы (1) (А) и соединения формулы (2) (Б). Носитель в отдельности оказывал незначительное влияние на приток нейтрофилов, как и соединение (несколько выше в случае (Б)). Данные для образца 1 из каждого исследования (соотношение соединение/TNF α - 0,1:1) существенно не отличались от данных исследования, когда добавляли TNF α в отсутствие соединения. Образец 2 (1:1) и образец 3 (10:1) характеризовались значительным ингибированием притока нейтрофилов (86 и 85% соответственно). Аналогичным образом образец 2 и образец 3 соединения формулы (2) характеризовались значительным ингибированием притока нейтрофилов (101 и 102% соответственно). У мышей из контрольной группы с антителами уровень ингибирования притока нейтрофилов составил 100% (данные не показаны).

В другом эксперименте hTNF α (0,3 мкг/мл) и соединение формулы (1) вводили мышам перорально (п/о).

Соединение формулы (1) получали в виде суспензии в 1%-ной метилцеллюлозе (носитель).

В указанном исследовании в качестве положительного контроля также использовали моноклональные антитела против TNF α человека (анти-hTNF, фирмы UCB).

Каждая группа включала десять самцов мышей Balb/c за исключением группы, в которой мышам вводили анти-hTNF α и которая включала 4 особи.

За 30 мин (t=-30) до инъекции TNF α человека мышам перорально (п/о) вводили 100 мкл носителя (1% метилцеллюлоза) или соединение формулы (1) в дозе 30 или 100 мг/кг или за 5 мин (t=-5) до инъекции TNF α человека вводили в/б анти-hTNF α в дозе 10 мг/кг. В момент времени t=0 мышам вводили в/б 100 мкл ФСБ или hTNF α в дозе 0,03 мкг/кг.

Всех мышей умерщвляли с использованием цервикальной дислокации через 2 ч после инъекции hTNF α (t=2 ч), брюшную полость промывали и оценивали число нейтрофилов, как описано выше.

Пероральное введение (п/о) соединения формулы (1) в дозе 30 и 100 мг/кг снижало стимулирующую активность TNF α в отношении притока нейтрофилов в брюшной полости на 49 и 79% соответственно (фиг. 15). Антитела (положительный контроль, 10 мг/кг), которые вводили в/б, полностью ингибировали накопление нейтрофилов.

Таким образом, соединение формулы (1) может проявлять антагонистическую активность в отношении активности TNF α in vivo не только при предварительном смешивании с TNF α при введении в/б, но также при его введении п/о.

Пример 15. Анализ стабилизации тримера TNF α соединениями формул (1) и (2).

Анализ термической денатурации с флуоресцентным зондом проводили для оценки влияния соединений на термостабильность TNF α как меры связывания соединения. Реакционная смесь содержала 5 мкл 30 \times SYPRO[®] Orange (фирмы Invitrogen) и 5 мкл TNF α (1,0 мг/мл), 37,5 мкл ФСБ (pH 7,4) и 2,5 мкл соединения (2 мМ в ДМСО). 10 мкл смеси в четырех повторах распределяли в оптическом 384-луночном планшете для ПЦР и анализировали на установке для ПЦР в реальном времени 7900HT Fast (фирмы Agilent Technologies). Систему нагрева установки для ПЦР настраивали в диапазоне от 20 до 99 $^{\circ}$ C, при этом скорость линейного изменения температуры составляла 1,1 $^{\circ}$ C/мин, изменение флуоресценции в лунках контролировали устройством с зарядовой связью (CCD). Строили графики зависимости повышения интенсивности флуоресценции от температуры, T_m рассчитывалась по точке, расположенной в середине указанной кривой денатурации (точка перегиба) (таблица ниже).

Стабилизацию TNF α оценивали по увеличению величины T_m. Соединения формул (1) и (2) повышали величины T_m TNF α (данные представлены в таблице ниже). Следовательно, соединения формул (1) и (2) повышают стабильность тримера TNF α .

Средняя точка температурного перехода (T_m) TNF α в присутствии соединения (1) или (2)

Образец	T _m (°C) (среднее значение \pm среднеквадр. отклонение)	Разница значений T _m (= (TNF + соединение) – (TNF + ДМСО))
TNF α + 5% ДМСО	61,4 \pm 0,86 (n = 13)	-
TNF α + 5% ДМСО + соединение (1)	73,2 \pm 0,6 (n = 4)	11,8
TNF α + 5% ДМСО + соединение (2)	78,5 \pm 1,1 (n = 4)	17,1

Пример 16. Флуоресцентный поляризационный анализ для определения влияния (эффекта) соединений формулы (1), (2) и (3) на связывание соединения формулы (4) с TNF α .

Соединение формулы (1) исследовали при 10 концентрациях, начиная с концентрации 100 мкМ, при этом конечная концентрация ДМСО составляла 5%, при этом перед добавлением соединения формулы (4) и дополнительной инкубацией при температуре окружающей среды в течение ночи соединение предварительно инкубировали в присутствии TNF α в течение 60 мин при температуре окружающей среды в 20 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,05% Твин 20. Конечные концентрации TNF α и соединения формулы (4) составляли 50 и 10 нМ соответственно, при этом общий объем анализируемого образца составлял 25 мкл. Планшеты считывали на ридере Analyst HT. Значения IC₅₀ рассчитывали с использованием xfit (4-параметрическая логистическая модель) в Activity Base.

Результаты представлены на фиг. 16 в виде графиков. Соединение формулы (1) способно ингибировать связывание соединения формулы (4) с TNF α , при этом значение IC₅₀ составляло 167 нМ.

Эксперимент повторяли с использованием соединений формулы (2) и (3). Соединение формулы (2) способно ингибировать связывание соединения формулы (4) с TNF α , при этом значение IC₅₀ составляло 102 нМ. Соединение формулы (3) способно ингибировать связывание соединения формулы (4) с TNF α , при этом значение IC₅₀ составляло 20 нМ.

Пример 17. Предварительные исследования других членов суперсемейства TNF.

