

Ця заявка заявляє привілеї попередньої [заявки США під серійним №60/199655, зареєстрованої 25 квітня 2000 року, попередньої заявки США під серійним №60/238057, зареєстрованої 25 жовтня 2000 року].

Представлений винахід загалом стосується фосфатидилінозит-3-кіназних (PI3K) ферментів, а точніше селективних інгібіторів активності PI3K та способів використання таких матеріалів.

Передачу сигналів клітинами шляхом 3'-фосфорилованих фосфоінозитидів залучено у різноманітність клітинних процесів, наприклад, злоякісну трансформацію, передачу сигналів фактору росту, запалення, та імунітет [дивися Rameh et al., J. Biol. Chem., 274:8347-8350 (1999)], для огляду. Фермент, відповідний за отримання цих фосфорилованих передаючих сигналів продуктів, фосфатидилінозит-3-кіназа (PI-3-кіназа; PI3K), був спочатку ідентифікований за активністю, асоційованою з вірусними онкобілками та тирозин-кіназами рецептору фактору росту, що фосфорилюють фосфатидилінозит (PI) та його фосфориловані похідні по 3'-гідроксилу кільця інозиту Panayotou et al., Trends Cell Biol 2; 358-60 (1992)].

Рівні фосфатидилінозит-3,4,5-трифосфату (PIP<sub>3</sub>), первинного продукту активації PI-3-кінази, зростають при обробці клітин різноманітністю агоністів. Активацію PI-3-кінази, тому, можна думати, включено у ряд клітинних реакцій, включаючи ріст, диференціацію та апоптоз клітин [Parker et al., Current Biology, 5:577-99 (1995); Yao et al., Science, 267:2003-05 (1995)]. Хоча нижчезрозташовані цілі фосфорилованих ліпідів, утворених після активації PI-3-кіназ, добре визначені, нові свідчення свідчать, що білки, які містять плекстрин-гомологічний домен та FYVE-фінгерний домен, активуються при зв'язуванні з різними фосфатидилінозит-ліпідами [Stemmark et al., J. Cell Sci., 112:4175-83 (1999); Lemmon et al., Trends Cell Biol., 7:237-42 (1997)] in vitro, деякі ізоформи білкової кінази C (PKC) безпосередньо активуються PIP<sub>3</sub>, а споріднена з PKC білкова кіназа, PKB, як показано, активується PI-3-кіназою [Burgering et al., Nature, 375:599-602 (1995)].

Зараз родину PI-3-кіназних ферментів розділяють на три класи на основі їх субстратної специфічності. PI3K класу I можуть фосфорилювати фосфатидилінозит (PI), фосфатидилінозит-4-фосфат, та фосфатидилінозит-4,5-дифосфат (PIP<sub>2</sub>) для отримання фосфатидилінозит-3-фосфату (PIP), фосфатидилінозит-3,4-дифосфату, та фосфатидилінозит-3,4,5-трифосфату, відповідно. PI3K класу II фосфорилюють PI та фосфатидилінозит-4-фосфат, а PI3K класу III можуть фосфорилювати тільки PL.

Початкова очистка та молекулярне клонування PI-3-кінази виявило, що вона є гетеродимером, що складається з субелементів p85 та p110 [Otsu et al., Cell, 65:91-104 (1991); Hiles et al., Cell, 70:419-29 (1992)]. Пізніше ідентифіковано чотири окремих PDK класу L, позначені як PDK  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , та  $\gamma$ , кожна з яких складається з відмінних каталітичного субелементу та регуляторного субелементу розміром 110кДа. Точніше, кожний з трьох каталітичних субелементів, тобто, p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  та p110 $\delta$ , взаємодіє з тим же самим регуляторним субелементом, p85; а p110 $\gamma$  взаємодіє з відмінним регуляторним субелементом, p101. Як далі описано, характер експресії кожного з цих PI3K у клітинах та тканинах людини також відмінний. Хоча у недавньому минулому накопичено надлишок інформації стосовно клітинних функцій PI-3-кінази взагалі, роль кожної окремої ізоформи значною мірою невідома.

Клонування коров'ячого p110 $\alpha$  описано. Цей білок ідентифікований як споріднений з білком *Saccharomyces cerevisiae*: Vps34p, білком, залученим у вакуолярну переробку білку. Продукт рекомбінантного p110 $\alpha$ , як також показано, асоційований з p85a, даючи активність PI3K у трансфектованих клітинах COS-1. [Дивися Hiles et al., Cell, 70:419-29 (1992)].

Клонування другої ізоформи p110 людини, позначеної як p110 $\beta$ , [описано Hu et al., Mol Cell Biol, 13:7677-88 (1993)]. Ця ізоформа, як показано, асоційована у клітинах з p85 та експресується усюди, оскільки мРНК p110 $\beta$  знайдено у ряді тканин людини та миші, а також у ендотеліальних клітинах пупочної вени людини, лейкоцитних Т-клітинах Джурката людини, ембріональних ниркових клітинах 293 людини, фібробластах миші 3T3, клітинах HeLa та клітинах карциноми сечового міхура NBT2 щурів. Така широка експресія свідчить, що ця ізоформа є дуже важливою у шляху передачі сигналів.

Ідентифікацію ізоформи p110 $\delta$  PI-3-кінази [описано Chantry et al., J Biol Chem, 272:19236-41 (1997)]. Спостерігали, що ізоформа p110 $\delta$  людини експресується тільки у тканинах. Вона експресується у високих рівнях у лімфоцитах та лімфоїдних тканинах, підтверджуючи, що білок може грати роль у опосередкованій PI-3-кіназою передачі сигналів у імунній системі. Детальний опис ізоформи p110 $\delta$  також можна знайти [у патентах США №5858753; 5822910; та 5985589]. [Дивися також, Vanhaesebroeck et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:4330-5 (1997) та міжнародну публікацію WO 97/46688].

У кожному з підтипів PI3K $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\delta$ , субелемент p85 впливає на локалізацію PI-3-кінази протоплазми мембран взаємодією його домену SH2 з фосфорилованими залишками тирозину (наявними у прийнятному оточенні послідовності) у цільових білках [Rameh et al., Cell, 83:821-30 (1995)]. Дві ізоформи p85 ідентифіковані, p85a, який експресується усюди, та p85 $\beta$ , яку спершу знайдено у мозку та лімфоїдних тканинах [Volinia et al, Oncogens, 7:789-93 (1992)]. Асоціація субелементу p85 з каталітичними субелементами p110 $\alpha$ ,  $\beta$ , або  $\delta$  PI-3-кінази виявляється потрібною для каталітичної активності та стабільності цих ферментів. На додаток, приєднання білків Ras також регулює з підвищенням активність PI-3-кінази.

Клонування p110 $\gamma$  виявило наступну складність у родині PI3K ферментів (Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)). Ізоформа p110 $\gamma$  є тісно спорідненою з p110 $\alpha$  та p110 $\beta$  (45-48% ідентичності у каталітичному домені), але не призводить до використання p85 як цільового субелементу. Замість цього p110 $\gamma$  містить додатковий домен, позначений як "плекстрин (pleckstrin)-гомологічний домен" поблизу свого амінозакінчення. Цей домен дає змогу взаємодії p110 $\gamma$  з субелементами  $\beta\gamma$  гетеротримерних G-білків та ця взаємодія призводить до регулювання їх активності.

Регуляторний субелемент p101 для PIBK-гама спочатку клонували у свині, а далі ідентифіковано ортолог людини [Krugmann et al, J. Biol. Chem, 274:17152-8 (1999)]. Взаємодія між N-термінальним регіоном p101 з N-термінальним регіоном p110 $\gamma$  є, виявляється, критичною для активації PI3K $\gamma$  через згаданий вище G $\beta\gamma$ .

Значно активний поліпептид PI3K є описаним [у міжнародній публікації WO 96/25488], яка розкриває отримання химерного конденсованого білку, у якому фрагмент зі 102-залишків p85, відомий як регіон інтер-SH2 (iSH2), є конденсованим через лінкерний регіон з N-закінченням мишачого p110. Домен p85 iSH2

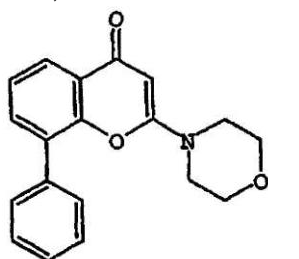
ймовірно є здатним активувати PI3K активністю способом, порівнюваним з недоторканим p85 [Klippel et al., Mol Cell Biol, 14:2675-85(1994)].

Отже, PI-3-кінази можуть бути визначеними за їх амінокислотною ідентичністю або за їх активністю. Додаткові члени цієї зростаючої родини генів включають віддаленіші споріднені ліпідні та білкові кінази, включаючи Vps34 TOR1 та TOR2 з *Saccharomyces cerevisiae* (та їх гомологи у ссавцях як-то FRAP та mTOR), генний продукт атаксичної телеангіектазії (ATR) та каталітичний субелемент ДНК-залежної білкової кінази (ДНК-ПК). [Дивися загалом, Hunter, Cell, 83:1-4(1995)].

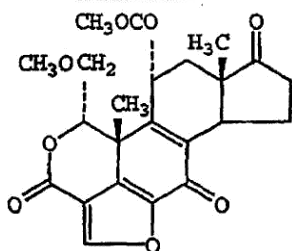
PI-3-кінази також виявлюється залученими у ряд аспектів активації лейкоцитів. Асоційована з p85 активність показана для PI-3-кінази, фізично асоційованої з цитоплазматичним доменом CD28, який є важливою коstimуляторною молекулою для активації Т-клітин у відповідь на антиген [Pages et al., Nature, 369:327-29 (1994); Rudd, Immunity, 4:527-34 (1996)]. Активація Т-клітин через CD28 знижує порогову величину для активації антигеном та збільшує інтенсивність та тривалість проліферативної реакції. Ця дія пов'язана зі збільшенням транскрипції ряду генів, включаючи інтерлейкін-2 (IL2), важливий фактор росту Т-клітин [Praser et al., Science, 251:313-16 (1991)]. Мутація CD28 так, щоб він не міг більше взаємодіяти з PI-3-кіназою, призводить до нездатності ініціювати продукування IL2, підтверджуючи критичну роль PI-3-кінази у активації Т-клітин.

Специфічні інгібітори проти окремих членів родини ферментів забезпечують безцінне знаряддя для розшифровки функцій кожного ферменту. Дві сполуки, LY294002 та вортманін є широко використовуваними як інгібітори PI-3-кінази. Ці сполуки, однак, є неспецифічними інгібіторами PI3K, які вони не розрізняють серед чотирьох членів PI-3-кіназ класу I. Наприклад, величини  $IC_{50}$  вортманіну проти кожної відмінної PI-3-кінази класу I PI-3K знаходяться в межах 1-10нМ. Подібно, величина  $IC_{50}$  для LY294002 супроти кожної з цих PI-3-кіназ є приблизно 1мкМ [Fruman et al., Ann Rev Biochem, 67:481-507 (1998)]. Звідси, корисність цих сполук у дослідженні ролі PI-3-кіназ окремого класу I є обмеженою.

Базуючися на дослідженні з використанням вортманіну, отримано свідоцтва, що функція PI-3-кінази також потрібна для деяких аспектів передачі сигналів лейкоцитами через сполучені з G-білком рецептори [Thelen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 51:4960-64 (1994)]. Більш того, показано, що вортманін та LY294002 блокують міграцію нейтрофілів та вивільнення супероксиду. Однак, оскільки ці сполуки не розрізняють різні ізоформи PI3K, залишається неясним, як певна ізоформа або ізоформи PDK включені у це явище.



LY294002



Вортманін

З точки зору вищенаведеного ясно, що існуюче знання є недостатнім з огляду на структурні та функціональні особливості PI-3-кіназних ферментів, включаючи субклітинну локалізацію, активаційні стани, субстратну афінність, тощо. Більш того, функція, яку ці ферменти виконують у нормальній та хворій тканинах, залишається незрозумілою. Зокрема, функція PI3K $\delta$  у лейкоцитах попередньо не визначена, а знання стосовно її функції у фізіології людини залишається обмеженим. Коекспресія у цих тканинах інших ізоформ PI3K раніше заплутала намагання розділити активності кожного ферменту. Більш того, розділення активності різних ізоферментів PI3K може бути неможливим без ідентифікації інгібіторів, що демонструють характеристики селективного інгібування. Дійсно, заявники зараз невпевнені, що продемонстровано такі селективні, або краще, специфічні, інгібітори ізоферментів PI3K.

Отже, у рівні техніки існує необхідність подальшого структурного дослідження поліпептиду PI3K $\delta$ . Існує також необхідність функціонального дослідження PDK $\delta$ . Більш того, наше розуміння PI3K $\delta$  потребує наступного уточнення структурних взаємодій P110 $\delta$ , з її регуляторним субелементом та іншими білками у клітині. Також залишається необхідність у селективних або специфічних інгібіторах ізоферментів PI3K, щоб краще визначити функції кожного ізоферменту. Зокрема, селективні або специфічні інгібітори PI3K $\delta$  є бажаними для дослідження ролі цього ізоферменту та для розробки фармацевтичних засобів для модуляції активності ізоферменту.

Згідно з одним аспектом представленого винаходу запропоновано сполуки, що можуть інгібувати біологічну активність PI3K $\delta$  людини. Згідно з другим аспектом винаходу запропоновано сполуки, що селективно інгібують PI3K $\delta$ , маючи при тому відносно низьку інгібувальну потужність проти інших ізоформ PI3K. Згідно з наступним аспектом винаходу запропоновано способи визначення функції PI3K $\delta$  людини. Згідно

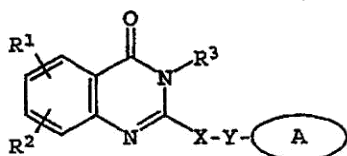
з ще одним аспектом винаходу запропоновано способи селективної модуляції активності PI3Kδ людини, а тим сприяння медичному лікуванню хвороб, опосередкованих дисфункцією PI3Kδ. Інші аспекти та переваги винаходу будуть легко зрозумілими фахівцю в цій області рівня техніки.

Зараз виявлено, що ці та інші аспекти можна розв'язати представленим винаходом, яким, згідно з одним аспектом, є спосіб порушення функції лейкоцитів, що включає взаємодію лейкоцитів зі сполукою, що селективно інгібує активність фосфатидилінозит 3-кінази-дельта (PI3Kδ) у лейкоцитах. Згідно зі способом лейкоцити можуть включати клітини, вибрані з групи, що складається з нейтрофілів, В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів та базофілів.

Наприклад, у випадках, в яких лейкоцити включають нейтрофіли, спосіб може включати порушення щонайменше одної нейтрофільної функції, вибраної з групи, що складається зі стимульованого вивільнення супероксиду, стимульованого екзоцитозу та хемотактичної міграції. Переважно, спосіб по суті не порушує бактеріального фагоцитозу або знищення бактерій нейтрофілами. У випадках, коли лейкоцити включають В-лімфоцити, спосіб може включати порушення проліферації В-лімфоцитів або антитіл продукування В-лімфоцитами. У випадках, коли лейкоцити включають Т-лімфоцити, спосіб може включати порушення проліферації Т-лімфоцитів. У випадках, коли лейкоцити включають базофіли, спосіб може включати порушення вивільнення гістаміну базофілами.

У способах згідно з винаходом, де застосовують селективний інгібітор PI3Kδ, краще, щоб сполука була щонайменше приблизно 10-кратно селективною стосовно інгібування PI3Kδ у порівнянні з іншими ізоформами PI3K типу I у дослідженнях на основі клітин. Краще, щоб сполука була щонайменше приблизно 20-кратно селективною стосовно інгібування PI3Kδ у порівнянні з іншими ізоформами PI3K типу I у дослідженнях на основі клітин. Ще краще, щоб сполука була щонайменше приблизно 50-кратно селективною стосовно інгібування PI3Kδ у порівнянні з іншими ізоформами PI3K типу I у біохімічних дослідженнях.

Кращі селективні сполуки, корисні згідно з способами, включають сполуки, що мають структуру (I):



(I)

де А представляє заміщену, як варіант, моноциклічну або дициклічну кільцеву систему, що містить щонайменше два атоми нітрогену, а щонайменше одне кільце системи є ароматичним;

Х вибрано з групи, що складається з  $\text{CHR}^b$ ,  $\text{CH}_2\text{CHR}^b$  та  $\text{CH}=\text{C}(\text{R}^b)$ ;

Y вибрано з групи, що складається з S, SO,  $\text{SO}_2$ , NH, O,  $\text{C}(=\text{O})$ ,  $\text{OC}(=\text{O})$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{O}$  та  $\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{S}$ , або Y відсутній;

$\text{R}^1$  та  $\text{R}^2$ , незалежно, вибрані з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$ алкілу, арилу, гетероарилу, атому галогену,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OR}^a$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , CN,  $\text{OC}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ , арил $\text{OR}^b$ , Het,  $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ , арил $\text{OC}_{1-3}$ алкілен- $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арил $\text{OC}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,  $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,

$\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{-NR}^a\text{SO}_2\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{2-6}$ алкенілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}=(\text{O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$ алкіленHet,  $\text{OC}_{2-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{CH}(\text{OR}^b)\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OC}_{1-4}$ алкіленHet,  $\text{OC}_{2-4}$ алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{OC}_{2-4}$ алкілен $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{N}(\text{SO}_2\text{C}_{1-4}\text{алкіл})_2$ ,  $\text{NR}^a(\text{SO}_2\text{C}_{1-4}\text{алкіл})$ ,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OSO}_2\text{CF}_3$ ,

$\text{C}_{1-3}$ алкіленарилу,  $\text{C}_{1-4}$ алкіленHet,  $\text{C}_{1-6}$ алкілен $\text{OR}^b$ ,  $\text{C}_{1-3}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{MHC}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ алкіленарилу,  $\text{C}_{3-8}$ циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$ гетероциклоалкілу, арил- $\text{OC}_{1-3}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арил $\text{OC}(=\text{O})\text{R}^b$ ,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ алкілен- $\text{C}_{3-8}$ гетероциклоалкілу,  $\text{NHC}(=\text{O})\text{C}_{1-3}$ алкіленHet,  $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^b$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкіленHet та  $\text{NHC}(=\text{O})$ галоген $\text{C}_{1-6}$ алкілу;

або  $\text{R}^1$  та  $\text{R}^2$  разом утворюють 3- або 4-членний алкіленовий або алкеніленовий ланцюговий компонент 5- або 6-членного кільця, що як варіант, містить щонайменше один гетероатом;

$\text{R}^3$  вибрано з групи, що складається з заміщеного, як варіант, атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$ алкілу,  $\text{C}_{3-8}$ циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$ гетероциклоалкілу,  $\text{C}_{1-4}$ алкіленциклоалкілу,  $\text{C}_{2-6}$ алкенілу,  $\text{C}_{1-3}$ алкіленарилу, арил $\text{C}_{1-3}$ алкілу,  $\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ , арилу, гетероарилу,  $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{SO}_2\text{R}^a$ ,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{S}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$ алкіленHet,  $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкіленарилу,  $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$ алкіленарилу, як варіант, заміщеного одним чи більше атомами галогену,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{SO}_2\text{CF}_3$ , CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$  та  $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$ алкіленHet,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(\text{O})\text{-C}_{1-4}$ алкіленарилу,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(\text{O})\text{-C}_{1-4}$ алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{Het}$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{O-C}_{1-4}$ алкілен $\text{OR}^a$ ,

$\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{-OR}^a$  та  $\text{C}_{1-4}$ алкілен $\text{OC}_{1-4}$ алкілен $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ;

$\text{R}^a$  вибрано з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}_{1-4}$ алкілу,

$\text{C}_{3-8}$ циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$ гетероциклоалкілу,  $\text{C}_{1-3}$ алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арилу, арил $\text{C}_{1-3}$ алкілу,  $\text{C}_{1-3}$ алкіленарилу, гетероарилу, гетероарил $\text{C}_{1-3}$ алкілу та  $\text{C}_{1-3}$ алкіленгетероарилу;

або дві групи  $\text{R}^a$  разом утворюють 5- або 6-членне кільце, що містить, як варіант, щонайменше один гетероатом;

$\text{R}^b$  вибрано з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$ алкілу, арилу, гетероарилу, арил $\text{C}_{1-6}$ алкілу, гетероарил $\text{C}_{1-3}$ алкілу,  $\text{C}_{1-3}$ алкіленарилу та  $\text{C}_{1-3}$ алкіленгетероарилу;

Het представляє 5- або 6-членне гетероциклічне кільце, насичене або частково чи повністю ненасичене, що містить щонайменше один гетероатом, вибраний з групи, що складається з атомів кисню, нітрогену та сульфуру, та як варіант, заміщене  $\text{C}_{1-6}$ алкілом або  $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$ ;

та їх фармацевтично прийнятні солі та сольвати (наприклад, гідрати),

при цьому сполука виявляє щонайменше приблизно 10-кратну селективність інгібування стосовно РВКδ відносно інших ізоформ PI3K типу-I у дослідженні на основі клітин.

Зокрема, другим втіленням винаходу є спосіб лікування медичного стану, опосередкованого нейтрофілами, що включає застосування до тварини, що цього потребує, ефективної кількості сполуки, що селективно інгібує активність фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (PI3Kδ) у нейтрофілах. Приклади медичних станів, що можна лікувати згідно зі способом, включають стани, визначені небажаною функцією нейтрофілів, вибраною з групи, що складається зі стимульованого вивільнення супероксиду, стимульованого екзоцитозу та хемотактичної міграції. Переважно, згідно зі способом, фагоцитозна активність або знищення бактерій нейтрофілами є по суті неінгібованими.

Зокрема, іншим втіленням винаходу є спосіб порушення функції остеокластів, що включає взаємодію остеокластів зі сполукою, що селективно інгібує активність фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (PI3Kδ) у остеокластах. Згідно зі способом сполука може включати групу, що преференційно приєднується до кісток.

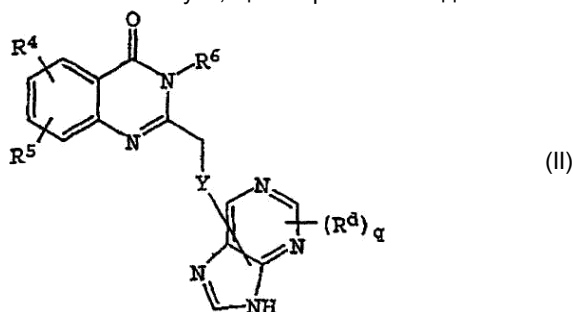
Зокрема, ще одним втіленням винаходу є спосіб поліпшення розладу кісткової ресорбції у тварини, що цього потребує, що включає застосування до тварини ефективної кількості сполуки, що інгібує активність фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (PI3Kδ) у остеокластах тварини. Переважним розладом ресорбції кісток, що підлягає лікуванню згідно зі способом, є остеопороз.

Зокрема, ще одним втіленням винаходу є спосіб інгібування росту або проліферації ракових клітин гематопоетичного походження, що включає взаємодію ракових клітин зі сполукою, що селективно інгібує активність фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (PI3Kδ) у ракових клітинах.

Спосіб може мати переваги при інгібуванні росту або проліферації талів раку, вибраних з групи, що складається з лімфом, множинних мієлом та лейкоїдів.

Зокрема, ще одним втіленням винаходу є спосіб інгібування кіназної активності поліпептиду фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (PI3Kδ), що включає взаємодію поліпептиду PI3Kδ зі сполукою, що має загальну структуру (I).

Бажані сполуки, що є корисними згідно зі способом, включають сполуки, вибрані з групи, що складається:



де Y вибрано з групи, що складається з S та NH, або Y відсутній;

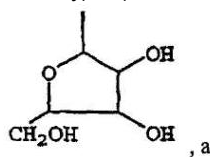
R<sup>4</sup> вибрано з групи, що складається з H, атому галогену, NO<sub>2</sub>, OH, OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub> та CF<sub>3</sub>;

R<sup>5</sup> вибрано з групи, що складається з H, OCH<sub>3</sub> та атому галогену;

або R<sup>4</sup> та R<sup>5</sup> разом з C-6 та C-7 хіназолінової кільцевої системи представляють 5- або 6-членне ароматичне кільце, що містить, як варіант, один чи більше атомів O, N, або S;

R<sup>6</sup> вибрано з групи, що складається з C<sub>1</sub>-алкілу, фенілу, галогенфенілу, алкоксифенілу, алкілфенілу, дифенілу, бензилу, піридинілу, 4-метилпіперазинілу, C(=O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> та морфолінілу;

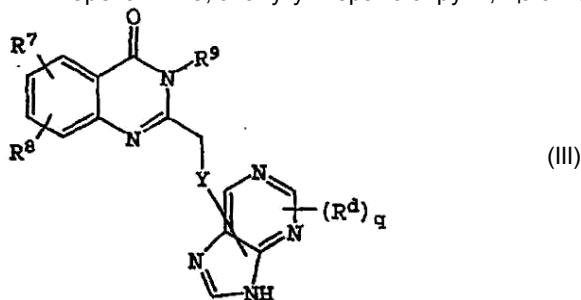
R<sup>d</sup> незалежно вибрано з групи, що складається з NH<sub>2</sub>, атому галогену, C<sub>1</sub>-алкілу, S(C<sub>1</sub>-алкілу), OH, NH(C<sub>1</sub>-алкілу), N(C<sub>1</sub>-алкілу)<sub>2</sub>, NH(C<sub>1</sub>-алкіленфенілу); та



q=1 або 2,

за умови, що щонайменше один з R<sup>4</sup> та R<sup>5</sup> не представляє H, коли R<sup>6</sup> представляє феніл або 2-хлорфеніл.

Переважніше, сполуку вибрано з групи, що складається з:



де Y вибрано з групи, що складається з S та NH, або Y відсутній;

R<sup>7</sup> вибрано з групи, що складається з H, атому галогену, OH, OCH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub> та CF<sub>3</sub>;

R<sup>8</sup> вибрано з групи, що складається з H, OCH<sub>3</sub> та атому галогену;

або R та R разом з C-6 та C-7 хіназолінової кільцевої системи представляють 5- або 6-членне ароматичне кільце, що містить, як варіант, один чи більше атомів O, N, або S;

R<sup>9</sup> вибрано з групи, що складається з C<sub>1</sub>-алкілу, фенілу, галогенфенілу, алкоксифенілу, алкілфенілу, дифенілу, бензилу, піридинілу, 4-метилпіперазинілу, C(=O)OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> та морфолінілу;

$R^d$  незалежно вибрано з групи, що складається з  $NH_2$ , атому галогену,  $C_1$ -залкілу,  $S(C_1$ -залкілу),  $OH$ ,  $NH(C_1$ -залкілу),  $N(C_1$ -залкілу) $_2$ ,  $NH(C_1$ -залкіленфенілу); а

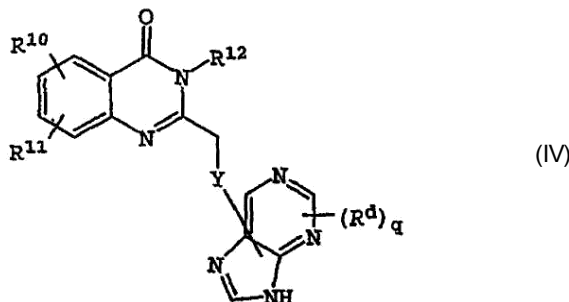
$q=1$  або  $2$ ,

за умови, що щонайменше один з  $R^7$  та  $R^8$  не представляє 6-галоген або 6,7-диметоксигрупу, а  $R^9$  не представляє 4-хлорфеніл.

Зокрема, ще одним втіленням винаходу є спосіб порушення функції лейкоцитів, спосіб включає взаємодію лейкоцитів зі сполукою, що має загальну структуру (I).

Зокрема, ще одним втіленням винаходу є клас сполук, що виявлені як такі, що інгібують активність PI3Kδ у біохімічних дослідженнях та дослідженнях на основі клітин, та стосовно яких очікують, що вони мають терапевтичну користь у таких медичних станах, в яких активність PI3Kδ є надлишковою чи небажаною. Отже, винахід забезпечує клас сполук, що мають структуру (II).

Переважно, сполуки мають загальну структуру (IV)



де  $Y$  вибрано з групи, що складається з  $S$  та  $NH$ , або  $Y$  відсутній;

$R^{10}$  вибрано з групи, що складається з  $H$ , атому галогену,  $OH$ ,  $OCH_3$ ,  $CH_3$  та  $CF_3$ ;

$R^{11}$  вибрано з групи, що складається з  $H$ ,  $OCH_3$  та атому галогену,

або  $R^{10}$  та  $R^{11}$  разом з  $C-6$  та  $C-7$  хіназолінової кільцевої системи представляють 5- або 6-членне ароматичне кільце, що містить, як варіант, один чи більше атомів  $O$ ,  $N$ , або  $S$ ;

$R^{12}$  вибрано з групи, що складається з  $C_1$ -залкілу, фенілу, галогенфенілу, алкоксифенілу, алкілфенілу, дифенілу, бензилу, піридинілу, 4-метилпіперазинілу,  $C(=O)OC_2H_5$  та морфолінілу;

$R^d$  незалежно вибрано з групи, що складається з  $NH_2$ , атому галогену,  $C_1$ -залкілу,  $S(C_1$ -залкілу),  $OH$ ,  $NH(C_1$ -залкілу),  $N(C_1$ -залкілу) $_3$ ,  $NH(C_1$ -залкіленфенілу); а

$q=1$  або  $2$ ,

за умови, що:

(а) щонайменше один з  $R^{10}$  та  $R^{11}$  не представляє 6-галоген або 6,7-диметоксигрупу;

(b)  $R^{12}$  не представляє 4-хлорфеніл; та

(с) щонайменше один з  $R^{10}$  та  $R^{13}$  не представляє  $H$ , коли  $R^{12}$  представляє феніл або 2-хлорфеніл, а  $X$  представляє  $S$ .

Ці та інші особливості та переваги представленого винаходу далі будуть зрозумілими з детального опису та прикладів, що представлені далі. Детальний опис та приклади забезпечують поліпшення розуміння винаходу, але не призначені обмежувати рамки винаходу.

Фіг.1 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ згідно з винаходом на активність трьох ізоформ PI3K.

Фіг.2 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на вироблення супероксиду нейтрофілами людини у присутності  $TNF$  або  $IgG$ .

Фіг.3 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на вироблення супероксиду нейтрофілами людини у присутності  $TNF$  або  $fMLP$ .

Фіг.4 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на екзоцитоз нейтрофільної еластази людини у присутності  $fMLP$ .

Фіг.5 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на  $fMLP$ -індукований хемотаксис нейтрофілів людини.

Фіг.6 показує, що селективний інгібітор PI3Kδ не впливає на фагоцитоз та знищення *S. aureus* нейтрофілами.

Фіг.7 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на проліферацію та продукування антитіл В-лімфоцитами людини.

Фіг.8 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на проліферацію, стимульовану анти-IgM В-лімфоцитами селезінки миші:

Фіг.9 показує дію селективного інгібітору PI3Kδ на екзоцитоз еластази у тваринній моделі.

Винахід забезпечує сполуки, що селективно інгібують активність PI3Kδ. Винахід крім того забезпечує способи інгібування активності PI3Kδ, включаючи способи селективної модуляції активності ізоферменту PI3Kδ у клітинах, особливо лейкоцитах, остеокластах та ракових клітинах. Способи включають застосування *in vitro*, *in vivo* та *ex vivo*.

Особливо корисними є способи селективної модуляції активності PI3Kδ у клініці для полегшення хвороб або розладів, опосередкованих активністю PI3Kδ. Отже, лікування хвороб або розладів визначених надлишковою або неприйнятною активністю PI3Kδ можна проводити застосуванням селективних модуляторів PI3Kδ згідно з винаходом.

Інші способи згідно з винаходом включають встановлення подальших характеристик фізіологічної ролі ізоферменту. Більш того, винахід забезпечує фармацевтичні композиції, що включають селективні інгібітори PI3Kδ. Більш того, винахід забезпечує промислові продукти, що включають селективну сполуку інгібітору PI3Kδ (або фармацевтичну композицію, що включає сполуку) та інструкції стосовно застосування сполуки. Деталі цих та інших корисних втілень винаходу тут описані.

Способи, описані тут, корисні внаслідок використання сполук, що селективно інгібують, а переважно специфічно інгібують, активність P13Kδ у клітинах, включаючи клітини *in vitro*, *in vivo*, або *ex vivo*. Клітини, корисні у способах, включають ті, що експресують ендогенну P13Kδ, де ендогенність вказує, що клітини експресують P13Kδ без рекомбінантної інтродукції у клітини одного чи більше поліпептидів, що кодують а P13Kδ поліпептид або її біологічно активний фрагмент. Способи також охоплюють використання клітин, що експресують екзогенну P13Kδ, де один чи більше поліпептидів, що кодують P13Kδ або її біологічно активний фрагмент, уведено у клітину, використовуючи способи рекомбінації.

Особлива перевага полягає в тому, що клітини можуть бути *in vivo*, тобто, у живому суб'єкті, наприклад, тварині або людині, де інгібітор P13Kδ можна використовувати як терапевтичний засіб для інгібування активності P13Kδ у суб'єкті. Альтернативно, клітини можуть бути виділеними як окремі клітини або у тканині, для способів *ex vivo* або *in vitro*. *In vitro* способи, також охоплені винаходом можуть включати етап взаємодії ферменту P13Kδ або його біологічно активного фрагменту зі сполукою інгібітору згідно з винаходом.

Фермент P13Kδ може включати очищений та виділений фермент, де фермент є виділеним з природного джерела (наприклад, клітини або тканини, що нормально експресують поліпептид P13Kδ без модифікації способами рекомбінації) або виділеним з клітин, модифікованими способами рекомбінації для експресії екзогенного ферменту.

Термін "селективний інгібітор P13Kδ", як це тут використано, стосується сполуки, що інгібує ізофермент P13Kδ ефективніше за інші ізоферменти родини P13K. Сполуку "селективного інгібітору P13Kδ" слід розуміти як селективнішу стосовно P13Kδ, ніж сполуку звичайно та загально визначених інгібіторів P13K, наприклад, вортманіну або LY294002. Супутню, вортманін та LY294002 вважають "неселективними інгібіторами P13K." Сполуки будь-якого типу, що селективно негативно регулюють експресію або активність P13Kδ, можуть бути використовуваними як селективні інгібітори P13Kδ у способах згідно з винаходом. Більш того, сполуки будь-якого типу, що селективно негативно регулюють експресію або активність P13Kδ та виявляють прийнятні фармакологічні властивості, можуть бути використовуваними як селективні інгібітори P13Kδ у терапевтичних способах згідно з винаходом.

Відносні ефективності сполук як інгібіторів ферментної активності (або іншої біологічної активності) можна встановити визначенням концентрації, при яких кожна сполука інгібує активність до попередньо визначеного степеню, а далі порівнянням результатів. Типово, кращим визначенням є концентрація, що інгібує 50% активності у біохімічному дослідженні, тобто, 50% концентрації інгібітору або "IK<sub>50</sub>". Визначення величини IK<sub>50</sub> можна проводити, використовуючи звичайні відомі у рівні техніки способу. Взагалі, величину IK<sub>50</sub> можна визначити виміром активності даного ферменту у присутності ряду концентрацій інгібітору при дослідженні. Експериментально отримані величини ферментної активності далі наносять на графік проти концентрації використовуваного інгібітору. Концентрація інгібітору, що дає 50% ферментної активності (у порівнянні з активністю у відсутність будь-якого інгібітору) приймають за величину IK<sub>50</sub>. Аналогічно, інші концентрації інгібітору можуть бути визначені через прийнятне визначення активності. Наприклад, у деяких випадках може бути бажаним встановити 90% концентрацію інгібітору, тобто, IK<sub>50</sub>/тощо.

Відповідно, "селективний інгібітор P13Kδ" альтернативно можна розуміти як сполуку, що виявляє 50% концентрацію інгібітору (величину IK<sub>50</sub>) з огляду на P13Kδ, що є щонайменше у 10-разів, переважно щонайменше у 20-разів, а переважніше щонайменше у 30-разів, нижча за величину IK<sub>50</sub> з огляду на будь-які або усі інші члени родини P13K класу I. Термін "специфічний інгібітор P13Kδ" можна розуміти як такий, що стосується селективної сполуки інгібітору P13Kδ, що виявляє величину IK<sub>50</sub> з огляду на P13Kδ, яка є щонайменше у 50-разів, переважно щонайменше у 100-разів, переважніше щонайменше у 200-разів, а ще переважніше щонайменше у 500-разів нижча за величину IK<sub>50</sub> з огляду на будь-які або усі інші члени родини P13K класу I.

Серед іншого, винахід забезпечує способи інгібування функції лейкоцитів. Точніше, винахід забезпечує способи інгібування або пригнічення функцій нейтрофілів та Т- та В-лімфоцитів. З огляду на нейтрофіли неочікувано виявлено, що інгібування активності P13Kδ інгібує функції нейтрофілів. Наприклад, спостерігали, що сполуки згідно з винаходом виявляють інгібування класичних функцій нейтрофілів як-то стимульоване вивільнення супероксиду, стимульований екзоцитоз та хемотактична міграція. Однак, далі спостерігали, що спосіб згідно з винаходом призводить до пригнічення деяких функцій нейтрофілів, не впливаючи по суті на інші функції цих клітин. Наприклад, спостерігали, що фагоцитоз бактерій нейтрофілами по суті не інгібується селективними сполуками інгібітору P13Kδ згідно з винаходом.

Отже, винахід включає способи інгібування функцій нейтрофілів, по суті без інгібування фагоцитозу бактерій. Функції нейтрофілів, придатні для інгібування згідно зі способом, включають будь-яку функцію, що опосередковує активність або експресію P13Kδ. Такі функції включають, без обмеження, стимульоване вивільнення супероксиду, стимульований екзоцитоз або дегрануляцію, хемотактичну міграцію, адгезію до судинного ендотелію (наприклад, прив'язка/прокатка нейтрофілів, запуск активності нейтрофілів, та/або фіксування нейтрофілів на ендотелії), трансмуральний діapedез або міграція через ендотелій до периферійних тканин. Взагалі, ці функції можна спільно назвати як "запальні функції", оскільки вони звичайно споріднені з реакцією нейтрофілів на запалення. Запальні функції нейтрофілів можна відрізнити від функцій знищення бактерій, що виявляють ці клітини, наприклад, фагоцитоз та знищення бактерій. Відповідно, винахід далі включає способи лікування хворобливих станів, в яких одна чи більше запальних функцій нейтрофілів є ненормальними або небажаними.

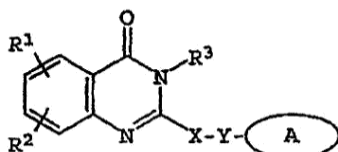
Далі у винаході встановлено, що P13Kδ грає роль у стимульованій проліферації лімфоцитів, включаючи В-клітини та Т-клітини. Більш того, P13Kδ, виявляється, грає роль у стимульованій секреції антитіл В-клітинами. Селективні сполуки інгібітору P13Kδ згідно з винаходом застосовано для встановлення, що ці явища можна відмінити інгібуванням P13Kδ. Отже, винахід включає способи інгібування проліферації лімфоцитів та способи інгібування продукування антитіл В-лімфоцитами. Інші способи, дозволені винаходом, включають способи лікування хворобливих станів, в яких одна чи більше цих функцій лімфоцитів є ненормальними або небажаними.