Согласно данным масс-спектрометрического анализа CD40L, который также образует гомотримеры, дестабилизируется в ДМСО, что приводит к снижению количества тримерного CD40L. Используемый протокол анализа был таким же, как протокол, описанный в примере 3 для TNF α , но вместо TNF α использовали CD40L. Было установлено, что соединение формулы (1) стабилизирует тримерный CD40L в присутствии ДМСО (см. фиг. 17). Полученные результаты свидетельствуют о том, что масс-спектрометрические методы исследования TNF α , его конформации в присутствии дестабилизирующих агентов, а также эффектов соединений по изобретению, можно использовать для исследования других членов суперсемейства TNF.

Пример 18. Соединения и комплексы, описанные в статьях Ma и др. (2014) и Silvian и др. (2014), по своим свойствам отличаются от соединений по настоящему изобретению.

Согласно данным, представленным на странице 12458 в статье Ma и др. (JBC, 289, 12457-12466 (2014)), соединение C87 было выявлено в ходе виртуального скрининга, целью которого был поиск молекул, размер которых соответствует пространству, занимаемому 7-членным пептидом из петли 2/домена 2 TNFR1, при его взаимодействии с внешней поверхностью TNF β . Соединение C87, описанное в статье Ma и др., и соединение BI08898, описанное в статье Silvian и др. (ACS Chemical Biology, 6, 636-647 (2011)), были исследованы авторами настоящего изобретения.

Кратное изложение полученных результатов.

Результаты анализа Viacore в отношении 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 C87 не наблюдалось.

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

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

По данным термического флуоресцентного анализа, который позволяет оценить стабилизацию температуры плавления TNF α , наблюдается небольшая стабилизация для C87.

Таким образом, не было найдено никаких доказательств того, что соединение C87 связывается в центре тримера. Подавляющее большинство данных не указывало на прямое взаимодействие с TNF α . Было также обнаружено, что BI08898 не связывается с TNF α .

Анализ с использованием репортерного гена NF κ B клеток HEK, индуцированных TNF.

Перед добавлением к клеткам HEK-293, стабильно трансфектированным SEAP под контролем NF κ B, соединение C87 предварительно инкубировали с TNF α в течение 1 ч. Проводили также соответствующий обратный скрининг для детектирования отсутствия связывания с мишенью (т.е. активности, которая не связана с TNF). Перед оценкой уровня ингибирования по сравнению с 100%-ной блокировкой контрольным соединением исследуемый образец инкубировали в течение ночи. Максимальная концентрация C87 составляла 10000 нМ, анализ проводили с использованием 3-кратных серийных разведений.

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

Анализ Viacore.

TNF иммобилизовали с использованием линкера avi-tag и соединение C87 пропускали через чип. В одном эксперименте дозозависимый эффект оценивали с использованием C87 в максимальной концентрации, которая составляла 10 мкМ. Никакого связывания обнаружить не удалось.

Во втором эксперименте скорость потока раствора C87, пропускаемого через чип, снижали. Наблю-

дался небольшой сдвиг сигнала, но общее связывание оставалось на пренебрежимо низком уровне.

Связывание С87 с TNF, описанное в статье Ма 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 α методом SPR (поверхностный плазмонный резонанс) на установке Biacore 4000. При связывании с CD40L среднее геометрическое IC₅₀ составляет 17 мкМ, при этом по данным указанного анализа связывание с TNF α в концентрации вплоть до 100 мкМ не наблюдалось.

Масс-спектрометрия.

Данных связывания С87 (400 мкМ) с TNF α 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 С87 с TNF α , включая условия исследований, 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 α в течение 1 ч. Конкуренцию с флуоресцентным соединением при прямом (связывание с тем же сайтом) или косвенном (нарушение TNF) связывании оценивали по снижению уровня FP.

При экстраполяции кривой ингибирования было установлено, что IC₅₀ составляет приблизительно 100 мкМ. Однако тушение 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.

Термический флуоресцентный анализ позволяет оценить изменение температуры плавления (T_m) TNF α в результате взаимодействия с соединением, стабилизирующим или изменяющим конформацию белка. Стабилизирующий эффект при использовании 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 модулирует передачу сигнала тримерным белком, который является членом суперсемейства фактора некроза опухоли (TNF), через необходимый рецептор, причем соединение представляет собой низкомолекулярное соединение с молекулярной массой 1000 Да или менее и способ включает

проведение анализа для определения средней температуры термического перехода (T_m) тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце, содержащем член суперсемейства TNF и соединение;

сравнение T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце с контрольным образцом, который включает член суперсемейства TNF в отсутствие соединения; и

а) выбор соединения, которое повышает T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF по сравнению с T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF в отсутствие соединения; и

б) контактирование рецепторов суперсемейства TNF как с членом суперсемейства TNF, так и с комплексом соединение-тример и детектирование предотвращения или снижения передачи сигнала тримера суперсемейства TNF через рецептор суперсемейства TNF под действием исследуемого соединения.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий

а) проведение анализа образца, содержащего член суперсемейства TNF и соединение, методом масс-спектрометрии для определения количества тримера члена суперсемейства TNF;

б) сравнение количества тримера члена суперсемейства TNF в образце с количеством в контрольном образце в отсутствие соединения; и

в) выбор соединения, которое повышает долю тримера по сравнению с долей тримера в контрольном образце.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий

а) проведение анализа связывания лиганда с рецептором, в ходе которого образец, содержащий

член суперсемейства TNF и соединение, наносят на необходимый рецептор TNF, который связан с поверхностью;

б) сравнение количества тримера члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором TNF, с контрольным образцом в отсутствии соединения; и

в) выбор соединения, которое повышает количество члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, по сравнению с количеством члена суперсемейства TNF, связанного с необходимым рецептором, в контрольном образце.

4. Способ по п.1, дополнительно включающий

а) проведение анализа методом поляризационной флуоресценции с использованием соединения и флуоресцентно помеченного соединения-зонда, которое известно как модулирующее передачу сигнала; и

б) сравнение степени поляризации соединения-зонда в присутствии соединения со степенью поляризации в контрольном образце в отсутствии соединения или в контрольном образце, который содержит известное модулирующее соединение.