Зараз визначено, що активність РІЗКД можна інгібувати селективно або специфічно для полегшення лікування опосередкованої РІЗКД хвороби при зменшенні або усуненні ускладнень, що типово асоційовані із супутнім інгібуванням активності інших РІЗ-кіназ класу І. Для ілюстрації цього втілення можна практикувати способи згідно з винаходом, використовуючи члени класу сполук, що виявлені як такі, що виявляють селективне інгібування РІЗКД стосовно інших ізоформ РІЗК.

Способи цього втілення можна практикувати, використовуючи сполуки, що мають загальну структуру (III). Кращі способи застосовують сполуки, що емпірично визначені як такі, що виявляють щонайменше 10-кратне селективне інгібування РІЗКД стосовно інших ізоформ РІЗК. Наприклад, можна практикувати способи, використовуючи наступні сполуки:

5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-флуорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-метоксифеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2,6-дихлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-6-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(3-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-бензил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-бутил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-морфолін-4-іл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат;  
 8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-6,7-дифлуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 6-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(3-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-піридин-4-іл-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-трифлуорметил-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-бензил-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(4-метилпіперазин-1-іл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат;  
 3-(2-хлорфеніл)-6-гідрокси-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 етиловий естер [5-флуор-4-оксо-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-4Н-хіназолін-3-іл]оцтової кислоти;  
 3-(2,4-диметоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-дифеніл-2-іл-5-хлор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-дифеніл-2-іл-5-хлор-3Н-хіназолін-4-он;  
 5-хлор-3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-флуорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бензил-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бутил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-морфолін-4-іл-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-феніл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-ізопропілфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он.

Далі визначено, що способи згідно з винаходом можна переважно практикувати, використовуючи члени класу сполук, що виявляють інгібувальну активність РІЗКД, полегшуючи тим інгібування активності РВКД при хворобах, опосередкованих цим. Наприклад, у цьому втіленні, способи згідно з винаходом можна практикувати, використовуючи сполуки, що мають загальну структуру (I)



(I)

де А, як варіант, заміщено моноциклічною або дициклічною кільцевою системою, що містить щонайменше два атоми нітрогену та щонайменше одна кільцева система є ароматичною;

Х вибрано з групи, що складається з  $\text{CHR}^b$ ,  $\text{CH}_2\text{CHR}^b$  та  $\text{CH}=\text{C}(\text{R}^b)$ ;

У вибрано з групи, що складається з S, SO, SO<sub>2</sub>, NH, O, C(=O), OC(=O), C(=O)O та NHC(=O)CH<sub>2</sub>S, або У відсутній;

R<sup>1</sup> та R<sup>2</sup>, незалежно, вибрані з групи, що складається з атому гідрогену, C<sub>1-6</sub>алкілу, арилу, гетероарилу, атому галогену, NHC(=O)C<sub>1-3</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, OR<sup>a</sup>, OCF<sub>3</sub>, N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, CN, OC(=O)R<sup>a</sup>, C(=O)R<sup>a</sup>, C(=O)OR<sup>a</sup>,

арилOR<sup>b</sup>, Het, NR<sup>a</sup>C(=O)C<sub>1-3</sub>алкіленC(=O)OR<sup>a</sup>, арилOC<sub>1-3</sub>алкілен-N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, арилOC(=O)R<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)OR<sup>a</sup>, OC<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)OR<sup>a</sup>,

C<sub>1-4</sub>алкіленOC<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)OR<sup>a</sup>, C(=O)-NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C<sub>2-6</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C(=O)NR<sup>a</sup>C<sub>1-4</sub>алкіленOR<sup>a</sup>, C(=O)-NR<sup>a</sup>C<sub>1-4</sub>алкіленHet, OC<sub>2-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C<sub>1-4</sub>алкіленCH(OR<sup>b</sup>)CH<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, OC<sub>1-4</sub>алкіленHet, OC<sub>2-4</sub>алкіленOR<sup>a</sup>, OC<sub>2-4</sub>алкіленNR<sup>a</sup>C(=O)OR<sup>a</sup>, NR<sup>a</sup>C<sub>1-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, NR<sup>a</sup>C(=O)R<sup>a</sup>, NR<sup>a</sup>C(=O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, N(SO<sub>2</sub>C<sub>1-4</sub>алкіл)<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>,

C<sub>1-3</sub>алкіленарилу, C<sub>1-4</sub>алкіленHet, C<sub>1-6</sub>алкіленOR<sup>b</sup>, C<sub>1-3</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C(=O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, NHC(=O)C<sub>1-3</sub>алкіленарилу, C<sub>3-8</sub>циклоалкілу, C<sub>3-8</sub>гетероциклоалкілу, арил-OC<sub>1-3</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, арилOC(=O)R<sup>b</sup>, NHC(=O)C<sub>1-3</sub>алкілен-C<sub>3-8</sub>гетероциклоалкілу, NHC(=O)C<sub>1-3</sub>алкіленHet, OC<sub>1-4</sub>алкіленOC<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)OR<sup>b</sup>, C(=O)C<sub>1-4</sub>алкіленHet та NHC(=O)галогенC<sub>1-6</sub>алкілу;

або R<sup>1</sup> та R<sup>2</sup> разом утворюють 3- або 4-членний алкіленовий або алкеніленовий ланцюговий компонент 5- або 6-членного кільця, що як варіант, містить щонайменше один гетероатом;

R<sup>3</sup> вибрано з групи, що складається з заміщеного, як варіант, атому гідрогену, C<sub>1-6</sub>алкілу, C<sub>3-8</sub>циклоалкілу, C<sub>3-8</sub>гетероциклоалкілу, C<sub>1-4</sub>алкіленциклоалкілу, C<sub>2-6</sub>алкенілу, C<sub>1-3</sub>алкіленарилу, арилC<sub>1-3</sub>алкілу, C(=O)R<sup>a</sup>, арилу, гетероарилу, C(=O)OR<sup>a</sup>, C(=O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C(=S)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, SO<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, S(=O)R<sup>a</sup>, S(=O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C(=O)NR<sup>a</sup>C<sub>1-4</sub>алкіленOR<sup>a</sup>, C(=O)NR<sup>a</sup>C<sub>1-4</sub>алкіленHet, C(=O)C<sub>1-4</sub>алкіленарилу, C(=O)C<sub>1-4</sub>алкіленгетероарилу, C<sub>1-4</sub>алкіленарилу, як варіант, заміщеного одним чи більше атомами галогену, SO<sub>2</sub>N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C(=O)OR<sup>a</sup>, NR<sup>a</sup>SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, C(=O)R<sup>a</sup>, OR<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub> та OC<sub>1-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C<sub>1-4</sub>алкіленгетероарилу, C<sub>1-4</sub>алкіленHet, C<sub>1-4</sub>алкіленC(O)-C<sub>1-4</sub>алкC<sub>1-4</sub>алкіленарилу, C<sub>1-4</sub>алкіленC(O)-C<sub>1-4</sub>алкіленгетероарилу, C<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)Het, C<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)N(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C<sub>1-4</sub>алкіленOR<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленNR<sup>a</sup>C(=O)R<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленO-C<sub>1-4</sub>алкіленOR<sup>a</sup>, C<sub>1-4</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, C<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)-OR<sup>a</sup> та C<sub>1-4</sub>алкіленOC<sub>1-4</sub>алкіленC(=O)OR<sup>a</sup>;

R<sup>a</sup> вибрано з групи, що складається з атому гідрогену, C<sub>1-6</sub>алкілу,

C<sub>3-8</sub>циклоалкілу, C<sub>3-8</sub>гетероциклоалкілу, C<sub>1-3</sub>алкіленN(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>, арилу, арилC<sub>1-3</sub>алкілу, C<sub>1-3</sub>алкіленарилу, гетероарилу, гетероарилC<sub>1-3</sub>алкілу та C<sub>1-3</sub>алкіленгетероарилу;

або дві групи R<sup>a</sup> разом утворюють 5- або 6-членне кільце, що містить, як варіант, щонайменше один гетероатом;

R<sup>b</sup> вибрано з групи, що складається з атому гідрогену, C<sub>1-6</sub>алкілу, арилу, гетероарилу, арилC<sub>1-3</sub>алкілу, гетероарилC<sub>1-3</sub>алкілу, C<sub>1-3</sub>алкіленарилу та C<sub>1-3</sub>алкіленгетероарилу;

Het представляє 5- або 6-членне гетероциклічне кільце, насичене або частково чи повністю ненасичене, що містить щонайменше один гетероатом, вибраний з групи, що складається з атомів оксигену, нітрогену та сульфору, та як варіант, заміщене C<sub>1-6</sub>алкілом або C(=O)OR<sup>a</sup>;

та їх фармацевтичне прийнятні солі та сольвати (наприклад, гідрати),

Наприклад, способи згідно з винаходом можуть застосовувати сполуки, що виявляють інгібувальну активність РІЗКД, які наведено нижче:

3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

5-хлор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он;

5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-флуорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-метоксифеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2,6-дихлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)-6-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-бензил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-бутил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-морфолін-4-іл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат;

8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)6,7-дифлуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(3-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

6-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(3-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

2-(9Н-пурил-6-ілсульфанілметил)-3-піридин-4-іл-3Н-хіназолін-4-он;

3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-трифлуорметил-3Н-хіназолін-4-он;

3-бензил-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

3-(4-метилпіперазин-1-іл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат;

3-(2-хлорфеніл)-6-гідрокси-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

етилловий естер [5-флуор-4-оксо-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-4Н-хіназолін-3-іл]оцтової кислоти;

3-дифеніл-2-іл-5-хлор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

5-хлор-3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-дифеніл-2-іл-т-хлор-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-флуорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;

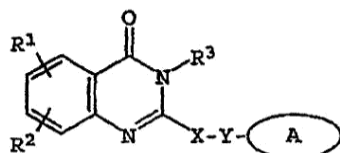
2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;



2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бензил-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бутил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-морфолін-4-іл-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-феніл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(4-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(2-хлорфеніл)-6,7-диметокси-2-(9Н-пурин-6-ілсульфан)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-7-нітро-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-6-бром-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-6,7-диметокси-3Н-хіназолін-4-он;  
 6-бром-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он;  
 3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-бензо[*g*]-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он та  
 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-метокси-феніл)-3Н-хіназолін-4-он.

Винахід крім того забезпечує сполуки, що є селективними інгібіторами активності РІЗКБ. Сполуки виявляють інгібування РІЗКБ у біохімічному дослідженні та селективно порушують функції експресуючих РІЗКБ клітин у дослідженні на основі клітин. Як це тут описано, сполуки згідно з винаходом продемонстровано стосовно інгібування деяких функцій у нейтрофілах та інших лейкоцитах, а також функцій остеокластів.

Взагалі, сполуки згідно з винаходом мають загальну структуру (I), є їх фармацевтично прийнятними солями, або їх проліками:



(I)

де А представляє заміщену, як варіант, моноциклічну або дициклічну кільцеву систему, що містить щонайменше два атоми нітрогену, а щонайменше одне кільце системи є ароматичним;

X вибрано з групи, що складається з  $\text{CHR}^b$ ,  $\text{CH}_2\text{CHR}^b$  та  $\text{CH}=\text{C}(\text{R}^b)$ ;

V вибрано з групи, що складається з S, SO,  $\text{SO}_2\text{NH}$ , O,  $\text{C}(\text{=O})$ ,  $\text{OC}(\text{=O})$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{O}$  та  $\text{NHC}(\text{=O})\text{CH}_2\text{S}$ , або Y відсутній;

$\text{R}^1$  та  $\text{R}^2$ , незалежно, вибрані з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}^{1-6}$  алкілу, арилу, гетероарилу, атому галогену,  $\text{NHC}(\text{=O})\text{C}_{1-3}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OR}^a$ ,  $\text{OCF}_3$ ,  $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , CN,  $\text{OC}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ , арил $\text{OR}^b$ , Het,  $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{C}_{1-3}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ , арил $\text{OC}_{1-3}$  алкілен- $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арил $\text{OC}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,  $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,

$\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{-NR}^a\text{SO}_2\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{2-6}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{-NR}^a\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{-NR}^a\text{C}_{1-4}$  алкіленHet,  $\text{OC}_{2-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{CH}(\text{OR}^b)\text{CH}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OC}_{1-4}$  алкіленHet,  $\text{OC}_{2-4}$  алкілен $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{N}(\text{SO}_2\text{C}_{1-4}$  алкіл) $_2$ ,  $\text{NR}^a(\text{SO}_2\text{C}_{1-4}$  алкіл),  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{OSO}_2\text{CF}_3$ ,  $\text{C}_{1-3}$  алкіленарилу,  $\text{C}_{1-4}$  алкіленHet,  $\text{C}_{1-6}$  алкілен $\text{OR}^b$ ,  $\text{C}_{1-3}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{NHC}(\text{=O})\text{C}_{1-3}$  алкіленарилу,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$  гетероциклоалкілу, арил- $\text{OC}_{1-3}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арил $\text{OC}(\text{O})\text{R}^b$ ,  $\text{NHC}(\text{=O})\text{C}_{1-3}$  алкілен- $\text{C}_{3-8}$  гетероциклоалкілу,  $\text{NHC}(\text{=O})\text{C}_{1-3}$  алкіленHet,  $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^b$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{C}_{1-4}$  алкіленHet та  $\text{NHC}(\text{=O})$  галоген $\text{C}_{1-6}$  алкілу;

або  $\text{R}^1$  та  $\text{R}^2$  разом утворюють 3- або 4-членний алкіленовий або алкеніленовий ланцюговий компонент 5- або 6-членного кільця, що як варіант, містить щонайменше один гетероатом;

$\text{R}^3$  вибрано з групи, що складається з заміщеного, як варіант, атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$  алкілу,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$  гетероциклоалкілу,  $\text{C}_{1-4}$  алкіленциклоалкілу,  $\text{C}_{2-6}$  алкілену,  $\text{C}_{1-3}$  алкіленарилу, арил $\text{C}_{1-3}$  алкілу,  $\text{C}(\text{=O})\text{R}^a$ , арилу, гетероарилу,  $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{=S})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{SO}_2\text{R}^a$ ,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{S}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{S}(\text{=O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{NR}^a\text{C}_{1-4}$  алкіленHet,  $\text{C}(\text{=O})\text{C}_{1-4}$  алкіленарилу,  $\text{C}(\text{=O})\text{C}_{1-4}$  алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$  алкіленарилу, як варіант, заміщеного одним чи більше атомами галогену,  $\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ,  $\text{NR}^a\text{SO}_2\text{CF}_3$ , CN,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{C}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$  та  $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$  алкіленHet,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{-C}_{1-4}$  алкіленарилу,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{O})\text{-C}_{1-4}$  алкіленгетероарилу,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{Het}$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{OR}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{NR}^a\text{C}(\text{=O})\text{R}^a$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{O-C}_{1-4}$  алкілен $\text{OR}^a$ ,

$\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ ,  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{-OR}^a$  та  $\text{C}_{1-4}$  алкілен $\text{OC}_{1-4}$  алкілен $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ;

$\text{R}^a$  вибрано з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$  алкілу,

$\text{C}_{3-8}$  циклоалкілу,  $\text{C}_{3-8}$  гетероциклоалкілу,  $\text{C}_{1-3}$  алкілен $\text{N}(\text{R}^a)_2$ , арилу, арил $\text{C}_{1-3}$  алкілу,  $\text{C}_{1-3}$  алкіленарилу, гетероарилу, гетероарил $\text{C}_{1-3}$  алкілу та  $\text{C}_{1-3}$  алкіленгетероарилу;

або дві групи  $\text{R}^a$  разом утворюють 5- або 6-членне кільце, що містить, як варіант, щонайменше один гетероатом;

$\text{R}^b$  вибрано з групи, що складається з атому гідрогену,  $\text{C}_{1-6}$  алкілу, арилу, гетероарилу, арил $\text{C}_{1-3}$  алкілу, гетероарил $\text{C}_{1-3}$  алкілу,  $\text{C}_{1-3}$  алкіленарилу та  $\text{C}_{1-3}$  алкіленгетероарилу;

Het представляє 5- або 6-членне гетероциклічне кільце, насичене або частково чи повністю ненасичене, що містить щонайменше один гетероатом, вибраний з групи, що складається з атомів оксигену, нітрогену та сульфуру, та як варіант, заміщене  $\text{C}_{1-6}$  алкілом або  $\text{C}(\text{=O})\text{OR}^a$ ;

та їх фармацевтично прийнятні солі та сольвати (наприклад, гідрати),

Як це тут використано, термін "алкіл" включає вуглеводневі групи з лінійним чи розгалуженим ланцюгом, що містять визначене число атомів . карбону, звичайно метил, етил та пропіл та бутіл з лінійним чи розгалуженим ланцюгом. Вуглеводнева група може містити до 16 атомів карбону, переважно один-вісім атомів

карбону. Термін "алкіл" включає "шунтований алкіл," тобто,  $C_5$ - $C_{16}$  дициклічну або поліциклічну вуглеводневу групу, наприклад, норборніл, адамантил, дицикло[2,2,2]октил, дицикло[2,2,1]гептил, дицикло(3,2,1)октил, або декагідронафтил. Термін "циклоалкіл" є визначеним як циклічна  $C_3$ - $C_8$  вуглеводнева група, наприклад, циклопропіл, циклобутил, циклогексил та цикlopентил.

Термін "алкеніл" є визначеним ідентично "алкілу" за винятком того, що містить карбон-карбонівий подвійний зв'язок. "Циклоалкеніл" є визначеним подібно до циклоалкілу, за винятком того, що у кільці наявний карбон-карбонівий подвійний зв'язок.

Термін "алкілен" стосується алкілу, що має замісник. Наприклад, термін " $C_{1-3}$ алкіленарил" стосується алкілу, що містить один-три атоми карбону та заміщений арилом,

Термін "галоген" або "атом галогену" є визначеним як флуор, бром, хлор та йод.

Термін "галогеналкіл" є визначеним як алкіл, заміщений одним чи більше галогеновими замісниками, флуором, хлором, бромом, йодом, або їх комбінаціями. Подібно, "Галогенциклоалкіл" є визначеним як циклоалкіл, що має один чи більше галогенових замісників.

Термін "арил," поодинокі або у комбінації, є визначеним тут як моноциклічна або поліциклічна ароматична група, переважно моноциклічна або дициклічна ароматична група, наприклад, феніл або нафтил. Якщо не визначено інше, "арил" може бути незаміщеним або заміщеним, наприклад, одним чи більше, а зокрема одним-трьома, атомами галогену, алкілом, фенілом, гідроксіалкілом, алкоксилем, алкоксіалкілом, галогеналкілом, нітрогрупою, аміногрупою, алкіламіногрупою, ациламіногрупою, алкілтіогрупою, алкілсульфінілом та алкілсульфонілом. Приклади арилів включають феніл, нафтил, дифеніл, тетрагідронафтил, хлорфеніл, флуорфеніл, амінофеніл, метилфеніл, метоксифеніл, трифлуорметилфеніл, нітрофеніл, карбоксифеніл, тощо. Термін "арил- $C_{1-3}$ алкіл" та "гетероарил- $C_{1-3}$ алкіл" є визначеними як арил або гетероарил, що мають  $C_{1-3}$ алкіл як замісник.

Термін "гетероарил" є визначеним тут як моноциклічна або дициклічна кільцева система, що містить одне або два ароматичних кільця і містить щонайменше один атом оксигену, нітрогену або сульфору у ароматичному кільці, і яка може бути незаміщеною або заміщеною, наприклад, одним чи більше, а зокрема одним-трьома замісниками типу атому галогену, алкілу, гідроксилу, гідроксіалкілу, алкоксилу, алкоксіалкілу, галогеналкілу, нітрогрупи, аміногрупи, алкіламіногрупи, ациламіногрупи, алкілтіогрупи, алкілсульфінілу та алкілсульфонілу. Приклади гетероарилів включають тієніл, фурил, піридил, оксазоліл, хіноліл, ізохіназоліл, індоліл, триазоліл, ізотіазоліл, ізоксазоліл, імідазоліл, бензотіазоліл, піразиніл, піримідиніл, тіазоліл та тіадіазоліл.

Термін "Het" є визначеним ж моноциклічна, дициклічна та трициклічна групи, що містять один чи більше гетероатомів, вибраних з групи, що складається з атомів оксигену, нітрогену та сульфору. Група "Het" також може містити оксогрупу ( $=O$ ), приєднану до кільця.

Необмежувальні приклади груп Het включають 1,3-діоксолан, 2-піразолін, піразолідин, піролідін, піперазин, піролін, 2H-піран, 4H-піран, морфолін, тіофолін, піперидин, 1,4-дитіан та 1,4-діоксан.

Термін "гідроксил" є визначеним як -OH.

Термін "алкоксил" є визначеним як -OH, де R - алкіл.

Термін "алкоксіалкіл" є визначеним як алкіл, в якому атом гідрогену заміщений алкоксигрупою,

Термін " (алкілтіо)алкіл" є визначеним подібно алкоксіалкілу, окрім того, що атом сульфору наявний замість атому оксигену.

Термін "гідроксіалкіл" є визначеним як гідроксигрупа, приєднана до алкілу,

Термін "аміногрупа" є визначеним як  $-NH_2$  а термін "алкіламіногрупа" є визначеним як  $-NR_2$ , де щонайменше один R є алкілом, а другий R є алкілом або атомом гідрогену.

Термін "ациламіногрупа" є визначеним як  $RC(=O)N$ , де R є алкілом або арилом.

Термін "алкілтіогрупа" є визначеним як -SR, де R є алкілом.

Термін "алкілсульфініл" є визначеним як  $R-SO_2$ , де R є алкілом.

Термін "аміногрупа" є визначеним як  $-NH_2$ , а термін "алкіламіногрупа" є визначеним як  $-NR_2$ , де щонайменше один R є алкілом, а другий R є алкілом або атомом гідрогену.

Термін "ациламіногрупа" є визначеним як  $RC(=O)N$ , де R є алкілом або арилом.

Термін "алкілтіогрупа" є визначеним як -SR, де R є алкілом.

Термін "алкілсульфініл" є визначеним як  $R-SO_2$ , де R є алкілом.

Термін "алкілсульфоніл" є визначеним як  $R-SO_2$ , де R є алкілом.

Термін "нітрогрупа" є визначеним як  $-NO_2$ ,

Термін "трифлуорметил" є визначеним як  $-CF_3$ .

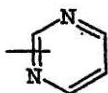
Термін "трифлуорметоксил" є визначеним як  $-OCF_3$ .

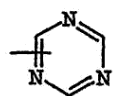
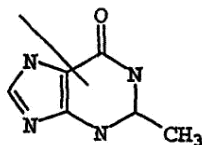
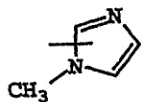
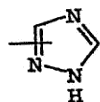
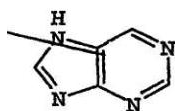
Термін "ціаногрупа" є визначеним як -CN.

У кращих втіленнях X вибрано з групи, що складається з  $CH_2$ ,  $CH_2CH_2$ ,  $CH=CH$ ,  $CH(CH_3)$ ,  $CH_2CH(CH_3)$  та  $C(CH_3)_2$ . У наступних кращих втіленнях Y вибрано з групи, що складається з S та NH, або Y відсутній.

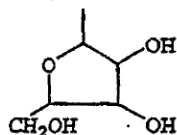
Кільце A може бути моноциклічним або дициклічним. Моноциклічні A-кільцеві системи є ароматичними. Дициклічні A-кільцеві системи містять щонайменше одне ароматичне кільце, але обидва кільця можуть бути ароматичними. Прикладами A-кільцевих систем включають, але без обмеження, імідазоліл, піразоліл, 1,2,3-триазоліл, піридиніл, піримідиніл, піразиніл, 1,3,5-триазиніл, пуриніл, цинолініл, фталазиніл, хіназолініл, хіноксалініл, 1,8-нафтиридиніл, птеридиніл. 1H-індазоліл та бенз-імідазоліл.

У кращій групі сполук формули (I), A репрезентує, як варіант, заміщену кільцеву систему, вибрану з групи, що складається з



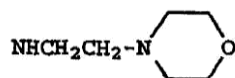


А-кільцева система, як варіант, може бути заміщена одним-трьма замісниками, а переважно одним-двома замісниками, вибраними з групи, що складається з  $N(R^a)_2$ , а тому галогену,  $C_{1-3}$ -алкілу,  $S(C_{1-3}$ -алкілу),  $OR^a$ , та



У другій кращій групі сполук формули (I),  $R^1$  та  $R^2$ , незалежно, репрезентують атом гідрогену,  $OR^3$ , атом галогену,  $C_{1-6}$ -алкіл,  $CF_3$ ,  $HO_2$ ,  $N(R^a)_2$ ,  $NR^aC_{1-3}$ -алкілен $N(R^a)_2$  та

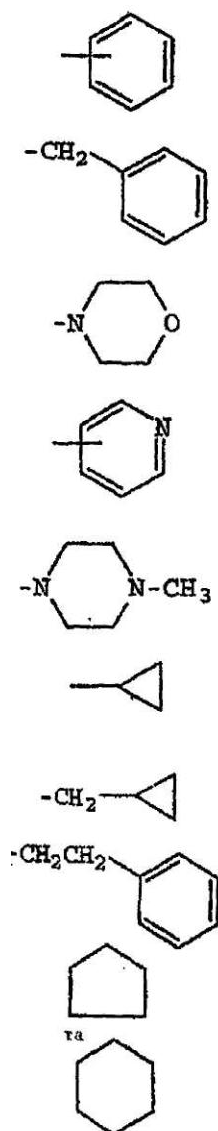
$OC_{1-3}$ -алкілен $OR^a$ . Певні замісники включають, але без обмеження,  $H$ ,  $OCH_3$ ,  $Cl$ ,  $Br$ ,  $F$ ,  $CH_3$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$ ,  $OH$ ,  $N(CH_3)_2$ ,



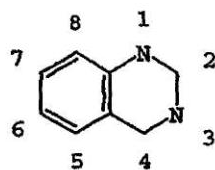
та  $O(CH_2)_2OCH_2C_6H_5$ .  $R^1$  та  $R^2$  також можуть разом утворювати кільце, наприклад, фенільне кільце.

У кращому втіленні,  $R^3$  вибрано з групи, що складається, як варіант, з заміщеного  $C_{1-6}$ -алкілу, арилу, гетероарилу,  $C_{3-8}$ -циклоалкілу,  $C_{3-8}$ -гетероциклоалкілу,  $C(=O)OR^a$ ,  $C_{1-4}$ -алкіленHet,  $C_{1-4}$ -алкілен-циклоалкілу,  $C_{1-4}$ -алкіленарилу,  $C_{1-4}$ -алкілен $C(=O)-$

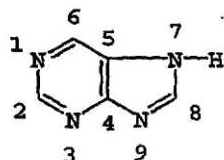
$C_{1-4}$ -алкіленарилу,  $C_{1-4}$ -алкілен $C(=O)OR^a$ ,  $C_{1-4}$ -алкілен- $C(=O)N(R^a)_2$ ,  $C_{1-4}$ -алкілен $C(=O)Het$ ,  $C_{1-4}$ -алкілен $N(R^a)_2$  та  $C_{1-4}$ -алкілен $NR^aC(=O)R^a$ . Певні групи  $R^3$  включають, але без обмеження



Група  $R^3$  може бути заміщеною одним-трьма замісниками, наприклад, атомом галогену,  $OR^a$ ,  $C_{1-6}$ алкілу, арилу, гетероарилу,  $NO_2$ ,  $N(R^a)_2$ ,  $NR^aSO_2CF_3$ ,  $NR^2C(=O)R^E$ ,  $C(=O)OR^a$ ,  $N(R^a)C_{1-4}$ алкілен( $R^a$ ) $_i$ ,  $SO_2N(R^a)_2$ ,  $CN$ ,  $C(=O)R^a$ ,  $C_{1-4}$ алкілен $N(R^a)_2$  та  $OC_{1-4}$ алкілен $N(R^a)_2$ . Певні замісники для групи  $R^3$  включають, але без обмеження,  $Cl$ ,  $F$ ,  $CH_3$ ,  $CH(CH_3)_2$ ,  $OCH_3$ ,  $C_6H_5$ ,  $NO_2$ ,  $NH_2$ ,  $NHC(=O)CH_3$ ,  $CO_2H$  та  $N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)_2$ .



Пуринова кільцева структура та нумерація кільцевої структури такі:



Сполуки згідно з винаходом представлено нижче:

- 3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил[2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 5-хлор-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он;
- 5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2-флуорфеніл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2-метоксифеніл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2,6-дихлорфеніл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2-хлорфеніл)-6-флуор-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2-хлорфеніл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;
- 3-(2-метоксифеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он;

[illegible]

2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-(2-флуорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-бензил-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-морфолін-4-іл-3Н-хіназолін-4-он;  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-3Н-хіназолін-4-он; та  
 2-(6-амінопурил-9-ілметил)-5-хлор-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он.

Термін "проліки" стосується сполук, що швидко перетворюються *in vivo* у сполуку, що має визначену вище структурну формулу (I), наприклад, гідролізом. Створення проліків описано загально Hardma et al. (Eds.), Goodman and Oilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., pp.11-16 (1996). Подальше обговорення представлено Higuchi et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol.14, ASCD Symposium Series та Roche (видавн.), Bioreversible Carriers in Drug Design, Американська Фармацевтична Асоціація та Pergamon Press (1987). Коротше, застосування ліків, супроводжується їх елімінацією з тіла або деякою біотрансформацією, при якій біологічна активність ліків зменшується або зникає. Альтернативно, процес біотрансформації може давати метаболічний побічний продукт, який є активнішим або однаково активним у порівнянні зі спочатку застосованими ліками. Поліпшення розуміння цих процесів біотрансформації призводить до створення так званих "проліків", які після біотрансформації стають фізіологічно активнішими у своєму зміненому стані. Проліки, отже, охоплюють фармакологічно неактивні сполуки, що перетворюються у біологічно активні метаболіти. Для ілюстрації, проліки можуть бути перетвореними у фармакологічно активну форму гідролізом, наприклад, естерного або амідного зв'язку, таким чином уводячи або відкриваючи функціональну групу на утвореному продукті. Проліки можна створювати так, щоб вони реагували з ендогенною сполукою для утворення водорозчинного кон'югату, що далі посилює фармакологічні властивості сполуки, наприклад, збільшенням часом напіввидалення. Альтернативно, проліки можна створювати так, щоб піддавати функціональну групу ковалентній модифікації, наприклад, глюкуроною кислотою, сульфатом, глютаміном, амінокислотами, або ацетатом. Утворений кон'югат може інактивуватися та виділятися у сечу, або ставати потужнішим за вихідну сполуку. Кон'югати високої молекулярної маси також можуть виділятися у жовч, піддаватися розщепленню ферментами, та вивільнятися назад у циркуляцію, таким чином ефективно збільшуючи біологічний час напіввидалення спочатку застосованої сполуки.

Способи ідентифікації негативних регуляторів активності PI3Kδ

Білок PI3Kδ, а також його фрагменти, що виявляють біологічну активність, можна використовувати для скринінгу сполук можливих негативних регуляторів будь-яким з різноманітних способів скринінгу ліків. Негативний регулятор PI3Kδ є сполукою, що зменшує або знищує здатність PI3Kδ стосовно виконання нею будь-якої з її біологічних функцій. Прикладом таких сполук є засіб, що зменшує здатність поліпептиду PI3Kδ до фосфоритування фосфатидилінозиту або націлювання прийнятних структур у клітині. Селективні сполуки, що негативно регулюють активність PI3Kδ, можна оцінити порівнянням їх активності стосовно PI3Kδ з їх активністю стосовно інших білків. Селективні негативні регулятори включають, наприклад, антитіла та інші білки або пептиди, що специфічно приєднуються до поліпептидів PI3Kδ, олігонуклеотиди, що специфічно приєднуються до поліпептидів PI3Kδ, та інші непептидні сполуки (наприклад, виділені або синтетичні органічні молекули), що специфічно взаємодіють з поліпептидами PI3Kδ. Негативні регулятори також включають сполуки, які описано вище, але які взаємодіють зі специфічно зв'язуваними партнерами поліпептидів PI3Kδ.

Зараз кращі цілі для розробки селективних негативних регуляторів PI3Kδ включають, наприклад:

- (1) цитоплазматичні регіони поліпептидів PI3Kδ, що контактують з іншими білками та/або локалізують PI3Kδ у клітині;
- (2) регіони поліпептидів PI3Kδ, що зв'язують специфічно зв'язуючі партнери;
- (3) регіони поліпептидів PI3Kδ, що зв'язують субстрат;
- (4) алостеричні регуляторні сайти поліпептидів PI3Kδ, що можуть або ні безпосередньо взаємодіяти з активним сайтом при регуляторному сигналі;
- (5) регіони поліпептидів PI3Kδ, що опосередковують мультимеризацію.

Наприклад, одною ціллю для розробки модуляторів є ідентифікована регуляторна взаємодія p85 з p110δ, яка може бути залученою у активацію та/або субклітинну локалізацію групи p110δ. Ще інші селективні модулятори включають ті, що розпізнають специфічні регуляторні або кодуєчі PI3Kδ нуклеотидні послідовності. Модулятори активності PI3Kδ можуть бути терапевтично корисними у лікуванні широкого ряду хвороб та фізіологічних станів, у яких є залученою аберантна активність PI3Kδ.

Відповідно, винахід забезпечує способи визначення потужності тест-сполуки як інгібітору поліпептиду PI3Kδ, вказаний спосіб включає етапи: (a) вимір активності поліпептиду PI3Kδ у присутності тест-сполуки; (b) порівняння активності поліпептиду PI3Kδ у присутності тест-сполуки з активністю поліпептиду PI3Kδ у присутності еквівалентної кількості еталонної сполуки (наприклад, сполуки інгібітору PI3Kδ згідно з винаходом, яку тут описано), при цьому нижча активність поліпептиду PI3Kδ у присутності тест-сполуки, ніж у присутності еталонної, вказує, що тест-сполука є потужнішим інгібітором, ніж еталонна сполука, а вища активність поліпептиду PI3Kδ у присутності тест-сполуки, ніж у присутності еталонної вказує, що тест-сполука є менш потужним інгібітором, ніж еталонна сполука.

Винахід крім того забезпечує способи визначення потужності тест-сполуки як інгібітору поліпептиду PI3Kδ, що включає етапи: (a) визначення результату контрольної сполуки (наприклад, сполуки інгібітору PI3Kδ згідно з винаходом, яку тут описано), що інгібує активність поліпептиду PI3Kδ, як контрольний процент інгібування, таким чином визначаючи контрольну кількість інгібітору для контрольної сполуки; (b) визначення кількості тест-сполуки, що інгібує активність поліпептиду PI3Kδ, як контрольний процент інгібування, таким чином визначаючи контрольну кількість інгібітору для тест-сполуки; (c) порівняння контрольної кількості інгібітору для

тест-сполук з контрольною кількістю інгібітору для контрольної сполуки, де нижча контрольна кількість інгібітору для тест-сполуки, ніж для контрольної сполуки вказує, що тест-сполука є потужнішим інгібітором, ніж контрольна сполука, а вища контрольна кількість інгібітору для тест-сполуки, ніж для контрольної сполуки вказує, що тест-сполука є менш потужним інгібітором, ніж контрольна сполука. Згідно з одним аспектом, спосіб використовує контрольну кількість інгібітору, яка є кількістю сполуки, що інгібує активність поліпептиду P13Kδ на 50%, 60%, 70%, або 80%. Згідно з другим аспектом спосіб застосовує контрольну кількість інгібітору, що є кількістю сполуки, що інгібує активні поліпептиду P13Kδ на 90%, 95%, або 99%. Ці способи включають визначення контрольної кількості сполуки інгібітору у біохімічному дослідженні *in vitro*, у дослідженні *in vitro* на основі клітин, або у дослідженні *in vivo*.

Винахід далі забезпечує способи ідентифікації негативної регуляторної активності P13Kδ, що включає етапи: (i) вимір активності поліпептиду P13Kδ у присутності та у відсутності тест-сполуки та (ii) ідентифікацію як негативного регулятора тест-сполуки, що зменшує активність P13Kδ та конкурує зі сполукою згідно з винаходом стосовно зв'язування з P13Kδ. Більш того, винахід забезпечує способи ідентифікації сполук, що інгібують активність P13Kδ, що включає етапи: (i) взаємодію поліпептиду P13Kδ зі сполукою згідно з винаходом у присутності та у відсутності тест-сполуки та (ii) ідентифікацію тест-сполуки як негативного регулятора активності P13Kδ, при цьому сполука конкурує зі сполукою згідно з винаходом стосовно зв'язування з P13Kδ. Винахід тому забезпечує спосіб скринінгу стосовно можливих негативних регуляторів активності P13Kδ та/або для підтвердження режиму дії таких можливих негативних регуляторів. Такі способи можна застосовувати стосовно інших ізоформ P13K паралельно з встановленням порівнюваної активності тест-сполуки стосовно ізоформи та/або стосовно сполуки згідно з винаходом.

Згідно з цими способами, поліпептид P13Kδ може бути фрагментом p110δ, що виявляє кіназну активність, тобто, фрагментом, що включає каталітичний сайт p110δ. Альтернативно, поліпептид P13Kδ може бути фрагментом з p110δ-зв'язувального домену p85 та забезпечувати спосіб ідентифікації алостеричних модуляторів P13Kδ. Способи можна застосовувати у клітинах, що експресують P13Kδ або її субелементи, ендогенно або екзогенно. Відповідно, поліпептид, застосовуваний у такі способи, може бути вільним у розчині, прив'язаним до твердої підкладки, модифікованим для виявлення на поверхні клітин, чи локалізованим інтрацелюлярно. Модуляція активності або утворення зв'язувальних комплексів між поліпептидом P13Kδ та тестованим засобом можна виміряти далі.

Поліпептиди P13K людини є тими, що підлягають високопродуктивному скринінгу у біохімічному дослідженні або дослідженні на основі клітин (HTS) згідно зі способами, відомими та практикованими у рівні техніки, включаючи системи меланофорного аналізу для дослідження взаємодій рецептор-ліганд, системи аналізу на основі дріжджів та системи експресії клітин ссавців. Для огляду, [дивися. Jayawickreme та Kost, Curr Opin Biotechnol, 8:629-34.(1997)].

Автоматизовані та мініатюризовані дослідження HTS включені також, як описано, [наприклад, у Houston та Banks, Curr Opin Biotechnol, 5:734-40 (1997)].

Такі дослідження HTS використовують для скринінгу бібліотек сполук для ідентифікації конкретних сполук, що виявляють потрібні властивості. Будь-яка бібліотека. сполук може бути використовуваною, включаючи хімічні бібліотеки, бібліотеки природних продуктів та комбінаційні бібліотеки, що включають випадкові або виявлені олігопептиди, олігонуклеотиди, або інші органічні сполуки. Хімічні бібліотеки можуть містити відомі сполуки, патентовані структурні аналоги відомих сполук, або сполук, що ідентифіковані при скринінгу природних продуктів.

Бібліотеки природних продуктів є колекціями матеріалів, виділених з природних джерел, звичайно, мікроорганізмів, тварин, рослин або морських організмів. Природні продукти виділяють з їх джерела ферментацією мікроорганізмів, а потім виділенням та екстракцією ферментаційного настою або безпосередньою екстракцією з мікроорганізмів або тканин (рослини або тварин) самих по собі. Бібліотеки природних продуктів включають полікетиди, нерибосомальні пептиди та їх варіанти (включаючи відсутні у природі варіанти). Для огляду [дивися. Cane et al., Science, 282:63-68 (1998)].

Комбінаційні бібліотеки складаються з великого числа споріднених сполук, як-то пептиди, олігонуклеотиди, або інші органічні сполуки як суміш. Такі сполуки є відносно простими для створення та отримання традиційними автоматизованими протоколами синтезу, PCR, клонування, або патентованими способами синтезу. Особливий інтерес представляють пептидні та олігонуклеотидні комбінаційні бібліотеки.

Ще інші бібліотеки за інтересом включають пептиди, білки, пептидоміметик, мультипаралельні синтетичні колекції, рекомбінаторні, та поліпептидні бібліотеки. Для огляду комбінаційної хімії та створених таким чином бібліотек, [дивися Myers, Curr Opin Biotechnol, 8:701-07(1997)].

Оскільки сполуки ідентифіковані як активні як негативні регулятори функцій P13Kδ, а програму оптимізації можна застосовувати у спробі підвищення потужності та або селективності активності. Цей аналіз співвідношень структура-активність (SAR) типово включає ітеративні серії селективних модифікацій структури сполук та їх кореляцію з біохімічною або біологічною активністю. Родини споріднених сполук можуть бути розробленими так, щоб усі вони виявляли потрібну активність, з деякими членами родини, а саме тими, що виявляють придатні фармакологічні профілі, потенційно кваліфікованими як терапевтичні кандидати.

Терапевтичні використання інгібіторів активності P13Kδ

Винахід забезпечує спосіб селективного або специфічного інгібування активності P13Kδ терапевтично або профілактично. Спосіб включає застосування селективного або специфічного інгібітору активності P13Kδ у ефективній для цього кількості. Цей спосіб можна застосовувати при лікуванні людей або тварин, які є або можуть бути суб'єктами з будь-яким станом, симптоми або патологія якого опосередковані експресією або активністю P13Kδ.

"Лікування", як це тут використано, стосується попередження появи розладу у тварини, що може бути схильною до розладу, але у якої його ще не діагностовано, що має його; інгібування розладу, тобто, затримки його розвитку; заспокоєння розладу, тобто, викликання його регресії; або полегшення розладу, тобто,

зменшення важкості симптомів, асоційованих з розладом. "Розлад" стосується визначення медичних розладів, хвороб, станів, синдромів тощо, без обмеження.

Способи згідно з винаходом охоплюють різні режими лікування тварини, переважно ссавця, переважніше примата, а ще переважніше людини. Серед тварин-ссавців, яких можна лікувати є, наприклад, домашні тварини (улюбленці), включаючи собак та котів; сільськогосподарські тварини, включаючи велику рогату худобу, коней, овець, свиней та кіз; лабораторні тварини, включаючи щурів, мишей, кролів, морських свинок та приматів, окрім людини, та тварини з зоопарків. Тварини-нессавці включають, наприклад, птиць, риб, рептилій та амфібій.

Згідно з одним аспектом, спосіб згідно з винаходом можна застосовувати для терапевтичного або профілактичного лікування суб'єктів, які мають запальний розлад або можуть бути суб'єктами, схильними до нього. Один аспект представленого винаходу походить від залучення РІЗКδ у опосередковані аспекти процесу запалення. Без прив'язки до будь-якої теорії можна вважати, що оскільки запалення включає процеси, які звичайно опосередковані активацією та хемотактичною трансміграцією лейкоцитів (наприклад, нейтрофілів, лімфоцитів, тощо.) і оскільки РІЗКδ може опосередковувати такі явища, антагоністи РІЗКδ можуть бути використовуваними для пригнічення порушень, асоційованих з запаленням.

"Запальний розлад", як це тут використано, може стосуватися будь-чого з хвороби, розладу, або синдрому, при яких надлишкова або нерегульована запальна реакція призводить до надлишкових запальних симптомів, пошкодження тканини хазяїна або втрати функції тканини. "Запальний розлад" також стосується патологічного стану, опосередкованого припливом лейкоцитів та/або хемотаксисом нейтрофілів.

"Запалення", як це тут використано, стосується локалізованої захисної реакції, викликані пораненням або пошкодженням тканин, яка допомагає розкладанню, розрідженню, або відокремленню (секвестер) пошкоджувального агента та пораненої тканини. Запалення є помітно асоційоване з припливом лейкоцитів та/або хемотаксисом нейтрофілів. Запалення може бути результатом інфекції патогенними організмами та вірусами та від неінфекційних чинників, як-то травма або реперфузія після інфаркту міокарда або припадку, імунної реакції на чужинний антиген, та аутоімунної реакції. Відповідно, запальні розлади, що підлягають винаходу, охоплюють розлади, асоційовані з реакціями специфічної захисної системи, а також з реакціями неспецифічної захисної системи.

Як це тут використано, термін "специфічна захисна система" стосується компоненту імунної системи, що реагує на присутність специфічних антигенів. Прикладами запалень, утворених від реакції специфічної захисної системи включають класичну відповідь на чужинні антигени, аутоімунні хвороби та реакцію гіперчутливості уповільненого типу, опосередковану Т-клітинами. Хронічні запальні хвороби, відторгнення твердої трансплантованої тканини та органів, наприклад, трансплантатів нирок та кісткового мозку, та хвороба трансплантат проти хазяїна (GVHD), є наступними прикладами запальних реакцій специфічної захисної системи.

Термін "неспецифічна захисна система", як це тут використано, стосується запальних розладів, що опосередковані лейкоцитами, що є нездатними мати імунологічну пам'ять (наприклад, гранулоцити та макрофаги). Приклади запалень, що є результатом, щонайменше частково, реакції неспецифічної захисної системи, включають запалення, асоційовані зі станами, як-то (гострий) респіраторний дистрес-синдром дорослих (ARDS) або синдромі множинного поранення органів; реперфузійні пошкодження; гострий гломерулонефрит; реактивний артрит; дерматоз з компонентами гострого запалення; гострий гнійний менінгіт або іншими запальними розладами центральної нервової системи, як-то припадок, термічні поранення; запальна хвороба кишечника, асоційовані з пересадкою гранулоцитів синдрому; та індукована цитокінами токсичність.

"Аутоімунна хвороба", як це тут використано, стосується будь-якої групи розладів, у яких поранення тканини асоційоване з гуморальною або опосередкованою клітинами реакціями на власні складові тіла. "Алергічна хвороба", як це тут використано, стосується будь-яких симптомів, пошкодження тканин або втрати функції тканин внаслідок алергії. "Артрозна хвороба", як це тут використано, стосується будь-якої хвороби, що визначена запальними ураженнями суглобів, які можуть відноситися до різних етіологій. "Дерматит" як це тут використано, стосується будь-якої з великої родини хвороб шкіри, що визначені запаленням шкіри, які можуть відноситися до різних етіологій. "Відторгнення трансплантату", як це тут використано, стосується будь-якої імунної реакції, спрямованої проти трансплантованої тканини, як-то органів або клітин (наприклад, кісткового мозку), визначеної втратою функції трансплантованої та оточуючої тканин, болю, набрякання, лейкоцитозу та тромбocyтопенії.

Терапевтичні способи згідно з представленим винаходом включають способи лікування розладів, асоційованих з активацією запальних клітин. "Активация запальних клітин" стосується індукованої стимулюючим впливом (включаючи, але без обмеження, цитокіни, антигени або ауто-антитіла) проліферативної клітинної реакції, продукування розчинних посередників (включаючи, але без обмеження цитокіни, оксигенові радикали, ферменти, простаноїди, або вазоактивні аміни), або експресії поверхню клітин нових або збільшеного числа посередників (включаючи, але без обмеження, головні гістосуміст антигени або молекули адгезії клітин) у запальних клітинах (включаючи, але без обмеження моноцити, макрофаги, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, гранулоцити (тобто, поліморфнонуклеарні лейкоцити, як-то нейтрофіли, базофіли та еозинофіли), тучні клітини, дендритні клітини, клітини Лангерханса та ендотеліальні клітини). Фахівці у рівні техніки повинні розуміти, що активация одного або комбінації цих фенотипів у цих клітинах може сприяти початку, збереженню, або загостренню запального розладу.

Сполуки згідно з винаходом виявлені як здатні до інгібування вивільнення супероксиду нейтрофілами. Супероксид вивільняється нейтрофілами у відповідь на будь-який з різноманітності стимулюючих чинників, включаючи сигнали інфекції, як механізм знищення клітин. Наприклад, вивільнення супероксиду відоме як індуковане фактором альфа некрозу пухлин (TNFα), який вивільняється макрофагами, тучними клітинами та лімфоцитами при контакті з компонентами стінки бактеріальної клітини, як-то ліпополісахарид (LPS). TNFα є надзвичайно потужним та різноманітним активатором процесів запалення, будучи залученим у активацію



нейтрофілів та різних інших типів клітин, індукцію адгезії лейкоцит/ендотеліальних клітин, пірексію, посилене продукування МНС класу I та стимуляцію ангіогенезу. Альтернативно, вивільнення супероксиду може бути стимульованим форміл-Met-Leu-Phe (fMLP) або іншими пептидами, що блокують N-закінчення формілованим метіоніном. Такі пептиди нормально не знайдено у еукаріотах, але вони фундаментально характеризують бактерії, та є сигналом присутності бактерій для імунної системи. Лейкоцити, експресуючі рецептор fMLP, наприклад, нейтрофіли та макрофаги, стимулюють мігрування уверх градієнтів цих пептидів (тобто, хемотаксис) назустріч локалізації інфекції. Як тут продемонстровано, сполуки згідно з винаходом інгібують стимульоване вивільнення супероксиду нейтрофілами у реакції на TNF $\alpha$  або fMLP. Інші функції нейтрофілів, включаючи стимульований екзоцитоз та спрямовану хемотактичну міграцію, також показані як такі, що інгібуються інгібіторами PI3K згідно з винаходом. Відповідно, сполуки згідно з винаходом, можна очікувати, будуть корисними при лікуванні розладів, як-то запальних розладів, які опосередковані будь-якою з цих функцій нейтрофілів або усіма ними.

Представлений винахід робить можливими способи лікування таких хвороб, як артритні хвороби, як-то ревматоїдний артрит, моноуглобовий артрит, остеоартрит, подагричний артрит, спондиліт; хвороба Бехтета; сепсис, септичний шок, ендотоксичний шок, грам-негативний сепсис, грам-позитивний сепсис та синдром токсичного шоку; синдром множинного поранення органів, вторинний стосовно септицемії, травми, або геморагії; офтальмологічні розлади як-то алергічний кон'юнктивіт, весняний кон'юнктивіт, увеїт та асоційована зі зоровою залозою офтальмопатія; еозинофільна гранулома; розлади легенів або респіраторні розлади як-то астма, хронічний бронхіт, алергічний риніт, ARCS, хронічна хвороба запалення легенів (наприклад, хронічна обструктивна хвороба легенів), силікоз, саркоїдоз легенів, плеврит, альвеоліт, васкуліт, емфізема, пневмонія, бронхоектазія та легенева киснева токсичність; реперфузійне пошкодження міокарду, мозку, або кінцівок; фіброз як-то цистичний фіброз; утворення келоїдних тканин або утворення шрамів; атеросклероз; автоімунні хвороби, як-то системний червоний вовчак (SLE), автоімунний тироїдит, множинний склероз, деякі форми діабету, синдром Рейнода; та розлади відторгнення трансплантату, як-то GVHD та відторгнення алотрансплантату; хронічний гломерулонефрит; запальні хвороби кишечника як-то хронічна запальна хвороба кишечника (CIBD), хвороба Крона, виразковий коліт та некротичний ентероколіт; запальні дерматози, як-то контактний дерматит, атопічний дерматит, псоріаз, або кропивниця; лихоманка та міалгії внаслідок інфекції; запальних розладів центральної чи периферійної нервової системи, запальних розладів, як-то менінгіт, енцефаліт та поранення мозку або спинного хребта внаслідок другорядної травми; синдрому Сьоргенсена; хвороб, в яких залучено лейкоцитарний діapedез; алкогольний гепатит; бактеріальної пневмонії; опосередкованої комплексом антиген-антитіло хвороби; гіповолемічний шок; цукровий діабет типу I; гостра та уповільнена гіперчутливість; хворобливі стани внаслідок лейкоцитарної дискразії та метастазів; термічних поранень; асоційовані з переносом гранулоцитів синдроми; та індукована цитокінами токсичність.

Спосіб може бути корисним при лікуванні суб'єктів, які є або можуть бути суб'єктами реперфузійного пошкодження, тобто, пошкодження одержаного у ситуації, у якій тканина або орган проходять період ішемії, а потім реперфузії. Термін "ішемія" стосується локалізованої анемії тканини внаслідок обструкції притоку артеріальної крові. Тимчасова ішемія, а потім реперфузія характеристично призводять до активації нейтрофілів та трансміграції через ендотелій кров'яних судини у пошкодженій ділянці. Накопичення активованих нейтрофілів в свою чергу призводить до створення реактивних метаболітів кисню, які пошкоджують компоненти залученої тканини або органу. Це явище "реперфузійного пошкодження" звичайно асоційоване зі станами, як-то судинний приступ (включаючи глобальну та фокальну ішемію), геморагічний шок, міокардальну ішемію або інфаркт, трансплантацію органу та церебральний вазоспазм. Для ілюстрації, реперфузійне пошкодження відбувається протягом шунтування серця або протягом зупинки серця, коли серце, будучи позбавлене отримання крові, відчуває реперфузію. Очікують, що інгібування активності PI3K призводитиме до зменшення ступеню реперфузійного пошкодження у таких ситуаціях.

З огляду на нервову систему глобальна ішемія відбувається, коли потік крові всередину мозку тимчасово припиняється. Глобальна ішемія може виникати від зупинки серця. Фокальна ішемія відбувається, коли частина мозку позбавлена нормальної подачі крові. Фокальна ішемія може виникати від тромбоемболічного закупорювання церебральних судин, травматичного поранення голови, набряку, або пухлини мозку. Навіть тимчасова глобальна та фокальна ішемія може викликати широкорозповсюджені нейронні пошкодження. Хоча пошкодження нервової тканини відбувається протягом годин або навіть днів після початку ішемії, деякі перманентні пошкодження нервової тканини можуть розвиватися у початкові хвилини після затримки потоку крові до мозку.

Ішемія також може відбуватися при інфаркті міокарда серця та інших серцево-судинних розладах, при яких коронарні артерії закупорені в результаті атеросклерозу, тромбозу, або спазму. Відповідно, винахід, можна думати, корисний для лікування пошкоджень серцевих тканин, зокрема пошкоджень, утворених в результаті серцевої ішемії або викликаних реперфузійним пошкодженням у савців.

Згідно з другим аспектом, селективні інгібітори активності PI3K, як-то сполуки згідно з винаходом, можна застосовувати у способах лікування хвороб кісток, особливо хвороб, у яких функція остеокластів є ненормальною або небажаною. Як показано у прикладі 6, нижче, сполуки згідно з винаходом інгібують функцію остеокластів *in vitro*. Відповідно, використання таких сполук та інших селективних інгібіторів PVBK може бути цінним при лікуванні остеопорозу, хвороби Педжета та споріднених з ресорбцією кісток розладів.

Згідно з наступним аспектом, винахід включає способи використання сполуки інгібітору PI3K для інгібування росту або проліферації ракових клітин гематопоетичного походження, переважно ракових клітин лімфоїдного походження, а переважніше ракових клітин, споріднених з В-лімфоцитами або попередниками В-лімфоцитів або похідними від них. Типи раку, придатні для лікування, використовуючи спосіб згідно з винаходом, включають, без обмеження, лімфоми, наприклад, злоскісні новоутворення лімфоїдних та ретикулоендотеліальних тканин, як-то лімфома Буркітта, лімфома Ходжкінса, лімфоми не-Ходжкінса, лімфоцитні лімфоми, тощо; множинні мієломи, а також лейкомії, як-то лімфоцитні лейкомії, хронічні мієлоїдні

(мієлоїгенні) лейкемії, тощо. У кращому втіленні сполуки інгібітору РІЗКδ можуть бути використовуваними для інгібування або контролю росту або проліферації клітин хронічної мієлоїдної (мієлоїгенної) лейкемії.

Згідно з другим аспектом, винахід включає спосіб пригнічення функції базофілів та/або тучних клітин і таким чином надавати можливості лікування хвороб або розладів, визначених надлишковою або небажаною активністю базофілів та/або тучних клітин. Згідно зі способом, можуть бути використовуваними сполуки згідно з винаходом, що селективно інгібують експресію або активність фосфатидилінозит-3-кінази-дельта (РІЗКδ) у базофілах та/або тучних клітинах. Переважно, спосіб застосовує інгібітор РВКδ у кількості, достатній для інгібування стимульованого вивільнення гістаміну базофілами та/або тучними клітинами. Відповідно, використання таких сполук та інших селективних інгібіторів РІЗКδ може бути цінним при лікуванні хвороб, визначених вивільненням гістаміну, тобто, алергічних розладів, включаючи такі розлади, як хронічна обструктивна хвороба легенів (COPD), астма, ARDS, емфізема та споріднені розлади.

Фармацевтичні композиції інгібіторів активності РІЗКδ

Сполуку згідно з представленим винаходом можна вживати в чистому вигляді, але звичайно сполуку використовують у формі фармацевтичної композиції або рецептури. Відповідно, представлений винахід також забезпечує фармацевтичні композиції, що включають хімічну або біологічну сполуку ("засіб"), що є активною як модулятор активності РІЗКδ та біосумісний фармацевтичний носій, ад'ювант або середовище. Композиція може включати засіб тільки як активну частину або у комбінації з іншими засобами, як-то оліго- або поліпептиди, оліго- або поліпептиди, ліки, або гормони у суміші з ексципієнтом або іншим фармацевтично прийнятними носіями. Носії та інші інгредієнти можна вважати фармацевтично прийнятними такою мірою, наскільки вони сумісні з іншими інгредієнтами композиції та нешкідливі для їх реципієнта.

Способи складання та вживання фармацевтичних композицій можна знайти у Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990. Фармацевтичні композиції згідно з представленим винаходом можна виготовити, використовуючи будь-який звичайний спосіб, наприклад, змішування, розчинення, гранулювання, створення драже, розтирання у порошок, емульгування, капсулювання, включення у матрицю, формування з розплаву, розпилювальну сушку, або процеси ліофілізації. Однак, оптимальну фармацевтичну композицію визначатиме фахівець у рівні техніки залежно від шляху застосування та потрібної дози. Такі композиції можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення *in vivo* та швидкість виведення *in vivo* застосовуваного засобу. Залежно від лікованого стану, ці фармацевтичні композиції можна формувати та застосовувати систематично або локально.

Фармацевтичні композиції формують з вмістом придатних фармацевтично прийнятних носіїв, вони можуть, як варіант, включати ексципієнти та допоміжні засоби, що полегшують переробку активних сполук у препарати, що можуть бути використовуваними фармацевтично. Модальність застосування загалом визначатиме природа носія. Наприклад, композиції для парентерального застосування можуть включати водні розчини активних сполук у водно-розчинній формі. Носії, придатні для парентерального застосування, можуть бути вибраними серед фізіологічного розчину, буферованого фізіологічного розчину, декстрози, води та інших фізіологічно сумісних розчинів. Кращими носіями для парентерального застосування є фізіологічно сумісні буфери, як-то розчин Ханка, розчин Рінгера, або буферований фізіологічний розчин. Для застосування до тканин або клітин у композиції використовують пенетранти, прийнятні для проникнення через певний бар'єр. Такі пенетранти загалом відомі у рівні техніки. Для препаратів, що включають білки, композиція може включати стабілізуючі матеріали, як-то поліюлі (наприклад, сахарозу) та/або сурфактанти (наприклад, неіоногенні сурфактанти), тощо.

Альтернативно, композиції для парентерального використання можуть включати дисперсії або суспензії активних сполук, отримані як прийнятні масляні суспензії для ін'єкцій. Придатні ліпофільні розчинники або середовища включають олії, як-то кунжутну олію, та такі синтетичні естери жирних кислот, як етилолеат або тригліцериди, або ліпосоми. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, що збільшують в'язкість суспензії, як-то натрій-карбокси-метилцелюлоза, сорбіт, або декстран, як варіант, суспензія також може містити придатні стабілізатори або засоби, що збільшують розчинність сполук для можливості отримання високо концентрованих розчинів. Водні полімери, що забезпечують чутливу до рН солюбілізацію та/або безперервне вивільнення активного засобу, також можуть бути використовуваними як покриття або матричні структури, наприклад, метакрилові полімери, як-то серії EUDRAGIT®, доступні від Rohm America Inc. (Piscataway, NJ) Емульсії наприклад, дисперсії масло-у-воді та вода-у-маслі, як варіант, стабілізовані засобом емульгування або диспергатором (поверхнево-активні матеріали, сурфактанти), також можуть бути використовуваними. Суспензії можуть містити містити суспендувальні засоби, як-то етоксифіковані ізостеарилові спирти, поліоксіетиленсорбіт та естери сорбіту, мікрокристалічна целюлоза, метагідроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар, камедь трагакант та їх суміші.

Ліпосоми, що містять активний засіб також, можна застосовувати для парентерального застосування. Ліпосоми загалом є похідними від фосфоліпідів або інших ліпідів. Композиції у формі ліпосом також можуть містити інші інгредієнти, як-то стабілізатори, консерванти, ексципієнти, тощо. Кращі ліпіди включають фосфоліпіди та фосфатидилхоліни (лецитини), природні та синтетичні. Способи отримання ліпосом відомі у рівні техніки. [Дивися, наприклад, Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Vol. XIV, p.33, Academic Press, New York (1976)].

Фармацевтичні композиції, що включають засіб у дозах, придатних для перорального використання, можна формувати, використовуючи фармацевтично прийнятні носії добре відомі у рівні техніки. Препарати, сформовані для перорального використання можуть бути у формі таблеток, пілюль, капсул, облаток, драже, коржів, рідин, гелів, сиропів; пульпи, еліксирів, суспензій, або порошоків. Для ілюстрації, фармацевтичні препарати для перорального використання можуть бути отриманими поєднанням активних сполук з твердим ексципієнтом, як варіант, розмеленням утвореної суміші та перетворенням суміші у гранули, а далі додаванням придатних допоміжних засобів, якщо потрібно, для отримання серцевини таблетки або драже. Пероральні композиції можуть застосовувати рідкі носії типу, подібного до того, що описано для парентерального використання, наприклад, буферовані водні розчини, суспензії, тощо.

Кращі пероральні композиції включають, таблетки, драже та желатинові капсули. Ці препарати можуть містити один з ексципієнтів, як включають, без обмеження:

- a) розріджувачі, як-то сахари, включаючи лактозу, декстрозу, сахарозу, маніт, або - сорбіт;
- b) зв'язувальні засоби, як-то алюмосилікат магнію, кукурудзяний, пшеничний, рисовий, картопляний тощо крохмаль;
- c) целюлозні матеріали, як-то метилцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза, та натрій-карбоксиметилцелюлоза, полівінілпіролідон, камеді, як-то гуміарабік та камедь трагаканту, та білки, як-то желатин та колаген;
- d) дезінтегратори або солюбілізувальні засоби, як-то перехресно-зшитий полівінілпіролідон, крохмалі, агар, алгінова кислота або такі її солі, як алгінат натрію, або газовиділяючі композиції;
- e) змащувальні засоби, як-то оксид силіцію, тальк, стеаринова кислота або її сіль магнію або кальцію, та поліетиленгліколь;
- f) ароматизатори та підсолюджувальні засоби;
- g) барвники або пігменти, наприклад, для ідентифікації продукту або для визначення кількості (доз) активної сполуки; та
- h) інші інгредієнти, як-то консерванти, стабілізатори, засоби для набрякання, засоби емульгування, промотори розчину, солі для регуляції осмотичного тиску та буфери.

Желатинові капсули включають капсули з щільною посадкою, зроблені з желатину, а також м'які герметизовані капсули, зроблені з желатину та такої обмазки, як гліцерин або сорбіт. Капсули з щільною посадкою можуть містити активний інгредієнт у суміші з наповнювачами, зв'язувальними засобами, змащувальними засобами, та/або стабілізаторами тощо. У м'яких капсулах активні сполуки можна розчиняти або суспендувати у придатних рідинах, як-то олії, рідкі парафін, або рідкий поліетиленгліколь зі стабілізаторами або без них.

Серцевини драже можуть бути покриті придатним покриттям, як-то концентровані розчини цукру, які також можуть містити гуміарабік, тальк, полівінілпіролідон, гель карбополу, поліетиленгліколь, та/або діоксид титану, розчини глазури та придатні органічні розчинники або суміші розчинників.

Фармацевтичні композиції можуть включати сіль активного засобу. Солі сприяють більшій розчинності у водному або іншому протонному розчиннику, ніж у відповідних вільних кислот або основ. Фармацевтично прийнятні солі добре відомі у рівні техніки. Сполуки, що містять кислотні групи можуть утворювати фармацевтично прийнятні солі з придатними катіонами. Придатні фармацевтично прийнятні катіони включають, наприклад, катіони лужних металів (наприклад, натрію або калію) та лужноземельних металів (наприклад, кальцію або магнію).

Сполуки структурної формули (I), що містять основні групи, можуть утворювати фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі з придатними кислотами. [Наприклад, Berge et al. детально описують фармацевтично прийнятні солі у J. Pharm Sci, 66:1 (1977)]. Солі можуть бути отриманими *in situ* протягом кінцевого виділення та очистки сполук згідно з винаходом або окремо реакцією вільної функціональної основної групи з придатною кислотою.

Репрезентативні кислотно-адитивні солі включають, але без обмеження, ацетат, адипат, алгінат, цитрат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, дисульфат, бугарат, камфорат, камфорол-сульфонат, диглюконат, гліцерофосфат, гемі-сульфат, гептаноат, гексаноат, фумарат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, 2-гідроксетан-сульфонат (ізотіонат), лактат, малеат, метан-сульфонат чи -сульфат, нікотинат, 2-нафталінсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, сукцинат, тартрат, тіоціанат, фосфат або гідрофосфат, глютамат, гідрокарбонат, п-толуолсульфонат та ундеканоат. Приклади кислот, що можна застосовувати для утворення фармацевтично прийнятних кислотно-адитивних солей включають, без обмеження, такі неорганічні кислоти, як гідрохлоридна кислота, гідробромідна кислота, сульфатна кислота та фосфатна кислота та так органічні кислоти як щавлева кислота, maleїнова кислота, янтарна кислота та лимонна кислота.

У світлі вищеведеного будь-які представлені тут посилання на сполуки згідно з представленим винаходом включають сполуки структурних формул (I)-(V), а також їх фармацевтично прийнятні солі та сольвати, а також їх проліки.

Основно-адитивні солі можуть бути отриманими *in situ* протягом кінцевого виділення та очистки сполук згідно з винаходом, або окремо реакцією карбоксильної групи з придатною основою, як-то гідроксид, карбонат, або гідрокарбонат катіону фармацевтично прийнятного металу, або з аміаком або органічним первинним, вторинним, або третинним аміном. Фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі включають, але без обмеження, солі на основі катіонів лужних металів або лужноземельних металів, як-то солі літію, натрію, калію, кальцію, магнію та алюмінію тощо, та нетоксичні солі катіонів четвертинного амонію та амінів, включаючи солі амонію, тетраметиламонію, тетраетиламонію, метиламонію, диметиламонію, триметиламонію, етиламонію, діетиламонію, триетиламонію тощо. Інші репрезентативні органічні аміни, придатні для утворення основно-адитивних солей, включають етилендіамін, етаноламін, діетаноламін, піперидин, піперазин, тощо.

Основні нітрогено-вмісні групи можуть бути перетвореними у четвертинні такими засобами, як нижчі алкілгалогеніди, як-то метил-, етил-, пропіл- та бутілхлориди, -броміди та -йодиди; діалкілсульфатами типу диметил-, діетил-, дибутил- та діамілсульфатів; довголанцюгові алкілгалогеніди, як-то децил-, лаурил-, міристил- та стеарилхлориди, -броміди та -йодиди; арил-алкілгалогеніди, як-то бензил- та фенетил-броміди; та інші. Продукти, що мають модифіковану розчинність або здатність до диспергування отримують таким чином.

Композиції, що включають сполуку згідно з винаходом, сформовану у фармацевтично прийнятному носії можуть бути отриманими, розміщеними у прийнятній ємності та помічені ярликом для лікування визначених станів. Відповідно, їх також розглядають продукт виробництва, як-то ємність, що включає дозовану форму

сполуки згідно з винаходом та ярлик, що містить інструкції стосовно використання сполуки. Комплекти згідно з винаходом розглядають також. Наприклад, комплект може включати дозовану форму фармацевтичної композиції та упаковану вставку, що містить інструкції стосовно використання композиції при лікуванні медичного стану. У будь-якому випадку стани, визначені на ярлику, можуть включати лікування запальних розладів, раку тощо.

Способи застосування інгібіторів активності PI3Kδ

Фармацевтичні композиції, що включають інгібітор активності PI3Kδ, можна застосовувати до суб'єкту будь-яким звичайним способом, включаючи парентеральні та ентеральні способи. Парентеральне застосування включає способи, у яких композицію вживають іншим шляхом, ніж через шлунково-кишковий тракт, наприклад, внутрішньовенними, внутрішньоартеріальними, інтраперитональними, інтрамедулярними, внутрішньом'язовими, внутрішньосуглобовими, інтратекальними та інтравентрикулярними ін'єкціями. Ентеральне застосування включає, наприклад, пероральне (включаючи букальне та сублінгвальне) та ректальне застосування. Трансепітеліальне застосування включає, наприклад, застосування через слизову оболонку та трансдермальне застосування.

Застосування через слизову оболонку включає, наприклад, ентеральне застосування, а також назальне, інгаляційне та глибоколегеневе застосування; вагінальне застосування; та ректальне застосування. Трансдермальне застосування включає пасивне або активне трансдермальне або трансдермальне вживання, включаючи, наприклад, пластири та пристрої для іонофорезу, а також місцеве нанесення паст, цілющих мазей, або притирок. Парентеральне застосування також може бути супроводжуване використанням способів із застосуванням високого тиску, наприклад, POWDERJECT®.

Хірургічні способи включають імплантування депо (резервуару) композицій, осмотичних насосів, тощо. Кращим шляхом застосування для лікування запалення може бути локальна або місцева доставка для локалізованих розладів, як-то артрит, або системна доставка для розсіяних розладів, наприклад, внутрішньовенна доставка для реперфузійних пошкоджень або для системних станів, як-то септицемія. Для інших хвороб, включаючи ті, у яких залучено респіраторний тракт, наприклад, хронічну обструктивну хворобу легенів, астму, та емфізему, застосування можна досягти інгаляціями або глибоколегеневим застосуванням спреїв, аерозолів, порошків, тощо.

Для лікування злоякісних хвороб, особливо лейкемії та інших розсіяних типів раку, парентеральне застосування звичайно є кращим. Композиції сполук для їх оптимізації для біорозподілу після парентерального застосування сполук інгібітору PI3Kδ можна вживати до, протягом або після застосування хемотерапії, радіотерапії та/або хірургії.

Більш того, терапевтичний індекс сполуки інгібітору PI3Kδ може бути посиленням модифікацією або дериватизацією сполуки для цільової доставки до ракових клітин, експресуючих маркер, що ідентифікує клітини як такі. Наприклад, сполуки можуть бути зв'язаними з антитілом, що розпізнає маркер, який є селективним чи специфічним для ракових клітин, так, щоб довести сполуки до зони поруч з клітинами для їх локальної дії, як описано раніше [дивися наприклад, Pietersz et al., *Immunol Rev.* 129:57 (1992); Trail et al., *Science*, 261:212 (1993); та Rowlinson-H-Busza et al., *Curr Opin Oncol*, 4:1142 (1992)]. Спрямована до пухлин доставка цих сполук посилює терапевтичну користь серед іншого тим, що мінімізує потенційну несприятливу токсичність, що може бути результатом радіаційного лікування або хемотерапії. Згідно з другим аспектом, сполуки інгібітору PI3Kδ та радіоізотопи або хемотерапевтичні засоби можуть бути спряженими з тими ж самими анти-пухлинними антитілами.

Для лікування ресорбційних розладів кісток або опосередкованих остеокластами розладів, інгібітори PI3Kδ можуть бути доставлені у будь-який придатний спосіб. Може бути бажаним фокальне застосування, як-то внутрішньосуглобовими ін'єкціями. У деяких випадках може бути бажаним сполучення сполуки з групою, що може націлювати сполуки до кісток. Наприклад, інгібітор PI3Kδ може бути сполученим зі сполукою з високою спорідненістю до гідроксіапатиту, який є головною складовою кістки. Цього можна досягти, наприклад, пристосуванням способу сполучення з тетрацикліном, розробленим для цільової доставки естрогену до кісток [Orme et al., *BioorgMed Chem Lett*, 4 (11):1375-80 (1994)].

Для того, щоб бути ефективними терапевтично у модуляції цілей центральної нервової системи, засоби, використовувані у способах згідно з винаходом повинні легко долати бар'єр кров-мозок при периферійному вживанні. Сполуки, що не можуть долати бар'єр кров-мозок, однак, можуть ще бути ефективно вживаними внутрішньовенним шляхом.

Як показано вище, характеристики засобу сам по собі та композиції засобу можуть впливати на фізичний стан, стабільність, швидкість вивільнення *in vivo* та швидкість *in vivo* зникнення вживаного засобу. Таку фармакокінетичну та фармакодинамічну інформацію можна зібрати через доклінічні дослідження *in vitro* та *in vivo*, далі підтверджені на людях протягом курсу клінічних досліджень. Отже, для будь-якої сполуки, використовуваної у способі згідно з винаходом, терапевтично ефективна доза може бути оцінена спочатку з даних біохімічного дослідження та/або дослідження на основі клітин. Далі, дозування можна формувати у тваринних моделях для отримання бажаних циркуляційних концентраційних меж, що модулюють експресію або активність PI3Kδ. Після проведення дослідження на людях з'ясуватиметься наступна інформація стосовно прийнятних рівнів дозування та тривалості лікування для різних хвороб та станів.

Токсичність та терапевтичну ефективність таких сполук можна визначити стандартними фармацевтичними способами у культурах клітин або на експериментальних тваринах, наприклад, для визначення LD<sub>50</sub> (доза, летальна для 50% популяції) та ED<sub>50</sub> (доза терапевтично ефективна у 50% популяції). Дозове співвідношення між токсичною та терапевтичною дією є "терапевтичним індексом", який звичайно виражають як співвідношення LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Сполуки, що виявляють великі терапевтичні індекси, тобто, токсична доза є суттєво вищою, ніж ефективна доза, є кращими. Отримані дані з такого дослідження культур клітин та додаткового дослідження тварин можуть бути використовуваними у формуванні меж дозування для використання людиною. Дозування таких сполук знаходиться переважно в межах циркуляційних концентрацій, що включають величину ED<sub>50</sub> з малою або відсутньою токсичністю.

Стосовно способів згідно з винаходом можуть бути використовуваними будь-які ефективні режими застосування, що регулюють часи прийому та послідовність доз. Дозовані засоби переважно включають елементи фармацевтичного дозування, що включають ефективну кількість засобу. Як це тут використано, "ефективна кількість" стосується кількості, достатньої для модуляції експресії або активності РІЗК $\beta$ , та/або призводить до вимірюваної зміни у фізіологічних параметрах суб'єкту після застосування одного чи більше елементів фармацевтичного дозування.

Прикладом рівнів дозування для людини є рівні порядку приблизно від 0,001 міліграм активного засобу на кілограм маса тіла (мг/кг) до приблизно 100мг/кг. Звичайно, елементи дозування активного засобу включають приблизно від 0,01мг до приблизно 10000мг, переважно приблизно від 0,1мг до приблизно 1000мг, залежно від показань, шляху застосування, тощо. Залежно від шляху застосування, придатну дозу можна розрахувати згідно з масою тіла, площею поверхні тіла, або розміром органу. Кінцевий режим дозування визначатиме ведучий лікар з точки зору прийнятої медичної практики, зважаючи на різні фактори, що модифікують дію ліків, наприклад, специфічної активності засобу, особливості та важкості хвороби, реактивності пацієнта, віку, стану, маси тіла, статі та діти пацієнта і важкості будь-якої інфекції. Додаткові фактори, що можна брати до уваги включають час та частоту застосування, комбінації ліків, реакційну чутливість та толерантність/реакцію на терапію. Наступну деталізацію дозування, прийнятого для лікування, що включає будь-яку зі згаданих тут композицій, звичайно робить компетентний фахівець без надлишкового експериментування, особливо у світлі інформації стосовно дозування та розкритих досліджень, а також фармакокінетичних клінічних досліджень людей. Прийнятні дозування можуть бути підсумовані через використання признаних досліджень стосовно визначення концентрації засобу у рідинах тіла або інших зразках разом з даними реакції на дозу.

Частота отримання дози залежатиме від фармакокінетичних параметрів засобу та шляху застосування. Дозування та застосування підганяють, щоб забезпечити достатні рівні активної складової або для підтримування потрібної дії. Відповідно, фармацевтичні композиції можна вживати одною дозою, багатьма дискретними дозами, безперервним вливанням, безперервним вивільненням з депо, або їх комбінаціями, які потрібні для підтримування потрібного мінімуму рівня засобу. Короткодійні фармацевтичні композиції (тобто, з коротким час напіввидалення) можна вживати раз на добу або частіше, ніж раз на добу (наприклад, два, три, або чотири разів на добу). Довгодійні фармацевтичні композиції можна вживати кожні 3-4 доби, кожного тижня, або раз кожні два тижні. Насоси, як-то підшкірні, інтраперитональні, або субдуральні насоси, можуть бути кращими для безперервного вливання.

Наступні приклади забезпечують розуміння винаходу та попередні умови розуміння звичайних способів, добре відомих фахівцям у рівні техніки, до як приклади, що стосуються, наприклад, будови векторів та плазмід, вставки генів, що кодують поліпептиди, у такі вектори та плазмиди, або інтродукції векторів та плазмід у клітини хазяїна. Такі способи описані у деталях у раді публікацій, включаючи, [наприклад, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Ausubel et al. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994); та Ausubel et al. (Eds.) Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc. (1999)], конкретні матеріали та умови, описані далі, призначені для ілюстрації конкретних аспектів винаходу без обмеження його рамок та змісту.