5. Способ по любому одному из пп.1-4, где образец, содержащий член суперсемейства TNF и соединение, дополнительно содержит дестабилизирующий агент, причем предпочтительно дестабилизирующий агент представляет собой диметилсульфоксид (ДМСО).

6. Способ по п.1, дополнительно включающий

а) проведение изотермического калориметрического анализа для определения связывающей аффинности члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором в присутствии соединения;

б) сравнение связывающей аффинности члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором TNF с контрольным образцом в отсутствии соединения; и

в) выбор соединения, которое повышает связывающую аффинность члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором по сравнению с контролем.

7. Способ по п.1, дополнительно включающий

а) проведение анализа для определения связывающей аффинности (K_{D-r}) тримерной формы члена суперсемейства TNF в отношении рецептора суперсемейства в образце, содержащем член суперсемейства TNF и соединение;

б) сравнение K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце с контрольным образцом в отсутствии соединения; и

в) выбор соединения, которое снижает K_{D-r} тримерной формы члена суперсемейства TNF в образце по сравнению с контролем.

8. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где увеличение стабильности приводит к повышению величины T_m тримерной формы члена суперсемейства TNF

а) по крайней мере на 1°C ;

б) по крайней мере на 10°C ; или

в) находится в интервале от 10 до 20°C .

9. Способ по п.7, где соединение повышает связывающую аффинность члена суперсемейства TNF с необходимым рецептором за счет повышения скорости ассоциации (k_{on-r}) и/или снижения скорости диссоциации (k_{off-r}), предпочтительно за счет повышения скорости ассоциации (k_{on-r}) по сравнению с величинами k_{on-r} и k_{off-r} для связывания члена суперсемейства TNF с его рецептором в отсутствии соединения.

10. Способ по п.7 или 9, где

i) соединение снижает величину K_{D-r} члена суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора по крайней мере в 10 раз по сравнению с величиной K_{D-r} члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора в отсутствии соединения;

ii) величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с необходимым рецептором в присутствии соединения составляет менее чем 10 нМ.

11. Способ по п.7 или 9, где

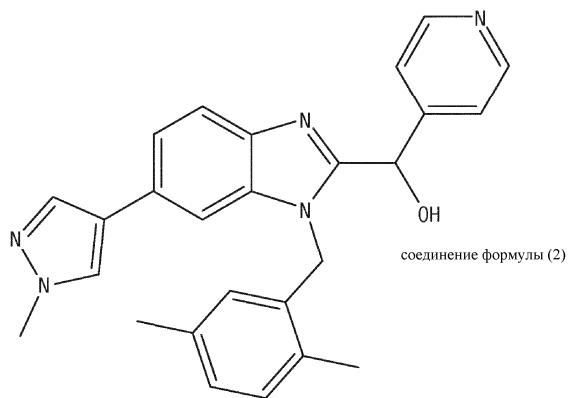
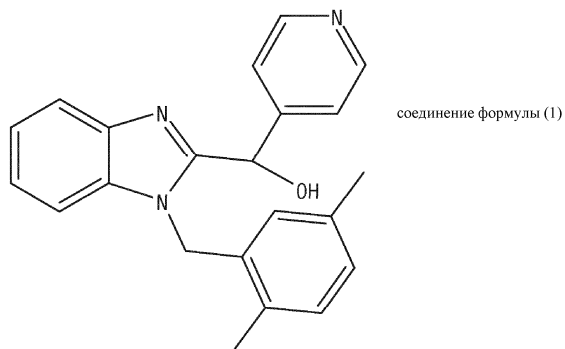
i) соединение снижает величину K_{D-r} члена суперсемейства TNF в отношении необходимого рецептора по крайней мере в 4 раза по сравнению с величиной K_{D-r} члена суперсемейства TNF в отношении его рецептора в отсутствии соединения;

ii) величина K_{D-r} члена суперсемейства TNF для связывания с необходимым рецептором в присутствии соединения составляет менее 600 пМ, предпочтительно менее 200 пМ.

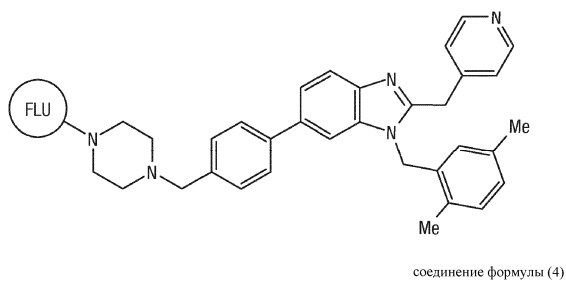
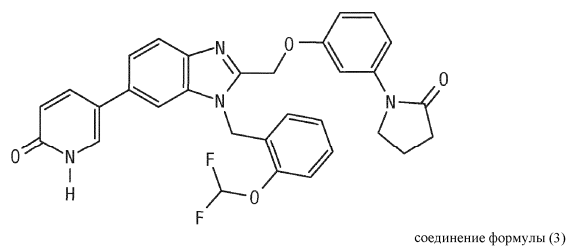
12. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где величина IC_{50} для указанного соединения составляет 500 нМ или менее.

13. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, где членом суперсемейства TNF является $TNF\alpha$, а рецептором является рецептор TNF.

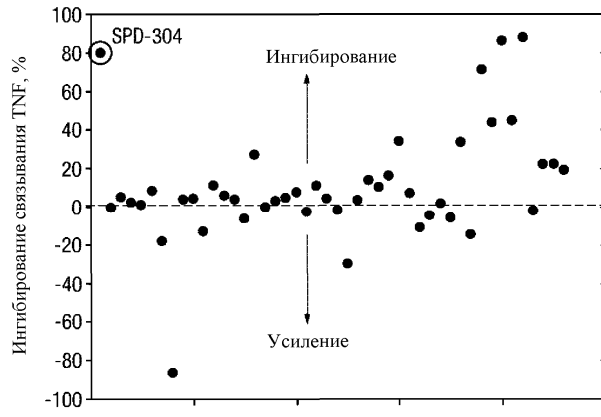
042619



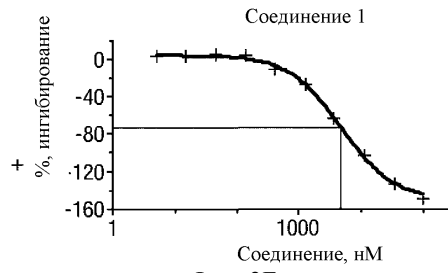
Фиг. 1



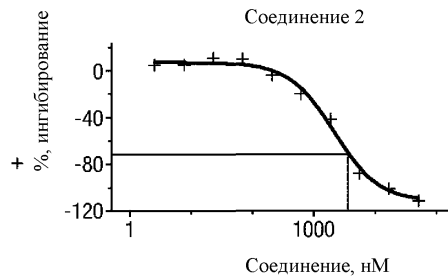
Фиг. 2



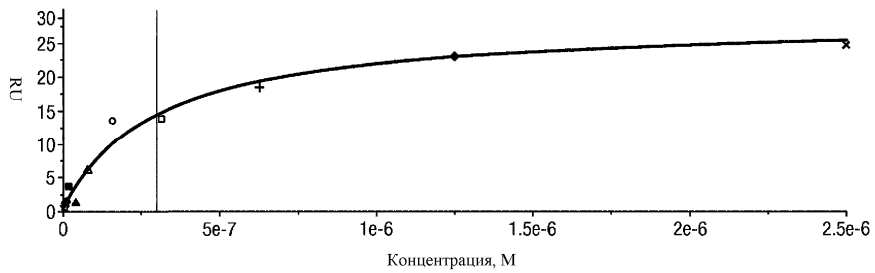
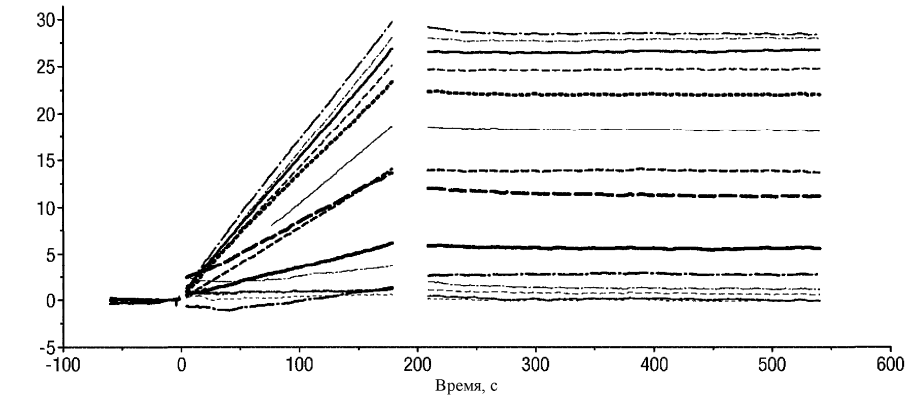
Фиг. 3А