#### ПРИКЛАД 1

Отримання та очистка рекомбінантних РІЗК $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\delta$

Рекомбінантні гетеродимерні комплекси РІЗК, що складаються з каталітичного субелементу р110 та регуляторного субелементу р85 надекспресували, використовуючи бакуловірусну експресійну систему BAC-DO-BAC $\text{®}$  HT (GIBCO/BRL) та далі очищали для використання у біохімічному дослідженні. Чотири РІЗК-кінази класу I клонували у бакуловірусні вектори таким чином:

р110 $\delta$ : Мічений FLAG $\text{®}$  варіант р110 $\delta$  людини (SEQ ID NO:1) [дивися Chantry et al., J Biol Chem, 272:19236-41 (1997)] субклонували, використовуючи стандартні способи рекомбінації ДНК, у сайт BamHI-XbaI експресійного вектору клітин комах рFastbac HTb (Life Technologies, Gaithersburg, MD), так, щоб клон був у рамці разом з His-міткою вектору. Система FLAG $\text{®}$  [описана у патентах США №№4703004; 4782137; 4851341; та 5011912], а реагенти є доступними від Eastman Kodak Co.

р110 $\alpha$ : Подібно способу, використовуваному для р110 $\delta$ , описаному вище, FLAG $\text{®}$ -мічений варіант р110 $\alpha$  [дивися Volinia et al., Genomes, 24 (3):427-477 (1994)] субклонували у сайти BamHI-HindIII рFastbac HTb (Life Technologies) так, щоб клон був у рамці разом з His-міткою вектору.

р110 $\beta$ : Клон р110 $\beta$  [дивися Hu et al., Mol Cell Biol, 13:7,677-88. (1993)] ампліфікували з наявної бібліотеки кДНК селезінки людини (Clontech, Palo Alto CA) згідно з інструкціями виробника, використовуючи наступні праймери:

##### 5' Праймер

5'-GATCGAATTCGGCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGCTTC  
AGTTTCATAATGCCTCC-3' (SEQ ID NO:3)

##### 3' Праймер

5'-GATCGCGGCGCTTAAGATCTGTAGTCTTTCGAACTGTGTG-3' (SEQ ID NO:4)

5' праймер вставляли у мітку FLAG $\text{®}$  у рамці разом з послідовністю р110 $\beta$ . Після ампліфікації послідовність FLAG $\text{®}$ -р110 $\beta$  субклонували, використовуючи стандартні способи рекомбінації, у сайти EcoRI-NotI рFastbac HTa (Life Technologies), так, щоб клон був у рамці разом з His-міткою вектору.

р110 $\gamma$ : кДНК р110 $\gamma$  [дивися Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)] ампліфікували з наявної бібліотеки кДНК селезінки людини (Clontech) згідно з інструкціями виробника, використовуючи наступні праймери:

##### 5' Праймер

5'-AGAATGCGGCGCATGGAGCTGGAGAACTATAAACAGCCC-3' (SEQ ID NO:5)

##### 3' Праймер

5'-CGCGGATCTTAGGCTGAATGTTTCTCTCTTGTG-3' (SEQ ID NO:6)

Мітку FLAG® далі приєднували до 5'-закінчення послідовності p110γ та клонували у сайти BamHI-SpeI pFastbac HTb (Life Technologies), використовуючи стандартні способи рекомбінації ДНК, з послідовністю FLAG®-110Y урамці разом з His-міткою вектору.

p85α: фрагмент BamHI-EcoRI FLAG®-міченої ДНК p85α [дивися Skolnik et al, Cell, 55:83-89 (1991)] субклонували у сайти BamHI-EcoRI вектору pFastbac dual (Life Technologies).

Рекомбінантні бакуловіруси, що містять вищезазначені клони, створювали, використовуючи протокол виробника (Life Technologies). Бакуловіруси, що експресують His-мічений каталітичний субелемент p110α, p110β, або p110δ та субелемент p85 коінфікували у клітини комах Sf21. Для поліпшення гетеродимерного ферментного комплексу, інфікували надлишкову кількість бакуловірусу, експресуючого субелемент p85, і His-мічений каталітичний субелемент p110 у комплексі з p85 очищали на афінній колонці з нікелем. Оскільки p110γ асоціюється з p85, клітини Sf21 інфікували рекомбінантними бакуловірусами, експресуючими тільки His-мічений p110γ. У альтернативному підході p110 може бути клонованими у бакуловірус для можливості коекспресії з його кращим зв'язувальним партнером p110γ.

Через 72-години постінфіковані клітини Sf21 (3 літри) збирали та гомогенізували у гіпотонічному буфері (20мМ ГЕПЕС-КОН з pH7,8, 5мМ KCl, повний коктейль інгібіторів протеаз (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN), використовуючи гомогенізатор Bounce. Гомогенати центрифугували при 1000×g протягом 15 хвилин. Над осадкові шари рідини далі центрифугували при 10000×g протягом 20 хвилин, потім ультра-центрифугували при 100000×g протягом 60 хвилин. Розчинну фракцію негайно завантажували на афінну колонку з нікелем об'ємом 10мл HiTRAP® (Pharmacia, Piscataway, NJ), урівноважену 50мл буферу А (50мМ ГЕПЕС-КОН з pH7,8, 0,5М NaCl, 10мМ імідазол). Колонку промивали екстенсивно буфером А та елювали з лінійним градієнтом 10-500мМ імідазолу. Вільний субелемент p85 видаляли з колонки протягом етапу промивки, а тільки гетеродимерний ферментний комплекс елювали при 250мМ імідазолу. Аліквоти нікелевих фракцій аналізували гель-електрофорезом на 10% SDS-поліакриламіді (SDS-PAGE), з проявленням SYPRO® Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) та кількісно визначали за допомогою фосфоровізуалізатору STORM® (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Активні фракції, об'єднували та безпосередньо завантажували на гепаринову колонку об'ємом 5мл Hi-trap, попередньо урівноважену буфером В, що містить 50мМ ГЕПЕС-КОН з pH7,5, 50мМ NaCl, 2мМ дитіотреїтол (dTT). Колонку промивали 50мл буферу В та елювали з лінійним градієнтом 0,05-2М NaCl. Одиначний пік, що містить комплекс ферменту PI3K, елювали при 0,8М NaCl. Аналіз на SDS-поліакриламідному гелі показав, що очищені фракції ферменту PI3K містять 1:1 стехіометричний комплекс субелементів p110 та, p85.

Білковий профіль комплексу ферментів протягом гепаринової хроматографії відповідав профілю активності кінази. Активні фракції об'єднували та заморожували під рідким азотом.

## ПРИКЛАД 2

Високопродуктивний скринінг(HTS) PI3Kδ та дослідження селективності

Високопродуктивний скринінг власної хімічної бібліотеки проводили для ідентифікації активності кандидатів у інгібітори PI3Kδ. PI3Kδ каталізує фосфопереніс від γ-[<sup>32</sup>P]АТФ до ліпосом PIP<sub>2</sub>/PS у позиції D3' PIP<sub>2</sub> кільця ліпідного інозиту. Ця реакція є залежною від MgCl<sub>2</sub> та її гасять у калій-фосфатному буфері високої молярності з pH8,0, що містить 30М ЕДТА. При скринінгу цю реакцію проводять у присутності або у відсутності бібліотечних сполук. Реакційні продукти (та усі немічені продукти) переносять у 96-комірковий, попередньо зволожений фільтр-планшет PVDF, фільтрують та промивають у фосфаті калію високої молярності. Сцинтиляційну речовину додають до висушеної комірки та кількісно визначають поглинену радіоактивність.

Більшість операцій дослідження проводили, використовуючи робототехнічні установки BIOMEK® 1000 (Beckman) та усі планшети зчитували, використовуючи протоколи планшетного лічильнику рідинної сцинтиляції Wallac.

Потрійні вихідні розчини субстратів та ферментів для дослідження виготовляли та зберігали у кюветі (для робототехнічного дослідження) або 96-комірковому, V-донному, поліпропіленовому планшеті (для немеханізованого дослідження). Реагенти були стабільними протягом щонайменше 3 годин при кімнатній температурі.

Потрійний субстрат для HTS містив 0,6мМ Na<sub>2</sub>АТФ, 0,10мМ/мл γ-[<sup>32</sup>P]АТФ (NEN, Pittsburgh, PA), 6мМ ліпосом PP<sub>2</sub>/PS (Avanti Polar Lipids, Inc., Atlanta, GA), у 20мМ ГЕПЕС з pH7,4.

Потрійний вихідний розчин ферменту для HTS містив 1,8нМ PI3Kδ, 150мкг/мл конячого IgG (використовуваного тільки як стабілізатор), 15мМ MgCl<sub>2</sub>, 3мМ DTT у 20мМ ГЕПЕС з pH7,4.

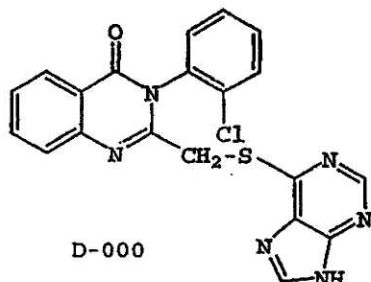
Хімічний високопродуктивний скринінг (HTS) бібліотечних зразків (кожний з вмістом пула з 22 сполук) у диметилсульфоксиді (ДМСО) розбавляли до 18,75мМ або 37,8мМ у двічі дистильованій воді та 20мкл розбавлень поміщали у комірки 96-коміркового поліпропіленового планшета для дослідження. Негативним інгібувальним контролем (або позитивним ферментним контролем) був ДМСО, розбавленим водою, а у позитивних інгібувальних контролях застосовували концентрації LY294002, достатні для забезпечення 50% та 100% інгібування.

До 20мкл розбавлень об'єднаної хімічної бібліотеки додавали 20мкл 3Хсубстрату. Реакцію ініціювали 20мкл 3Хферменту, інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Це розбавлення давало кінцеву концентрацію 200мМ АТФ у реакційному об'ємі. Реакцію зупиняли 50мкл' гасильного буферу (1,0М фосфат калію з pH8,0, 30М ЕДТА). Частину гасильного розчину (1-80мкл) далі переносили на попередньо зволожений фільтр-планшет PVDF (Millipore #MAIP NOV з наступними промивками по 200мкл 100% метанолом, водою та під кінець 1,0М промивальним буфером з фосфатом калію з pH8,0).

Фільтр-планшет PVDF відсмоктували у помірному вакуумі (2-5мм рт.ст.), промивали 5×200мкл промивального буферу та далі сушили відсмоктуванням. Фільтр далі блотували, сушили на повітрі повністю та вставляли у Wallac підрахункову касету з 50мкл сцинтиляційного коктейлю Ecosint, доданого на комірку. Поглинену радіоактивність визначали кількісно та дані аналізували, після нормалізації до ферментного позитивного контролю (приблизно 100%), для ідентифікації точки кривої при 50% величин інгібування для оцінки величин ІK<sub>50</sub> для інгібіторів.

Усі 57 об'єднаних кращих комірок були вибрані для деконволюції, основаної на комбінованому критерії остаточної активності менше 42% при тестованій концентрації та загальній прийнятній успішній спробі не більше, ніж 0,2%. При 22 сполуки на комірку усі 1254 сполуки були ідентифіковані через цю деконволюцію та окремо досліджені при 1× концентрації 27,7мкМ для ідентифікації, які сполуки виявляли потрібну активність. З цього дослідження були вибрані 73 сполуки та досліджені далі для створення величин кривизни  $IK_{50}$ . За отриманими величинами кривизни  $IK_{50}$  для досліджень селективності проти  $PI3K\alpha$  та  $PI3K\beta$  були вибрані 34 сполуки (дивися протокол дослідження у прикладі 11).

У дослідженнях селективності одна сполука 3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (сполука D-000), була вибрана як відносно потужна та селективна сполука. Каталог досліджень та аналізів селективності багатьох аналогічних сполук з удаюю потужністю та/або селективністю дав тільки одну сполуку, що мала активність та селективність, аналогічну D-000. Цю сполуку отримали від Contract Services Corporation (Каталог #7232154), вона відрізнялася від D-000 заміщуючим фенілом замість 2-хлорфенілу у D-000.



Як описано вище, інгібітор  $PI-3$ -кінази LY294002 (Calbiochem, La Jolla, CA) не має значної селективності серед різних тестованих ізоформ  $PI-3$ -кінази. В умовах нашого дослідження LY294002 інгібувала усі три ізоформи  $PI-3$ -кінази з величинами  $IK_{50}$  0,3-1мкМ. Однак, коли сполуку D-000 тестували проти тих же самих ізоформ  $PI-3$ -кінази, спостерігали відмінну селективність. Специфічно, як показано у Фіг.1, D-000 інгібувала активність ізоформи  $\delta$   $PI3K$  з величиною  $IK_{50}$  приблизно 0,3мкМ, при тому, що у подібних умовах вона не інгібувала активність  $\alpha$  та  $\beta$  ізоформ на межі 100мкМ сполуки. Ці результати показують, що D-000 селективно інгібує активність  $PI3K\delta$ .

#### ПРИКЛАДИ 3-7

Оскільки  $PI3K\delta$  експресується у значних рівнях тільки у лейкоцитах, важливо для дослідження дії селективного стосовно  $PI3K\delta$  інгібітору на функції лейкоцитів. Відповідно, досліджували дію інгібування  $PI3K\delta$  на кількох типах лейкоцитів. Нейтрофіли досліджували для визначення дії, яку могло б викликати селективне інгібування  $PI3K\delta$  (Приклад 3, нижче). Несподівано було знайдено, що селективне інгібування активності  $PI3K\delta$  виявляється значно асоційованим з інгібуванням деяких, але не усіх функціональних характеристик активованих нейтрофілів. На додаток, також тестували дію інгібування  $PI3K\delta$  на функції В-клітин та Т-клітин (Приклади 4-5, нижче). Більш того, оскільки  $PI3K\delta$  також експресується в остеокластах, досліджували дію інгібування  $PI3K\delta$  на функцію цих спеціалізованих клітин (Приклад 6, нижче).

#### ПРИКЛАД 3

Визначення ролі  $PI3K\delta$  у функції нейтрофілів

Тестували дію інгібітору  $PI3K\delta$  згідно з винаходом, тобто, D-000, на функції нейтрофілів, як-то вироблення супероксиду, екзоцитоз еластази, хемотаксис та знищення бактерій.

А Отримання нейтрофілів з крові людини

Аліквоти (8мл) гепаринізованої крові від здорових волонтерів нашаровували на 3мл прокладки 7,3% FICOLL® (Sigma, St. Louis, MO) та 15,4% HYPACQUE® (Sigma) і центрифугували при 900об./хвил. протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у настільній центрифугі (Beckman). Збагачену нейтрофілами смужку вищезазначеної прокладки FICOLL®-HYPACQUE® збирали та промивали збалансованим сольовим розчином Ханка (HBSS), що містить 0,1% желатину. Остаточні еритроцити видаляли гіпотонічним лізісом з 0,2% NaCl. Отримані нейтрофіли двічі промивали HBSS, що містить 0,1% желатину та використовували негайно.

В. Вимір продукування супероксиду нейтрофілами

Вироблення супероксиду є однією з ознак активації нейтрофілів. Ряд активаторів робить можливим вироблення супероксиду нейтрофілами. Дію інгібітору  $PI3K\delta$  D-000 на вироблення супероксиду трьома різними агоністами:  $TNF1\alpha$ , IgG та fMLP, кожний з яких репрезентує окремі класи активаторів, вимірювали. Супероксид, створюваний нейтрофілами, вимірювали відстежуванням зміни поглинання при відновленні цитохрому С модифікацією способу, [що описано Green et al., pp.14,5,1-14,5,11 у Supp.12, Curr Protocols Immunol (Eds., Colligan et al.) (1994)], таким чином. Окремі комірки 96-коміркового планшета покривали протягом ночі при 4°C 50мкл розчином 2мг/мл фібриногену людини або IgG. Комірки промивали PBS та до кожної комірки додавали наступні реагенти: 50мкл HBSS або супероксид-дисмутази (1мг/мл), 50мкл HBSS або  $TNF1\alpha$  (50нг/мл), 50мкл цитохрому С (2,7мг/мл) та 100мкл очищеної суспензії нейтрофілів людини ( $2 \times 10^5$ клітин/мл). Планшет центрифугували протягом 2 хвилин при 200об./хвил. та відстежували поглинання при 550нм протягом 2 годин. Для вимірювання відносної кількості створюваного супероксиду, величини, отримані з комірок з вмістом супероксид-дисмутази віднімали від усіх інших та нормалізували до величин, отриманих з комірок без будь-якого інгібітору.

Як показано у Фіг.2, інгібітор  $PI3K\delta$  D-000 інгібує індуковане  $TNF$  вироблення супероксиду нейтрофілами залежним від концентрації чином. Вироблення супероксиду, індуковане  $TNF$ , зменшувалося до половини його максимальної величини приблизно при 3мкМ D-000. Фіг.2 також показує, що вироблення супероксиду, індуковане IgG незначно інгібувалося D-000. Фактично, навіть при 10мкМ цей інгібітор  $PI3K\delta$  не має будь-якого впливу на вироблення супероксиду, індуковане IgG.

Далі, досліджували дію D-000 на вироблення супероксиду, індукованого другим потужним індуктором, бактеріальним пептидом, форміл-Met-Leu-Phe (fMLP). Аналогічно індукованому TNF виробленню супероксиду, індуковане fMLP вироблення супероксиду також інгібувалося D-000 (Фіг.3). Ці результати показують, що інгібітор PI3Kδ D-000 може відвертати стимульовану специфічну індукцію вироблення супероксиду нейтрофілами, вказуючи, що PI3Kδ є залученим у цей процес.

#### С. Вимір екзоцитозу нейтрофільної еластази

На додаток до вироблення супероксиду, активовані нейтрофіли також відповідають вивільненням кількох протеаз, що є відповідними за пошкодження тканин та хрящ протягом запалення. Як показник вивільнення протеази вимірювали дію D-000 на екзоцитоз еластази. Екзоцитоз еластази кількісно визначали модифікацією способу, [описаного Ossanna et al. J Clin Invest, 77:1939-1951 (1986)], таким чином. Очищені нейтрофіли людини ( $0, \times 10^6$ ) (оброблені ДМСО або серійними розбавленнями D-000 у ДМСО) стимулювали fMLP у PBS, що містить 0,01 мг/мл цитохалазину В, 1,0 мкМ азид натрію ( $\text{NaN}_3$ ), 5 мкг/мл L-метіоніну та 1 мкМ fMLP протягом 90 хвилин при 37°C у 96-комірковому планшеті. Наприкінці періоду інкубації планшет центрифугували протягом 5 хвилин при 1000 об./хвил. та 90 мкл надосадкового шару рідини переносили до 10 мкл 10 мМ розчину субстратного пептиду еластази, MeO-suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, де MeO-suc = метокси-сукциніл; pNA = p-нітроанілід (Calbiochem, San Diego, CA). Поглинання при 410 нм відстежували протягом 2 годин у 96-комірковому планшетному зчитувачі. Для вимірювання відносної кількості підданої екзоцитозу еластази, усі величини поглинання нормалізували до величини, отриманої без будь-якого інгібітору. Як показано у Фіг.4, інгібітор PI3Kδ D-000 значно інгібує індукований fMLP екзоцитоз еластази та робить це залежним від дози чином. Інгібування було напів-максимальним при концентрації приблизно 2-3 мкМ D-000.

#### Д. Вимір індукованої fMLP міграції нейтрофілів людини

Нейтрофіли мають притаманну здатність мігрувати через тканини та є одним з перших типів клітин, що прибувають на ділянки запалення або поранення тканин. Дію D-000 на міграцію нейтрофілів у напрямі концентраційного градієнту fMLP вимірювали. У добу перед дослідженням міграції, 6-коміркові планшети покривали рекомбінантним конденсованим білком ICAM-1/Fc (Van der Vliet et al., Immunity, 3: 683-690 (1995) (25 мкг/мл у гідрокарбонатному буфері з pH 9,3) та залишали протягом ночі при 4°C. Після промивки 1% розчином агарози у RPMI-1640 до комірок додавали 0,5% альбумін коров'ячої сироватки (BSA), без інгібітору або з ним, та планшети поміщали у холодильник перед пробиванням отворів у желюваній агарозі для створення бляшок (1 центральний отвір, оточений 6 периферійними отворами на комірку).

Нейтрофіли людини отримували як описано вище та знов суспендували у RPMI середовищі, доповненому 0,5% BSA при  $5 \times 10^6$  клітин/мл. Після поєднання рівних об'ємів суспензії нейтрофілів та середовища (ДМСО або серійних розбавлень тест-сполуки у ДМСО), нейтрофіли аліквотували у периферійні отвори, а у центральний отвір додавали fMLP (5 мкМ). Планшети інкубували при 37°C у присутності 5%  $\text{CO}_2$  протягом 4 годин, а потім припиняли міграцію додаванням 1% розчину глутаральдегіду у D-PBS. Після видалення шару агарози, комірки промивали дистильованою водою та сушили.

Аналіз міграції нейтрофілів проводили на автоматизованій відеоустановці з інверсійним мікроскопом (їх об'єктив) Nikon DIAPHOT®, використовуючи програму NIH 1.61, використовуючи програми Microsoft Excel та Table Curve 4 (SPSS Inc., Chicago PL), індекс міграції отримували для кожної з досліджених умов. Індекс міграції визначали як площу під кривою, що репрезентує число промігрувавших нейтрофілів стосовно чистої відстані міграції на клітину.

Як показано у Фіг.5, інгібітор PI3Kδ D-000 має сильну дію на міграцію нейтрофілів, інгібуючи цю активність залежним від дози чином. Величина  $\text{EC}_{50}$  цієї сполуки стосовно інгібування міграції нейтрофілів у цих дослідженнях приблизно 1 мкМ. На основі візуального контролю зареєстрованих шляхів клітин у цих дослідженнях виявлено, що загальна довжина шляху для нейтрофілів не відчувала значного впливу тест-сполуки. Переважніше, сполука впливала на орієнтацію нейтрофілів або орієнтацію спрямування, так, щоб замість міграції вздовж осі хемоатрактантного градієнту, клітини мігрували неспрямовано або менш спрямовано.

#### Е. Вимір бактерицидної здатності нейтрофілів

Встановлено, що інгібітор PI3Kδ-D-000 впливає на деякі функції нейтрофілів, деталізовані вище, цікаво подивитися чи впливає сполука на опосередковане нейтрофілами знищення бактерій. Дію D-000 на опосередковане нейтрофілами знищення *Staphylococcus aureus* досліджували згідно зі способом, що [описаний Clark та Nauseef pp.7,23,4-7,23,6 у Vol.2, Supp.6, Curr Protocols Immunol (Eds., Colligan et al.) (1994)]. Очищені нейтрофіли людини ( $5 \times 10^6$  клітин/мл) (оброблених ДМСО або серійними розбавленнями D-000 у ДМСО) перемішували з автологічною сироваткою. Вирощені протягом ночі клітини *S. aureus* промивали, знов суспендували у HBSS та додавали до опсонізованих сироваткою нейтрофілів при співвідношенні 10:1. Нейтрофілам давали засвоїти бактерії фагоцитозною інкубацією при 37°C протягом 20 хвилин. Незасвоєні бактерії знищували 10 одиницями/мл лізостафіну при 37°C протягом 5 хвилин та спільну суміш ротирували при 37°C. Зразки видаляли у різний час впритул до 90 хвилин та нейтрофіли лізували розбавленням у воді. Життєздатні бактерії підраховували нанесенням прийнятного розбавлення на триптиказо-соєво-агаровий планшет та підрахунком *S. aureus* колонії після вирощування протягом ночі.

Як показано у Фіг.6, опосередковане нейтрофілами знищення *S. aureus* було подібним у зразках, оброблених ДМСО (контроль) та D-000. Ці результати свідчать, що інгібітор PI3Kδ незначно впливає на здатність нейтрофілів до знищення *S. aureus*, підтверджуючи, що PI3Kδ незалучений у цю функцію нейтрофілів.

#### ПРИКЛАД 4

##### Визначення ролі PI3Kδ у В-функції лімфоцитів

Дію інгібітору PI-3-кінази на функції В-клітин, включаючи класичні показники, як-то . продукування антитіл та індуковану певним стимулюючим чинником проліферацію, вивчали також.

##### А. Отримання та стимуляція В-клітин з периферійної крові людини



Гепаринізовану кров (200мл) від здорових волонтерів перемішували з рівним об'ємом D-PBS, нанесеним на 10×10мл FICOLL-PAQUE® (Pharmacia), та центрифугували при 1600об./хвил. протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Мононуклеарні клітини периферійної крові (PBMC) збирали з поверхні розділу PICOIX®/сироватка, нанесеної на 10мл сироватки зародка теляти (FBS) та центрифугували при 800об./хвил. протягом 10 хвилин для видалення тромбоцитів. Після промивки клітини інкубували з DYNAL® Antibody Mix (В-клітинний комплект) (DynaL Corp., Lake Success, NY) протягом 20 хвилин при 4-8°C. Після видалення незв'язаних антитіл PBL перемішували з покритими анти-мишачим IgG магнітними бусинками (DynaL) протягом 20 хвилин при 4-8°C з обережним струшуванням, а потім видаленням мічених не-В-клітин на сепараторі магнітних бусинок. Цю операцію повторювали ще раз. В-клітини знов суспендували у RPMI-1640 з 10% FBS та тримали на льоді до наступного використання.

#### В. Вимір продукування антитіл В-клітинами людини

Для дослідження продукування антитіл, В-клітини поділяли на аліквоти при  $50-75 \times 10^3$  клітини/комірку у 96-комірковий планшет без інгібітору або з ним, до якого додавали IL-2 (100одиниць/мл) та PANSORBIN® (Calbiochem) клітини Staphylococcus aureus (1:90000). Частину середовища видаляли через 24-36 годин та додавали свіжі середовища (без інгібітору або з ним) та IL-2. Культури інкубували при 37°C в інкубаторі у присутності CO<sub>2</sub> протягом додаткових 7 діб. Зразки від кожних умов (при потроєнні) видаляли та аналізували стосовно IgG та IgM, які виміряно за допомогою ELISA A. Коротше, 96-коміркові планшети IMMULON® 4 покривали (50мкл/комірку) 150нг/мл осялого антилюдинного IgG (H+L) (Jackson bnmunoResearch, West Grove PA), або 2мкг/мл осялого антилюдинного IgG+IgM (H+L) (Jackson bnmunoResearch) у гідрокарбонатному буфері та залишали протягом ночі при 4°C. Після 3х промивки буферованим фосфатом фізіологічним розчином, що містив 0,1% TWEEN®-80 (PBST) (350мкл/комірку) та блокування 3% козячою сироваткою у PBST (100мкл/комірку) протягом 1 години при кімнатній температурі додавали зразки (100мкл/комірку) В-клітинного виснаженого середовища, розбавленого PBST. Для планшетів з IgG межі розбавлення складали 1:500-1:10000, а для планшетів з IgM - 1:50-1:1000. Через 1 годину планшети піддавали дії біотин-спряженого антилюдинного IgG (100нг/мл) або антилюдинного IgM (200нг/мл) (Jackson bnmunoResearch) протягом 30 хвилин, а потім дії стрептавідин-HRP (1:20000) протягом 30 хвилин, та під кінець дії розчину TMB (1:100) з гідропероксидом (1:10000) протягом 5 хвилин, з 3х PBST промивками між етапами. Розвиток кольору зупиняли розчином H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та планшети зчитували на планшетному зчитувачі ELISA. Як показано у Фіг.7, D-000 значно інгібував продукування антитіл. На продукування IgM вплив був більшим, ніж на продукування IgG: напів-максимальне інгібування продукування IgM спостерігали приблизно при 1мкМ проти приблизно 7мкМ у порівнянні з інгібуванням продукування IgG.

#### С. Вимір проліферації В-клітин у відповідь на стимуляцію поверхні клітин IgM

У вищенаведеному експерименті В-клітини стимулювали, використовуючи PANSORBIN®. Дію D-000 на реакцію проліферації В-клітин, коли їх стимулювали IgM через поверхню їх клітин, вимірювали також використовуючи антитіло анти-IgM. Мишачі спленоцити (Balb/c) поміщали у 96-коміркові мікротитрувальні планшети при  $2 \times 10^5$  клітин на комірку у 10% FBS/RPMI. Прийнятні розбавлення тест-інгібітору у повному середовищі додавали до клітин та планшети інкубували протягом 30-60 хвилин до додавання стимулюючого чиннику. Після попередньої інкубації тест-інгібітором препарату козячого антитіла F(ab')<sub>2</sub>, специфічного стосовно μ-ланцюга, до комірок додавали IgM миші при кінцевій концентрації 25мкг/мл. Планшети інкубували при 37°C протягом 3 діб та до кожної комірки додавали 1мкКі [<sup>3</sup>H]-тимідин до кінцевих чотирьох годин культивування. Планшети збирали на скловолокняні фільтри, промивали та поглинені радіо-мітки визначали, використовуючи бета-лічильник (Matrix 96, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) та виражали як число імпульсів на хвилину (CPM).

Фіг.8 показує дію D-000 на стимульовану анти-IgM проліферацію В-клітин. Сполука інгібувала стимульовану анти-IgM проліферацію В-клітин залежним від дози чином. Приблизно при 1мкМ, проліферація зменшувалася до половини своєї максимальної величини.

Оскільки сполука D-000 інгібує проліферацію В-клітин, передбачено, що ця сполук та інші інгібітори P13Кδ могли б бути використовуваними для пригнічення небажаної проліферації В-клітин у клінічних умовах. Наприклад, при злоякісності В-клітин В-клітини різних стадій диференціації показують нерегульовану проліферацію. На основі показаних вище результатів можна зробити висновок, що селективні інгібітори P13Кδ могли б бути використовуваними для контролю, обмеження, або інгібування росту таких клітин.

#### ПРИКЛАД 5

##### Визначення ролі P13Кδ у Т-функції лімфоцитів

Вимірювали проліферацію Т-клітин у відповідь на костимуляцію CD3+CD28. Т-клітини очищали від крові здорової людини негативною селекцією, використовуючи покриті антитілами магнітні бусинки згідно з інструкціями виробника (DynaL) та ресуспендували у RPMI. Клітини обробляли ДМСО або серійними розбавленнями D-000 у ДМСО та поміщали при їх  $10^5$  клітини/комірку на 96-комірковий планшет, попередньо покритий козячим антимишачим IgG. Мишачі моноклональні анти-CD3 та анти-CD28 антитіла далі додавали до кожної комірки при 0,2нг/мл та 0,2мкг/мл, відповідно. Планшет інкубували при 37°C протягом 24 годин та додавали [<sup>3</sup>H]-тимідин (1мкКі/комірку). Ще через 18 годин інкубації клітини збирали автоматичним збирачем клітин, промивали та кількісно визначали поглинену радіоактивність.

Хоча інгібітор P13Кδ D-000 інгібував індуковану анти-CD3- та анти-CD28 проліферацію Т-клітин, його дія не перевищувала його дію на В-клітини або на деякі функції нейтрофілів. Напів-максимального інгібування поглинення тимідину не досягали при найвищій тестованій концентрації, тобто, 10мкМ D-000.

#### ПРИКЛАД 6

##### Визначення ролі P13Кδ у функції остеокластів

Для аналізу дії інгібітору P13Кδ D-000 на клітини остеокластів кісткового мозку миші виділяли та диференціювали їх до остеокластів обробкою клітин фактором стимуляції колоній макрофагів (mCSF) та остеопрогеритивним лігандом (OPGL) у сироватко-вмісному середовищі (αMEM) з 10% інактивованою нагріванням FBS; Sigma) протягом 3 діб. На четверту добу, коли остеокласта стали розвиненими, середовище

видаляли та клітини збирали. Остеокласта поміщали на дентинові пластини при  $10^5$  клітин/комірку у середовищі для культивування, тобто,  $\alpha$ MEM, що містить 1% сироватки та 2%. BSA з 55мкг/мл OPGL та 10мкг/мл mCSF-1. Через 3 години середовище заміняли на 1% сироватки та 1% BSA, без остеопонтину або з ним (25мкг/мл) та інгібіторами PI3K (100нМ). Середовище заміняли кожні 24 години свіжим остеопонтином та інгібіторами. На 72 годину середовище видаляли та дентинові поверхні промивали водою для видалення відходів клітин та фарбували кислотним гематоксиліном. Надлишок барвника відмивали та кількісно визначали глибину лунки, використовуючи конфокальну мікроскопію. Як показано у таблиці 1, у двох експериментах, інгібітори PI-3-кінази мали інгібувальну дію стосовно функції остеокластів. Неспецифічні інгібітори LY294002 та вортманін інгібували активність остеокластів. Однак, інгібітор PI3K D-000 мав найбільш сильну дію, оскільки при 100нМ ця сполука майже повністю інгібувала активність остеокластів.

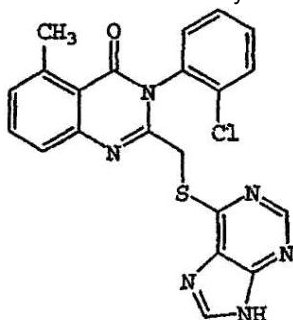
Таблиця 1

Остеопонтин (OPN).	D-000+OPN	LY294002+OPN	Вортманін +OPK
10±0,5	1	4,6±0,22	5,7±0,6
9±0,4	1	5,8±0,5	5±0,5

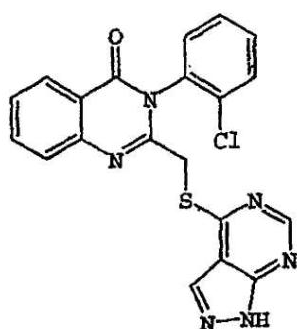
#### ПРИКЛАД 7

Визначення ролі РВКδ у функції базофілів

Оцінку дії сполуки згідно з винаходом на функцію базофілів тестували, використовуючи звичайне дослідження вивільнення гістаміну, загалом згідно зі способом, [описаним Miura et al., J Immunol, 162:4198-206 (1999)]. Коротше, збагачені базофіли попередньо інкубували з тест-сполуками при кількох концентраціях від 0,1 до 1000нМ, протягом 10 хвилин при 37°C. Далі, додавали поліклональний козячий антилюдинний IgE (0,1мкг/мл) чи fMLP та давали інкубуватися протягом ще додаткових 30 хвилин. Вивільнення гістаміну у надосадковий шар рідини вимірювали, використовуючи спосіб автоматизованої флуорометрії. Тестували дві показані нижче сполуки.



D-026



D-999

Залежне від дози зменшення вивільнення гістаміну спостерігали для 3-(2-хлорфеніл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-ону (d-026), коли базофіли стимулювали анти-IgE. Це пригнічення вивільнення гістаміну було по суті 100% при 1000нМ, з величиною  $EC_{50}$  приблизно 25нМ. Друга сполука, 3-(2-хлорфеніл)-2-(1H-піразоло[3,4-d]піримідин-4-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-999), у якій пуринова кільцева структура є перебудованою, була менш ефективною при інгібуванні вивільнення гістаміну. Жодна сполука не викликала будь-якої дії, коли базофіли стимулювали fMLP. Для порівняння, неселективний інгібітор PI3K LY294002, був тестований при 0,1нМ та 1000нМ, показавши близьке до 100% інгібування вивільнення гістаміну при найвищій концентрації.

Ці дані свідчать, що інгібітори активності PI-3-кінази дельта можуть бути використовуваними для пригнічення вивільнення гістаміну який є одним з посередників алергії. Оскільки активність різних PI-3-кіназ, є потрібною для транспорту, секреції та екзоцитозу білків у багатьох вищенаведених типах клітин, дані свідчать,

що вивільнення гістаміну іншими клітинами, як-то тучними клітинами, також може бути порушеним дельта-селективними інгібіторами PI-3-кіназ.

#### ПРИКЛАДИ ХІМІЧНОГО СИНТЕЗУ

Специфічні необмежувальні приклади сполук згідно з винаходом представлено нижче. У рівні техніки відомо, що захисні групи можна застосовувати там, де це необхідно згідно з загальними принципами синтетичної хімії. Ці захисні групи видаляють у кінцевих етапах синтезу в основних, кислотних, або гідрогенолітичних умовах, добре відомих фахівцям у рівні техніки. Використанням прийнятних процедур та захисту будь-якої хімічної функціональної групи, синтезу сполук структурної формули (I), неконкретно наведених тут, можна досягти способами аналогічними наведеним нижче у схемах.

Якщо не визначено інше, усі вихідні матеріали отримували від комерційних постачальників та використовували без наступної очистки. Усі реакції та хроматографічні фракції аналізували тонкошаровою хроматографією (ТШХ) на силікагелевих пластинах по 250мм, візуалізованих ультрафіолетовим (UV) світлом або забарвленням йодом (I<sub>2</sub>). Продукти та інтермедіати очищали флеш-хроматографією або обернено-фазовою високопродуктивною рідинною хроматографією.

Наступні скорочення використано у прикладах синтезу: aq (водн), H<sub>2</sub>O (вода), CHCl<sub>3</sub> (хлороформ), HCl (гідрохлоридна кислота), MeOH (метанол), NaOH (гідроксид натрію), NaOMe (метоксид натрію), TFA, (трифлуороцтова кислота), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (карбонат калію), SOCl<sub>2</sub> (тіонілхлорид), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (метиленхлорид), EtOAc (етилацетат), ДМФ (диметилформамід), EtOH (етанол), ДМСО (диметилсульфоксид), NaHCO<sub>3</sub> (гідрокарбонат натрію), ТШХ (тонкошарова хроматографія), ВЕРХ (високоєфективна рідинна хроматографія), НОВТ (гідроксибензотриазол), EDC (етилдіетиламінопропілкарбодіімід), DIEA (діізопропілетилтан) та HOAc (оцтова кислота).

#### I. Загальні способи

##### Спосіб А

Тіонілхлорид додавали до швидко перемішуваного розчину антранілової кислоти або бензойної кислоти у бензолі та суміш перемішували при кипінні під зворотним холодильником протягом 5-18 годин. Реакційну суміш концентрували у вакуумі та очищали двічі бензолом. Утворене масло розчиняли у CHCl<sub>3</sub> та до цього розчину додавали прийнятний анілін. Реакційну суміш гріли до кипіння під зворотним холодильником та перемішували до завершення, яке визначали за допомогою ТШХ, при якому реакційну суміш охолоджували до зовнішньої температури. Осад видаляли фільтруванням та фільтрат концентрували у вакуумі. Сирий продукт очищали хроматографією та/або перекристалізацією з MeOH для отримання амідів Ia-Ir.

##### Спосіб В

До швидко перемішуваної суспензії амиду у льодяній оцтовій кислоті додавали хлорацетилхлорид. Реакційну суміш гріли до 120°C та перемішували при цій температурі до завершення, яке визначали за допомогою ТШХ. Після швидкого охолодження реакційну суміш концентрували у вакуумі. Сирий залишок очищали екстракцією, хроматографією та/або перекристалізацією для отримання хлоридів 2a-2r.