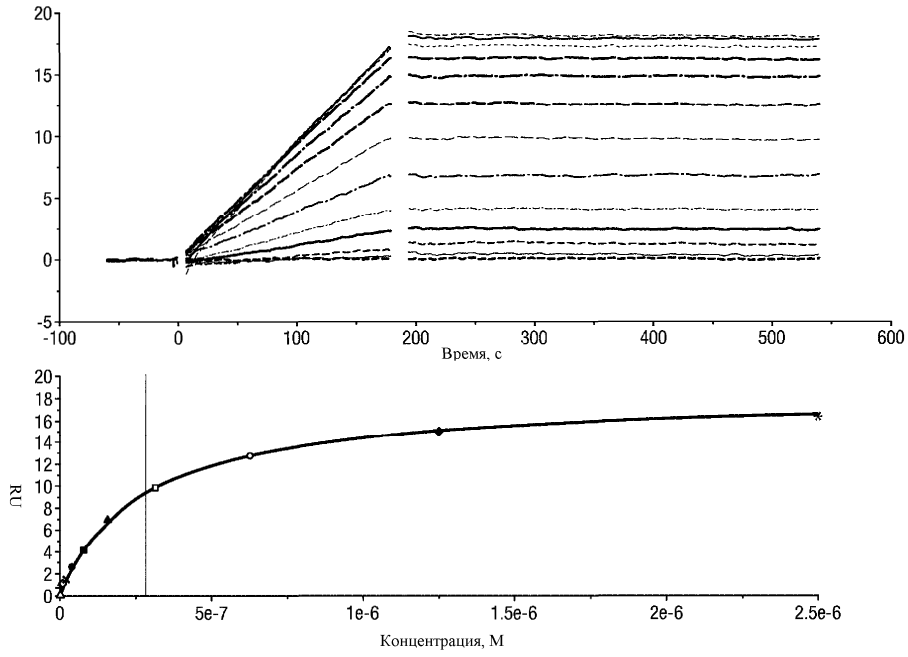
Фиг. 3Б



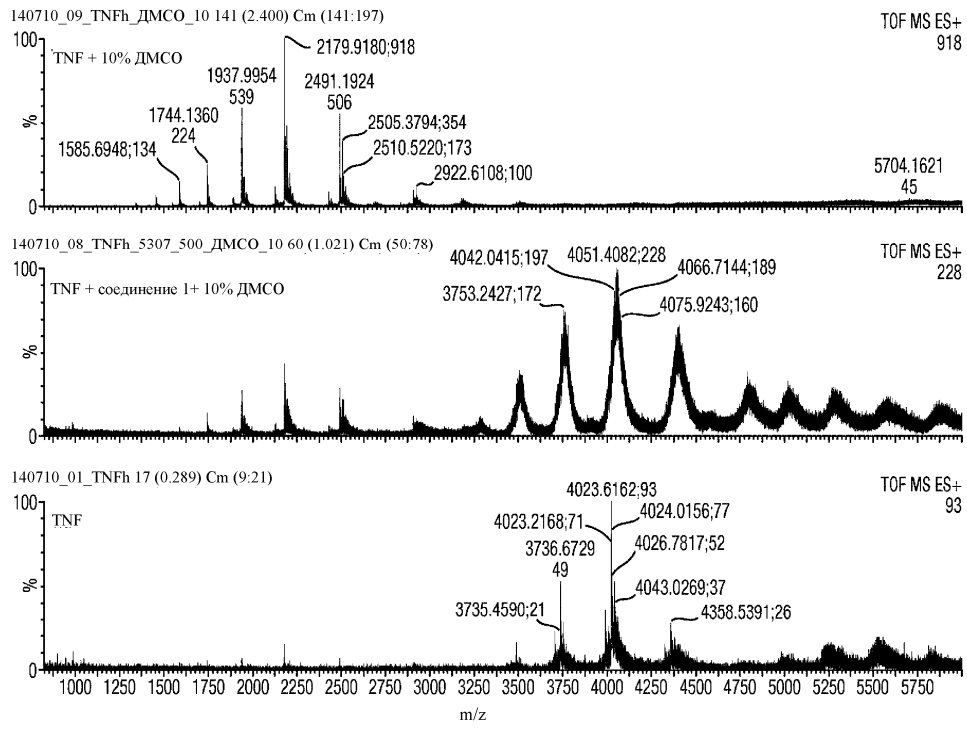
Фиг. 3В



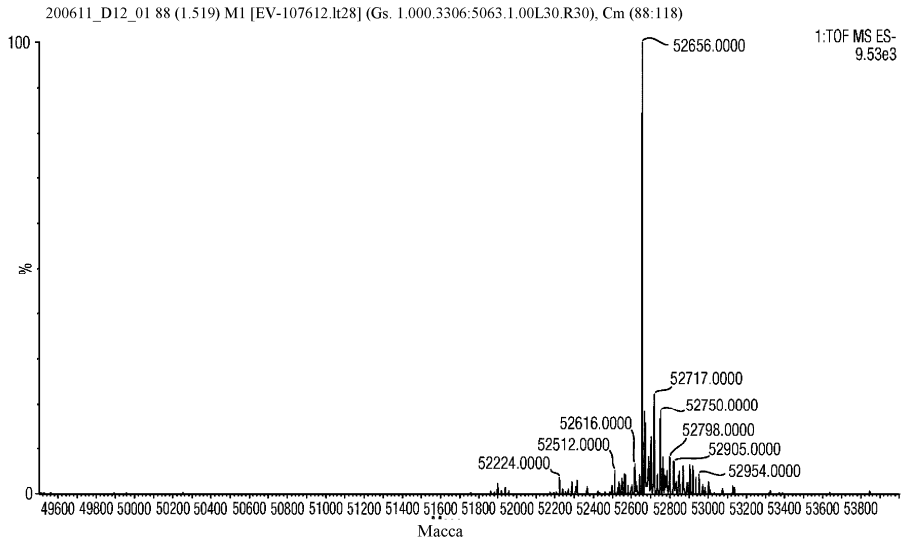
Фиг. 4А



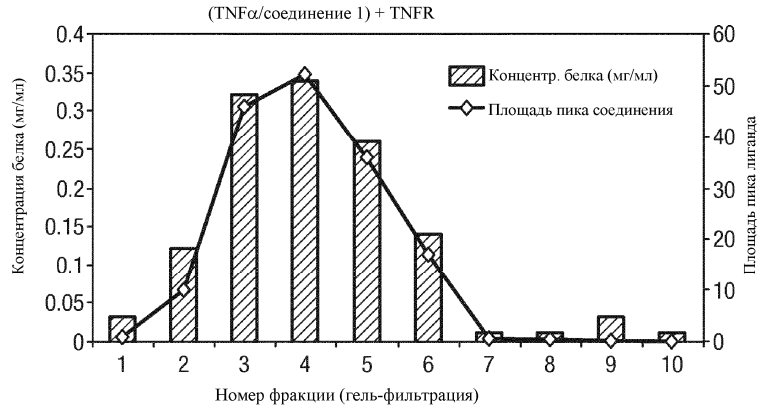
Фиг. 4Б



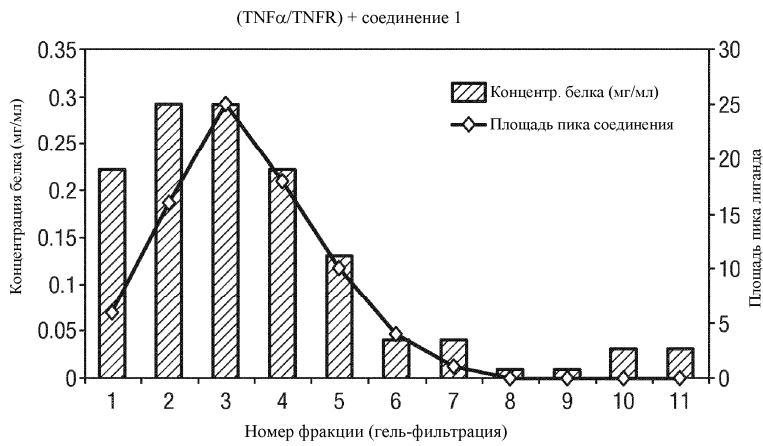
Фиг. 5



Фиг. 6

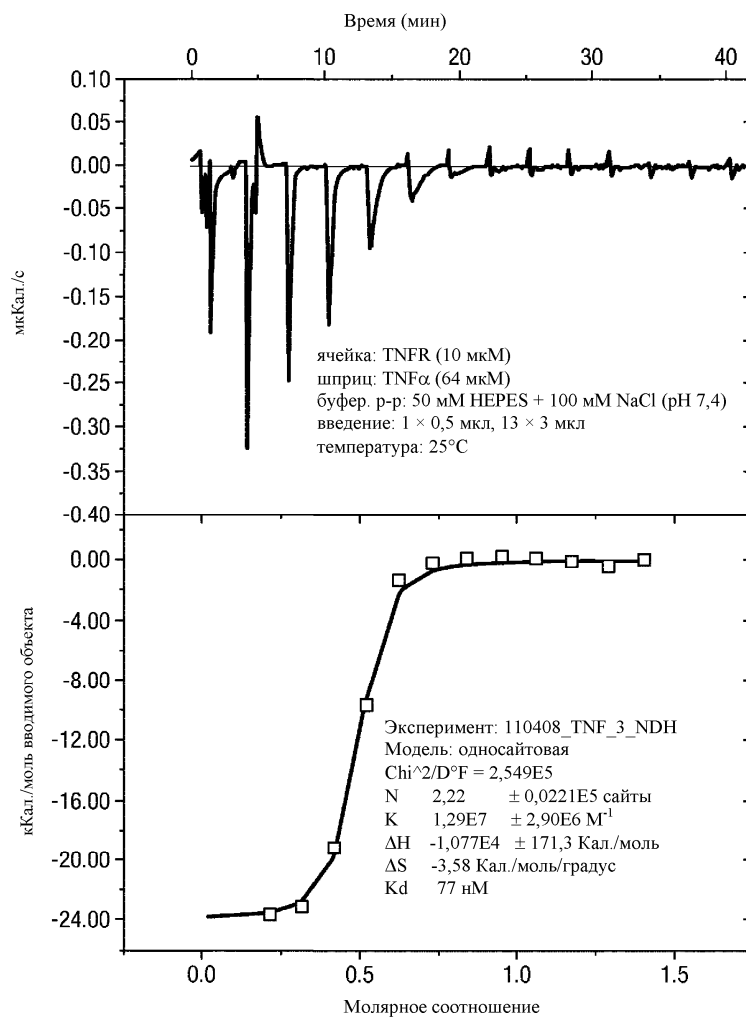


Фиг. 7А

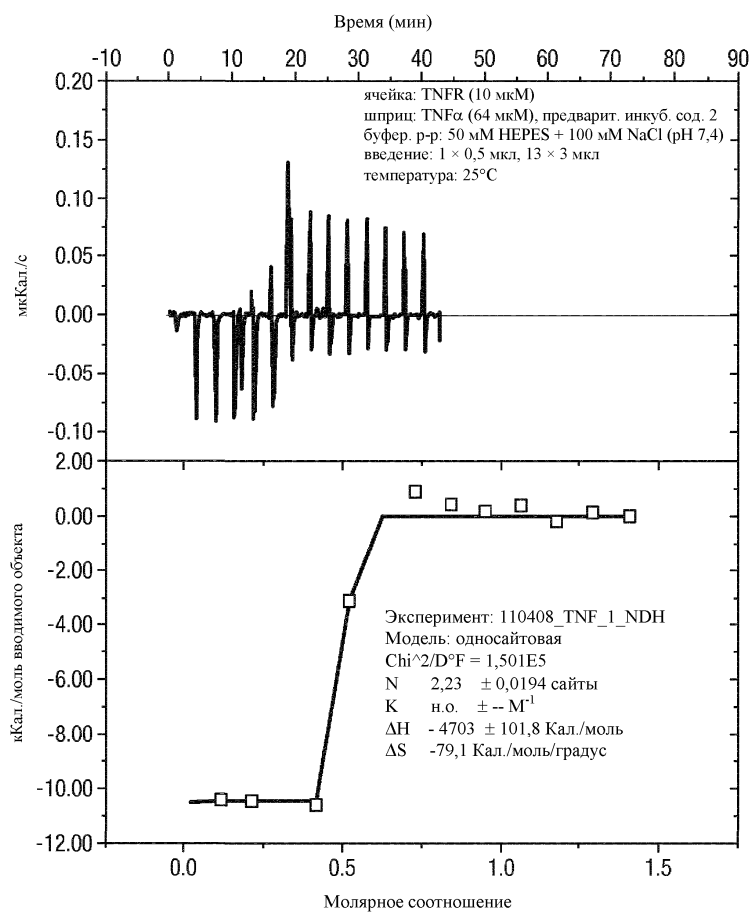


Фиг. 7Б

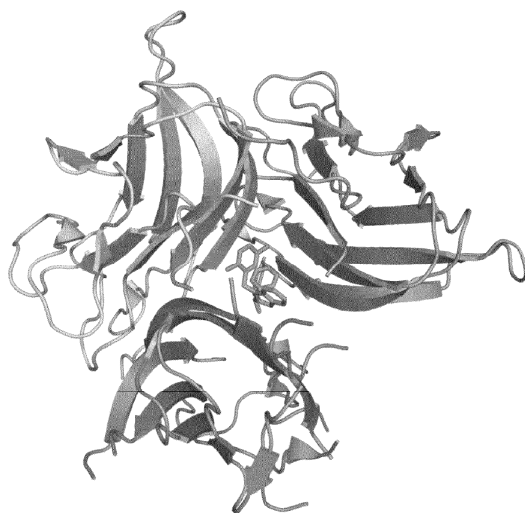
042619



Фиг. 8А

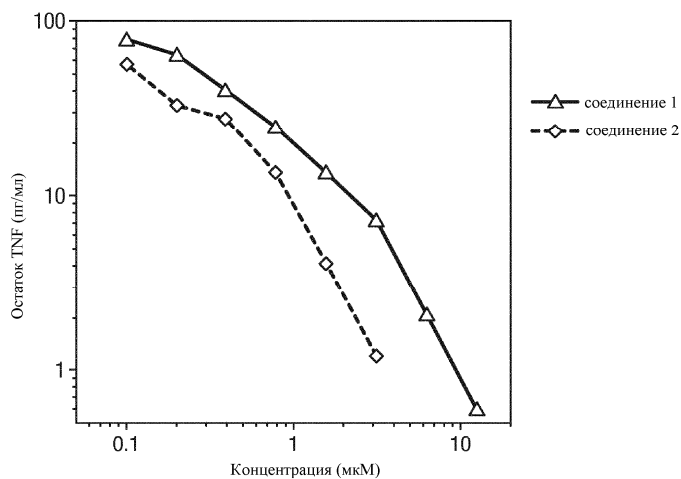


Фиг. 8Б



Фиг. 9

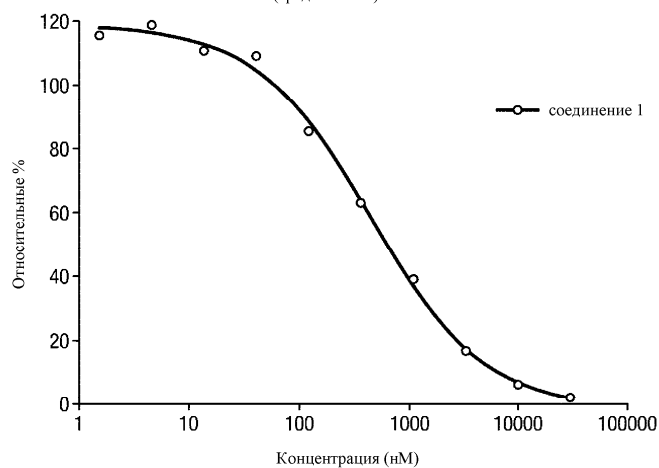
Нейтрализация TNF человека в биоанализе L929



	IC ₅₀ (нМ)
Соединение 1	306
Соединение 2	125

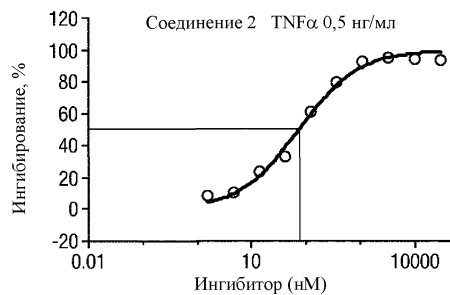
Фиг. 10

IL-8
(среднее n = 3)