##### Спосіб С

Суміш хлориду, нітрогенового або сульфурного нуклеофілу, наприклад, моногідрату меркаптопурину або аденіну та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> у ДМФ перемішували при кімнатній температурі протягом 15-72 годин. Утворену суспензію виливали у воду та тримали при 4°C протягом кількох годин. Сирий твердий продукт фільтрували, промивали водою та очищали хроматографією або перекристалізацією для отримання кінцевих продуктів.

#### ПРИКЛАД 8

##### Отримання інтермедіатів; Аміді

##### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-4,5-диметоксибензамід (1a)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 4,5-диметоксиантранілову кислоту (5,0г, 25,4ммоль) та SOCl<sub>2</sub> (5,5мл, 76,1ммоль) у бензолі (100мл), а потім 2-хлоранілін (6,7мл, 63,5ммоль) та CHCl<sub>3</sub> (75мл). Продукт промивали водним розчином NaHCO<sub>3</sub> (2x25мл) та HCl (0,5М, 75мл) і очищали хроматографією у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання 4,3г коричневої піни. (55%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,42 (dd, J=1,5,8,3Гц, 1H); 8,32 (br s, 1H); 7,40 (dd, J=1,4,8,0Гц, 1H); 7,31 (dt, J=1,4,7,9Гц, 1H); 7,05 (dt, J=1,5,7,7Гц, 1H); 7,03 (s, 1H); 6,24 (s, 1H); 3,8 8 (s, 3H); 3,87 (s, 3H). MS (EP<sup>+</sup>): m/z 307,0 (M<sup>+</sup>).

##### 2-аміно-5-бром-N-(2-хлорфеніл)бензамід (1b)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-5-бромбензойну кислоту (5,0г, 23,1ммоль) та SOCl<sub>2</sub> (7,0мл, 95,9ммоль) у бензолі (50мл), а потім 2-хлоранілін (7,3мл, 69,3ммоль) та CHCl<sub>3</sub> (50мл). Продукт очищали двома хроматографіями у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання 1,48г жовто-оранжевого твердого продукту (20%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,36 (dd, J=1,2, 8,2Гц, 1H); 8,20 (br s, 1H); 7,62 (d, J=2,1Гц, 1H); 7,42 (dd, J=1,3, 8,0Гц, 1H); 7,34 (dd, J=2,2, 8,8Гц, 1H); 7,28-7,33 (m, 1H); 7,09 (dt, J=1,4, 7,7Гц, 1H); 6,62 (d, J=8,7Гц, 1H); 5,57 (br s, 2H).

##### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-4-флуорбензамід (1c)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-4-флуорбензойну кислоту (1,15г, 7,41ммоль) та SOCl<sub>2</sub> (1,4мл, 18,5ммоль) у бензолі (25мл), а потім 2-хлоранілін (1,6мл, 14,8ммоль) та CHCl<sub>3</sub> (25мл). Продукт хроматографували з CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, дат розтирали у гексанах для отримання 1,02г білуватого твердого продукту (52%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 12,91 (br s, 1H); 8,72 (dd, J=2,7, 12Гц, 1H); 8,34 (dd, J=6,4, 9,2Гц, 1H); 8,29 (dd, J=5,9, 8,8Гц, 1H); 7,81 (dd, J=6,2, 8,8Гц, 1H); 7,28 (dd, J=2,4, 3,4Гц, 1H); 7,21 (dd, J=2,4, 9,0Гц, 1H); 6,92 (ddd, J=2,4, 7,3, 9,1Гц, 1H); 6,54 (ddd, J=2,4, 7,8, 8,8Гц, 1H); 6,45 (dd, J=2,4, 11Гц, 1H); 5,93 (br s, 2H). MS (EP<sup>+</sup>): m/z 265,0 (M<sup>+</sup>).

##### 2-аміно-5-хлор-N-(2-хлорфеніл)бензамід (1d)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-5-хлорбензойну кислоту (2,0г, 11,7ммоль) та SOCl<sub>2</sub> (2,2мл, 29,2ммоль) у бензолі (50мл), а потім 2-хлоранілін (2,5мл, 23,3ммоль) та CHCl<sub>3</sub> (50мл). Продукт очищали перекристалізацією з MeOH для отримання 1,72г темно-жовтого твердого продукту (52%). <sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,37 (dd, J=1,5, 8,3Гц, 1H); 8,22 (br s, 1H); 7,48 (d, J=2,3Гц, 1H); 7,42 (dd, J=1,5, 8,1Гц, 1H); 7,31 (dt, J=1,4, 7,8Гц, 1H); 7,22 (dd, J=2,4, 8,8Гц, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7Гц, 1H); 6,67 (d, J=8,8Гц, 1H); 5,56 (br s, 2H).

##### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-6-флуорбензамід (1e)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-флуорбензойну кислоту (2,0г, 12,9ммоль) та

$\text{SOCl}_2$  (2,3мл, 32,2ммоль) у бензолі (50мл), а потім 2-хлоранілін (2,7мл, 25,8ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (50мл). Продукт очищали хроматографією у суміші  $\text{EtOAc}$ /гексани для отримання 2,06г блідо-оранжевого твердого продукту (60%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 9,00 (d, J=17Гц, 1H); 8,47 (d, J=8,3Гц, 1H); 7,41 (d, J=8,0Гц, 1H); 7,30 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,10-7,20 (m, 1H); 7,07 (t, J=7,7Гц, 1H); 6,49 (d, J=8,3Гц, 1H); 6,03 (br s, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 265,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-6-хлор-N-(2-хлорфеніл)бензамід (1f)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-хлорбензойну кислоту (2,5 г, 14,6ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (2,7мл, 36,4ммоль) у бензолі (75мл), а потім 2-хлоранілін (3,1мл, 29,1ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (75мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 1,05г жовто-оранжевого твердого продукту (26%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,54 (d, J=8,1Гц, 1H); 8,30 (br s, 1H); 7,41 (dd, J=1,5, 8,0Гц, 1H); 7,33 (t, J=7,8Гц, 1H); 7,10 (t, J=8,1Гц, 1H); 7,09 (dt, J=1,1 7,8Гц, 1H); 6,78 (dd, J=0,4,7,9Гц, 1H); 6,63 (dd, J=0,9,8,2Гц, 1H); 4,69 (br s, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 303,0 ( $\text{M}^+$ 22), 281,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-6-метилбензамід (1g)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-метилбензойну кислоту (2,5г, 16,5ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (3,0мл, 41,3ммоль) у бензолі (75мл), а потім 2-хлоранілін (3,5мл, 33,0ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (75мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 2,19г коричневого масла (51%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,58 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,99 (br s, 1H); 7,40 (dd, J=1,4, 8,0Гц, 1H); 7,34 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,11 (t, J=7,8Гц, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 6,64 (d, J=7,5Гц, 1H); 6,59 (d, J=8,1 Hz, 1H); 4,29 (br s, 2H); 2,45 (s, 3H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 283,0 ( $\text{M}^+$ 22).

#### 2-аміно-3-хлор-N-(2-хлорфеніл)бензамід(1h)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-3-хлорбензойну кислоту (1,0г, 5,82ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (1,1мл, 14,6ммоль) у бензолі (25мл), а потім 2-хлоранілін (1,2мл, 11,7ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (25мл). Продукт перекристалізовували з  $\text{MeOH}$  для отримання 1,29г жовтого твердого продукту (78%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,43 (dd, J=1,4, 8,3Гц, 1H); 8,30 (brs, 1H); 7,47 (dd, J=1,1, 8,0Гц, 1H); 7,42 (d, J=8,0Гц, 2H); 7,33 (dt, J=1,4, 7,9Гц, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7Гц, 1H); 6,68 (t, J=7,9Гц, 1H); 6,13 (br s, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 281,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-N-дифеніл-2-іл-6-хлорбензамід (1i)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-хлорбензойну кислоту (2,0г, 11,7ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (2,1мл, 29,3ммоль) у бензолі (60мл), а потім 2-амінодифеніламін (4,15г, 24,5ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (60мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 2,16г спіненого темно-янтарного залишку (57%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,48 (d, J=8,2Гц, 1H); 7,79 (br s, 1H); 7,34-7,46 (m, 6H); 7,20-7,30 (m, 2H); 7,00 (t, J=8,1Гц, 1H); 6,63 (dd, J=0,6, 7,9Гц, 1H); 6,54 (d, J=8,3Гц, 1H); 4,58 (br S, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 323,1 (mf)

#### 2-аміно-6-хлор-N-о-толілбензамід (1j)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-хлорбензойну кислоту (1,0г, 5,83ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (1,1мл, 14,6ммоль) у бензолі (30мл), а потім о-толуїдин (1,4мл, 12,8ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (30мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 840мг маслоподібного жовтого продукту (55%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,96 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,60 (br s, 1H); 7,23-7,30 (m, 2H); 7,14 (t, J=7,5Гц, 1H); 7,11 (t, J=8,3Гц, 1H); 6,78 (d, J=7,9Гц, 1H); 6,64 (d, J=8,2Гц, 1H); 4,73 (brs, 2H); 2,35 (s, 3H). МС ( $\text{E}^+$ ):m/z 261,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-6-хлор-N-(2-флуорфеніл)бензамід(1k)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-хлорбензойну кислоту (2,0г, 11,7ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (2,1мл, 29,1ммоль) у бензолі (60мл), а потім 2-флуоранілін (2,3мл, 23,4ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (60мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 1,05 г жовтого твердого продукту (34%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,45 (t, J=8,0Гц, 1H); 8,01 (br s, 1H); 7,02-7,22 (m, 4H); 6,78 (dd, J=0,5, 7,9Гц, 1H); 6,64 (dd, J=0,8, 8,2Гц, 1H); 74,73 (brs, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 265,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-6-хлор-N-(2-метоксифеніл)бензамід (1l)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-6-хлорбензойну кислоту (2,0 г, 11,7ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (2,1мл, 29,1ммоль) у бензолі (60мл), а потім о-анізидин (2,6мл, 23,4ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (60мл). Продукт хроматографували у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 2,61г темно-жовтого масла (81%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,53 (dd, J=1,7, 7,9Гц, 1H); 8,39 (br.s, 1H); 7,11 (dt, J=1,6, 7,8Гц, 1H); 7,09 (t, J=8,1Гц, 1H); 7,02 (dt, J=1,4, 7,8Гц, 1H); 6,92 (dd, J=1,4, 8,0Гц, 1H); 6,62 (dd, J=0,9, 8,2Гц, 1H); 4,66 (br s, 2H); 3,87 (s, 3H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 277,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-3-трифлуорметилбензамід (1m)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 3-трифлуорметилантранілову кислоту (2,0г, 9,75ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (1,8мл, 24,4ммоль) у бензолі (50мл), а потім 2-хлоранілін (2,1мл, 19,5ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (50мл). Продукт очищали перекристалізацією з  $\text{MeOH}$  для отримання 2,38г жовтих кристалів (78%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,40 (dd, J=1,4, 8,3Гц, 1H); 8,25 (brs, 1H); 7,71 (d, J=7,8Гц, 1H); 7,60 (d, J=7,8Гц, 1H); 7,43 (dd, J=1,4, 8,0Гц, 1H); 7,34 (dt, J=1,3, 7,9Гц, 1H); 7,11 (dt, J=1,5, 7,7Гц, 1H); 6,77 (t, J=7,8Гц, 1H); 6,24 (br s, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 315,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### (2-хлорфеніл)амін 3-амінонафталін-2-карбонової кислоти (1n)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 3-аміно-2-нафтоїну кислоту (2,0г, 10,7ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (1,9мл, 26,7ммоль) у бензолі (50мл), а потім 2-хлоранілін (2,3мл, 21,4ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (50мл). Продукт перекристалізовували з  $\text{MeOH}$  для отримання 1,71г коричневого твердого продукту (54%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 10,88 (br s, 1H); 9,21 (s, 1H); 8,91 (s, 1H); 8,70 (dd, J=1,0, 8,3Гц, 1H); 7,95-8,01 (m, 1H); 7,87-7,94 (m, 1H); 7,60-7,68 (m, 2H); 7,41 (dd, J=1,3, 8,0Гц, 1H); 7,34 (dt, J=1,2, 7,8Гц, 1H)/7,07 (dt, J=1,4, 7,7Гц, 1H). МС (BS): m/z 297,1 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-4-нітробензамін (1o)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 4-нітроантранілову кислоту (5,0г, 27,5ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (5,0мл, 68,6ммоль) у бензолі (150мл), а потім 2-хлоранілін (5,8мл, 55,0ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (150мл). Продукт очищали хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , а потім перекристалізацією з  $\text{MeOH}$  для отримання 2,20г оранжево-коричневого твердого продукту (31%).  $^1\text{H}$ ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,41 (dd, J=1,3, 8,3Гц, 1H) 8,31 (br s, 1H); 7,67 (d, J=8,6Гц, 1H); 7,57 (d, J=2,1Гц, 1H); 7,52 (dd, J=2,2, 8,5Гц, 1H); 7,44 (dd, J=1,3, 8,1Гц, 1H); 7,35 (dt, J=1,3,7,9Гц, 1H); 7,13 (dt, J=1,4, 7,8Гц, 1H); 5,88 (br s, 2H). МС ( $\text{E}^+$ ): m/z 292,0 ( $\text{M}^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-5-гідроксибензамід (1p)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-5-гідроксибензойну кислоту (5,0г, 32,7ммоль) та

$\text{SOCl}_2$  (6,0мл, 81,6ммоль) у бензолі (150мл), а потім 2-хлоранілін (6,9мл, 65,4ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (150мл). Продукт очищали двома хроматографіями у суміші  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 990мг коричневого твердого продукту (12%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{MeOH}-d_6$ )  $\delta$ : 7,92 (dd,  $J=1,6$ , 8,1Гц, 1H); 7,48 (dd,  $J=1,5$ , 7,7Гц, 1H); 7,34 (dt,  $J=1,5$ , 7,7Гц, 1H); 7,20 (dt,  $J=1,7$ , 7,7Гц, 1H); 7,16 (d,  $J=2,7$ Гц, 1H); 6,83 (dd,  $J=2,7$ , 8,7Гц, 1H); 6,76 (d,  $J=8,7$ Гц, 1H); 6,24 (br s, 2H). МС (ЕР):  $m/z$  263,0 ( $M^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-4,5-дифлуорбензамід (1q)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 4,5-дифлуорантраниловою кислоту (2,0г, 11,6ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (2,1мл, 28,9ммоль) у бензолі (60мл), а потім 2-хлоранілін (2,4мл, 23,2ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (60мл). Продукт очищали двома хроматографіями у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  та  $\text{EtOAc}$ /гексани для отримання 769мг жовтого твердого продукту (23%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,69-8,82 (m, 1H); 8,00 (dd,  $J=8,4$ , 9,0Гц, 1H); 7,90 (dd,  $J=8,9$ , 12Гц, 1H); 7,39 (dd,  $J=6,8$ , 10Гц, 1H); 6,53 (dd,  $J=6,6$ , 12Гц, 1H); 6,41 (br s, 2H); 5,79 (br s, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  283,1 ( $M^+$ ).

#### 2-аміно-N-(2-хлорфеніл)-5-флуорбензамід (1r)

Отримано згідно зі способом А, використовуючи 2-аміно-5-флуорбензойну кислоту (1,0г, 6,45ммоль) та  $\text{SOCl}_2$  (1,2мл, 16,1ммоль) у бензолі (30мл), а потім 2-хлоранілін (1,4мл, 12,9ммоль) та  $\text{CHCl}_3$  (30мл). Продукт розтирали у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 985мг гірчично-жовтого твердого продукту (58%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,66 (dd,  $J=2,9$ , 8,7Гц, 1H); 7,52-7,55 (m, 1H); 7,32-7,37 (m, 3H); 7,09 (dt,  $J=3,0$ , 8,5Гц, 1H); 6,71 (dd,  $J=4,3$ , 8,7Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  305,0 ( $M^+$  40).

#### ПРИКЛАД 9

Отримання інтермедіатів; Хлориди.

#### 2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-6,7-диметокси-3H-хіназолін-4-он (2a)

Отримано згідно зі способом В з 1a (2,95г, 9,63ммоль) та хлорацетилхлориду (2,3мл, 28,9ммоль) у оцтовій кислоті (30мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$  та перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 1,61г коричневого кристалічного твердого продукту (46%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,59-7,66 (m, 2H); 7,45-7,56 (m, 3H); 7,20 (s, 1H); 4,37 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,08 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,04 (s, 3H); 4,00 (s, 3H). МС (ЕР):  $m/z$  365,0 ( $M^+$ ).

#### 6-бром-2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-3H-хіназолін-4-он (2b)

Отримано згідно зі способом В з 1b (500мг, 1,54ммоль) та хлорацетилхлориду (0,37мл, 4,61ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 490мг білуватого твердого продукту (83%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,43 (d,  $J=2,3$ Гц, 1H); 7,91 (dd,  $J=2,3$ , 8,7Гц, 1H); 7,67 (d,  $J=8,7$ Гц, 1H); 7,60-7,65 (m, 1H); 7,47-7,56 (m, 2H); 7,52 (t,  $J=5,3$ Гц, 1H); 7,47-7,56 (m, 1H); 4,37 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,06 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  385,0 ( $M^+$ ).

#### 2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-3H-хіназолін-4-он (2c)

Отримано згідно зі способом В з 1c (500мг, 1,89ммоль) та хлорацетилхлориду (0,45мл, 5,67ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , а потім перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 501мг жовтого кристалічного твердого продукту (82%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,32 (dd,  $J=6,0$ , 8,9Гц, 1H); 7,59-7,66 (m, 1H); 7,50-7,55 (m, 3H); 7,44 (dd,  $J=2,4$ , 9,4Гц, 1H); 7,27 (dt,  $J=2,5$ , 8,5Гц, 1H); 4,37 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,07 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  323,0 ( $M^+$ ).

#### 6-хлор-2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-3H-хіназолін-4-он (2d)

Отримано згідно зі способом В з 1d (500мг, 1,78ммоль) та хлорацетилхлориду (0,42мл, 5,33ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 555мг жовтого твердого продукту (92%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,27 (d,  $J=1,9$ Гц, 1H); 7,74-7,78 (m, 2H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,48-7,57 (m, 3H); 4,37 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,07 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  339,0 ( $M^+$ ).

#### 2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-3H-хіназолін-4-он (2e)

Отримано згідно зі способом В з 1e (500мг, 1,89ммоль) та хлорацетилхлориду (0,45мл, 5,67ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$  та перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 430мг білуватого кристалічного твердого продукту (70%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,76 (dt,  $J=5,3$ , 8,2Гц, 1H); 7,56-7,65 (m, 2H); 7,47-7,56 (m, 3H); 7,16-7,25 (m, 1H); 4,35 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,07 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  323,0 ( $M^+$ ).

#### 5-хлор-2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом В з 1f (1,00г, 3,56ммоль) та хлорацетилхлориду (0,85мл, 10,7ммоль) у оцтовій кислоті (15мл), очищено перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 791мг білуватого кристалічного твердого продукту (65%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,70 (s, 1H); 7,68 (d,  $J=3,8$ Гц, 1H); 7,61-7,65 (m, 1H); 7,55 (dd,  $J=2,7$ , 6,4Гц, 1H); 7,51 (d,  $J=3,1$ Гц, 1H); 7,50 (s, 2H); 4,35 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,05 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  339 ( $M^+$ ).

#### 2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-5-метил-3H-хіназолін-4-он (2g)

Отримано згідно зі способом В з 1g (2,18г, 8,36ммоль) та хлорацетилхлориду (2,0мл, 25,1ммоль) у оцтовій кислоті (40мл). Очищено двома хроматографіями у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  та  $\text{EtOAc}$ /гексани, з наступною перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 638мг білуватого кристалічного твердого продукту (24%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 7,73-7,80 (m, 3H); 7,58-7,64 (m, 3H); 7,41 (d,  $J=7,4$ Гц, 1H); 4,40 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,26 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 2,74 (s, 3H). МС  $m/z$  319,0 ( $M^+$ ).

#### 8-хлор-2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-3H-хіназолін-4-он (2h)

Отримано згідно зі способом В з 1h (500мг, 1,78ммоль) та хлорацетилхлориду (0,49мл, 6,13ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , а потім перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 448мг жовтого твердого продукту (74%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,23 (dd,  $J=1,4$ , 8,0Гц, 1H); 7,90 (dd,  $J=1,4$ , 7,8Гц, 1H); 7,61-7,66 (m, 1H); 7,51-7,55 (m, 3H); 7,47 (t,  $J=8,0$ Гц, 1H); 4,48 (d,  $J=12$ Гц, 1H); 4,12 (d,  $J=12$ Гц, 1H). МС (ЕР):  $m/z$  339,0 ( $M^+$ ).

#### 3-дифеніл-2-іл-5-хлор-2-хлорметил-3H-хіназолін-4-он (2i)

Отримано згідно зі способом В з 1i (2,0г, 6,20ммоль) та хлорацетилхлориду (1,5мл, 18,6ммоль) у оцтовій кислоті (30мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  з наступною перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 1,44г білуватого твердого продукту (61%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,61-7,64 (m, 1H); 7,58-7,59 (m, 1H); 7,54-7,57 (m, 2H); 7,52-7,53 (m, 1H); 7,45-7,52 (m, 2H); 7,24 (s, 5H); 3,92-4,03 (m, 2H). МС (ЕР):  $m/z$  381,0 ( $M^+$ ).

5-хлор-2-хлорметил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (2j)

Отримано згідно зі способом В з 1j (750мг, 2,88ммоль) та хлорацетилхлориду (0,69мл, 8,63ммоль) у оцтовій кислоті (15мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  з наступною перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 340мг білуватого твердого продукту (37%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,69 (d, J=2,1Гц, 1H); 7,68 (q, J=7,4Гц, 1H); 7,54 (dd, J=2,2, 7,0Гц, 1H); 7,35-7,47 (m, 3H); 7,21-7,25 (m, 1H); 4,27 (d, J=12Гц, 1H); 4,11 (d, J=12Гц, 1H); 2,18 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 319,0 ( $\text{M}^+$ ).

5-хлор-2-хлорметил-3-(2-флуорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он (2k).

Отримано згідно зі способом В з 1k (1,0г, 3,78ммоль) та хлорацетилхлориду (0,90мл, 11,3ммоль) у оцтовій кислоті (20мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 484мг блідо-рожевого твердого продукту (40%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,69 (s, 1H); 7,68 (d, J=3,2Гц, 1H); 7,56 (d, J=3,0Гц, 1H); 7,54 (d, J=3,0Гц, 1H); 7,40-7,47 (m, 1H); 7,35-7,38 (m, 1H); 7,27-7,32 (m, 1H); 4,35 (d, J=12Гц, 1H); 4,18 (d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 323,0

5-хлор-2-хлорметил-3-(2-метоксифеніл)-3Н-хіназолін-4-он (2l)

Отримано згідно зі способом В 1l (2,6г, 9,41ммоль) та хлорацетилхлориду (2,2мл, 28,2ммоль) у оцтовій кислоті (40мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  з наступною перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 874мг блідо-жовтого твердого продукту (28%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,55-7,74 (m, 2H); 7,47-7,54 (m, 2H); 7,34 (dd, J=1,7, 7,8Гц, 1H); 7,13 (dt, J=1,2, 7,7Гц, 1H); 7,08 (dd, J=1,0, 8,4Гц, 1H); 4,29 (d, J=12Гц, 1H); 4,11 (d, J=12Гц, 1H); 3,80 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 335,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-8-трифлуорметил-3Н-хіназолін-4-он (2m)

Отримано згідно зі способом В з 1m (500мг, 1,59ммоль) та хлорацетилхлориду (0,38мл, 4,77ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 359мг білого твердого продукту (61%):  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,51 (dd, J=1,0, 8,0Гц, 1H); 8,14 (d, J=7,3Гц, 1H); 7,65 (dd, J=2,5, 5, 6Гц, 1H); 7,62 (d, J=3,9Гц, 1H); 7,48-7,60 (m, 3H); 4,44 (d, J=12Гц, 1H); 4,12 (d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 373,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-3Н-бензо [g] хіназолін-4-он (2n)

Отримано згідно зі способом В з 1n (500мг, 1,68ммоль) та хлорацетилхлориду (0,40мл, 5,05ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  з наступною перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 232мг світло-коричневого твердого продукту (39%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,92 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 8,81 (d, J=8,3Гц, 1H); 8,32 (d, J=8,3Гц, 1H); 7,51-7,69 (m, 4H); 7,55 (d, J=5,2Гц, 1H); 7,53 (d, J=3,8Гц, 1H); 4,43 (d, J=12Гц, 1H); 4,12 (d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 355,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-7-нітро-3Н-хіназолін-4-он (2o)

Отримано згідно зі способом В з 1o (500мг, 1,71ммоль) та хлорацетилхлориду (0,41мл, 5,14ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , а потім двома хроматографіями у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 338мг жовтого масла (56%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,64 (d, J=2,2Гц, 1H); 8,48 (d, J=8,8Гц, 1H); 8,32(dd, J=2,2,8,7Гц, 1H); 7,66 (dd, J=2,5,6,0Гц, 1H); 7,52-7,59(m, 3H); 4,41 (d, J=12Гц, 1H); 4,10(d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 350,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-4-оксо-3,4-дигідро-хіназолін-6-іловий естер оцтової кислоти (2p)

Отримано згідно зі способом В з 1p (670мг, 2,55ммоль) та хлорацетилхлориду (0,61мл, 7,65ммоль) у оцтовій кислоті (10мл). Очищено хроматографією у 0,3%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , а потім перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 523мг ацетату як блідо-персикових кристалів (57%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,00 (d, J=2,7Гц, 1H); 7,82 (d, J=8,8Гц, 1H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,56 (dd, J=2,7, 8,8Гц, 1H); 7,51 (t, J=4,7Гц, 2H); 7,50 (s, 1H); 4,38 (d, J=12Гц, 1H); 4,08 (d, J=12Гц, 1H); 2,36 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 363,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-6,7-дифлуор-3Н-хіназолін-4-он (2q)

Отримано згідно зі способом В з 1q (700мг, 2,48ммоль) та хлорацетилхлориду (0,60мл, 7,43ммоль) у оцтовій кислоті (12мл). Очищено хроматографією у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , а потім перекристалізацією з ізопропанолу для отримання 219мг жовтого кристалічного твердого продукту (26%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,07 (dd, J=8,5,9,7Гц, 1H); 7,64 (dd, J=2,5, 5,6Гц, 1H); 7,60 (dd, J=3,5, 11Гц, 1H); 7,55 (q, J=2,9Гц, 3H); 7,52 (d, J=1,9Гц, 1H); 7,49-7,51 (m, 1H); 4,36 (d, J=12Гц, 1H); 4,06 (d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 341,0 ( $\text{M}^+$ ).

2-хлорметил-3-(2-хлорфеніл)-6-флуор-3Н-хіназолін-4-он (2r)

Отримано згідно зі способом В з 1r (850мг, 3,21ммоль) та хлорацетилхлориду (0,77мл, 9,63ммоль) у оцтовій кислоті (15мл). Очищено екстракцією з водного розчину  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , а потім хроматографією у суміші  $\text{EtOAc}/\text{гексани}$ . Друга хроматографія у суміші ацетон/гексани дала 125мг білого твердого продукту (12%).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,95 (dd, J=2,9, 8,2Гц, 1H); 7,81 (dd, J=4,8, 9,0 Гц, 1H); 7,61-7,66 (m, 1H); 7,57 (dd, J=2,7, 8,6Гц, 1H); 7,57 (dd, J=2,7, 8,6Гц, 1H); 7,52 (dd, J=3,2, 6,9Гц, 1H); 7,52 (br s, 2H); 4,38 (d, J=12Гц, 1H); 4,08 (d, J=12Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 323,0 ( $\text{M}^+$ ).

ПРИКЛАД 10

Отримання сполук інгібітору PI3Kδ

Сполука D-001

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-6,7-диметокси-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2a (200мг, 0,546ммоль), аденін (81мг, 0,601ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (83мг, 0,601ммоль) та ВМР (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з етанолу ( $\text{EtOH}$ ) для отримання 164мг бежевого, твердого продукту (65%), т.пл. 281,5-282,7°C (розкладається).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,76-7,81 (m, 1H); 7,70-7,76 (m, 1H); 7,60-7,67 (m, 2H); 7,45 (s, 1H); 7,22 (s, 2H); 6,90 (s, 1H); 5,08 (d, J=17Гц, 1H); 4,91 (d, J=17Гц, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,87 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-d_6$ ) млн.  $^1$ : 159,9, 156,2, 155,4, 152,9, 150,0, 149,7, 149,4, 143,0, 141,9, 133,7, 132,1, 131,9, 131,2, 130,8, 129,3, 118,4, 113,6, 108,4, 105,8, 56,5, 56,1, 44,7. МС (ЕР): m/z 464,1 ( $\text{M}^+$ ) Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClN}_7\text{O}_3$  0,1 $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}$ ·0,05 $\text{KCl}$ : С, 56,47; Н, 3,97; Cl, 7,88; N, 20,76. Знайдено: С, 56,54; Н, 4,05; Cl, 7,77; N, 20,55.

Сполука D-002

2-(6-амінопурин-о-ілметил)-6-бром-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2b (100мг, 0,260ммоль), аденін (39мг, 0,286ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (40мг, 0,286ммоль) та ДМФ (2мл). Сирий продукт перекристалізовували з  $\text{EtOH}$  для отримання 52мг білуватого твердого продукту (41%), темп-пл. 284,2-284,7°C (розкладається).  $^1\text{H}$  ЯМР ( $\text{DMSO}-$

$\delta$ : 8,24 (d,  $J=2,0$ Гц, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,98 (dd,  $J=1,9, 8,6$ Гц, 1H); 7,74-7,83 (m, 2H); 7,59-7,68 (m, 2H); 7,46 (d,  $J=8,7$ Гц, 1H); 7,22 (s, 2H); 5,12 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,94 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 159,5, 156,2, 152,9, 152,0, 150,1, 145,8, 141,8, 138,4, 133,1, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,1, 129,4, 128,9, 122,4, 120,4, 118,4, 45,0. МС (ЕР):  $m/z$  482,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClBrN}_7\text{O}\cdot 0,1\text{KCl}$ : С, 49,01; Н, 2,67; Cl, 7,96; N, 20,00. Знайдено: С, 48,82; Н, 2,82; Cl, 8,00; N, 19,79.

Сполука D-003

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2с (100мг, 6,310ммоль); аденін (46мг, 0,340ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (47мг, 0,340ммоль) та ДМФ (1мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 57мг бежевого твердого продукту (44%), темп.пл. 216,8-217,2°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,22 (dd,  $J=6,3, 8,7$ Гц, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,78-7,80 (m, 2H); 7,61-7,64 (m, 2H); 7,46 (dt,  $J=2,1, 8,6$ Гц, 1H); 7,32 (d,  $J=9,8$ Гц, 1H); 7,22 (s, 2H); 5,13 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,95 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 166,1 (d,  $J=253$ Гц), 159,6, 155-8, 152,5, 149,7, 148,6 (d,  $J=14$ Гц), 141,4, 132,8, 131,8, 131,6, 130,8, 130,5, 129,8 (d,  $J=11$ Гц), 129,0, 118,1, 117,4, 116,2 (d,  $J=24$ Гц), 112,7 (d,  $J=22$ Гц), 44,6. МС (ЕР):  $m/z$  422,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClFN}_7\text{O}\cdot 0,1\text{H}_2\text{O}\cdot 0,15\text{KCl}$ : С, 55,25; Н, 3,06; Cl, 9,38; N, 22,55. Знайдено: С, 55,13; Н, 2,92; Cl, 9,12; N, 22,30.

Сполука D-004

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-6-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2d (100мг, 0,294ммоль), аденін (44мг, 0,323ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (45мг, 0,323ммоль) та ДМФ (1мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 50мг жовтого твердого продукту (39%), темп.пл. 294,5-294,8°C (розкладається).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,10 (d,  $J=2,2$ Гц, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,86 (dd,  $J=2,4, 8,8$ Гц, 1H); 7,75-7,82 (m, 2H); 7,59-7,67 (m, 2H); 7,53 (d,  $J=8,7$ Гц, 1H); 7,22 (br s, 2H); 5,13 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,95 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 159,7, 156,2, 152,9, 151,9, 150,1, 145,5, 141,8, 135,7, 133,1, 132,3, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,0, 129,4, 125,9, 122,0, 118,4, 44,9. МС (ЕР):  $m/z$  438,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}$ : С, 54,81; Н, 2,99; N, 22,37. Знайдено: С, 54,72; Н, 2,87; N, 22,18.

Сполука D-005

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5флуор-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2е (200мг, 0,619ммоль), аденін (92мг, 0,681ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (94мг, 0,680ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 168мг білуватого твердого продукту (64%), темп.пл. 159-172°C (поступово розкладається).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,10 (s, 1H); 8,08 (s, 1H); 7,73-7,89 (m, 3H); 7,57-7,71 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 2H); 7,34 (d,  $J=11$ Гц, 1H); 7,30 (d,  $J=8,3$ Гц, 1H); 5,14 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,94 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 160,8 (d,  $J=264$ Гц), 157,5 (d,  $J=4,2$ Гц), 155,8, 152,4, 152,4, 150,0, 148,7, 142,1, 136,4 (d,  $J=11$ Гц), 133,0, 132,2, 132,1, 131,2, 130,9, 129,4, 123,8 (d,  $J=3,6$ Гц), 118,4, 114,5 (d,  $J=20$ Гц), 110,2 (d,  $J=6,0$ Гц), 44,9. МС (ЕР):  $m/z$  422,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClFN}_7\text{O}$ : С, 56,95; Н, 3,11; Cl, 8,40; N, 23,24. Знайдено: С, 54,62; Н, 3,32; Cl, 9,40; N, 21,29.

Сполука D-006

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2f (300мг, 0,883ммоль), аденін (131мг, 0,972ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (134мг, 0,972ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  та перекристалізовували з EtOH для отримання 188мг блідо-оранжевого кристалічного твердого продукту (49%), темп.пл. 245,7-246,0 (починає випаровуватися при 220°C).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,76-7,81 (m, 2H); 7,72 (d,  $J=8,0$ Гц, 1H); 7,59-7,66 (m, 3H); 7,41 (d,  $J=8,1$ Гц, 1H); 7,26 (br s, 2H); 5,11 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,93 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 158,5, 156,2, 152,9, 152,2, 150,1, 149,2, 135,4, 133,3, 133,2, 132,1, 132,0, 131,2, 130,4, 129,4, 127,3, 118,4, 117,7, 44,9. МС (ЕР):  $m/z$  438,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}\cdot 0,1\text{C}_2\text{H}_6\text{O}\cdot 0,05\text{H}_2\text{O}$ : С, 54,67; Н, 3,11; Cl, 15,98; N, 22,09. Знайдено: С, 54,35; Н, 3,00; Cl, 15,82; N, 22,31.

Сполука D-007

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2g (250мг, 0,783ммоль), аденін (116мг, 0,862ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (119мг, 0,862ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 93мг блідо-жовтого твердого продукту (28%), темп.пл. 190,7-190,9°C.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,76-7,79 (m, 1H); 7,71-7,74 (m, 1H); 7,59-7,67 (m, 1H); 7,34 (d,  $J=7,4$ Гц, 1H); 7,28 (d,  $J=8,2$ Гц, 1H); 7,24 (br s, 2H); 5,07 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,92 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 2,73 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 161,1, 156,2, 152,8, 150,9, 150,1, 148,3, 141,9, 141,0, 134,6, 133,6, 132,2, 131,9, 131,3, 130,8, 130,3, 129,3, 125,9, 119,1, 118,4, 44,8, 22,8. МС (ЕР):  $m/z$  418,1 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{ClN}_7\text{O}\cdot \text{H}_2\text{O}$ : С, 57,87; Н, 4,16; Cl, 8,13; N, 22,49. Знайдено: С, 57,78; Н, 3,99; Cl, 8,38; N, 22,32.

Сполука D-008

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2h (100мг, 0,294ммоль), аденін (44мг, 0,324ммоль),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (45мг, 0,324ммоль) та ДМФ (1мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  для отримання 50мг блідо-жовтого твердого продукту (39%), темп.пл. 273,3-273,5°C (знебарвлюється).  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,11 (dd,  $J=1,3, 8,0$ Гц, 1H); 8,08 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,00 (dd,  $J=1,3, 7,8$ Гц, 1H); 7,79-7,83 (m, 2H); 7,63-7,66 (m, 2H); 7,56 (t,  $J=7,9$ Гц, 1H); 7,21 (br s, 2H); 5,17 (d,  $J=17$ Гц, 1H); 4,97 (d,  $J=17$ Гц, 1H).  $^{13}\text{C}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 160,2, 156,1, 152,8, 152,2, 150,2, 143,3, 142,0, 135,6, 133,1, 132,3, 131,9, 131,1, 131,0, 130,9, 129,4, 128,4, 126,0, 122,5, 118,4, 45,0. МС (ЕР):  $m/z$  438,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{N}_7\text{O}\cdot 0,1\text{CH}_4\text{O}\cdot 0,6\text{H}_2\text{O}\cdot 0,15\text{KCl}$ : С, 52,09; Н, 3,18; N, 21,15. Знайдено: С, 51,85; Н, 2,93; N, 21,01.

Сполука D-009

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-дифеніл-2-іл-5-хлор-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2i (400мг, 1,05ммоль), аденін (155мг, 1,15ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (159мг, 1,15ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 344мг білого твердого продукту (68%), темп.пл. 299,9-300,1°C (знебарвлюється). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 8,08 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,58-7,73 (m, 5H); 7,51 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,46 (d, J=7,5Гц, 2H); 7,27-7,41 (m, 3H); 7,14-7,27 (m, 3H); 5,14 (d, J=17Гц, 1H); 4,82 (d, J=17Гц, 1H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 159,6, 156,2, 152,8, 152,5, 150,0, 149,0, 141,7, 140,2, 137,7, 135,0, 133,3, 133,2, 131,8, 130,7, 130,1, 129,8, 129,5, 128,8, 128,6, 128,4, 127,1, 118,4, 117,6, 45,3. МС (ЕР): m/z 480,1 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>7</sub>O: С, 65,07; Н, 3,78; Cl, 7,39; N, 20,43. Знайдено: С, 64,77; Н, 3,75; Cl, 7,43; N, 20,35.

Сполука D-010

5-хлор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2j (200мг, 0,626ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (93мг, 0,546ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (95мг, 0,689ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 125мг білуватого твердого продукту (46%), темп.пл. 213,9°C. <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 13,53 (br s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,78 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,63 (d, J=8,2Гц, 1H); 7,59 (6, J=7,7Гц, 1H); 7,49 (d, J=6,9Гц, 1H); 7,24-7,41 (m, 3H); 4,32445 (m, 2H); 2,14 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,9, 157,2, 154,2, 151,5, 149,6, 143,5, 136,1, 135,9, 135,1, 133,2, 131,3, 130,3, 130,0, 129,9, 129,1, 127,6, 127,1, 32,4, 17,5. МС (ЕР): m/z 438,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>OS: С, 58,00; Н, 3,48; Cl, 8,15; N, 19,32; S, 7,37. Знайдено: С, 58,05; Н, 3,38; Cl, 8,89; N, 18,38; S, 7,00.