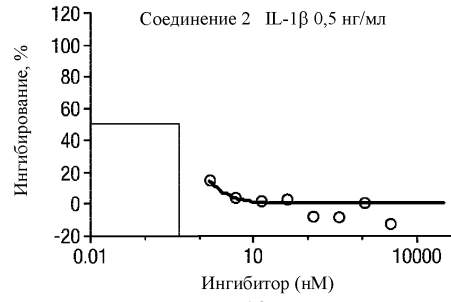


	Соединение 1
IC ₅₀	454,1

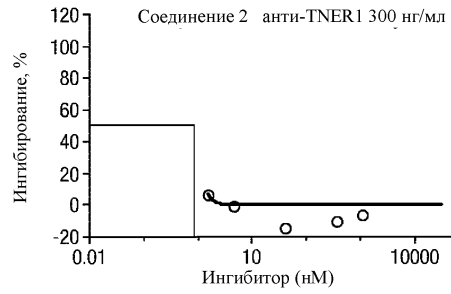
Фиг. 11



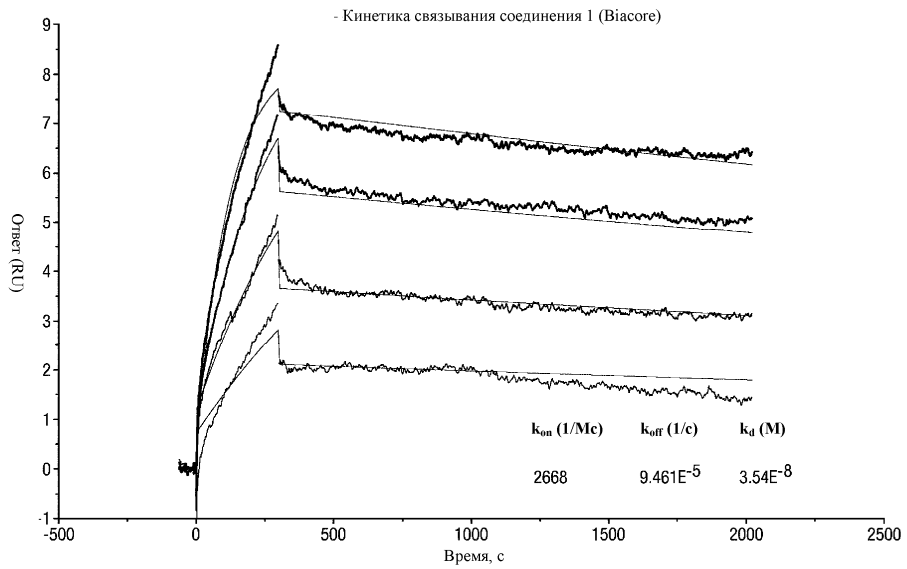
Фиг. 12А



Фиг. 12Б



Фиг. 12В

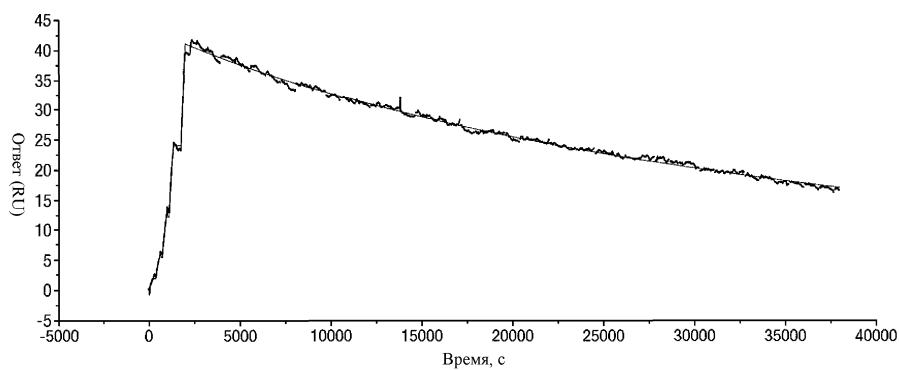


Фиг. 13А



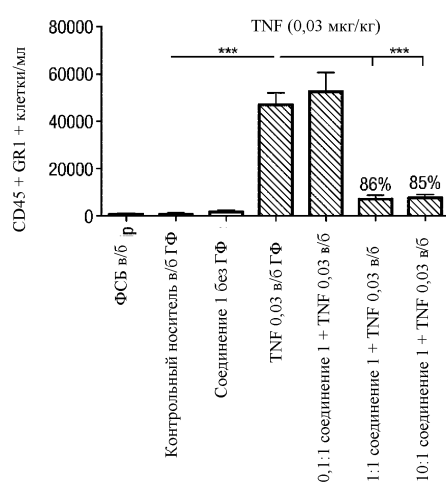
Фиг. 13Б

Кинетика связывания соединения 3 (Biacore)