5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2k (210мг, 0,650ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (122мг, 0,715ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99мг, 0,715ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 240мг білуватого твердого продукту (84%), темп.пл. 244,0°C. <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 13,56 (br s, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,45 (a, 1H); 7,81 (t, J=8,0Гц, 1H); 7,74 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,67 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,62 (d, J=7,7Гц, 1H); 7,46-7,55 (m, 1H); 7,29-7,42 (m, 2H); 4,47-4,59 (m, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,4, 157,3 (d, J=249Гц), 156,4, 153,8, 151,0, 149,1, 143,2, 135,0, 132,9, 131,8 (d, J=8,0Гц), 130,8, 129,9, 126,7, 125,3 (d, J=3,5Гц), 123,6 (d, J=13Гц), 117,0, 116,2 (d, J=19Гц), 31,7. МС (ЕР): m/z 439,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>6</sub>OS: С, 54,74; Н, 2,76; Cl, 8,08; N, 19,15; S, 7,31. Знайдено: С, 54,42; Н, 2,88; Cl, 8,08; N, 18,87; S, 7,08.

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-флуорфеніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2k (210мг, 0,650ммоль), аденін (97мг, 0,715ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99мг, 0,715ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 137мг жовто-коричневого твердого продукту (50%), темп.пл. 295,6-295,8°C (розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 8,05 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,75 (t, J=7,6Гц, 1H); 7,74 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,62-7,69 (m, 1H); 7,61 (d, J=7,6Гц, 1H); 7,47-7,55 (m, 1H); 7,48 (d, J=7,8Гц, 1H); 7,41 (d, J=8,0Гц, 1H); 7,24 (br s, 2H); 5,19 (d, J=17Гц, 1H); 5,03 (d, J=17Гц, 1H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,7, 157,6 (d, J=250Гц), 156,2, 152,8, 152,4, 150,0; 149,2, 141,8, 135,4, 133,3, 132,5 (d, J=8,0Гц), 131,0, 130,4, 127,3, 126,2 (d, J=3,5Гц), 123,1 (d, J=14Гц), 118,4, 117,6, 117,2 (d, J=19Гц), 45,1. МС (ЕР): m/z 422,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>ClFN<sub>7</sub>O<sub>0,05</sub>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O: С, 56,92; Н, 3,16; Cl, 8,36; N, 23,12. Знайдено: С, 56,79; Н, 3,20; O, 8,46; N, 22,79.

Сполука D-013

3-дифеніл-2-іл-5-хлор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфаніл-метил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2i (400мг, 1,05ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (196мг, 1,15ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (159мг, 1,15ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> та далі перекристалізовували з EtOH для отримання 439мг блідо-жовтого кристалічного твердого продукту (84%), т.пл. 222,0-222,5°C (з розкладанням). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 13,56 (br s, 1H); 8,55 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,73 (t, J=8,0Гц, 1H); 7,64 (d, J=7,7Гц, 1H); 7,50-7,59 (m, 4H); 7,41-7,48 (m, 1H); 7,25-7,38 (m, 5H); 4,41 (d, J=16Гц, 1H); 4,16 (4 J=16Гц, 1H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 160,2, 153,7, 151,5, 149,7, 149,3, 143,5, 139,9, 137,8, 135,1, 134,1, 133,3, 131,5, 130,5, 130,3, 129,1, 128,9, 128,4, 128,4, 126,9, 117,5, 32,3. МС (ЕР): m/z 497,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>26</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>OS: С, 62,84; Н, 3,45; Cl, 7,13; N, 16,91; S, 6,45. Знайдено: С, 62,60; Н, 3,47; Cl, 7,15; N, 16,65; S, 6,41.

Сполука D-014

5-хлор-3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 21 (250мг, 0,746ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (140мг, 0,821ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (113мг, 0,821ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 254мг білуватого твердого продукту (76%), темп.пл. 237,0°C (з розкладанням; знебарвлюється при 154,6°C). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 13,53 (brs, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,78 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,64 (d, J=8,0Гц, 1H); 7,59 (d, J=7,7Гц, 1H); 7,48 (d, J=7,3Гц, 1H); 7,42 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,15 (d, J=8,2Гц, 1H); 7,03 (t, J=7,5Гц, 1H); 4,45 (s, 2H); 3,76 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,9, 157,1, 154,8, 154,7, 151,5, 149,6, 143,6, 135,1, 133,2, 131,3, 130,4, 130,0, 127,0, 124,8, 121,2, 117,8, 112,7, 56,1, 32,0. МС (ЕР): m/z 451,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<sub>0,15</sub>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>0,05</sub>KCl: С, 55,43; Н, 3,47; Cl, 8,07; N, 18,21; S, 6,95. Знайдено: С, 55,49; Н, 3,68; Cl, 7,95; N, 17,82; S, 6,82.

Сполука D-015

3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2e (200мг, 0,619ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (116мг, 0,681ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (94мг, 0,681ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 152мг білого твердого продукту (56%), темп.пл. 222,7-223,8°C (знебарвлюється). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 13,56 (brs, 1H); 8,48 (a, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,89 (dt, J=5,6,8,1Гц, 1H); 7,76 (dd, J=1,6, 7,3Гц, 1H); 7,67 (d, J=7,4Гц, 1H); 7,56 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,47 (t, J=7,1Гц, 1H); 7,41-7,53 (m, 2H); 7,37 (dd, J=8,7, 11Гц, 1H); 4,38-4,52 (m, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 160,9 (d, J=264Гц), 157,6, 156,8, 154,1, 151,5, 149,6, 149,0, 143,6, 136,4 (d, J=11Гц), 133,9, 132,2, 131,7, 131,6, 130,5, 130,2, 128,8, 123,6, 114,4 (d, J=20Гц), 110,2, 32,0. МС (ЕР): m/z 439,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>6</sub>OS<sub>0,5</sub>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O: С, 54,61; Н, 3,27; Cl,



7,68; N, 18,19; S, 6,94. Знайдено: C, 54,37; H, 3,26; Cl, 7,89; N, 18,26; S, 6,55.

Сполука D-016

3-(2-хлорфеніл)-6,7-диметокси-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2a (200мг, 0,546ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (102мг, 0,601ммоль),  $K_2CO_3$  (83мг, 0,601ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 172мг білуватого твердого продукту (65%), темп.пл. 160-180°C (поступово розкладається).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,55 (br s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,72 (d,  $J=6,9$ Гц, 1H); 7,66 (d,  $J=6,9$ Гц, 1H); 7,38-7,54 (m, 3H); 7,22 (s, 1H); 4,36-4,52 (m, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,89 (s, 3H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 160,1, 155,4, 151,5, 151,1, 149,4, 143,2, 134,6, 132,3, 131,6, 131,5, 130,4, 128,7, 113,6, 108,4, 105,8, 56,5, 56,1, 32,0. МС (ЕР): m/z 481,1 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{22}H_{17}ClN_6O_3S \cdot 0,5C_2H_6O \cdot 0,05KCl$ : C, 54,41; H, 3,97; Cl, 7,33; N, 16,55; S, 6,32. Знайдено: C, 54,43; H, 3,94; Cl, 7,69; N, 16,69; S, 6,52.

Сполука D-017

6-бром-3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2b (200мг, 0,519ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (97мг, 0,570ммоль),  $K_2CO_3$  (79мг, 0,572ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 123мг білуватого твердого продукту (47%), темп.пл. 212-242°C (поступово розкладається).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,07 (br s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,24 (d,  $J=2,3$ Гц, 1H); 8,06 (dd,  $J=2,3, 8,7$ Гц, 1H); 7,76 (dd,  $J=1,9, 7,4$  Hz, 1H); 7,70 (d,  $J=8,7$ Гц, 1H); 7,66 (d,  $J=8,1$ Гц, 1H); 7,51 (dd,  $J=2,1, 7,9$ Гц, 1H); 7,46 (dd,  $J=1,9, 7,9$ Гц, 1H); 4,47 (s, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 159,7, 156,8, 153,6, 151,5, 146,1, 143,6, 138,5, 134,0, 132,1, 131,8, 131,5, 130,5, 130,2, 129,9, 128,9, 128,8, 122,2, 120,3, 32,0. МС (ЕР): m/z 499,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{20}H_{12}ClBrN_6OS \cdot 0,2C_2H_6O \cdot 0,05KCl$ : C, 47,79; H, 2,59; N, 16,39; S, 6,25. Знайдено: C, 47,56; H, 2,54; N, 16,25; S, 6,58.

Сполука D-018

3-(2-хлорфеніл)-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-трифлуорметил-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2m (200мг, 0,536ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (100мг, 0,588ммоль),  $K_2CO_3$  (82мг, 0,593ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 148мг білого твердого продукту (56%), темп.пл. 218,5-219,4°C.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,52 (br s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,43 (d,  $J=6,0$ Гц, 1H); 8,26 (d,  $J=7,5$ Гц, 1H); 7,84 (dd,  $J=2,5, 6,7$ Гц, 1H); 7,70-7,75 (m, 2H); 7,51-7,59 (m, 2H); 4,40-4,55 (m, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 160,0, 157,2, 154,2, 151,4, 149,6, 144,4, 143,4, 133,8, 133,0 (q,  $J=5,1$ Гц), 132,0, 131,9, 131,6, 131,4, 130,6, 129,0, 127,3, 125,2 (q,  $J=30$ Гц), 123,6 (q,  $J=27$ Гц), 121,8, 32,6. МС (ЕР): m/z 489,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{21}H_{12}ClF_3N_6OS$ : C, 51,59; H, 2,47; Cl, 7,25; N, 17,19; S, 6,56. Знайдено: C, 51,51; H, 2,55; Cl, 7,37; N, 17,05; S, 6,38.

Сполука D-019

3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-бензо[*g*]хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2n (200мг, 0,563ммоль), 6-моногідрат 6-меркаптопурину (105мг, 0,619ммоль),  $K_2CO_3$  (86мг, 0,619ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 128мг темно-жовтого твердого продукту (48%), т.пл. 247,8-254,4°C (розкладається).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,56 (br s, 1H); 8,90 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 8,27 (d,  $J=8,2$ Гц, 1H); 8,16 (d,  $J=8,2$ Гц, 1H); 7,81 (dd,  $J=1,6, 7,3$ Гц, 1H); 7,70 (t,  $J=7,5$ Гц, 1H); 7,61-7,74 (m, 2H); 7,49 (t,  $J=7,5$ Гц, 1H); 7,44-7,53 (m, 1H); 4,44-4,56 (m, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 161,3, 151,6, 151,5, 143,9, 142,2, 136,7, 134,4, 131,8, 131,6, 130,5, 129,7, 129,3, 128,8, 128,3, 128,3, 127,1, 125,2, 119,5, 32,4. МС (ЕР): m/z 471,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{24}H_{15}ClN_6OS \cdot 0,2C_6H_6O \cdot 0,05KCl$ : C, 60,57; H, 3,37; Cl, 7,69; N, 17,37; S, 6,63. Знайдено: C, 60,24; H, 3,46; Cl, 7,50; N, 17,34; S, 6,69.

Сполука D-020

6-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2d (200мг, 0,587ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (110мг, 0,646ммоль),  $K_2CO_3$  (90мг, 0,651ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 113мг жовтого кристалічного твердого продукту (42%), темп.пл. 237,1-238-2°C (розкладається).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,55 (br s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 7,94 (d,  $J=8,3$ Гц, 1H); 7,78 (d,  $J=8,1$ Гц, 2H); 7,66 (d,  $J=6,7$ Гц, 1H); 7,48-7,56 (m, 2H); 4,48 (s, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 159,8, 156,8, 153,5, 151,5, 145,8, 143,6, 135,7, 134,0, 132,2, 132,1, 131,5, 130,5, 130,2, 129,8, 128,8, 125,8, 121,9, 32,0. МС (ЕР): m/z 455,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{20}H_{12}Cl_2N_6OS \cdot 0,1C_2H_6O \cdot 0,6H_2O \cdot 0,15KCl$ : C, 50,34; H, 2,89; Cl, 15,82; N, 17,44; S, 6,65. Знайдено: C, 50,02; H, 2,63; Cl, 15,51; N, 17,39; S, 6,81.

Сполука D-021

8-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2h (200мг, 0,589ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (124мг, 0,726ммоль),  $K_2CO_3$  (100мг, 0,726ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 202мг білого твердого продукту (75%), темп.пл. 211,9-212,7°C (розкладається).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,54 (br s, 1H); 8,47 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,12 (d,  $J=7,9$ Гц, 1H); 8,07 (d,  $J=7,6$ Гц, 1H); 7,78 (d,  $J=7,5$ Гц, 1H); 7,67 (d,  $J=7,1$ Гц, 1H); 7,58 (t,  $J=7,9$ Гц, 1H); 7,42-7,54 (m, 2H); 4,52 (s, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )млн. $^{-1}$ : 160,3, 156,9, 153,9, 151,5, 149,7, 143,5, 135,7, 134,0, 132,1, 131,8, 131,4, 131,1, 130,5, 130,3, 128,9, 128,3, 126,1, 122,4, 32,5. МС (ЕР): m/z 455,0 ( $M^+$ ). Аналіз, розраховано: для  $C_{20}H_{12}Cl_2N_6OS$ : C, 52,76; H, 2,66; Cl, 15,57; N, 18,46; S, 7,04. Знайдено: C, 52,65; H, 2,79; Cl, 15,32; N, 18,47; S, 7,18.

Сполука D-022

3-(2-хлорфеніл)-7-флуор-2-(9H-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2c (200мг, 0,619ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (116мг, 0,681ммоль),  $K_2CO_3$  (95мг, 0,687ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 143мг білого твердого продукту (53%), темп.пл. 151,4-154,2°C (знебарвлюється).  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,55 (br s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,23 (dd,  $J=6,3, 8,7$ Гц, 7,77 (dd,  $J=1,7, 7,4$ Гц, 1H); 7,64 (d,  $J=7,4$ Гц, 1H); 7,57 (d,  $J=9,8$ Гц, 1H); 7,45-7,52 (m, 4,48 (s, 2H).  $^{13}C$  ЯМР (ДМСО-

$d_6$ )млн<sup>-1</sup>: 169,0 (d, J=253Гц), 162,6, 159,3, 157,0, 154,0, 152,2, 151,7 (d, J=13Гц), 146,1, 136,5, 134,7, 134,2, 134,0, 133,0, 132,6 (d, J=11Гц), 131,3, 120,2, 118,9 (d, J=24Гц), 115,3 (d, J=22Гц), 34,6. МС (ЕР): m/z 439,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>6</sub>OS·0,4H<sub>2</sub>O·0,15KCl: С, 52,52; Н, 3,22; Cl, 8,57; N, 17,67. Знайдено: С, 52,25; Н, 3,11; Cl, 8,20; N, 17,69.

Сполука D-023

3-(2-хлорфеніл)-7-нітро-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2o (216мг, 0,617ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (116мг, 0,681ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (94мг, 0,680ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 212мг жовтого кристалічного твердого продукту (74%), темп.пл. 218,0-218,3°C (розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,56 (br s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 8,38-8,45 (m, 2H); 8,31 (d, J=8,4Гц, 1H); 7,81 (d, J=6,5Гц, 1H); 7,68 (d, J=6,7Гц, 1H); 7,43-7,58 (m, 2H); 4,53 (s, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 157,7, 154,4, 153,3, 149,8, 149,3, 147,6, 145,2, 141,4, 131,5, 129,8, 129,7, 129,2, 128,4, 127,1, 126,7, 122,7, 120,3, 119,4, 29,9. МС (ЕР): m/z 466,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>3</sub>S·0,4C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O·0,05KCl: С, 51,19; Н, 2,97; О, 7,63; N, 20,09; S, 6,57. Знайдено: С, 51,27; Н, 2,88; Cl, 7,40; N, 20,04; S, 6,52.

Сполука D-024

3-(2-хлорфеніл)-6-гідрокси-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2p (200мг, 0,552ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (117мг, 0,685ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (95мг, 0,687ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 182мг білої твердої суміші потрібного продукту та ацетилпохідного. Частина цього матеріалу (120мг) суспендували у суміші MeOH (2мл) та водного розчину NaHCO<sub>3</sub> (насичений, 1мл) та перемішували швидко протягом 4 годин. Суміш концентрували у вакуумі, суспендували у воді (10мл) та зберігали при 4°C протягом ночі. Білий твердий продукт збирали та сушили до 103мг (66%), темп.пл. 186-214°C (поступово розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,48 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,71 (d, J=6,8Гц, 1H); 7,62-7,64 (m, 2H); 7,43-7,51 (m, 2H); 7,40-7,43 (m, 1H); 7,35 (d, J=8,8Гц, 1H); 4,39-4,52 (m, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 160,6, 157,1, 156,2, 151,4, 150,8, 149,3, 144,1, 140,2, 134,5, 132,2, 131,6, 131,4, 130,4, 129,3, 128,7, 124,8, 121,7, 109,8, 32,0. МС (ЕР): m/z 437,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для (2 C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S·0,1C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O·6H<sub>2</sub>O): С, 49,68; Н, 3,88; Cl, 7,26; N, 17,21; S, 6,57. Знайдено: С, 49,43; Н, 3,62; Cl, 7,32; N, 17,07; S, 6,58.

Сполука D-025

5-хлор-3-(2-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2f (300мг, 0,883ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (165мг, 0,972ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (134мг, 0,972ммоль) та DMP (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 341мг блідо-оранжевого кристалічного твердого продукту (85%), темп.пл. 233,7-234,4°C (розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,58 (br s, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,77-7,85 (m, 2H); 7,68 (d, J=8,1Гц, 2H); 7,65 (d, J=7,7Гц, 1H); 7,41-7,56 (m, 2H); 4,45 (d, J=1,2Гц, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 158,7, 156,8, 153,8, 151,5, 149,6, 143,5, 135,4, 134,1, 133,3, 132,2, 131,6, 130,5, 130,2, 128,8, 127,1, 117,6, 32,0. МС (ЕР): m/z 455,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>OS·C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O·0,3H<sub>2</sub>: С, 52,14; Н, 3,70; Cl, 13,99; N, 16,58; S, 6,33. Знайдено: С, 52,07; Н, 3,37; Cl, 13,40; N, 16,65; S, 6,42.

Сполука D-026

3-(2-хлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2g (300мг, 0,940ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (176мг, 1,03ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (142мг, 1,03ммоль) та ДМФ (5мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 324мг білого твердого продукту (79%), темп.пл. 227,8-230,1°C (розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,57 (br s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,69-7,78 (m, 2H); 7,66 (d, J=7,3Гц, 1H); 7,55 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,39-7,52 (m, 1H); 7,36 (d, J=6,9Гц, 1H); 4,38-4,50 (m, 2H); 2,74 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 161,2, 156,3, 152,4, 151,5, 148,6, 143,9, 141,0, 134,6, 134,5, 132,3, 131,7, 131,4, 130,4, 130,2, 128,7, 125,7, 119,0, 32,0, 22,8. МС (ЕР): m/z 435,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>5</sub>OS·0,65C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O·0,1H<sub>2</sub>O: С, 57,40; Н, 4,13; Cl, 7,60; N, 18,01; S, 6,87. Знайдено: С, 57,11; Н, 3,96; Cl, 7,45; N, 17,79; S, 6,90.

Сполука D-027

3-(2-хлорфеніл)-6,7-дифлуор-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2q (200мг, 0,586ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину, (110мг, 0,645ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (89мг, 0,645ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 143мг блідо-жовтого кристалічного твердого продукту (53%), темп.пл. 207,8°C (знебарвлюється; випаровується при 136°C). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,57 (br s, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,11 (t, J=9,4Гц, 1H); 7,88 (dd, J=7,3, 11Гц, 1H); 7,77 (dd, J=1,7, 7,3Гц, 1H); 7,67 (d, J=7,4Гц, 1H); 7,42-7,55 (m, 2H); 4,48 (s, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 159,5 (d, J=2,5Гц), 154,6 (dd, J=14, 255Гц), 154,0 (d, J=1,5Гц), 151,5, 149,3 (dd, J=14, 250Гц), 145,1 (d, J=12Гц), 143,9, 133,9, 132,1, 131,8, 131,4, 130,5, 128,9, 118,0 (d, J=4,9Гц), 115,8 (d, J=18Гц), 114,6 (d, J=20Гц), 32,0. МС (ЕР): m/z 457,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>11</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>6</sub>OS: С, 52,58; Н, 2,43; Cl, 7,76; N, 18,40; S, 7,02. Знайдено: С, 51,81; Н, 2,37; Cl, 7,49; N, 18,04; S, 7,55.

Сполука D-028

3-(2-хлорфеніл)-6-флуор-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи інтермедіат 2r (118мг, 0,365ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (68мг, 0,402ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (56мг, 0,402ммоль) та ДМФ (2мл). Сирий продукт перекристалізовували з EtOH для отримання 103мг білуватого кристалічного твердого продукту (64%), темп.пл. 232,8-233,0°C (знебарвлюється). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,56 (br s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,81-7,86 (m, 3H); 7,76 (d, J=7,5Гц, 1H); 7,67 (d, J=7,5Гц, 1H); 7,40-7,54 (m, 2H); 4,48 (br s, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн<sup>-1</sup>: 160,8 (d, J=247Гц), 160,2 (d, J=3,3Гц), 156,9, 152,3 (d, J=1,9Гц), 151,5, 149,7, 144,0, 143,6, 134,1,

132,1, 131,7, 131,5, 130,5, 130,4, 130,2, 128,8, 124,0 (d, J=24Гц), 122,0 (d, J=8,7Гц), 111,7 (d, J=24Гц), 32,0. МС (EP): m/z 439,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>6</sub>OS·0,2C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O·0,1H<sub>2</sub>O: C, 54,46; H, 3,00; Cl, 7,88; N, 18,68. Знайдено: C, 54,09; H, 2,73; Cl, 7,80; N, 18,77.

#### Сполука D-029

##### 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он

Тіонілхлорид (2,2мл, 30ммоль) додавали до перемішаного розчину 2-аміно-6-метилбензойної кислоти (1,51г, 10ммоль) у бензолі (50мл) та суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Після охолодження розчинник видаляли у вакуумі та двічі промивали бензолом (25мл). Залишок розчиняли у СНCl<sub>3</sub> (50мл) та обробляли 2-ізопропіланіліном (2,83мл, 20ммоль). Пульпу далі гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 3 годин. У цей час за допомогою ТШХ (50% етилацетат/гексан) було визначено, що реакція завершилася. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш виливали на 4-см тампон силікагелю та промивали сумішшю 20% етилацетат/гексан. Продукт, що містить фракції, поєднували та концентрували у вакуумі. Залишок розчиняли у HOAc (50мл) та обробляли хлорацетилхлоридом (1,6мл, 20ммоль) і суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Реакційну суміш охолоджували та концентрували у вакуумі. Залишок HOAc видаляли азеотропною перегонкою з толуолом (25мл) три рази. Залишок розчиняли у толуолі (10мл) та пропускали через 4-см тампон силікагелю, промиваючи сумішшю 20% етилацетат/гексан. Продукт, що містить фракції ідентифікували РХ-МС (МС (EP): m/z 327 (M<sup>+</sup>)) та концентрували у вакуумі для отримання 975мг (30%) як білої піни. Хлорид білої піни (450мг, 1,36ммоль) розчиняли у ДМФ (10мл) та обробляли аденіном (275мг, 2,04ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (281мг, 2,04ммоль) і суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Суспензію далі виливали у 200мл води, перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин далі охолоджували у холодильнику протягом 30 хвилин. Утворений твердий продукт збирали вакуумним фільтруванням та перекристалізовували з EtOH для отримання 285мг (49%) білуватого твердого продукту, темп.пл. 258,0-258,2°C. <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 8,19 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,45 (m, 2H), 7,23 (m, 3H), 5,11 (d, J=17,5Гц, 1H), 4,71 (d, J=17,5Гц, 1H); 2,68 (s, 3H), 2,73 (q, J=6,9Гц, 1H), 1,34 (d, J=6,8Гц, 3H), 1,13 (d, J=6,8Гц, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 161,9, 156,2, 152,8, 151,6, 150,1, 148,4, 146,1, 142,2, 140,8, 134,3, 133,7, 130,6, 130,0, 129,0, 127,7, 127,6, 125,8, 119,2, 118,4, 44,8, 28,3, 24,4, 23,3, 22,9. МС (EP) m/z 426,4 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O: C, 67,75; H, 5,45; N, 23,04. Знайдено: C, 67,60; H, 5,45; N, 22,82.

#### Сполука D-030

##### 2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он

Тіонілхлорид (2,2мл, 30ммоль) додавали до перемішаного розчину 2-аміно-6-метилбензойної кислоти (1,51г, 10ммоль) у бензолі (50мл) та суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Після охолодження розчинник видаляли у вакуумі та двічі промивали бензолом (25мл). Залишок розчиняли у СНCl<sub>3</sub> (50мл) та обробляли о-толуїдином (2,13мл, 20ммоль). Пульпу далі гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 3 годин. У цей час за допомогою ТШХ (50% етилацетат/гексан) було визначено, що реакція завершилася. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш виливали на 4-см тампон силікагелю та промивали сумішшю 20% етилацетат/гексан. Продукт, що містить фракції поєднували та концентрували у вакуумі. Залишок розчиняли у HOAc (50мл) та обробляли хлорацетилхлоридом (1,6мл, 20ммоль) та суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Реакційну суміш охолоджували та концентрували у вакуумі. Залишок HOAc видаляли азеотропною перегонкою з толуолом (25мл) три рази. Залишок розчиняли у толуолі (10мл) та пропускали через 4-см тампон силікагелю, промиваючи сумішшю 20% етилацетат/гексан. Продукт, що містить фракції, ідентифікували за допомогою РХ-МС [МС (EP): m/z 299 (M<sup>+</sup>)] та концентрували у вакуумі для отримання 476мг (16%) як білої піни. Хлорид білої піни (470мг, 1,57ммоль) розчиняли у ДМФ (10мл) та обробляли аденіном (423мг, 3,14ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (433мг, 3,14ммоль) і суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі. Суспензію далі виливали у 200мл води, перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, далі охолоджували у холодильнику протягом 30 хвилин. Утворений твердий продукт збирали вакуумним фільтруванням та перекристалізовували з EtOH для отримання 123мг (20%) білуватого твердого продукту, темп.пл. 281,5-282,7°C (розкладається). <sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ: 8,07 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,61 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,48 (m, 4H), 7,25 (m, 3H), 5,09 (d, J=17,4Гц, 1H); 4,76 (d, J=17,4Гц, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,18 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 161,3, 156,2, 152,8, 151,4, 150,0, 148,5, 142,2, 140,9, 136,1, 135,4, 134,3, 131,7, 130,1, 130,6, 129,0, 128,0, 125,8, 119,2, 118,5, 44,8, 22,9, 17,4. МС (EP): m/z 398,2 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O: C, 66,49; H, 4,82; N, 24,67. Знайдено: C, 66,29; H, 4,78; N, 24,72.

#### Сполука D-031

##### 3-(2-флуорфеніл-5-метил-2-(9Н-пурин-6-іл-сульфанометил)-3Н-хіназолін-4-он

Тіонілхлорид (2,2мл, 30ммоль) додавали до перемішаного розчину 2-аміно-6-метилбензойної кислоти (1,51г, 10ммоль) у бензолі (50мл) та суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Після охолодження розчинник видаляли у вакуумі та промивали двічі бензолом. (25мл). Залишок розчиняли у СНCl<sub>3</sub> (50мл) та обробляли 2-флуораніліном (1,93мл, 20ммоль). Пульпу далі гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 3 годин. У цей час за допомогою ТШХ (50% етилацетат/гексан) було визначено, що реакція завершилася. Після охолодження до кімнатної температури, реакційну суміш виливали на 4-см тампон силікагелю та промивали сумішшю 20% EtOAc/гексан. Продукт, що містить фракції, поєднували та концентрували у вакуумі. Залишок розчиняли у HOAc (50мл) та обробляли хлорацетилхлоридом (1,6мл, 20ммоль) і суміш гріли при кипінні під зворотним холодильником протягом 18 годин. Реакційну суміш охолоджували та концентрували у вакуумі. Залишок HOAc видаляли азеотропною перегонкою з толуолом (25мл) три рази. Залишок розчиняли у толуолі (10мл) та пропускали через 4-см тампон силікагелю, промиваючи сумішшю 20% етилацетат/гексан. Продукт, що містить фракції, ідентифікували за допомогою РХ-МС [МС (EP): m/z 303 (M<sup>+</sup>)] та концентрували у вакуумі для отримання 1,12г (37%) як білої піни. Хлорид білої піни (455мг, 1,50ммоль) розчиняли у ДМФ (10мл) та обробляли моногідратом 6-меркаптопурина (510мг, 3,0ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (414мг, 3,0ммоль) і суміш перемішували протягом ночі при кімнатній температурі.

Суспензію далі виливали у 200мл води, перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, далі охолоджували у холодильнику протягом 30 хвилин. Утворений твердий продукт збирали вакуумним фільтруванням та перекристалізовували з EtOH для отримання 487мг (77%) білуватого твердого продукту, темп.пл. 151,9-152,2°C. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,48 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,70 (m, 2H); 7,48 (m, 2H), 7,33 (m, 3H), 4,55 (d, J=15,1Гц, 1H); 4,48 (d, J=15,1Гц, 1H), 2,73 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 161,3, 157,8 (d, J=249,1Гц), 156,9, 152,8, 151,5, 149,6, 148,6, 143,6, 140,9, 134,7, 131,9 (d, J=8,0Гц), 131,4, 130,2, 125,6 (d, J=3,6Гц), 125,5, 124,4 (d, J=13,5Гц), 118,8, 116,6 (d, J=19,6Гц), 56,4, 22,9. МС (ЕР): m/z 419,5 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>6</sub>OS·0,15·C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O: C, 60,14; H, 3,77; F, 4,47; N, 19,76; S, 7,54. Знайдено: C, 59,89; H, 3,88; F, 4,42; N, 19,42; S, 7,23.

#### Сполука D-032

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 2j (200мг, 0,626ммоль), аденін (93мг, 0,689ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (95мг, 0,689ммоль) та ДМФ (3мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання 101мг білуватого твердого продукту (39%), темп.пл. 262,0-266,5°C. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,08 (s, 1H); 8,07 (s, 1H); 7,70 (t, J=8,0Гц, 1H); 7,58 (dd, J=0,6, 7,9Гц, 1H); 7,43-7,57 (m, 4H); 7,36 (dd, J=0,7, 8,0Гц, 1H); 7,26 (br s, 2H); 5,12 (d, J=18Гц, 1H); 4,78 (d, J=18Гц, 1H); 2,20 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,7, 156,2, 152,9, 152,7, 150,0, 149,4, 142,1, 136,1, 135,1, 135,0, 133,2, 131,8, 130,3, 130,1, 128,9, 128,1, 127,2, 118,5, 117,9, 44,9, 17,4. МС (ЕР): m/z 418,1 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>6</sub>O·0,1H<sub>2</sub>O·0,05KCl: C, 59,57; H, 3,86; Cl, 8,79; N, 23,16. Знайдено: C, 59,65; H, 3,80; Cl, 8,70; N, 22,80.

#### Сполука D-033

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-5-хлор-3-(2-метокси-феніл)-3Н-хіназолін-4-он

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 2l (250мг, 0,746ммоль), аденін (111мг, 0,821ммоль), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (113мг, 0,821ммоль) та ДМФ (4мл). Сирий продукт хроматографували у суміші MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> та перекристалізовували з EtOH для отримання 124мг коричневого твердого продукту (38%), темп.пл. 257,0-257,1°C. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,06 (s, 1H); 8,01 (s, 1H); 7,71 (t, J=8,0Гц, 1H); 7,57 (dd, J=0,9, 7,9Гц, 1H); 7,52-7,59 (m, 1H); 7,50 (dd, J=1,6, 7,8Гц, 1H); 7,38 (dd, J=11, 8,2Гц, 1H); 7,27 (dd, J=0,6, 8,3Гц, 1H); 7,24 (br s, 2H); 7,17 (dt, J=0,9, 7,6Гц, 1H); 5,07 (d, J=17Гц, 1H); 4,97 (d, J=17Гц, 1H); 3,79 (s, 3H). <sup>13</sup>C ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>)млн.<sup>-1</sup>: 158,8, 156,2, 154,7, 153,2, 152,8, 150,1, 149,3, 142,0, 135,1, 133,2, 131,8, 130,1, 130,1, 127,2, 123,8, 121,6, 118,4, 117,9, 113,1, 56,2, 44,8. МС (ЕР): m/z 434,0 (M<sup>+</sup>). Аналіз, розраховано: для C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>·0,5H<sub>2</sub>O·0,04KCl: C, 56,57; H, 3,84; Cl, 8,27; N, 21,99. Знайдено: C, 56,29; H, 3,75; Cl, 8,21; N, 21,61.

Наступні сполуки виготовляли загальною згідно з вищеописаними способами, і вони призначені для наступної ілюстрації певних втілень сполук згідно з винаходом:

3-(2,6-дихлорфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он(d-034)

3-(2-ізопропілфеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-035)

3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он(d-036)

3-бензил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он(d-037)

3-бутил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он(d-038)

3-морфолін-4-іл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат (d-039)

3-(3-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-040)

3-(3-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-041)

2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-піридин-4-іл-3Н-хіназолін-4-он (d-042)

3-бензил-5-флуор-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-043)

3 (4-метилпіперазин-1-іл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, ацетат (d-044)

етиловий естер [5-флуор-4-оксо-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-4Н-хіназолін-3-іл] оцтової кислоти (d-045)

3-(2-метоксифеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-046)

3-(2-метоксифеніл)-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он(d-047)

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-флуорфеніл)-5-метил-3Н-хіназолін-4-он (d-048)

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бензил-5-флуор-3Н-хіназолін-4-он (d-049)

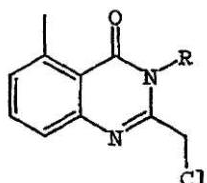
2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-бутил-3Н-хіназолін-4-он(d-050)

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-морфолін-4-іл-3Н-хіназолін-4-он, ацетат (d-051)

3-(4-хлорфеніл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-052).

Додаткові сполуки згідно з представленим винаходом отримали наступними способами синтезу.

Наступні інтермедіати отримали вищеописаним способом А.



3a R = циклопропіл

3b R = циклопропілметил

3c R = фенетил

3d R = циклопентил

3e R = 3-(2-хлор)піридил

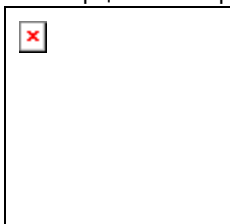
3f R = 4-(2-метил)бензойна кислота

3g R = 4-нітробензил

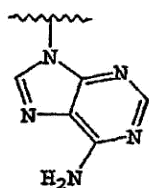
3h R = циклогексил

3i R = E-(2-феніл)циклопропіл

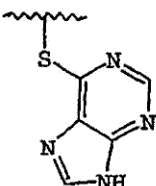
Додаткові сполуки згідно з представленим винаходом (d-053-D-070), що мають Серцевинна структура:



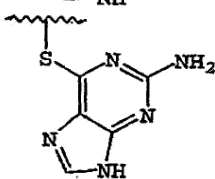
Сполука№	R	R'
D-053	циклопропіл	с
D-054	циклопропілметил	в
D-055	циклопропілметил	А
D-056	іщклопропілмегил.	с
D-057	фенетил	в
D-058	фенетил	с
D-059	циклопентил	в
D-060	циклопентил	А
D-061	3-(2-хлор)піридил	в
D-062	3-(2-хлор)піридил	А
D-063	4-(2-метил) бешойна кисшіа	В
D-064	циклопропіл	В
D-065	циклопропіл	А
D-066	4ннпробензил	В
D-067	циклогексил	В
D-068	циклогексил	А
D-069	циклогексил	С
D-070	Е-(2-феніл) циклопропіл	В



A



B



C

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3a (100мг, 0,4ммоль), 2-аміно-6-меркаптопурин (80мг, 0,48ммоль) та  $K_2CO_3$  (77мг, 0,56ммоль). Продукт очищали розтиранням у воді.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 7,89 (d,  $J=0,9$ Гц, 1H); 7,54 (t,  $J=7,4$ Гц, 1H); 7,34 (d,  $J=8,1$ Гц, 1H); 7,19 (d,  $J=7,2$ Гц, 1H); 6,28 (s, 2H); 4,94 (s, 2H); 2,70 (s, 3H); 1,24 (d,  $J=6,5$ Гц, 2H); 0,91 (s, 2H). МС (ЕР):  $m/z$  380 (M+H), 190.

3-циклопропілметил-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-054)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3b (300мг, 1,14ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (214мг, 1,26ммоль) та  $K_2CO_3$  (189мг, 1,37ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою, а потім перекристалізацією з MeOH.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,60 (br s, 1H); 8,72 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,63 (t,  $J=7,8$ Гц, 1H); 7,42 (d,  $J=8,0$ Гц, 1H); 7,28 (d,  $J=7,3$ Гц, 1H); 5,01 (s, 2H); 4,11 (d,  $J=6,8$ Гц, 2H); 2,78 (s, 3H); 1,35 (квінтет,  $J=6,2$ Гц, 1H); 0,44-0,59 (m, 4H). МС (ЕР):  $m/z$  379 (M+H), 325.

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-циклопропілметил-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-055)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3b (300мг, 1,14ммоль), аденін (170мг, 1,26ммоль) та  $K_2CO_3$  (189мг, 1,37ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою, з наступною перекристалізацією від MeOH.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 8,21 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); 7,52 (t,  $J=7,7$ Гц, 1H); 7,18-7,31 (m, 3H); 7,06 (d,  $J=8,1$ Гц, 1H); 5,6,8 (s, 2H); 4,14 (d,  $J=6,8$ Гц, 2H); 2,77 (s, 3H); 1,34 (квінтет,  $J=6,4$ Гц, 1H); 0,45-0,60 (m, 4H). МС (ЕР):  $m/z$  362 (M+H), 308.

2-(2-аміно-9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-циклопропілметил-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-056)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3b (280мг, 1,1ммоль), 2-аміно-6-меркаптопурин (200мг, 1,2ммоль) та  $K_2CO_3$  (180мг, 1,3ммоль). Продукт очищали розтиранням з MeOH.  $^1H$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 12,70 (br

s, 1H); 7,95 (s, 1H); 7,64 (t, J=7,8Гц, 1H); 7,44 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,28 (d, J=7,4Гц, 1H); 6,41 (s, 2H); 4,91 (s, 2H); 4,05 (d, J=6,8Гц, 2H); 2,78 (s, 3H); 1,26-1,43 (m, 1H); 0,36-0,56 (m, 4H). МС (ЕР): m/z 394 (M+H), 340.

5-метил-3-фенетил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-057)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3с (750мг, 2,4ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (442мг, 2,6ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (398мг, 2,9ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,61 (s, 1H); 8,71 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,65 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,44 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,16-7,35 (m, 6H); 4,89 (s, 2H); 4,29 (br t, J=7,9Гц, 2H); 3,08 (br t, J=7,8Гц, 2H); 2,81 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 429 (M+H), 105.

2-(2-аміно-9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-5-метил-3-фенетил-3H-хіназолін-4-он (d-058)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3с (750мг, 2,4ммоль), 2-аміно-6-меркаптопурин (435мг, 2,6ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (398мг, 2,9ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 12,61 (s, 1H); 7,95 (s, 1H); 7,65 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,45 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,14-7,32 (m, 6H); 6,44 (s, 2H); 4,81 (s, 2H); 4,24 (br t, J=7,9Гц, 2H); 3,04 (br t, J=7,8Гц, 2H); 2,81 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 444 (M+H), 340.

3-циклопентил-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он(d-059)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3d (100мг, 0,36ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (73мг, 0,43ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100мг, 0,72ммоль). Продукт очищали перекристалізацією з MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,62 (br s, 1H); 8,77 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,62 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,42 (d, J=7,8Гц, 2H); 7,26 (d, J=7,4Гц, 1H); 5,03 (s, 2H); 4,80 (квінтет, J=8,0Гц, 1H); 2,76 (s, 3H); 2,12-2,31 (m, 2H); 1,79-2,04 (m, 4H); 1,44-1,58 (m, 2H). МС (ЕР): m/z 393 (M+H), 325.

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-циклопентил-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-060)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3d (100мг, 0,36ммоль), аденін (58мг, 0,43ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100мг, 0,72ммоль). Продукт очищали перекристалізацією з MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,15 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 7,52 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,16-7,31 (m, 3H); 7,10 (d, J=8,0Гц, 2H); 5,68 (s, 2H); 4,78 (квінтет, J=8,3Гц, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09-2,32 (m, 2H); 1,86-2,04 (m, 2H); 1,68-1,86 (m, 2H); 1,43-1,67 (m, 2H). МС (ЕР): m/z 376 (M+H), 308,154.

3-(2-хлор-піридин-3-іл)-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он. (d-061)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3е (500мг, 1,6ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (289мг, 1,7ммоль) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (262мг, 1,9ммоль). Продукт очищали розтиранням у воді. МС (ЕР): m/z 436 (M+H), 200.

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-(2-хлор-піридин-3-іл)-5-метил-3H-хіназолін-4-он(d-062)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3е (500мг, 1,6ммоль), аденін (230мг, 1,7ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (262мг, 1,9ммоль). Продукт очищали розтиранням у воді. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,59 (dd, J=1,7,4,8Гц, 1H); 8,22(dd, J=1,7,7,8Гц, 1H); 8,025 (s, 1H); 8,017 (s, 1H); 7,60-7,72 (m, 2H); 7,35 (t, J=8,2Гц, 2H); 7,22 (s, 2H); 5,12 (d, J=17,0Гц, 1H); 5,02 (d, J=17,0Гц, 1H); 2,72 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 419 (M+H).

3-метил-4-[5-метил-4-оксо-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-4H-хіназолін-3-іл]-бензойна кислота (d-063)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3f (400мг, 1,17ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (219мг, 1,29ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (226мг, 1,64ммоль). Продукт очищали перекристалізацією з MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,54 (br s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 7,80 (s, 2H); 7,71 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,59 (d, J=8,6Гц, 1H); 7,52 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,34 (d, J=7,4 Hz, 1H); 4,46 (d, J=15,4Гц, 1H); 4,34 (d, J=15,7Гц, 1H); 3,17 (d, J=4,4Гц, 1H); 2,73 (s, 3H); 2,17 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 459 (M+H)

3-циклопропіл-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-064)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3a (100мг, 0,40ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (90мг, 0,53ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (97мг, 0,7ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,69 (d, J=0,8Гц, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,57 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,37 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,23 (d, J=7,3Гц, 1H); 5,08 (s, 2H); 3,06-3,18 (m, 1H); 2,74 (s, 3H); 1,14-1,36 (m, 2H); 0,92-1,06 (m, 2H).

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-циклопропіл-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-065)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3a (100мг, 0,40ммоль), аденін (94мг, 0,7ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (121мг, 0,88ммоль). Продукт очищали розтиранням з водою. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,19 (d, J=0,9Гц, 1H); 8,09 (d, J=1,0Гц, 1H); 7,48 (t, J=7,8Гц, 1H); 7,13-7,29 (m, 3H); 7,04. (d, J=8,1Гц, 1H); 5,74 (s, 2H); 3,00-3,13 (m, 1H); 2,73 (s, 3H); 1,18-1,38 (m, 2H); 0,94-1,09 (m, 2H).

5-метил-3-(4-нітробензил)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-066)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3g (200мг, 0,58ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (148мг, 0,87ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (160мг, 1,16ммоль). Продукт очищали розтиранням у MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,44 (br s, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,03 (d, J=8,6Гц, 2H); 7,58 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,37 (d, J=8,3Гц, 3H); 7,22 (d, J=7,5Гц, 1H); 5,44 (s, 2H); 4,70 (s, 2H); 2,66 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 460 (M+H).

3-циклогексил-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-067)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3h (150мг, 0,52ммоль), моногідрат 6-меркаптопурину (97мг, 0,57ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (86мг, 0,62ммоль). Продукт очищали розтиранням у MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 13,66 (br s, 1H); 8,82 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 7,62 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,42 (d, J=8,0Гц, 1H); 7,26 (d, J=7,3Гц, 1H); 5,01 (s, 2H); 4,11 (br s, 1H); 2,75 (s, 3H); 2,38-2,65 (m, 2H); 1,58-1,90 (m, 4H); 1,37-1,57 (m, 1H); 0,71-1,26 (m, 3H). МС (ЕР): m/z 407 (M+H), 325.

2-(6-амінопурин-9-ілметил)-3-циклогексил-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-068)

Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3h (150мг, 0,52ммоль), аденін (77мг, 0,57ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (86мг, 0,62ммоль). Продукт очищали розтиранням у MeOH. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,15 (s, 2H); 7,54 (t, J=7,9Гц, 1H); 7,06-7,35 (m, 4H); 5,65 (s, 2H); 4,09 (br s, 1H); 2,73 (s, 3H); 1,41-1,90 (m, 6H); 0,99-1,34 (m, 4H). МС (ЕР): m/z 390 (M+H) 308.

2-(2-аміно-9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-циклогексил-5-метил-3H-хіназолін-4-он (d-069)

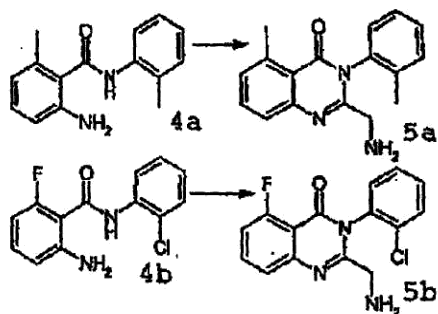
Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3h (150мг, 0,52ммоль), 2-аміно-6-меркаптопурин (95мг, 0,57ммоль) та K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (86мг, 0,62ммоль). Продукт очищали обернено-фазовою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220 ). МС (ЕР): m/z 422 (M+H), 340, 170.

5-метил-3-(Е-2-феніл-циклопропіл)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-070)

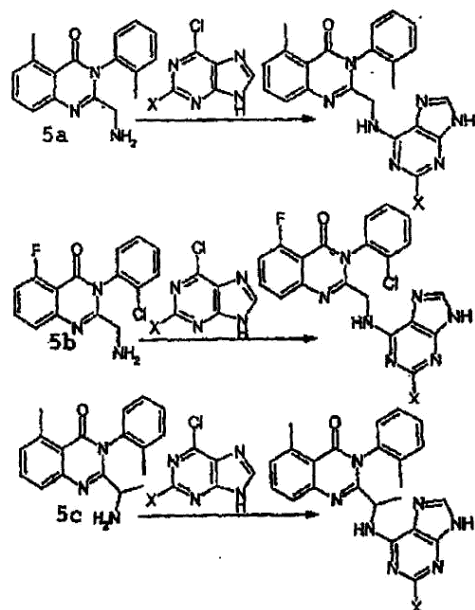
Отримано згідно зі способом С, використовуючи 3і та моногідрат 6-меркаптопурина. Продукт очищали обернено-фазовою ВЕРХ, (колонка С18 Lupa, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220). МС (ЕР): m/z 441.

Додаткові сполуки згідно з винаходом наведено нижче разом з шляхом синтезу для сполуки D-071-D-118.

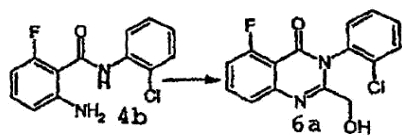
Спосіб D



Спосіб E



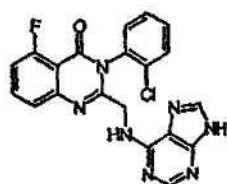
Спосіб F



Спосіб D: Суміш аміду 4а або 4b, FMOC-гліцилхлориду та льодяної оцтової кислоти гріли до 120°C протягом 1-4 годин. Утворену суміш концентрували у вакуумі та очищали флеш-хроматографією для отримання захищеного циклізованого аміну. Цей матеріал об'єднували з 10 еквівалентами октантіолу та каталітичною кількістю DBU у ТГФ та перемішували при зовнішній температурі до витрати вихідного матеріалу, що визначали за допомогою РХ-МС. Реакційну суміш виливали безпосередньо у флеш-хроматографічну колонку (урівноважену у CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) та елювали 0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання вільного аміну, 5а або 5b. Сполуку 5с отримали аналогічно, використовуючи (±) FMOC-аланілхлорид замість FMOC-гліцилхлориду.

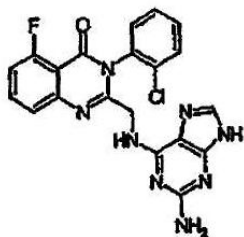
Спосіб E: Еквімолярні кількості 5а або 5b, прийнятний 6-хлорпурин та DIEA поєднували з EtOH у невеликій колбі та гріли до 80°C. Реакційну суміш відстежували регулярно за допомогою РХ-МС та очищали як вказано.

Спосіб F: Суміш аміду 4b, ацетоксіацетилхлориду та льодяної оцтової кислоти гріли до 120°C та перемішували протягом 2 годин. Охолоджену реакційну суміш фільтрували та тверді продукти промивали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання циклізованого ацетату як білого твердого продукту. Цей матеріал об'єднували з K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> у водному метанолі та перемішували протягом однієї години, далі концентрували у вакуумі. Утворені тверді продукти розтирали з водою для отримання 6а як білого твердого продукту.



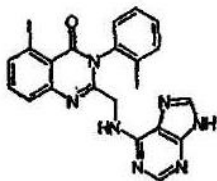
3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-2-[(9H-пурин-6-іламіно)-метил]-3H-хіназолін-4-он (d-072)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5b (50мг, 0,165ммоль) та 6-хлорпурин (26мг, 0,165ммоль) у 1 мл EtOH. Через 5 діб реакційну суміш очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор, при 220А). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 12,99 (br s, 1H); 8,14 (br s, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,85 (dt, J=5,7, 8,1Гц, 1H); 7,68-7,79 (m, 3H); 7,57 (t, J=6,2Гц, 1H); 7,57 (d, J=7,7Гц, 1H); 7,50 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,35 (dd, J=8,4,10,7Гц, 1H); 4,15-4,55 (m, 2H). МС (ЕР): m/z 422 (M+H), 211.



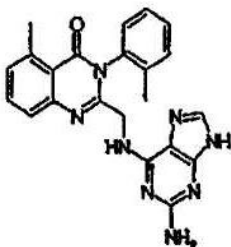
2-[(2-аміно-9H-пурин-6-іламіно)метил]-3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-3H-хіназолін-4-он (d-074)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5b (50мг, 0,165ммоль) та 2-аміно-6-хлорпурин (28мг, 0,165ммоль) у 1мл EtOH. Через 5 діб реакційну суміш очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор, при 220А). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 12,13 (br s, 1H); 7,86 (dt, J=5,6, 8,2Гц, 1H); 7,76-7,83 (m, 2H); 7,68 (br s, 1H); 7,61 (t, J=5,7Гц, 1H); 7,61 (d, J=7,2Гц, 1H); 7,53 (d, J=8,2Гц, 1H); 7,35 (dd, J=8,2, 10,9Гц, 1H); 5,66 (br s, 2H); 4,164,50 (m, 1H); 4,09 (q, J=5,3Гц, 2H). МС (ЕР): m/z 437 (M+H), 219.



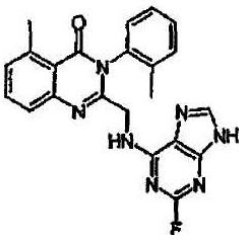
5-метил-2-[(9F-пурин-6-іламіно)метил]-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-071)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 6-хлорпурин (11мг, 0,072ммоль) та 5a (20мг, 0,072ммоль). Через 5 діб реакцію гасили водою та утворену суспензію фільтрували. Тверді продукти очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220А). <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 12,98 (br s, 1H); 8,14 (br s, 1H); 8,10 (s, 1H); 7,58-7,79 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 4H); 7,26-7,36 (m, 2H); 3,93-4,39 (m, 2H); 2,75 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 398 (M+H), 199.



2-[(2-аміно-9H-пурин-6-іламіно)метил]-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-073)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5a (189мг, 0,677ммоль) та, 2-аміно-6-хлорпурин (115мг, 0,677) у 3мл EtOH. Через 3 доби реакційну суміш фільтрували для видалення надлишку пурину та фільтрат очищали за допомогою ВЕРХ (C18 Luna колонка, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220А) для отримання 7мг продукту як солі TFA. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,88 (br s, 1H); 8,21 (s, 1H); 7,71 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,45-7,56 (m, 2H); 7,38-7,44 (m, 3H); 7,35 (d, J=7,5Гц, 1H); 7,30 (br s, 1H); 4,40 (dd, J=4,5,17,5Гц, 1H); 4,27 (dd, J=5,3, 17,4Гц, 1H); 2,75 (s, 3H); 2,09 (s, 3H). МС (ЕР): m/z 413 (M+H), 207, 163.

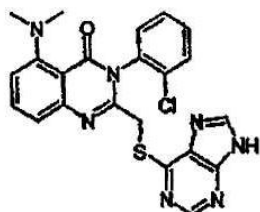


2-[(2-флуор-9H-пурин-6-іламіно)метил]-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-076)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5a (20мг, 0,072ммоль) та 2-флуор-6-хлорпурин (16мг, 0,094ммоль) у 1мл EtOH. Через 18 годин реакційну суміш очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвил., 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ) та далі перекристалізовували з EtOH для отримання 14мг продукту як жовтої твердої

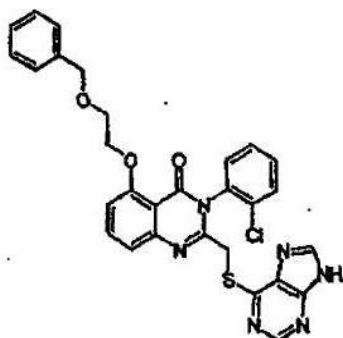


речовини.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,12 (br s, 1H); 8,40 (br s, 1H); 8,15 (s, 1H); 7,66 (t,  $J=7,7\text{Гц}$ , 1H); 7,35-7,49 (m, 4H); 7,31 (d,  $J=7,2\text{Гц}$ , 1H); 4,00-4,22 (m, 2H); 3,17 (s, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). МС (ЕР):  $m/z$  416 (M+H), 208.



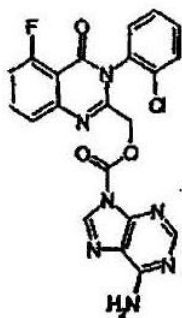
(2-хлорфеніл)-диметиламіно-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он(d-075)

D-015 (100мг, 0,228ммоль) об'єднували з гідроксидом амонію (28-30%, 1мл) у ДМФ (2мл) та гріли до 80°C. Через 2 доби реакційну суміш очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ,) для отримання продукту як жовтої твердої речовини, приблизно 2мг.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 13,52 (br s, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 7,69 (dd,  $J=2,1,7,3\text{Гц}$ , 1H); 7,62 (dd,  $J=1,6,7,6\text{Гц}$ , 1H); 7,61 (t,  $J=8,0\text{Гц}$ , 1H); 7,37-7,48 (m, 2H); 7,05 (d,  $J=7,9\text{Гц}$ , 1H); 6,96 (d,  $J=7,8\text{Гц}$ , 1H); 4,32-4,45 (m, 2H); 2,80 (s, 6H). МС (ЕР):  $m/z$  464 (M+H), 232.



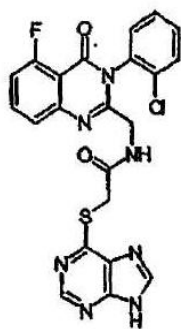
5-(2-бензилоксіетокси)-3-(2-хлорфеніл)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-078)

До розчину 2-бензилоксіетанолу (0,3мл) у ДМФ (1,0мл) додавали NaH (50мг, 2,08ммоль). Після перемішування протягом 5 хвилин, 0,5мл додавали до розчину IC-87185 (50мг, 0,114ммоль) у безводному ДМФ (0,75мл). Реакційну суміш гріли до 50°C та перемішували протягом 3 діб. Очистка за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ,) дала продукт як гетерогенну тверду речовину, 150мкг. МС (ЕР):  $m/z$  571 (M+H), 481.



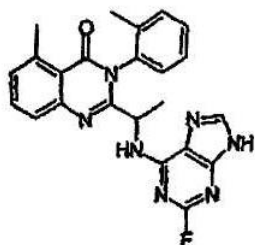
3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-4-оксо-3,4-дигідро-хіназолін-2-ілметилловий естер 6-амінопурин-9-карбонової кислоти (d-079)

До розчину 3b (20мг, 0,066ммоль) у  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (500мкл) при 0°C додавали фосген (2M/толуол, 36мкл, 0,072ммоль), а потім аденін (10мг, 0,072ммоль) та DIEA (25мкл, 0,145ммоль). Реакційній суміші давали досягти зовнішньої температури та перемішували протягом 8 діб. Очистка за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ,) дала продукт як суміш.  $^1\text{H}$  ЯМР (ДМСО- $d_6$ )  $\delta$ : 11,04 (br s, 1H); 8,61 (s, 1H); 8,40 (s, 1H); 7,85-7,95 (m, 1H); 7,76 (dd,  $J=5,4,9,6\text{Гц}$ , 1H); 7,70-7,78 (m, 1H); 7,52-7,63 (m, 3H); 7,38 (dt,  $J=8,3, 10,6\text{Гц}$ , 1H); 4,76-4,89 (m, 2H). МС (ЕР):  $m/z$  466 (M+H), 331, 305



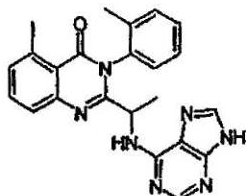
N-[3-(2-хлорфеніл)-5-флуор-4-оксо-3,4-дигідро-хіназолін-2-ілметил]-2-(9Н-пурин-6-ілсульфаніл)-ацетамід (d-077)

(9Н-пурин-6-ілсульфаніл)-оцтову кислоту (63мг, 0,296ммоль), 5b (108мг, 0,355ммоль), EDC (68мг, 0,355ммоль), НОBT (48мг, 0,355ммоль), DIEA (62мкл, 0,355ммоль) та ДМФ (1мл) поєднували у колбі та перемішували при зовнішній температурі протягом одної години. Реакційну суміш розбавляли EtOAc (20мл) та промивали розбавленим розсолон (2×13мл). Органічну фазу концентрували у вакуумі та хроматографували у суміші 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> для отримання 91мг продукту як в'язкої, персикового кольору піни. <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 12,88 (br s, 1H); 8,72 (s, 1H); 8,62 (t, J=5,0Гц, 1H); 8,49 (s, 1H); 7,88 (dt, J=5,6, 8,2Гц, 1H); 7,73-7,78 (m, 1H); 7,67-7,72 (m, 1H); 7,57-7,65 (m, 2H); 7,38 (d, J=8,1Гц, 1H); 7,36 (dd, J=8,3, 11,1Гц, 1H); 4,11-4,24 (m, 2H); 3,96 (dd, J=5,0, 17,4Гц, 1H); 3,78 (dd, J=5,2, 17,4Гц, 1H). МС (ЕР): m/z 496 (M+H), 248.



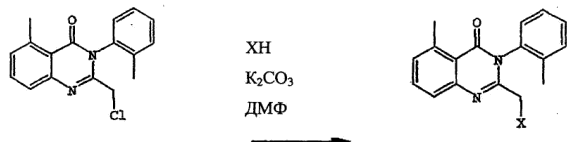
2-[1-(2-флуор-9Н-пурин-6-іламіно)етил]-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-080)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5с (50мг, 0,17ммоль) та 2-флуор-6-хлорпурин (35мг, 0,204ммоль) у 1,2мл EtOH. Очистка за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ) дала два атропізомери як білі тверді продукти. Дані для одного з них такі: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,48 (br d, J=6,4Гц, 1H); 8,17 (s, 1H); 7,69 (t, J=7,8Гц, 1H); 7,53 (d, J=7,8Гц, 1H); 7,44 (d, J=7,8Гц, 2H); 7,33 (d, J=7,2Гц, 2H); 7,07 (br t, J=7,2Гц, 1H); 4,80 (br t, J=6,8Гц, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 1,38 (d, J=6,7Гц, 3H). МС (ЕР): m/z 430 (M+H), 215.



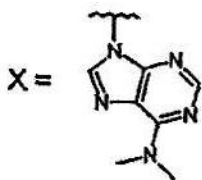
5-метил-2-[1-(9Н-пурин-6-іламіно)етил]-3-о-толіл-Н-хіназолін-4-он (d-081)

Отримано згідно зі способом Е, використовуючи 5с (50мг, 0,17ммоль) та 6-хлорпурин (32мг, 0,204ммоль) у 1,2мл EtOH. Очистка за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ) дала два атропізомери як жовті тверді продукти. Дані для одного з них такі: <sup>1</sup>H ЯМР (ДМСО-d<sub>6</sub>) δ: 8,39 (br s, 1H); 8,34 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 7,71 (t, J=7,7Гц, 1H); 7,56 (d, J=7,9Гц, 1H); 7,49 (d, J=6,9Гц, 1H); 7,28-7,43 (m, 3H); 7,20 (br s, 1H); 5,06 (br s, 1H); 2,73 (s, 3H); 2,04 (s, 3H); 1,51 (d, J=6,6Гц, 3H). МС (ЕР): m/z 412 (M+H) 206.



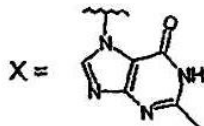
Наступні сполуки згідно з представленим винаходом (d-082-D-109) отримували способом С, використовуючи 2-хлорметил-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (10мг), прийнятний нуклеофіл ХН (20мг, надлишок) та карбонат калію (10мг) у ДМФ (0,25мл). Реакційну суміш перемішували 16 годин при кімнатній температурі, гасили водою та сирий твердий продукт збирали фільтруванням та сушили на повітрі. Сирий матеріал розчиняли у 0,5мл ДМСО та очищали обернено-фазовою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцеві продукти.

2-(6-диметиламінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-082)



Вихід: 8,1 мг.

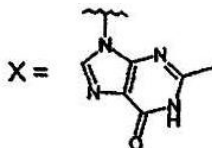
<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 8,13 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,60 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,54-7,38 (m, 4H), 7,30 (d, J=7,4 Гц, 1H), 7,20 (d, J=8,1 Гц, 1H), 5,11 (d, J=17,4 Гц, 1H), 4,76 (d, J=17,4 Гц, 1H), 3,33 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 2,20 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=426 (M+1).



Вихід: 3,3 мг

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 12,06 (s, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,60 (t, J=7,8 Гц, 1H); 7,55-7,38 (m, 4H), 7,30 (d, J=7,4 Гц, 1H); 7,15 (d, J=7,9 Гц, 1H), 5,26 (d, J=17,4 Гц, 1H), 4,94 (d, J=17,4 Гц, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,24 (s, 3H). Алкілювання в позиції N<sub>7</sub> пурину визначено довільно на базі зсуву сигналу метиленових протонів по ходу внаслідок впливу карбонілу, LR MS (ЕР позит.) m/z=413 (M+1).

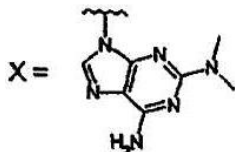
5-метил-2-(2-метил-6-оксо-1,6-дигідро-пурин-9-ілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-084)



Виділено з тої ж реакційної суміші, що D-083. Вихід: 3,6 мг.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 12,17 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,63 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,57-7,39 (m, 4H), 7,32 (d, J=7,4 Гц, 1H), 7,26 (d, J=8,1 Гц, 1H), 5,08 (d, J=17,2 Гц, 1H), 4,70 (d, J=17,2 Гц, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,17 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=413 (M+1).

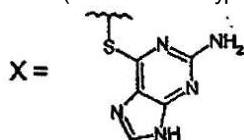
2-(амінодиметиламінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-085)



Вихід: 6,7 мг.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 7,66 (s, 1H), 7,61 (d, J=7,8 Гц, 1H), 7,55-7,40 (m, 4H), 7,32-7,26 (m, 2H), 6,74 (s, 2H), 4,94 (d, J=17,2 Гц, 1H), 4,63 (d, J=17,2 Гц, 1H), 4,63 (d, J=17,2 Гц, 1H), 2,97 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=441 (M+1).

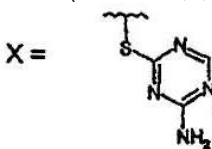
2-(2-аміно-9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-086)



Вихід: 9,5 мг.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 12,54 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,69 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,51 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,51 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,43 (t, J=3,9 Гц, 1H), 7,34-7,26 (m, 4H), 6,16 (s, 2H), 4,32 (квартет АВ, J=14,8 Гц, Δν=23,7), 2,74 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=430 (M+1).

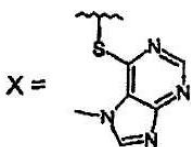
2-(4-аміно-1,3,5-триазол-2-ілсульфанілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-087)



Вихід: 5,8 мг.

<sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 8,10 (s, 1H), 7,70 (t, J=7,8 Гц, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,52 (d, J=8,0 Гц, 1H), 7,48-7,26 (m, 6H), 4,08 (s, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=391 (M+1).

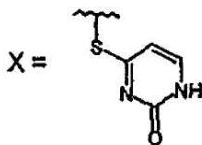
5-метил-2-(7-метил-7Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (4088)



Вихід: 3,1 мг.

$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 8,52 (s, 1H), 8,49 (s, 1H); 7,70 (t,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,50 (d,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,45 (d,  $J=7,1$  Гц, 1H), 7,35-7,20 (m, 4H), 4,41 (квартет АВ,  $J_{\text{AB}}=15,3$  Гц,  $\Delta N=19,2$  Гц), 4,08. (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.)  $m/z=406$  (M+1).

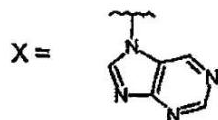
5-метил-2-(2-оксо-1,2-дигідро-піридин-4-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-089)



Вихід: 2,4 мг.

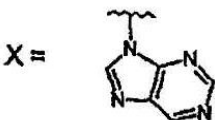
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 11,49 (s, 1H), 7,70 (t,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,60 (brt,  $J=6,0$  Гц, 1H), 7,53-7,48 (m, 2H), 7,46-7,28 (m, 4H), 6,31 (d,  $J=6,7$  Гц, 1H), 4,05 (s, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.)  $m/z=391$  (M+1).

5-метил-2-пурин-7-ілметил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-090)



$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 9,04 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 7,65-7,54 (m, 2H), 7,53-7,39 (m, 3H), 7,31 (d,  $J=7,4$  Гц, 1H), 7,13 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 5,31 (d,  $J=17,6$  Гц, 1H), 5,16 (d,  $J=17,6$  Гц, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). Алкілювання у позиції N7 пурин визначали за посиленням NOE між протоном пурину у позиції 6 та метиленовими протонами на лінкері між пурином та хіназоліновими групами. LR MS (ЕР позит.)  $m/z=383$  (M+1).

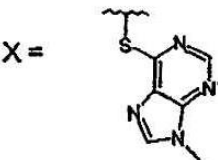
5-метил-2-пурин-9-ілметил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-091)



З тої ж самої реакції, що дала D-090.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 9,17 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,59 (t,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,55-7,42 (m, 4H), 7,30 (d,  $J=7,4$  Гц, 1H), 7,13 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 5,26 (d,  $J=17,5$  Гц, 1H), 4,92 (d,  $J=17,5$  Гц, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,19 (s, 3H). Алкілювання в позиції N9 пурину підтверджено втратою посилення NOE між протонами пурину у позиції 6 та лінкерними метиленовими протонами.

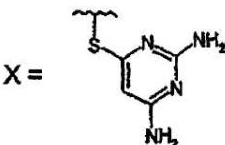
LR MS (ЕР позит.)  $m/z=383$  (M+1).

5-метил-2-(9-метил-9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-092)



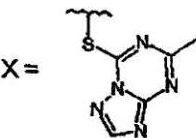
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 8,52 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,69 (t,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,50 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,44 (d,  $J=7,6$  Гц, 1H), 7,36-7,27 (m, 4H), 4,38 (квартет АВ,  $J_{\text{AB}}=15,5$  Гц,  $\Delta N=21,0$  Гц), 3,80 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.)  $m/z=429$  (M+1).

2-(2,6-діамінопіримідин-4-ілсульфанілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-093)



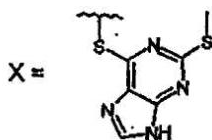
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 7,70 (t,  $J=7,7$  Гц, 1H), 7,54 (d,  $J=8,0$  Гц, 1H), 7,45-7,27 (m, 5H), 6,22 (br s, 1H), 5,80 (br s, 1H), 3,99 (АВ квартет,  $J_{\text{AB}}=14,6$  Гц,  $\Delta N=26,9$  Гц, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,08 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.)  $m/z=405$  (M+1).

5-метил-2-(5-метил-[1,2,4]триазоло[1,5-a]піримідин-7-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-094)



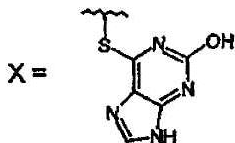
$^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 8,57 (s, 1H), 7,73 (t,  $J=7,8$  Гц, 1H), 7,55-7,35 (m, 4H), 7,18 (s, 1H), 4,27 (s, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,55 (s, 3H), 2,08 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.)  $m/z=429$ . (M+1).

5-метил-2-(2-метилсульфаніл-9Н-пурин-6-ілсульфаніл-метил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-095)



<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 13,30 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,72 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,54 (d, J=7,8Гц, 1H), 7,47 9d, J=6,3Гц, 1H), 7,38-7,26 (m, 4H), 4,34 (квартет АВ, J<sub>AB</sub>=16,1Гц, ΔN=23,6Гц, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,10 (s, 3H). LR MC (ЕР позит.) m/z=461 (M+1).

2-(2-гідрокси-9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-096)



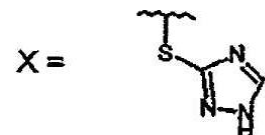
<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 8,08 (s, 1H), 7,69 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,50 (brd, J=t,8Гц, 2H), 7,33-7,50 (m, 4H), 4,28 (квартет АВ, J<sub>AB</sub>=15,5Гц, Δv=21,3Гц, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). LR MC (ЕР позит.) m/z=431 (M+1).

5-метил-2-(1-метил-1H-імідазол-2-ілсульфаніл-метил)-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-097)



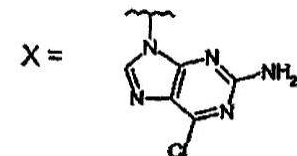
<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 7,691, J=7,8Гц, 1H), 7,46-7,37 (m, 5H), 7,32 (d, J=7,3Гц, 1H), 7,20 (d, J=1,0Гц, 1H), 6,48 (d, J=1,0Гц), 3,83 (квартет АВ, J<sub>AB</sub>=15,0Гц, Δv=18,8Гц, 1H), 3,55 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). LR MC (ЕР позит.) m/z=364 (M+1).

5-метил-3-о-толіл-2-(1H-[1,2,4] триазол-3-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он(d-098)



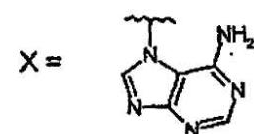
<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 13,98 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,70 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,49 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,44-7,31 (m, 5H), 4,04 (квартет АВ, J=15,5Гц, Δv=19,1Гц, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,10 (s, 3H). LR MC (ЕР позит.) m/z=364 (M+1).

2-(2-аміно-6-хлорпурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он(d-099)



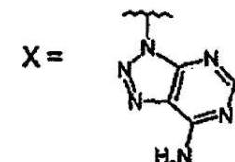
LR MC (ЕР позит.) m/z=432 (M+1).

2-(6-амінопурин-7-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-100)



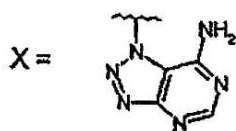
<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 8,19 (s, 3H), 7,66 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,59-7,43 (m, 5H), 7,34 (d, J=7,4Гц,-1H), 7,23 (d, J=8,0Гц, 1H), 6,90 (s, 2H), 5,21 (квартет АВ, J<sub>AB</sub>=17,4Гц, Δv=22,1Гц, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,93 (s, 3H). Алкілювання в позиції N<sub>7</sub> пурину підтверджено посиленням NOE між наступними протонами: 1) протонами екзоциклічного аміну та метиленовими протонами; 2) протонами екзоциклічного аміну та толілметиловими протонами. LR MC (ЕР позит.) m/z=398 (M+1).

2-(7-аміно-1,2,3-триазоло[4/5-d]піримідин-3-іл-метил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-101)



<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 8,43 (br s, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,10 (brs, 1H), 7,62 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,49-7,28 (m, 5H), 7,22 (d, J=8,1Гц, 1H), 5,49 (d, J=17,0Гц, 1H), 5,19 (d, J=17,0Гц, 1H), 2,73 (s, 1H), 2,11 (s, 3H). Алкілювання в позиції N<sub>7</sub> пурину визначено за подібністю до спектру ЯМР D-030, LR MC (ЕР позит.) m/z=399 (M+1).

2-(7-аміно-1,2,3-триазоло[4,5-d]піримідин-1-іл-метил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-102)



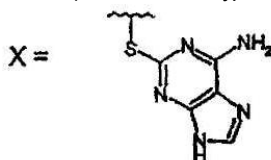
З тої ж реакційної суміші, що D-101.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 8,2,7 (s, 1H), 8,20 (br s, 1H), 8,05 (br s, 1H), 7,70 (t,  $J=7,8$ Гц, 1H), 7,47-7,26 (m, 6H), 5,61 (квartet AB,  $J=16,0$ Гц,  $\Delta\nu=20,7$ Гц, 2H), 2,75 (s, 3H), 1:98 (s, 3H)).

Алкілювання в позиції  $N_7$  пурину визначено за подібністю до спектру ЯМР D-100.

LR MC (EP позит.)  $m/z=399$  ( $M+1$ ).

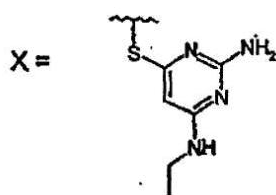
2-(6-аміно-9H-пурин-2-ілсульфанілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-103)



$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 12,62 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,69 (t,  $J=7,7$ Гц, 1H), 7,51 (d,  $J=8,1$ Гц, 1H), 7,42 (dd,  $J=7,6,1,7$ Гц, 1H), 7,35-7,15 (m, 6H), 4,12 (квartet AB,  $J_{AB}=14,5$ Гц,  $\Delta\nu=18,2$ Гц, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,10 (s, 3H).

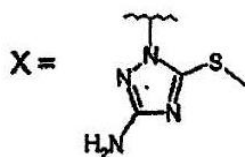
LR MC (EP позит.)  $m/z=430$  ( $M+1$ ).

2-(2-аміно-6-етиламіно-піримідин-4-ілсульфаніл-метил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-104)



$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 7,70 (t,  $J=7,8$ Гц, 1H), 7,53 (d,  $J=8,0$ Гц, 1H), 7,44-7,31 (m, 5H), 6,69 (br s, 1H), 5,83 (brs, 2H), 5,61 (s, 1H), 4,03 (d,  $J=14,6$ Гц, 1H), 3,95 (d,  $J=14,6$ Гц, 1H), 3,22-3,11 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 1,06 (t,  $J=7,1$ Гц, 3H). LR MC (EP позит.)  $m/z=433$  ( $M+1$ ).

2-(3-аміно-5-метилсульфаніл-1,2,4-триазол-1-іл-метил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-105)

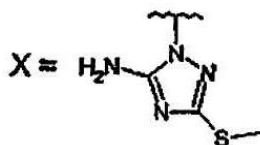


Вихід: 5,0мг.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_4$ -MeOH)  $\delta$ : 7,67 (t,  $J=7,8$ Гц, 1H), 7,55-7,37 (m, 4H), 7,35-7,27 (m, 2H), 4,77 (d,  $J=17,1$ Гц, 1H), 4,60 (d,  $J=17,1$ Гц, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

LR MC (EP позит.)  $m/z=393$  ( $M+1$ ).

2-(5-аміно-3-метилсульфаніл-1,2,4-триазол-1-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-106)

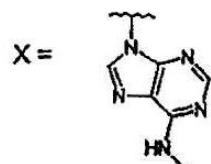


Вихід: 0,6мг.

Виділено з тої ж реакційної суміші, що D-105.

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_4$ -MeOH)  $\delta$ : 7,67 (t,  $J=7,8$ Гц, 1H), 7,50-7,24 (m, 6H), 4,83 (d,  $J=16,5$ Гц, 1H), 4,70 (d,  $J=16,5$ Гц, 1H), 2,79 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,14 (s, 3H) LR MC (EP позит.)  $m/z=393$  ( $M+1$ ).

6-метил-2-(6-метиламінопурин-9-ілметил)-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-107)

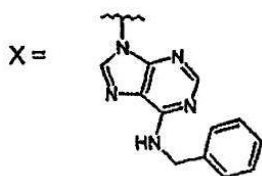


Вихід: 5,0мг

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_4$ -MeOH)  $\delta$ : 8,17 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,54-7,43 (m, 4H), 7,31-7,23 (m, 2H), 5,14 (d,  $J=17,5$ Гц, 1H), 4,90 (d,  $J=17,5$ Гц, 1H), 3,14 (br s, 3H), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).

LR MC (EP позит.)  $m/z=412$  ( $M+1$ ).

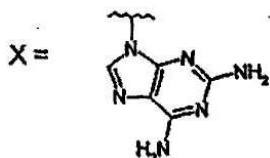
2-(6-бензиламінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3H-хіназолін-4-он (d-108)



Вихід: 6,7 мг.

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-MeOH) δ: 8,13 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,58 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,51-7,21 (m, 11H), 5,15 (d, J=17,5Гц, 1H), 4,91 (d, J=17,5Гц, 1H), 4,83 (s, 2H, пік під H<sub>2</sub>O), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H) LR MC (EP позит.) m/z=488 (M+1).