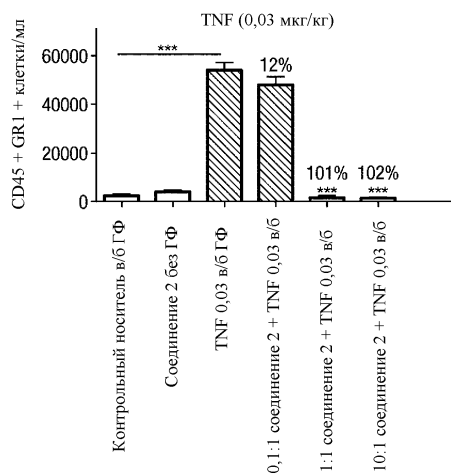


k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_d (М)
5470	$4.067E^{-5}$	$7E^{-9}$

Фиг. 13В

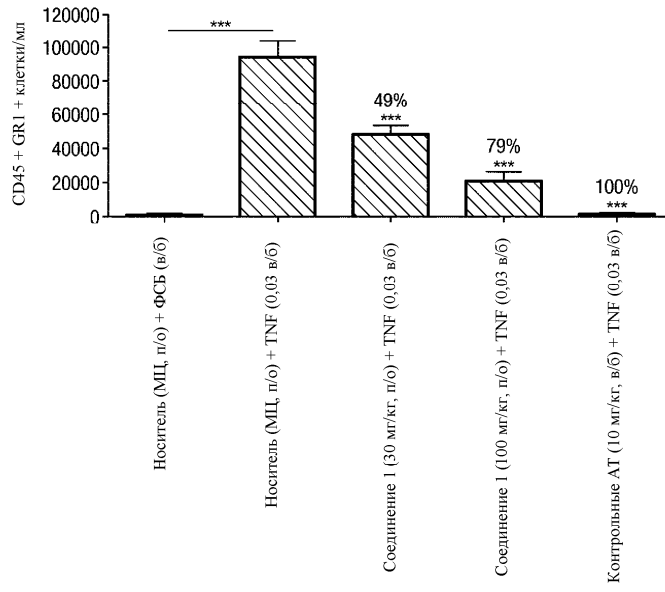


Фиг. 14А



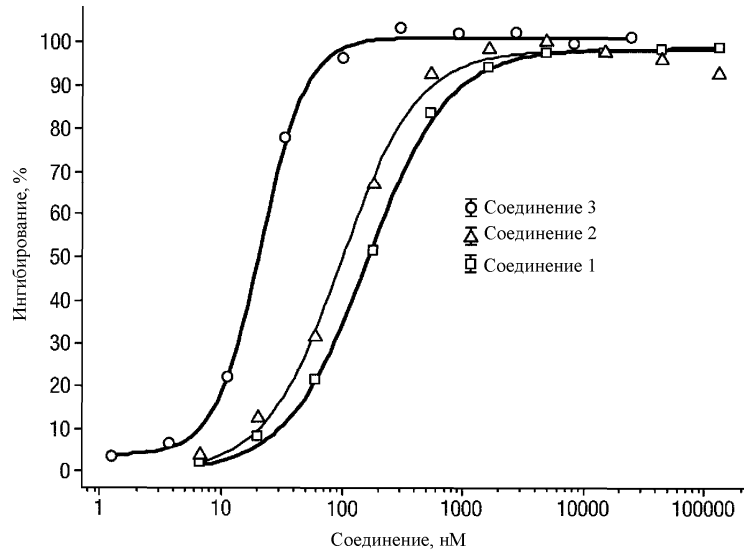
Фиг. 14Б

Влияние соединения 1 (п/о) на индуцируемый hTNF (0,03 мкг/кг) приток нейтрофилов

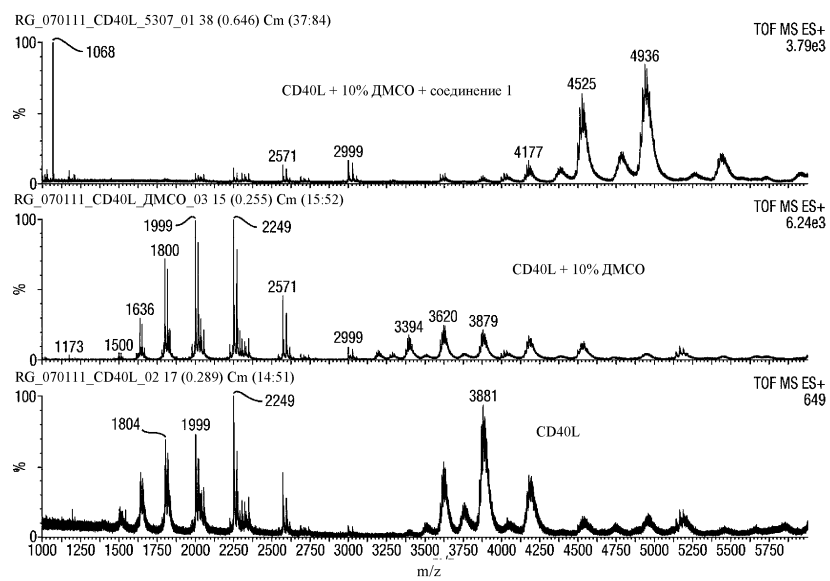


n = 10/группа

Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