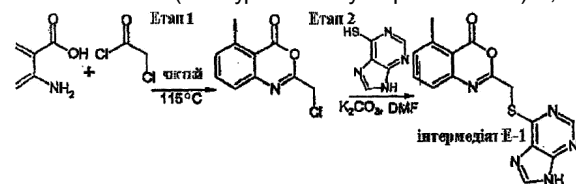
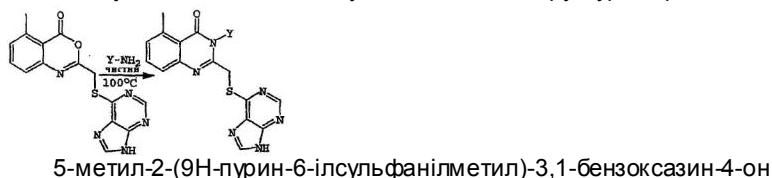
2-(2,6-діамінопурин-9-ілметил)-5-метил-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-109)



Подвійні кількості усіх реагентів. Вихід: 14мг

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-DMCO) δ: 8,53 (br s, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,64 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,33 (d, J=7,4Гц, 1H), 7,27 (d, J=7,9Гц, 1H), 4,96 (d, J=17,5Гц, 1H), 4,64 (d, J=17,5Гц, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,17 (s, 3H). LRMC (EP позит.) m/z=413 (M+1).

Сполуки D-110-D-115 наступної загальної структури отримано з наступних інтермедіатів E-1-E-3.



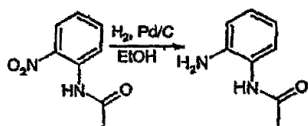
Етап 1. Суспензію 6-метилантранілової кислоти (2г, 13,2ммоль) у хлорацетилхлориді (12мл, великий надлишок) перемішували при 115°C у герметичній колбі протягом 30 хвилин. Утворений розчин охолоджували до кімнатної температури та обробляли ефіром (приблизно 5мл). Після охолодження при 4°C протягом ночі, утворений кремний осад збирали фільтруванням, промивали ефіром та сушили у вакуумі, одержавши хлор-інтермедіат (1,39г, 50%).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,67 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,46 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,35 (d, J=7,6Гц, 1H), 4,39 (e, 2H), 2,81 (s, 3H). LR MC (EP позит.) m/z=210, (M+1).

Етап 2. Суміш хлор-інтермедіату (50мг, 0,25ммоль), моногідрату 6-меркаптопурина (43мг, 0,25ммоль) та карбонату калію (25мг, 0,25ммоль) у сухому ДМФ (0,5мл) перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Суміш виливали у етилацетат (20мл) та увесь нерозчинний матеріал відфільтровували та відкидали. Фільтрат концентрували у вакуумі для видалення усього етилацетату та залишок обробляли ефіром, для отримання світло-оранжевого осаду. Осад збирали фільтруванням, промивали ефіром та сушили у вакуумі для отримання інтермедіату E-1 (41мг, 51%)

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-DMCO) δ: 8,64 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 7,73 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,44-7,37 (m, 2H), 4,69 (s, 2H), 2,69 (s, 3H). LR MC (EP позит.) m/z=326 (M+1).

Інтермедіат E-2

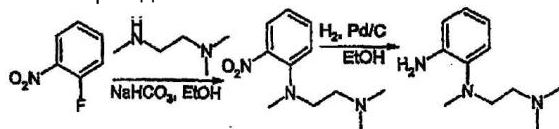


Інтермедіат E-2

Розчин 2-нітроацетанілізу (1,0г, 5,6ммоль) у EtOH продували азотом, обробляли Pd(OH)<sub>2</sub> (20% за масою на C, 200мг, каталізатор) та струшували протягом 2 годин у атмосфері водню (20фунт/кв.дюйм). Каталізатор видаляли фільтруванням через мембрану з ацетагу целюлози товщиною 0,22мкм (Corning) та фільтрат концентрували у вакуумі для отримання білого кристалічного твердого продукту (800мг, 96%).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-DMCO) δ: 9,12 (s, 1H), 7,14 (dd, J=7,8,1,3Гц, 1H), 6,88 (dt, J=7,6,1,5Гц, 1H), 6,70 (dd, J=8,0,1,3Гц, 1H), 6,52 (dt, J=7,5,1,4Гц, 1H), 4,85 (br s, 2H); 2,03 (s, 3H). LR MC (EP позит.) m/z=151 (M+1).

Інтермедіат E-3



### Інтермедіат Е-3

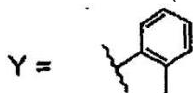
Суміш 2-флуор-нітробензолу (1,41г, 10ммоль) та  $\text{NaHCO}_3$  у EtOH (20мл) обробляли (N,N,N'-триметил)-1,2-діаміноетаном (1,1г, 11ммоль) та перемішували протягом 16 годин при 80°C. Розчинник видаляли у вакуумі, залишок обробляли 0,1М розчином NaOH (120мл) та суміш екстрагували етилацетатом (2×50мл). Органічні шари поєднували та промивали 20мл води (1×) та розсолем (2×), сушили сульфатом натрію та концентрували у вакуумі до оранжевої рідини (2,2г, 100%; EP MC:  $m/z=224$ , (M+1).

Цей інтермедіат розчиняли у EtOH, розчин продували азотом, обробляли  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  (20% за масою на C., 180мг, каталізатор) та струшували протягом 2 годин у атмосфері водню (50фунт/кв.дюйм). Каталізатор видаляли фільтруванням через мембрану з ацетату целюлози товщиною 0,22мм (Corning) та фільтрат концентрували у вакуумі для отримання червоного рідкого продукту Е-3 (1,8г, 95%).

$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,64 (s, 1H), 7,03 (dd, J=8,3, 1,4Гц, 1H), 6,91 (ddd, J=7,6, 7,2, 1,4Гц, 1H), 6,73-6,67 (m, 2H), 4,20 (br s, 2H), 2,95 (t, J=6,7Гц, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,41 (t, J=6,7Гц, 1H), 2,26 (s, 6H). LR MC (EP позит.)  $m/z=194$ . (M+1),

Сполуки D-110-D-115 отримали таким чином:

5-мегил-2-(9Н-пури-6-ілсульфанілметил)-3-о-толіл-3Н-хіназолін-4-он (d-110)



Суміш інтермедіату Е-1 (40мг) та о-толуїдину (0,3мл, великий надлишок) гріли при 100°C у герметичній колбі протягом 16 годин. Реакційну суміш охолоджували, обробляли 1Н HCl (2мл) та ефіром (2мл) і утворений сірий осад збирали фільтруванням, промивали ефіром та сушили на повітрі (19мг сир). Сирий твердий продукт розчиняли у 0,5мл ДМСО та очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилин, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (4мг)

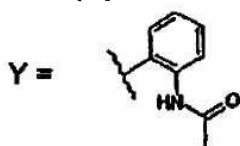
$^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 13,52 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,69 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,50 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 7,37-7,25 (m, 4H), 4,37 (квартет AB,  $J_{AB}$  15,4Гц,  $\Delta\nu=22,4$ Гц, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H). LR MC (EP позит.)  $m/z=415$  (M+1).

3-ізобутил-5-метил-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-111)



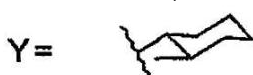
Суміш інтермедіату Е-1 (40мг) та ізобутил-аміну (0,4мл, великий надлишок) гріли при 120°C у герметичній колбі протягом 16 годин. Надлишку ізобутиламіну давали випаритися, залишок розчином у 1мл ДМСО та очищали двома прийомами за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилин, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (4мг).  $^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 13,75 (br s, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,63 (t, J=7,7Гц, 1H), 7,42 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,28 (d, J=7,3Гц, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,00 (d, J=7,5Гц, 2H), 2,77 (s, 3H), 2,30-2,15 (m, 1H), 0,98 (d, J=6,7Гц, 1H). LR MC (EP позит.)  $m/z=381$  (M+1).

N-{2-[5-метил-4-оксо-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-4Н-хіназолін-3-іл]-феніл}-ацетамід (d-112)



Суміш інтермедіату Е-1 (80мг, 0,25ммоль) та інтермедіат Е-2 (75мг, 0,5ммоль, 2екв.) гріли до плавлення у герметичній колбі, використовуючи нагрівальний пристрій. Реакційну суміш розтирали з ефіром та тверді продукти збирали фільтруванням. Сирий матеріал розчиняли у 1мл ДМСО та очищали двома прийомами за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилин, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину.  $^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 13,52 (s, 1H), 9,52 (s, 1H), 8,48 (s, 3H), 8,42 (s, 3H), 8,02 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,69 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,51 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,45-7,37 (m, 2H), 7,31 (d, J=7,3Гц, 1H), 7,19 (t, J=7,5Гц, 1H), 4,38 (s, 2H), 2,74 (s, 3H), 1,93 (s, 3H). LR MC (EP позит.)  $m/z=458$  (M+1)

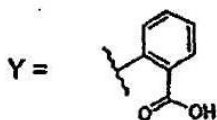
5-метил-3-(Е-2-метил-циклогексил)-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он (d-113)



Суміш інтермедіату Е-1 (80мг, 0,25ммоль) та транс-2-метил-1-аміноциклогексану (0,25мл, великий надлишок) гріли у герметичних умовах при 100°C протягом 16 годин. Реакційну суміш розтирали з ефіром та тверді продукти збирали фільтруванням. Сирий матеріал розчиняли у 0,5мл ДМСО та очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилин, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (1,5мг).  $^1\text{H}$  ЯМР (300МГц,  $d_6$ -ДМСО)  $\delta$ : 13,5 (brs, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,63 (t, J=7,7Гц, 1H), 7,43 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,27 (d, J=7,4Гц, 1H), 5,11 (d, J=14,5Гц, 1H), 3,78-3,69 (m, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,55-2,40 (m, 3H), 1,88-1,46 (m, 4H), 1,31-1,11 (m, 1H), 0,90-0,65 (m, 1H), 0,74 (d, J=6,7Гц, 3H). LR MC (EP позит.)  $m/z=421$  (M+1).

2-[5-метил-4-оксо-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-4Н-хіназолін-3-іл]-бензойна кислота (d-114)

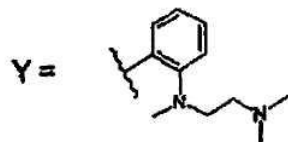




Суміш інтермедіату E-1 (80мг, 0,25ммоль), метилантранілату (0,25мл, великий надлишок) гріли у герметичній колбі при 100°C протягом 16 годин. Реакційну суміш розтирали з ефіром та тверді продукти збирали фільтруванням. Сирий матеріал розчиняли у 0,5мл ДМСО та очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,1мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (8мг).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 13,51 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,11 (dd, J=7,4, 1,1Гц, 1H), 7,88 (dt, J=7,7, 1,4Гц, 1H), 7,70 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,57 (t, J=7,2Гц, 1H), 7,49-7,35 (m, 3H), 4,58 (d, J=15,5Гц, 1H), 4,35 (d, J=15,5Гц, 1H), 2,44 (s, 3H). LR MS (EP позит.) m/z=445 (M+1).

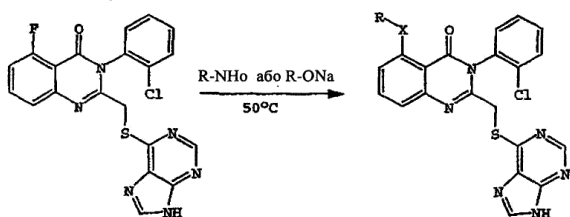
3-{2-[(2-диметиламіноетил)-метил-аміно]-феніл}-5-метил-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-115)



Суміш інтермедіату E-1 (40мг, 0,25ммоль) інтермедіату E-3 (0,2мл, великий надлишок) гріли у герметичній колбі при 100°C протягом 16 годин. Реакційну суміш розтирали з ефіром та тверді продукти збирали фільтруванням. Сирий матеріал розчиняли у 1мл ДМСО та очищали за допомогою ВЕРХ двома прийомами (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, 0,05% TFA в усіх розчинниках, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як трифлуорацетат (11мг).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ДМСО) δ: 13,4 (br s, 1H), 9,27 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,72 (t, J=7,8Гц, 1H), 7,53 (d, J=7,9Гц, 1H), 7,40-7,33 (m, 4H), 7,10-7,04 (m, 1H), 4,42 (s, 3H), 3,5 (m, 2H), 3,23-3,03 (m, 3H), 2,75 (s, 3H), 2,68-2,56 (m, 8H). LR MS (EP позит.) m/z=501 (M+1).

Сполуки D-116-D-118 отримано таким чином:



3-(2-хлорфеніл)-5-метокси-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил) (d-116)

(R=Me, X=O)

Суміш D-015 (25мг) у 0,5М NaOMe (2мл у суміші з MeOH; великий надлишок) перемішували при 50°C протягом 16 годин у герметичній колбі. Реакційну суміш охолоджували до кімнатної температури, обробляли водою (5мл) та утворений осад збирали фільтруванням, промивали водою та сушили на повітрі. Сирий матеріал розчиняли у 0,5мл ДМСО та очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (53мг).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>5</sub>-ДМСО) δ: 13,52 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,44 (br s, 1H), 7,77 (t, J=8,2Гц, 1H), 7,71-7,60 (m, 2H), 7,51-7,34 (m, 2H), 7,23 (d, J=8,2Гц, 1H), 7,10 (d, J=8,4Гц, 1H), 4,39 (квартет АВ, J<sub>AB</sub>=5,2Гц, Δν=23,2Гц, 2H), 3,85 (s, 3H). LR MS (EP позит.) m/z=451 (M+1).

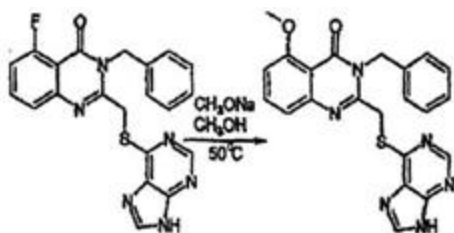
3-(2-хлорфеніл)-5-(2-морфолін-4-ілетиламіно)-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-117)



Суміш D-015 (25мг) та 4-(аміноет-2-1H)-морфоліну (650мг, великий надлишок) перемішували при 50°C протягом 16 годин. Сиру реакційну суміш очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт.

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-ацетон) δ: 8,57 (br s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,72 (dd, J=7,7, 1, 6Гц, 1H), 7,65 (dd, J=8,0, 1,2Гц, 1H), 7,57 (t, J=8,1Гц, 1H), 7,49 (dt, J=7,7, 1,6Гц, 1H), 7,40 (dt, J=7,7, 1,5Гц, 1H), 6,86 (dd, J=7,4Гц, 1H), 6,82 (d, J=8,3Гц, 1H), 4,55 (d, J=15,0Гц, 1H), 4,42 (d, J=15,1Гц, 1H), 4,05-3,90 (m, 4H), 3,90 (t, J=6,9Гц, 2H), 3,75-3,4 (m, 4H), 3,54 (t, J=6,9Гц, 2H). LR MS (EP позит.) m/z=549 (M+1).

3-бензил-8-метокси-2-(9H-пурин-6-ілсульфанілметил)-3H-хіназолін-4-он (d-118)



Суміш D-043 (25мг) у 0,5М NaOMe (2мл у суміші з MeOH; великий надлишок) перемішували при 50°C протягом 16 годин у герметичній колбі. Реакційну суміш обробляли 1Н HCl (1мл) та аліквоти цього розчину (0,5мл кожна) очищали за допомогою ВЕРХ (колонка C18 Luna, 4,6×250мм, 4,7мл/хвилини, 10-75% ацетонітрил/вода протягом 15 хвилин, 100% ацетонітрил протягом 18 хвилин, детектор при 220λ). Прийнятні фракції концентрували у вакуумі, одержавши кінцевий продукт як білу тверду речовину (6,6мг).

<sup>1</sup>H ЯМР (300МГц, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 13,57 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,72 (t, J=8,1Гц, 1H), 7,42-7,30 (m, 2H), 7,30-7,19 (m, 3H), 7,15 (d, J=8,0Гц, 1H), 7,06 (d, J=8,3Гц, 1H), 5,43 (s, 2H), 4,80 (s, 2H), 3,87 (s, 3H). LR MS (ЕР позит.) m/z=431 (M+1).

Сполука D-999 (порівняльна)

3-(2-хлорфеніл)-2-(1Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он

Аналогову сполуку, 3-(2-хлорфеніл)-2-(1Н-піразоло[3,4-d]піримідин-4-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он, також синтезували згідно з описаними способами, за винятком того, що на кінцевому етапі меркаптопурин заміняли 4-меркапто-1Н-піразоло[3,4-d]піримідин.

#### ПРИКЛАДИ

Біохімічні дослідження потужності та селективності РІЗК

А. Біохімічні дослідження, використовуючи 20мкМ АТФ

Використовуючи спосіб, описаний у прикладі 2 вище, сполуки згідно з винаходом тестували стосовно активності та потужності інгібітору проти РІЗКδ та на селективність стосовно РІЗКδ у порівнянні з іншими ізоферментами РІЗК класу І. У таблиці 2, величини ІK<sub>50</sub> (мкМ) надано для РІЗК<sub>α</sub> ("Альфа"), РІЗК<sub>β</sub> ("Бета"), РІЗК<sub>γ</sub> ("Гама") та РІЗК<sub>δ</sub> ("Дельта"). Для ілюстрації селективності сполук надані співвідношення величин ІK<sub>50</sub> дам сполук РВК<sub>α</sub>, РВК<sub>β</sub> та РВК<sub>γ</sub> стосовно РВК<sub>δ</sub>, відповідно, як "співвідношення Альфа/Дельта," "співвідношення Бета/Дельта," та "співвідношення Гама/Дельта."

Початкові дослідження селективності робили ідентично протоколу селективних досліджень у прикладі 2, за винятком використання 100мкл EcosCint для визначення радіомітки. Наступні дослідження селективності робили подібно, використовуючи ті ж самі вихідні розчини 3Х субстрату за винятком того, що вони містили 0,05мКи/мл γ[<sup>32</sup>P]АТФ та 3мМ РІР<sub>2</sub>. Наступні дослідження селективності також використовували ті ж самі вихідні розчини 3Х ферментів, за винятком того, що вони не містили 3нМ будь-якої з даних ізоформ РІЗК.

Для усіх досліджень селективності, тест-сполуки зважували та розчиняли до 10-50мМ вихідних розчинів у 100% ДМСО (залежно від відповідної їм розчинності) та зберігали при -20°C. Сполуки розтоплювали (при кімнатній температурі або 37°C), розбавляли до 300мкМ у воді, від чого робили серії 3-кратних розбавлень у воді. З цих розбавлень 20мкл додавали у комірки для дослідження поруч з чистою водою, яку використовували для контролю з ферментами (позитивного) та контролю без ферменту (фонового). Далі дослідження по суті робили згідно з протоколом дослідження селективності у прикладі 2.

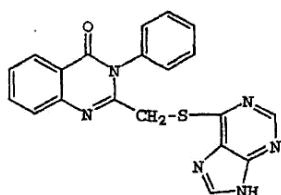
Для випадків, у яких у дослідженні використовували найвищу концентрацію, тобто, 100мкМ, що не інгібувала активність ферменту щонайменше на 50%, таблиця показує процент залишкової активності при цій концентрації (тобто, при 100мкМ); У цих випадках дійсне співвідношення активностей для сполук не можна розраховувати внаслідок відсутності потрібних даних про величини ІK<sub>50</sub> одної сполуки. Однак, для отримання деякого розуміння властивостей цих сполук, розраховати гіпотетичні співвідношення активності, використовуючи дані для 100мкМ замість відсутніх величин. У таких випадках співвідношення селективності фактично повинні бути більшими, ніж гіпотетичні величини, і це визначено використанням символу більше, ніж (>).

Таблиця 2

Сполука	Альфа IK <sub>50</sub>	Бета IK <sub>50</sub>	Дельта IK <sub>50</sub>	Гама IK <sub>50</sub>	Альфа/Дельта Співвідношення	Бета/Дельта Співвідношення	Гама/Дельта Співвідношення
D-000	86%	74%	0,33	7,7	>302	>302	23
D-001	83%	45	68		>1,5	0,66	
D-002	88%	78%	44		>23	>23	
D-003	92	53%	4		22	>24	
D-004	93%	89%	64		>2	>1,6	
D-005	89%	46	0,8		>121	56	
D-006	78%	6	0,15		>652	38	
D-007	82%	30	0,16		>619	188	
D-008	82%	68	1,2		>85	57	
D-009	82	6	0,12		683	50	
D-010	48	11	0,06	0,70	800	183	12
D-011	72%	55	0,10	1,0	>1000	550	10
D-012	69%	11	0,17		>588	65	
D-013	71%	13	0,05	2,1	>2000	260	42

D-014	63%	3,6	0,06	0,56	>1667	60	9,3
D-015	55%	69%	0,21	3,6	>480	>480	17
D-016	91%	81%	40		>2,5	>3	
D-017	89%	108%	12		>8	>8	
D-018	88%	93%	4,2		>24	>24	
D-019	67	105	7		10	15	
D-020	69%	69%	1,9		>53	>53	
D-021	100	110	1,6		62	68	
D-022	81%	110	0,8	40	>125	137,50	50
D-023	83%	91%	26		>4	>3,9	
D-024	100	76%	2,6		38	>38	
D-025	73%	61%	0,11	1,5	>909	>909	14
D-026	68%	54%	0,08	1,7	>1250	>1250	21
D-027	59%	58	0,6		>169	97	
D-028	67%	13	0,18		>556	69	
D-029	49	3,0	0,06		882	54	
D-030	50	5	0,07		758	70	
D-031	74	10	0,12		>833	83	
D-034	19	11	0,15		131	74	
D-035	9	3	0,05		199	65	
D-036	63%	31	0,4		>226	69	
D-037	64%	80	0,8		>125	100	
D-039	77%	66%	0,9	38	>111	>111	42
D-038	77%	63%	0,6	60	>167	>170	100
D-040	77%	64%	1,7		>61	>61	
D-041	67%	65%	4		>25	>25	
D-042	70%	25	3		>32	8	
D-043	83%	77%	2,1		>47'	>47	
D-044	105	61	4,2		25	15	
D-045	98%	74%	7,6		>13	>13	
D-046	64%	95	9		>11	11	
D-047	30	9	0,09	0,5	333	100	5,6
D-048	70	14	0,16		449	90	
D-049	110%	30	1,0		>100	30	
D-050	99%	41	1,6		>63	26	
D-051	89%	57%	3,3		>31	>31	
D-052	0,7	69%	8		0,09	>13	
D-121	69%	70%	0,48		>211	>211	
D-999	105	71%	47	60	2,2	2,1	1,3
LY2940	1,2	0,4	0,23		5,3	1,7	

Сполука D-121 є 3-феніл-2-(9Н-пурин-6-ілсульфанілметил)-3Н-хіназолін-4-он



В. Біохімічні дослідження, використовуючи 200мкМ АТФ

У вищенаведеному розділі А сполуки згідно з винаходом тестували для встановлення їх величин  $IK_{50}$  для інгібування альфа, бета, дельта та гама ізоформ РІЗК, використовуючи 20мкМ АТФ. Наступний скринінг проводили для встановлення величин  $IK_{50}$  для інгібування чотирьох ізоформ РІЗК при кінцевій концентрації 200мкМ АТФ, у 10-разів більшій та по суті близькій до нормальної фізіологічної концентрації АТФ у клітинах. Цей протокол встановлення селективності є ідентичним з описаним вище, за винятком того, що 3Х вихідний розчин АТФ має концентрацію 600мкМ. Дані цього дослідження підсумовані у таблиці 3, нижче. Спостережена чутливість до концентрації АТФ свідчить, що ці сполуки інгібітору РВКδ діють як конкуренти АТФ.

Таблиця 3

Сполука	Альфа $IK_{50}$	Бета $IK_{50}$	Дельта $IK_{50}$	Гама $IK_{50}$	Альфа/Дельта Співвідношення	Бета/Дельта Співвідношення	Гама/Дельта Співвідношення
D-000	91±1%	84±2	2±1	35±35	91	84	18
D-005	104%	82%	11	91%	20	Є	17
D-006	104±1%	44±5	0,92±0,1	87±33	226	48	95

D-007	92±11%	72±12	0,73±0,2	88±4	252	99	121
D-009	70%	18	0,7	53	200	26	76
D-010	74±18%	33±4	0,23±0,2	6±3	658	144	27
D-011	88±4%	105±3	0,25±0,2	61±70	700	420	244
D-012	70±4%	108±4	1,3±0,4	50±0	107	83	38
D-013	117±8%	73±24	0,51±0,6	12±1	461	289	24
D-014	100±6%	13±0	0,5±0,4	5±3	398	26	10
D-015	95±22%	81±3	1,1±0,5	83±37%	180	154	160
D-019	100%	100	30	33	7	3	1
D-022	88%	101%	4,2	60%	42	48	29
D-025	89±11%	77±6	0,32±0,3	7,8±3	556	478	24
D-026	83±1%	77±8	0,38±0,2	13±10	443	411	34
D-027	74%	110	4	60	37	28	15
D-028	100%	81%	1,6	29	125	101	18
D-029	110±12	34±4	0,34±0,08	13±0,7	653	101	37
D-030	95±11	80±14	0,53±0,005	31±10	362	152	59
D-031	87±10	137±2	0,2±0,01	155±60	903	707	802
D-034	92±11	103±4	1,2±0,3	34±1	153	85	28
D-035	95±6	34±6	0,49±0,	6,8±1	193	69	14
D-036	99%	73%	4,1	72	48	36	18
D-037	112%	58%	3,5	45	64	33	13
D-038	69%	74%	1,8	55	77	82	31
D-039	85%	65%	2,6	57%	65	50	4-4
D-047	81%	30	0,2	4,5	810	150	23
D-048	90±57	95±7	1,4±0,9	123±40	67	70	91
D-121	71%	62%	0,9	61%	158	138	136
D-999	62%	71%	75	90	2	2	1
LY29400	23±5	3,7±2	2,1±1,5	29±13	11	2	13

#### ПРИКЛАД 12

Дані дослідження на основі клітин для інгібіторної активності РРКδ

Використовуючи способи, описані вище у прикладах 3-5, сполуки згідно з винаходом тестували стосовно їх інгібувальної активності та потужності у дослідженнях стимульованої В та Т-клітинами проліферації, міграції нейтрофілів (PMN) та вивільнення нейтрофілами (PMN) еластази. Дані цього дослідження представлені нижче у таблиці 4. У таблиці 4 показані величини є ефективними концентраціями сполук ( $EC_{50}$ ; мкМ). При відсутності величини дослідження не проводили.

Таблиця 4

Сполука	Стимуляція BCR миші (ЕК <sub>50</sub> )	Стимуляція TCE миші	Еластаза PMN людини (ЕК <sub>50</sub> )	Міграція PMN людини (ЕК <sub>50</sub> )
D-000	0,9±0,4	5,5±4	2,2±2	1-5
D-003	3,9	5,7		
D-005	0,7±0,1	3,9	4,3±1	
D-006	0,2±0,1	5,3	0,3±0,1	
D-007	0,3±0,1	4,2	0,4	
D-008	1,0			
D-009	0,3±0,2		10,5	
D-010	0,2±0,1		0,3±0,3	
D-011	0,3±0,1		0,9±0,7	
D-012	0,3±0,2		0,3	
D-013	1,4			
D-014	0,2±0,1	4,3		
D-015	1,2±0,2	1,8	1,3±0,4	2,0
D-019	0,9±0,01	0,9		
D-021	1,8	3,5		
D-022	1,8	2,3		
D-024			2,9	
D-025	0,3±0,1	4,4±0,6	0,3±0,2	0,3±0,3
D-026	0,3±0,1	3,5	0,2±0,2	0,3±0,3
D-027	>2		2	
D-028	0,4±0,2		1	
D-029	0,1±0,03	3,4±2	0,5±0,6	0,3
D-030	0,1±0,1	6	0,4±0,5	0,2
D-031	0,2±0,1		0,7±0,1	
D-034	0,6±0,4			
D-035	0,2±0,1	2,9±0,7	0,3±0,1	
D-036	0,9±0,04	4,1	5,5±5	0,2
D-037	1,2±0,4		1,3±0,4	2,0
D-038	1,4±0,1	2,9	5	
D-039	0,9±0,1		5	
D-043	1,4	2,6		
D-045			9,0	
D-047	0,3±0,1		0,5±0,2	
D-048	0,4±0,2	5	0,9±0,2	
D-049	2,0	6,3	5,0	
D-121	1,4			
D-999	3,1±0,7	5,9	>20	1
LY29	0,9±0,5			

## ПРИКЛАД 13

Дослідження активності інгібіторів РВКδ у ракових клітинах

Дію сполук згідно з винаходом на проліферацію ракових клітин оцінювали тестуванням одної зі сполук проти, ліній клітин панелі хронічної мієлоїдної лейкемії (СМЛ), включаючи KU812, RWLeu4, K562 та MEG-01.

Інгібувальну активність сполуки (d-000, розчин у ДМСО) визначали таким чином. Тестовану сполуку додавали у серії концентрацій (0,001-20мкМ) на 96-коміркові мікротитрувальні планшети з клітинами (1000-5000 клітин/комірку). Планшети інкубували протягом п'яти діб при 37°C, протягом яких контрольні культури без тест-сполук були здатними до щонайменше двох циклів поділу клітин. Клітинний ріст вимірювали поглинанням [<sup>3</sup>H]-тимідину протягом 18 години, доданого на третю, четверту та п'яту доби. Клітини переносили до фільтру, промивали та підраховували радіоактивність, використовуючи бета-лічильник Matrix 96 (Packard). Процент росту клітин вимірювали таким чином:

(середній підрахунок інкубованих клітин

% Клітинного росту=при даній концентрації інгібітору) ×100

(середній підрахунок клітин без інгібітору)

Величини ЕК<sub>50</sub> у цих експериментах визначали за концентрацією тест-сполуки, що дає підрахунок радіоактивності, що на 50% нижча отримуваної, використовуючи контроль без інгібітору. Сполука D-000 виявляла активність інгібітору з ЕК<sub>50</sub> приблизно 2мкМ для ліній KU812 та RWLeu4. Сполука, як знайдено, не виявляла впливу на лінії K562 та MEG-01.

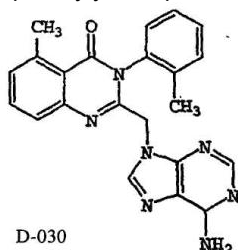
Інгібітори РІКδ згідно з винаходом, як знайдено, виявляли інгібування росту клітин СМЛ, а тому могли б бути корисними у лікуванні доброякісних або злоякісних пухлин. Експресію РВКδ в поточний час продемонстровано головним чином у клітинах гематопоетичного походження. Однак, вона могла б бути наявною у широкій різноманітності проліферуючих клітин. Тому сполуки згідно з винаходом могли б бути використовуваними для індукції регресії пухлин та для попередження утворення пухлинного метастазу при лейкемії та твердій пухлині або при проліферації не пухлинного походження. При додаванні сполуки можна

було б використовувати поодиночі та у комбінації з іншими фармакологічно активними сполуками або у комбінації з радіацією як сенситивізуючий засіб.

#### ПРИКЛАД 14

Вимір екзоцитозу еластази при промивці повітряних карманів миші

Дію D-030 на притік лейкоцитів та екзоцитоз нейтрофільної еластази тестували у тваринних моделях. Шести добова модель повітряних карманів є моделлю запалення *in vivo*, що гістологічно має схожість з синовітом суглобів. Розвивається підкладка зі сформованих моноклеарних клітин та фібробластів, що має близьку схожість з синовіальною порожниною. Модель репрезентує "гостру" модель хронічної хвороби (наприклад, ревматоїдного артриту). Ця модель дає змогу для оцінки *in vivo* засобів блокування клітинного притоку у повітряний карман під впливом запального стимулюючого чинника.



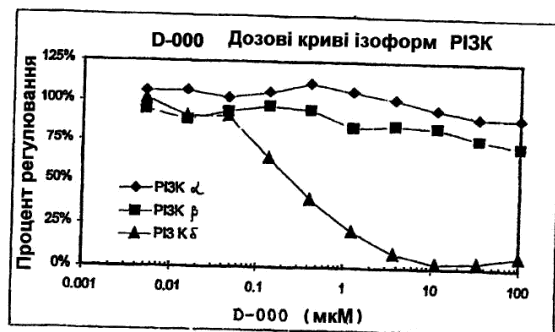
Тест проводили таким чином: на добу нуль групи щурів голили та ін'єктували підшкірно 10мл повітря у бік кожного, утворюючи карман. На третю добу 10мл повітря ін'єктували повторно. За шість годин до контрольного зараження TNF на добу шість, одна група щурів (n=6) отримувала D-030 (100мг/кг у середовищі ПЕГ 400) перорально, а друга група (n=12) отримувала тільки середовище перорально. Через шість годин після отримання дози повітряні кармани обох групи отримували 2,5нг TNF. Через дванадцять

годин після отримання дози, кармани промивали фізіологічним розчином та утворену промивальну рідину аналізували стосовно числа лейкоцитів та активності нейтрофільної еластази. На додаток, відбирали кров для визначення рівнів D-030 у циркуляційній крові. Результати були такими: щури, що отримували D-030 протягом дванадцяти годин, мали в середньому 8,7мкМ сполуки у циркуляційній крові та мали 82% зменшення загальних лейкоцитів у промивальній рідині у порівнянні з контролем середовищем. Зменшення конкретних підрахунків лейкоцитів було таким: нейтрофіли (90%), еозинофіли (66%) та лімфоцити (70%). Кількісне визначення нейтрофільної еластази виявило, що оброблені D-030 щури мали рівні еластази, що були дещо зменшеними (15%) у порівнянні з контролем середовищем. У другому тесті, площину боку миші голили, використовуючи ножиці та утворювали повітряний карман ін'єктуванням 3мл повітря підшкірно. На третю добу ін'єкцію повітря повторювали. На шосту добу, тварини дозували D-030 (32мг/кг у LABRAFIL®) або тільки LABRAFIL® за одну годину перед контрольним зараженням та дві години після контрольного зараження TNFα (0,5нг у 1мл PBS), або тільки PBS. PBS представляє буферований фосфатом фізіологічний розчин. Чотири години після контрольного зараження TNF, тварин анестезували та кармани промивали 2мл 0,9% фізіологічного розчину з 2мМ EDTA. Промивні рідини центрифугували при 14000об/хвил. у мікроцентрифугі. П'ятдесят мікролітрів надосадкового шару рідини використовували для вимірювання екзоцитозу еластази способом, описаним вище.

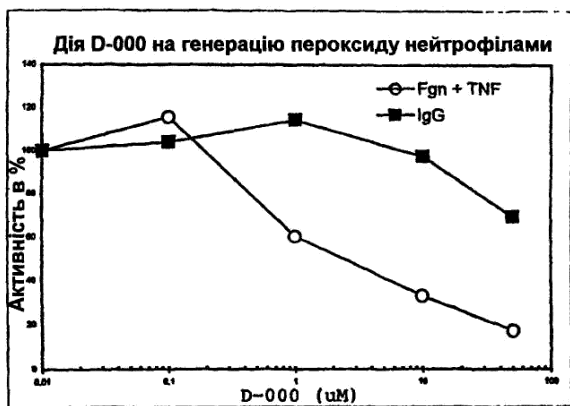
Як показано у Фіг.9, контрольне зараження TNF індувало високі рівні екзоцитозу еластази у порівнянні з тваринами з контрольним зараженням PBS. Однак, коли тварин з контрольним зараженням PBS обробляли D-030, спостерігали значне зменшення активності еластази у промивках повітряних карманів.

Усі публікації та патентні документи, цитовані в цьому описі представлено як довідкові стосовно усього, що вони розкривають.

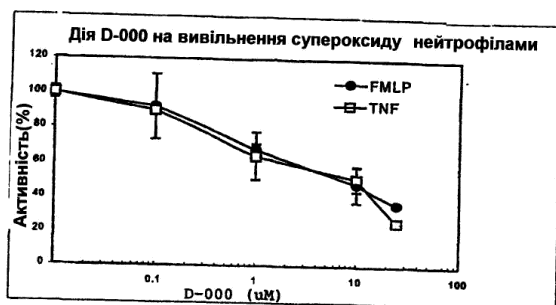
При тому, що представлений винахід описано з певними посиланнями на деякі кращі втілення для ясності та розуміння, фахівцю потрібно розуміти, що в рамках винаходу можна практикувати наступні зміни та модифікації, як це визначено у наведеній нижче формулі винаходу. Відповідно, жодних інших обмежень не слід використовувати стосовно винаходу, ніж тих, що конкретно наведено у формулі винаходу.



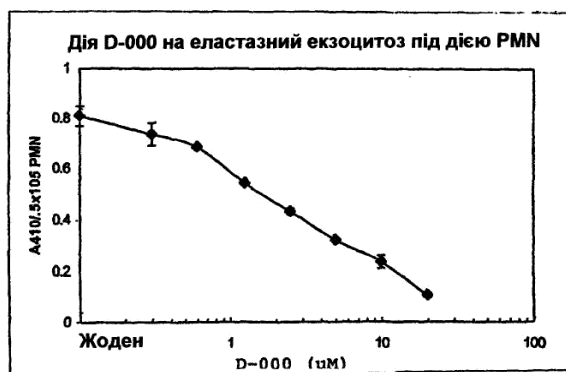
**ФІГ.1**



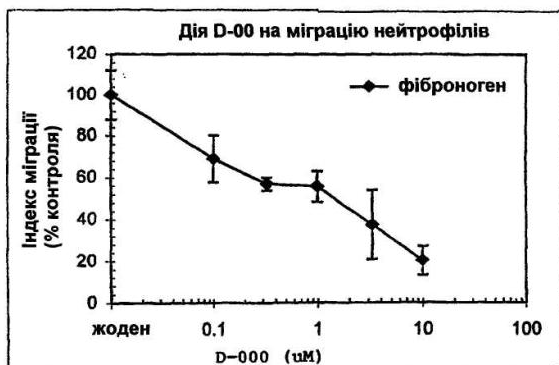
ФІГ.2



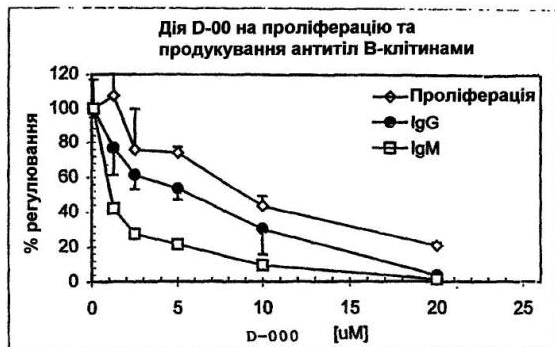
ФІГ.3



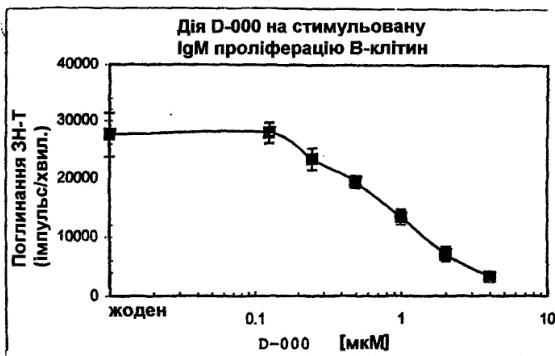
ФІГ.4



ФІГ.5



ФІГ.7



ФІГ.8

